UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

KELIANI BORDIN

**Avaliação de biomarcadores da exposição humana à fumonisina B₁
nos alimentos em municípios dos estados de São Paulo e Santa
Catarina, Brasil**

Pirassununga

2015

KELIANI BORDIN

**Avaliação de biomarcadores da exposição humana à fumonisina B₁
nos alimentos em municípios dos estados de São Paulo e Santa
Catarina, Brasil**

VERSÃO CORRIGIDA

Tese apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Ciências da Engenharia de Alimentos.

Área de Concentração: Ciências da Engenharia de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Augusto Fernandes de Oliveira

Pirassununga

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

Serviço de Biblioteca e Informação da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da
Universidade de São Paulo

B729a Bordin, Keliani
Avaliação de biomarcadores da exposição humana à
fumonisina B₁ nos alimentos em municípios dos estados de
São Paulo e Santa Catarina, Brasil / Keliani Bordin. --
Pirassununga, 2015.
151 f.
Tese (Doutorado) -- Faculdade de Zootecnia e
Engenharia de Alimentos - Universidade de São Paulo.
Departamento de Engenharia de Alimentos.
Área de Concentração: Ciências da Engenharia de
Alimentos.
Orientador: Prof. Dr. Carlos Augusto Fernandes de
Oliveira.

1. FB₁ 2. Esfingolipídeos 3. Milho e derivados 4. Soro
5. Urina 6. Cabelo 7. Análise. I. Título.

*Dedico este trabalho à minha Mãe, Pai e minha Nona
... minha família, meu tesouro, meu conforto,
onde me fortaleço e
me ergo para as batalhas e desafios da vida!
Obrigada por existirem!*

AGRADECIMENTOS

No decorrer da pesquisa uma rede de amigos e colaboradores contribuiu à sua maneira para a concretização desta Tese, aos quais gostaria de citar como testemunho do meu mais profundo agradecimento.

Em primeiro lugar agradeço a Deus por permitir a culminação deste trabalho e assim dar mais um passo na minha formação acadêmica.

Aos voluntários da pesquisa que dispuseram a colaborar com a pesquisa em todo esse período, sem vocês nada disso teria acontecido.

Ao professor Carlos Augusto Fernandes de Oliveira, por sua orientação através de incontáveis e valiosas discussões e intervenções construtivas, além do seu apoio e incentivo ao longo da pesquisa. Meus sinceros agradecimentos.

Ao Dr. George por toda ajuda e amizade (*To doctor George Rotthinghaus who was abundantly helpful and offered invaluable assistance, support and guidance. George is someone you will instantly love and never forget once you meet him. He has the biggest heart that I know, thank you for all!*)

Ao professor Carlos Corassin, que além de orientar, sempre foi um amigo, incentivando e aconselhando sempre preocupado em me mostrar o melhor caminho a seguir.

A Roice, pela ajuda, paciência e empenho em solucionar os diversos problemas que surgiram em todos esses anos, é maravilhoso trabalhar com você.

Aos estagiários que foram essenciais para a realização da pesquisa especialmente Gabriela Zambelli, Matheus Tres e Viviane Vieira. Por todo esforço e dedicação, esse mérito também é de vocês, muito obrigada por tudo, sem vocês não seria possível a concretização desse trabalho. Além de outros que, menos tempo, mas foram essenciais para o desenvolvimento do trabalho: Marina, Natalia, Aline, Esteban, Felipe, Victor, André, Pamela, Ana Laura, Jessica.

A Alessandra por desvendar o mistério do massas, e também pela ajuda na validação dos métodos.

Aos colegas de laboratório, os atuais e os que já fecharam seu ciclo: Sara, Estela, especialmente a Bruna, Agata, Sara, Laura, Fernanda e Daiane. Polly e Mayra minhas companheiras inseparáveis, e meu porto seguro que quero carregar para sempre comigo, obrigada por toda ajuda e amizade. A Diane que me acompanhou desde o começo, sempre parceira me ajudando e me alegrando cada dia. Vocês todas que tornam esse mundinho o mais agradável, muito obrigada pela paciência e cooperação!

A Carol pelos ensinamentos, dicas, dedicação, conselhos e amizade que espero cultivar para sempre.

Aos queridos amigos e colegas de Columbia/ MO/EUA obrigada por toda ajuda e incentivo (*To my friends and colleges from University of Missouri by the support in my analysis and my dear friends from Columbia*).

Aos funcionários da UBAS, especialmente ao Geraldo e Fabiana que auxiliaram na realização das coletas de sangue.

A Prefeitura do Campus da USP e a Prefeitura Municipal de Erval Velho por todo o suporte concedido.

Meus sinceros agradecimentos também a todos os integrantes da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, especialmente os funcionários, membros da seção de pós graduação e professores.

A dona Lurdes, Severino e demais funcionários que auxiliaram na limpeza, sempre com alegria e amizade.

A seção de segurança pelos funcionários sempre prestativos e dispostos a ajudar a qualquer hora, muito obrigada!

Meus queridos amigos especialmente Camila e Debora que me aguentaram nos piores dias, sempre me apoiando e me incentivando.

A todos os meus amigos e colegas que fizeram parte e participaram desse caminho especialmente a Samara, Nilva, Hilton, Amanda, Wissem e Vini, distante fisicamente mas sempre próximos, me apoiando e dando forças em todos os momentos. Ao José pela paciência e companheirismo, e apesar do tempo, foram fundamentais nesse período. Aos amigos que me apóiam e estão sempre do meu lado, especialmente a Naty, Roney, Eliane, Tiago, Daniel, Bruna, Paola, Vitor, Miriam, Taise e Adja enfim todos os amigos e colegas que fizeram parte dessa jornada.

Ao professor Gilmar, que merece além do meu agradecimento especial, toda a minha admiração pois mostrou-me o verdadeiro caminho de um pesquisador.

A toda a minha família que vibrou comigo com as descobertas e conquistas e me socorreu nos momentos de angústia. Meu irmão e cunhada, Gean e Sabrina pela paciência e amizade, assim como toda minha família, especialmente a minha amada Nona, demais avós, tias, primas e primos.

À minha base: meu pai Claudemir, minha mãe Neila que me incentivaram em todos os momentos nessa jornada, minha fonte inspiradora e minha riqueza, que me fazem acreditar e conservar meus princípios. Obrigada por tudo.

À Fapesp, pela bolsa e auxílio financeiro concedido.

Há muito mais a quem agradecer... A todos aqueles que, embora não nomeados, me brindaram com seus inestimáveis apoios em distintos momentos e por suas presenças afetivas, o meu reconhecido e carinhoso muito obrigada!

"Quando morremos, nada pode ser levado conosco, com a exceção das sementes lançadas por nosso trabalho e do nosso conhecimento."

[Dalai Lama]

"O sucesso é o resultado do esforço e o esforço nos torna fortes"

(La réussite est au bout de l'effort et l'effort fait les forts)

Provérbio africano.

RESUMO

BORDIN, K. **Avaliação de Biomarcadores da Exposição Humana à Fumonisina B₁ nos Alimentos em Municípios dos Estados de São Paulo e Santa Catarina, Brasil, 2015.** Tese (Doutorado)- Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2015.

A fumonisina B₁ (FB₁) é uma micotoxina produzida pelo metabolismo secundário de espécies de *Fusarium*, principalmente *F. verticillioides* e *F. proliferatum*, os quais contaminam diversos alimentos antes e após o processamento, sobretudo o milho e derivados, gerando graves problemas para a Saúde Pública e a qualidade dos alimentos. O objetivo deste trabalho foi avaliar a exposição humana à FB₁ presente nos alimentos através da estimativa de ingestão da toxina na dieta e da análise de diferentes biomarcadores presentes em amostras de sangue, urina e cabelo. Além disso, foram investigados os efeitos da toxina através da avaliação de ácido fólico presentes em alimentos e em soro, e os níveis de uréia e creatinina presentes em soro. O estudo foi realizado em dois municípios dos Estados de São Paulo e Santa Catarina, cujos respectivos voluntários foram categorizados como de baixo consumo de derivados de milho (Grupo A, voluntários de Pirassununga/SP) e de alto consumo de derivados de milho (Grupo B, voluntários de Erval Velho/SC). As amostras de alimentos do Grupo A (Pirassununga/SP) foram fornecidas pelos voluntários (n=100) nos meses de Junho/2011, Setembro/2011, Dezembro/2011 e Março/2012. Os voluntários do Grupo B (Erval Velho/SC) (n=20) forneceram amostras de alimentos no mês de Abril/2012. Em cada grupo, uma lista com 20 alimentos à base de milho foi entregue aos voluntários, para fornecimento de amostras daqueles disponíveis em suas respectivas residências em cada mês de amostragem, totalizando 122 amostras de derivados de milho no Grupo A e 17 amostras no Grupo B coletadas durante o estudo. Adicionalmente, aplicou-se um Questionário de Frequência Alimentar (QFA) e um Inquérito Recordatório de 24 horas (QIR - 24 h) no momento das coletas de amostras. Em cada mês de amostragem de alimentos, foram coletadas amostras de sangue, urina (somente Grupo A) e cabelo dos voluntários, sendo as amostras armazenadas a -20°C (urina e cabelo) ou -80°C (sangue) até o momento das análises. As amostras de alimentos foram submetidas à análise de FB₁, sendo que as de farinha de milho foram também analisadas quanto ao teor de ácido fólico. Ambas as análises foram feitas através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Em soro, foram avaliadas a relação esfinganina/esfingosina (Sa/So), resíduos de FB₁, ácido fólico, uréia e creatinina. Em urina, foram analisados os níveis de FB₁, creatinina para correção do volume urinário e a relação Sa/So. Em cabelo, foram analisados os resíduos de FB₁ através de CLAE acoplada à espectrometria de massas. Todos os métodos de análise foram submetidos a procedimento de otimização e validação intra-laboratorial. A incidência

de FB₁ nos alimentos foi, em média, 72% (n=122) nas amostras do Grupo A (Pirassununga/SP) e 35% (n=17) no Grupo B (Eral Velho/SC). Os maiores níveis foram encontrados em amostras de pipoca provenientes do Grupo B, com uma amostra excedendo o limite de tolerância estabelecido no Brasil (2,500 µg kg⁻¹). A ingestão diária provável média (IDP_M) de FB₁ no Grupo A foi de 63,3 ng kg⁻¹ peso corpóreo (p.c.) dia⁻¹, que corresponde a 3,1% da ingestão provisória máxima tolerável (IPMT) recomendada para fumonisinas (2.000 ng kg⁻¹ p.c. dia⁻¹). A IDP_M do Grupo B apresentou uma média de 190,1 ng kg⁻¹ p.c. dia⁻¹ o que corresponde a 9,5% da IDMT. As concentrações de ácido fólico nas amostras de farinha de milho variaram de < 0,3 µg kg⁻¹ (limite de quantificação do método) a 1.705 µg kg⁻¹, com média de 713 ± 435 µg kg⁻¹. Somente uma amostra apresentou nível de ácido fólico acima do valor mínimo estabelecido pela ANVISA. Em urina, a incidência de FB₁ foi de 33,4% (n=251), com níveis médios de 3,19 ± 3,15 ng mg⁻¹ de creatinina. Não houve correlação (P>0,05) entre as concentrações de FB₁ na urina e nos alimentos. Os níveis de esfinganina foram mais elevados em mulheres, com 25,0% (n=116) de amostras positivas, em comparação à urina de homens, 10,4% (n=96). A relação Sa/So apresentou em média 0,91, 0,77 e 0,89 para urina de mulheres, homens e em combinação, respectivamente. Em soro, os níveis de esfingosina foram em média 2,48 ng mL⁻¹ para o Grupo A e 5,01 ng mL⁻¹ para o Grupo B. A relação Sa/So variou de 0,06 a 3,19 com média de 0,79 para o Grupo A e 0,78 para o Grupo B. Embora tenha havido correlação positiva (r=0,574, P<0,05) entre a relação Sa/So no soro e os dados de consumo de milho e derivados obtidos no QIR-24 h, não foram observadas correlações (P>0,05) entre a ingestão de FB₁ e a relação Sa/So na urina ou soro. A concentração de ácido fólico no soro variou de 6,7 a 24,0 ng mL⁻¹ (média de 13,4 ± 5,4 ng mL⁻¹), com ambos os grupos (A e B) apresentando resultados dentro dos valores de referências. Não foram observados níveis detectáveis de FB₁ nas amostras de soro. No entanto, FB₁ foi detectada em 4 amostras de cabelo humano (7,2%) dos Grupos A e B, cuja concentração média foi de 21,3 ± 12,1 ng g⁻¹. Em síntese, os resultados obtidos nas análises de biomarcadores de FB₁ no presente trabalho estão de acordo com os valores de IDP_M encontrados, indicando que a exposição à FB₁ nas populações estudadas não representa um risco a saúde.

Palavras chave: FB₁, Esfingolipídeos, Milho e Derivados, Soro, Urina, Cabelo, Análise.

ABSTRACT

BORDIN, K. **Evaluation of Biomarkers of Human Exposure to Dietary Fumonisin B₁ in Cities from São Paulo and Santa Catarina States, Brazil. 2015.** Thesis (PhD) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2015.

Fumonisin B₁ (FB₁) is a mycotoxin produced by the secondary metabolism of *Fusarium* species, mainly *F. verticillioides* and *F. proliferatum*, which contaminates foods before and after processing and causes serious problems to public health and food quality. The aim of this study was to evaluate the human exposure to FB₁ in food by means of estimated intake of toxin in the diet, and analysis of different biomarkers in serum, urine and hair. In addition, folic acid in food and blood as well urea and creatinin in serum were investigated to evaluate the toxin effects. The study was conducted in two cities of São Paulo and Santa Catarina States, where the respective volunteers were categorized as low-consumers of corn products (Group A, volunteers from Pirassununga/SP) and high-consumers of corn products (Group B, volunteers from Erval Velho/SC). Food samples from Group A (Pirassununga/SP) were provided by volunteers (n=100) in June/2011, September/2011, December/2011 and March/2012. The volunteers from Group B (Erval Velho/SC) (n=20) provided food samples in April/2012. In each group, a list of 20 corn products was given to volunteers, to allow them to check and collect the food items available in their homes at each sampling time. The total number of samples of corn products provided by the volunteers were 122 and 17 in Group A and Group B, respectively. Additionally, a Food Frequency Questionnaire (FFQ) and a 24-Hours Dietary Recall Questionnaire (24h-DRQ) were applied by the time of sample collections. In each month of food samples collection, samples of blood, urine (only Group A) and hair from the volunteers were collected and storage at -20°C (urine and hair) or -80°C (blood) until analysis. Food samples were submitted to determination of FB₁, and corn meal samples were also evaluated for folic acid levels. Both analysis were performed by high performance liquid chromatography (HPLC). In serum, analyses included sphinganine/sphingosine ratio (Sa/So), FB₁ residue, folic acid, urea and creatinine. In urine, the levels of FB₁, creatinine to correct urinary volume and Sa/So ratio were evaluated. In hair, FB₁ residues were analysed by HPLC coupled to mass spectrometry. All the analytical methods were submitted to optimization and intra-laboratorial validation procedures. The mean incidences of FB₁ in corn products were 72% (n=122) in samples of Group A (Pirassununga/SP), and 35% (n=17) of Group B (Erval Velho/SC). The higher levels were found in popcorn from Group B, with one sample exceeding the tolerance limit established in Brazil (2,500 µg kg⁻¹). The mean probable daily intake (PDI_M) of FB₁ in Group A was 63.3 ng kg⁻¹ body weigh (b.w.) day⁻¹, which corresponds

to 3.1% of provisional maximum tolerable intake (PMTDI) recommended for fumonisins ($2,000 \text{ ng kg}^{-1} \text{ b.w. day}^{-1}$). PDI_M of Group B was $190.1 \text{ ng kg}^{-1} \text{ b.w. day}^{-1}$, which represents 9.5% of PMTDI. Folic acid levels in corn meal ranged from $< 0,3 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$ (quantification limit) to $1.705 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$, with a mean of $713 \pm 435 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$. Only one sample had levels of folic acid above the minimum established by ANVISA. In urine, the incidence of FB_1 was 33,4% ($n=251$), at mean levels of $3,19 \pm 3,15 \text{ ng mg}^{-1}$ of creatinine. There wasn't correlation ($P>0.05$) between concentrations of FB_1 in urine and foods. Sphinganine levels were higher in woman, with 25.0% ($n=116$) of positive samples in comparison to urine of men, 10.4% ($n=96$). The mean Sa/So ratios were 0.91, 0.77 and 0.89 for urine of women, men and in combination, respectively. In serum, sphingosine presented a mean of 2.48 ng mL^{-1} to Group A and 5.01 ng mL^{-1} to Group B. Sa/So ratio ranged from 0.06 to 3.19 with a mean of 0.79 to Group A and 0.78 to Group B. Although a positive correlation ($r=0.574$, $P<0.05$) was found between Sa/So ratio in serum and corn consumption data obtained by 24h-DRQ, no correlation was observed ($P>0,05$) with FB_1 intake and Sa/So ratio in urine or serum. Folic acid concentration in serum ranged from 6.7 to 24.0 ng mL^{-1} (mean of $13.4 \pm 5.4 \text{ ng mL}^{-1}$), with both groups (A and B) presenting levels within the reference values. There were no detectable levels of FB_1 in serum samples. However, FB_1 was detected in 4 human hair samples (7.2%) of Groups A and B, at a mean concentration was $21.3 \pm 12.1 \text{ ng g}^{-1}$. In summary, the results obtained in the analyses of FB_1 biomarkers in the present study are in agreement with the PDI_M values found, hence indicating that FB_1 exposure in the populations studied do not represent a health concern.

Keywords: FB_1 , Sphingolipids, Corn and byproducts, Serum, Urine, Hair, Analysis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Estrutura química das fumonisinas.	24
Figura 2 - Estrutura química da Esfinganina, Esfingosina e Fumonisina B ₁ .	26
Figura 3 - Via biossintética dos esfingolipídeos e via de degradação ilustrando a interferência pela FB ₁ .	27
Figura 4 - Mecanismo de interrupção do metabolismo e transporte de folato proposto para fumonisinas.	31
Figura 5 - Reação de derivatização de fumonisinas com OPA.	42
Figura 6 - Síntese sequencial das atividades executadas no experimento.	45
Figura 7 - Localização e principais características das cidades de Pirassununga (SP) e Erval Velho (SC).	47
Figura 8 - Coleta de sangue venoso.	50
Figura 9 - Procedimento para preparo da amostra para injeção em CLAE para FB ₁ em derivados de milho.	55
Figura 10 - Procedimento de análise de creatinina em urina.	57
Figura 11 - Marcha analítica para determinação de FB ₁ em amostras de urina.	58
Figura 12 - Procedimento para preparo da amostra para quantificação de Sa/ So em urina.	60
Figura 13 - Procedimento de análise de FB ₁ em soro.	63
Figura 14 – Marcha analítica para determinação de Sa/So em amostras de soro.	65
Figura 15 – Fluxograma de análise de FB ₁ em cabelo.	67
Figura 16 - Cromatograma de amostra de pipoca contaminada com 100 µg kg ⁻¹ de FB ₁ (LQ).	75
Figura 17-Cromatograma amostra de polenta contaminada no nível de 100 µg kg ⁻¹ de FB ₁ (LQ).	75
Figura 18 - Curva padrão utilizada para avaliação de FB ₁ em urina.	80
Figura 19 - Cromatograma de amostra de urina sem contaminação.	82
Figura 20 - Cromatograma do padrão de FB ₁ na concentração de 125 ng mL ⁻¹ diluída em fase móvel.	82
Figura 21 - Cromatograma obtido através de amostra de urina contaminada com 3,6 ng mL ⁻¹ .	82

Figura 22 - Número de indivíduos com contaminação média de FB ₁ em urina.	84
Figura 23 - Curva padrão utilizada para avaliação de FB ₁ em urina.	85
Figura 24 - Cromatograma de determinação de Sa e So em amostra de urina.	87
Figura 25 - Curva padrão utilizada para avaliação de FB ₁ em soro.	90
Figura 26 – Cromatograma de SIM de amostra em branco (adição de 13C34 – FB1 na concentração de 1.600 pg mL ⁻¹ , seguida de fortificação do extrato com padrões fumonisinas B ₁ e B ₂ nas concentrações de 800 pg mL ⁻¹ .	91
Figura 27 - Cromatograma obtido através de branco realizado sem adição de amostra.	93
Figura 28 - Cromatograma obtido através de amostra de soro sem níveis quantificáveis de Sa e So.	93
Figura 29 - Cromatograma obtido através de padrão de Sa e So na concentração de 40 ng mL ⁻¹ preparados com extrato de soro	93
Figura 30 - Curvas padrões utilizadas para avaliação de esfingosina (a) e esfinganina (b) preparadas com extrato de soro e solvente.	94
Figura 31 - Espectro de TIC obtido para FB ₁ .	100
Figura 32 - Cromatograma de monitoramento seletivo de íons de cabelo humano contaminado com FB ₁ .	101
Figura 33 – Níveis de FB ₁ em amostras de cabelo individuais de Pirassununga e Erval Velho, Brasil, e a respectiva estimativa de ingestão diária (ID) de fumonisina B ₁	101

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Ocorrência de FB ₁ em produtos destinados ao consumo humano em alguns países nos últimos 10 anos.....	34
Tabela 2 - Ocorrência de FB ₁ em milho e derivados destinados ao consumo humano no Brasil nos últimos 10 anos.	35
Tabela 3 - Ingestão de FB ₁ em alimentos destinados ao consumo humano analisados em diferentes regiões do mundo.....	37
Tabela 4 – Estudos realizados utilizando a relação entre Esfinganina (Sa), Esfingosina (So) e a relação Sa/So como biomarcadores de fumonisina em seres humanos.	41
Tabela 5 – Períodos abordados nas 4 diferentes coletas realizadas no Grupo A e características climáticas compreendidas.	46
Tabela 6 - Dados antropométricos médios (variação) declarados pelos voluntários homens e mulheres avaliados no questionário aplicado nos Grupos A (Pirassununga) e Grupo B (Erval Velho).	47
Tabela 7 – Número de amostras de alimentos coletadas nas 4 coletas do Grupo A (Pirassununga) e na coleta realizada no Grupo B (Erval Velho).	48
Tabela 8 - Número de amostras de material biológico (sangue, urina e cabelo) coletadas no Grupo B e nos diferentes períodos de coleta (Coletas A, B, C e D) no Grupo A	49
Tabela 9 - Parâmetros utilizados nas quantificações de fumonisinas em soro por LC-MS/MS.	64
Tabela 10- Número de indivíduos pertencentes aos Grupo A e Grupo B que informaram o consumo médio de milho e derivados no dia anterior (24 horas anteriores) as coletas de material biológico.....	69
Tabela 11 – Consumo médio mensal de derivados de milho (g mês ⁻¹ hab ⁻¹) por voluntário declarado através do QFA obtidos nos Grupos A (Pirassununga) e B (Erval Velho).....	70
Tabela 12 – Número de indivíduos dos Grupos A e B que descreveram através do QFA o local onde geralmente fazem suas refeições.	71
Tabela 13 – Número de indivíduos que descreveram a origem dos alimentos fornecidos pelos voluntários e a frequência de compra em cada local.	72
Tabela 14 - Recuperação de fumonisina B ₁ em amostras fortificadas em produtos a base de milho.....	73
Tabela 15 - Níveis de fumonisina B ₁ em amostras coletadas das residências de voluntários.	74
Tabela 16 - Ingestão diária provável (IDP) de fumonisina B ₁ estimada para os voluntários pertencentes aos Grupos A e B.	76
Tabela 17 - Níveis ácido fólico em amostras de farinha de milho avaliadas.	78

Tabela 18 - Análise de creatinina na urina em homens e mulheres avaliados em diferentes coletas.	79
Tabela 19 - Recuperações obtidas através da do método de determinação de FB ₁ em urina.	81
Tabela 20 - Resultados obtidos de FB ₁ em urina nos indivíduos avaliados nas diferentes coletas.	83
Tabela 21 - Validação do método otimizado para determinação de esfinganina (Sa) e Esfingosina (So) em urina.....	85
Tabela 22 - Recuperações obtidas com o método de detecção de esfinganina (Sa) e esfingosina (So) em urina de homens e mulheres.	86
Tabela 23 - Análise de Esfinganina (Sa), Esfingosina (So) e relação Sa/So em urina de seres humanos.	88
Tabela 24- Recuperações obtidas com o método de detecção de FB ₁ em soro humano.....	90
Tabela 25 - Recuperações obtidas com o método de detecção de esfinganina e esfingosina em soro.....	92
Tabela 26 - Análise de Esfinganina (Sa), Esfingosina (So) e relação Sa/So em urina de seres humanos no Grupo A.	95
Tabela 27- Análise de Esfinganina (Sa), Esfingosina (So) e relação Sa/So em urina de seres humanos no Grupo B.....	95
Tabela 28 - Níveis médios de ácido fólico (ng mL ⁻¹) e desvio padrão nas 4 coletas de voluntários homens e mulheres pertencentes ao Grupo A.....	97
Tabela 29 - Níveis ácido fólico (ng mL ⁻¹) e desvio padrão das amostras avaliadas do Grupo B.	97
Tabela 30 - Médias das análises de uréia e creatinina em homens e mulheres pertencentes aos Grupos A e B.	98
Tabela 31 - Recuperações obtidas para a metodologia adotada para determinação de FB ₁ em cabelo.	100
Tabela 32 - Correlação de Pearson obtido entre os dados de estimativa da exposição a FB ₁ e dos biomarcadores avaliados em urina (p < 0,05).....	103
Tabela 33- Correlação de Pearson obtido entre os dados de estimativa da exposição a FB ₁ e dos biomarcadores avaliados em soro, bem como os níveis de uréia e creatinina.	104

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AF	Ácido fólico
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOAC	<i>Association of Official Analytical Chemists</i>
API	<i>Atmospheric Pressure Ionisation</i>
CE	Câncer Esofágico
CIA	Colunas de Imunoafinidade
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLAE-EM/EM	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas
CV	Coefficiente de Variação
dL	Decilitro
DP	Desvio Padrão
DPR	Desvio Padrão Relativo
DTN	Defeitos no Tubo Neural
ESI	<i>Eletrospray Ionisation</i>
EU	European Union
EUA	Estados Unidos da América
FAO	<i>Food and Agriculture Organization</i>
FB ₁	Fumonisin B ₁
¹³ C ₃₄ - FB ₁	Padrão interno marcado de fumonisin B ₁
g	grama
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i>
IDP	Ingestão Diária Provável
IDP _M	Ingestão Diária Provável Média
IDMT	Ingestão Diária Máxima Tolerável
JECFA	<i>Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives</i>
kg	kilograma
kV	kilovolts
L	Litro
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
M	Molar
m/z	Relação massa/carga
MAPA	Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento
min	minuto
mg	miligrama
mL	mililitro
mm	milímetro
MS	<i>Mass Spectrometry</i>
Nm	Nanômetro
ND	Não Detectado
NE	Nefropatia Endêmica
R	Coefficiente de Correlação de Pearson
r ²	Coefficiente de Determinação

SIM	Selected Ion Monitoring
ng	nanograma
OTA	Ocratoxina A
OPA	o-Ftalaldeído
p	p-valor
pg	picograma
pH	Potencial hidrogeniônico
PMTDI	<i>Provisional Maximum Tolerable Intake</i>
PTFE	Politetrafluoretileno
QFA	Questionário de Frequência Alimentar
QIR-24h	Questionário de Inquérito Recordatório de 24 horas
rpm	Rotações por minuto
s	Segundo
Sa	Esfinganina
So	Esfingosina
Sa/So	Relação Esfinganina/Esfingosina
S/R	Sinal/Ruído
SAX	<i>Strong Anion Exchange Column</i>
SPE	<i>Solid Phase Extraction</i>
TIC	Total ion chromatogram
UE	União Européia
USDA	<i>United States Department of Agriculture</i>
v/v	Volume/volume
V	Volts
µg	micrograma
µm	micrômetro
°C	Graus Celsius

SUMÁRIO

1.	ORGANIZAÇÃO DA TESE.....	20
2.	INTRODUÇÃO.....	21
3.	OBJETIVOS.....	44
4.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	23
4.1	Fumonisinas.....	23
4.1.1	Fungos produtores.....	23
4.1.2	Características físico-químicas.....	24
4.1.3	Mecanismo de toxicidade.....	25
4.1.4	Aspectos toxicodinâmicos e toxicocinéticos.....	27
4.1.5	Efeitos tóxicos em animais e testes “in vitro”.....	28
4.2	Efeitos atribuídos em seres humanos.....	29
4.2.1	Câncer esofágico.....	29
4.2.2	Defeitos no tubo neural (DTN).....	30
4.2.3	Associação com a nefropatia endêmica.....	32
4.2.4	Micotoxicose aguda.....	33
4.3	Ocorrência em alimentos destinados ao consumo humano.....	33
4.3.1	Incidência de fumonisinas no Brasil.....	34
4.3.2	Legislação para fumonisinas.....	35
4.4	Exposição humana à fumonisina B ₁ e avaliação dos riscos à saúde.....	36
4.4.1	Consumo de milho e derivados.....	36
4.4.2	Estimativa da ingestão diária através dos alimentos.....	37
4.4.2.1	Frequência Alimentar.....	38
4.4.2.2	Inquérito Recordatório de 24 horas.....	38
4.5	Biomarcadores de exposição às fumonisinas.....	39
4.5.1	Resíduos da Fumonisina B ₁ em materiais biológicos.....	39
4.5.2	Relação Esfinganina/Esfingosina (Sa/So) em soro e urina.....	40
4.6	Métodos de Análise de Fumonisinas.....	41
4.6.1	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.....	41
4.6.2	Cromatografia Líquida acoplada a Espectrômetro de Massas.....	42
5.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	45
5.1	Seleção dos Voluntários.....	46
5.2	Coletas das Amostras.....	48
5.2.1	Amostragem de alimentos.....	48
5.2.2	Amostragem de materiais biológicos.....	49
5.2.2.1	Sangue.....	49
5.2.2.2	Urina.....	50
5.2.2.3	Cabelo.....	51
5.3	Análise da Dieta dos Participantes.....	51
5.3.1	Questionário de Inquérito Recordatório de 24 horas.....	51
5.3.2	Questionário de Frequência Alimentar.....	52
5.4	Parâmetros de desempenho analítico dos métodos.....	52
5.4.1	Linearidade.....	53
5.4.2	Limites de detecção e quantificação.....	53
5.4.3	Faixa Linear de trabalho.....	53
5.4.4	Seletividade.....	54
5.4.5	Recuperação e precisão.....	54
5.5	Análises realizadas.....	55
5.5.1	Alimentos.....	55
5.5.1.1	Determinação dos resíduos de FB ₁	55
5.5.1.1.1	Preparo dos padrões analíticos e avaliação do método.....	56
5.5.1.2	Análise de Ácido Fólico.....	56
5.5.2	Urina.....	57
5.5.2.1	Análise de Creatinina.....	57
5.5.2.2	Determinação de resíduos de FB ₁	58
5.5.2.2.1	Parâmetros de validação e preparo dos padrões analíticos.....	59

5.5.2.3	Avaliação dos níveis de Esfinganina e Esfingosina	59
5.5.2.3.1	Parâmetros de validação e preparo dos padrões analíticos	61
5.5.3	Soro	61
5.5.3.1	Determinação dos resíduos de FB ₁	61
5.5.3.1.1	Otimização dos parâmetros para fragmentação da FB ₁	61
5.5.3.1.2	Seleção da fase móvel e da vazão	62
5.5.3.1.3	Descrição do método de análise de fumonisinas B ₁ em soro	62
5.5.3.1.4	Parâmetros de validação	64
5.5.3.2	Avaliação dos níveis de Esfinganina e Esfingosina	64
5.5.3.2.1	Parâmetros de validação	65
5.5.3.3	Análise de Ácido Fólico	66
5.5.3.4	Avaliação de ureia e creatinina no soro	66
5.5.4	Cabelo	67
5.5.4.1	Determinação dos resíduos de FB ₁	67
5.5.4.1.1	Parâmetros de Validação	68
5.6	Análises dos resultados	68
6.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	69
6.1	Avaliação da ingestão alimentar populacional	69
6.1.1	Inquérito Recordatório de 24 horas	69
6.1.2	Frequência Alimentar	70
6.1.2.1	Outras informações importantes	71
6.1.3	Análises de resíduos de FB ₁ e biomarcadores	73
6.1.3.1	Alimentos	73
6.1.3.2	Determinação de FB ₁ em derivados de milho	73
6.1.3.2.1	Avaliação do método	73
6.1.3.2.2	Avaliação de FB ₁ em amostras de alimentos	74
6.1.3.3	Estimativa da Ingestão Diária	76
6.1.3.4	Análise de Ácido Fólico	77
6.2	Biomarcadores em Materiais Biológicos	79
6.2.1	Urina	79
6.2.1.1	Análise de Creatinina	79
6.2.1.2	Determinação de FB ₁	80
6.2.1.2.1	Avaliação do Método	80
6.2.1.2.2	Determinação de FB ₁ em amostras de urina	82
6.2.1.3	Avaliação dos níveis de Esfinganina e Esfingosina	84
6.2.1.3.1	Avaliação do método	84
6.2.1.3.2	Determinação de Sa e So em amostras de urina	87
6.2.2	Soro	89
6.2.2.1	Determinação de Fumonisin B ₁	89
6.2.2.1.1	Avaliação do Método	89
6.2.2.1.2	Determinação em amostras de soro	91
6.2.2.2	Avaliação dos níveis de Esfinganina e Esfingosina	92
6.2.2.2.1	Avaliação do Método	92
(a)	(b)	94
6.2.2.2.2	Determinação de Sa e So em amostras de soro	94
6.2.2.3	Análise de Ácido Fólico	96
6.2.2.3.1	Relação de ácido fólico em soro e alimentos e a exposição a FB ₁	98
6.2.2.4	Determinação de uréia e creatinina	98
6.2.3	Cabelo	99
6.2.3.1	Determinação de FB ₁	99
6.2.3.1.1	Avaliação do Método	99
6.2.3.1.2	Determinação de FB ₁ em amostras de cabelo	101
6.3	Correlação entre os biomarcadores e a estimativa de ingestão de FB ₁	102
7.	CONCLUSÕES	106
8.	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	108
9.	REFERÊNCIAS	109

1. ORGANIZAÇÃO DA TESE

Esta tese foi elaborada a partir dos dados obtidos no projeto de pesquisa intitulado “Avaliação da Exposição Humana à Fumonisina B₁ Utilizando Biomarcadores em Materiais Biológicos”. As análises foram executadas no Laboratório de Microbiologia e Micotoxilogia de Alimentos (LMMA), do Departamento de Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo (FZEA/USP). A investigação foi financiada pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (Processo número 2010/06291-9) sob a coordenação do Prof. Dr. Carlos Augusto Fernandes de Oliveira.

O projeto foi planejado e desenvolvido com algumas alterações e ajustes dos procedimentos durante o período de sua execução, com início em 2010 com o ingresso da aluna no Curso de Doutorado Direto do Programa de Pós Graduação em Ciências da Engenharia de Alimentos da FZEA/USP.

O estudo foi realizado em parceria com a University of Missouri (Columbia/MO/EUA), onde parte das análises foram realizadas, também financiadas pela FAPESP através do Programa de Bolsa de Estágio de Pesquisa no Exterior (Processo número 2013/06291-9), sob a supervisão do Dr. George E. Rottinghaus, no Veterinary Medical Diagnostic Laboratory.

Parte dos resultados obtidos durante o desenvolvimento deste trabalho encontra-se publicado em dois artigos científicos, relacionados no Anexo C.

2. INTRODUÇÃO

As micotoxinas são metabólitos secundários produzidos por fungos toxigênicos que possuem baixo peso molecular com diferentes estruturas e atividades biológicas (CHU; BHATNAGAR, 2003). Estas toxinas causam efeitos agudos e crônicos em humanos e animais, dependendo do tipo e a suscetibilidade do animal (ZAIN, 2011). Segundo a *United States Department of Agriculture* (USDA) a contaminação por micotoxinas chega a 25% da produção mundial de grãos destinados à alimentação humana e animal (DOHLMAN, 2001). Dentre as micotoxinas de maior importância no Brasil, destacam-se as fumonisinas, principalmente pelo impacto econômico e de saúde pública que apresentam. Estas micotoxinas constituem um grupo de 28 substâncias, sendo a fumonisina B₁ (FB₁) o metabólito mais frequente e com maior poder toxigênico (DOMIJAN, 2012).

Em climas tropicais e subtropicais como encontrado no Brasil, o desenvolvimento fúngico é favorecido por excelentes condições de umidade e temperatura. *Fusarium verticillioides* e *F. proliferatum* são os principais produtores de fumonisinas, os quais possuem elevada ocorrência em milho e seus derivados (FIGUEIRA et al., 2003). O milho (*Zea mays* L.) possui elevado valor nutricional constituindo um produto básico de consumo humano (MARTINS et al., 2012). A produção anual de milho no Brasil girou em torno de 53 milhões de toneladas na safra de 2009/2010, sendo o terceiro maior produtor mundial do referido grão (MAPA et al., 2015). Estudos realizados anteriormente no Brasil demonstraram a elevada incidência de contaminação por fumonisinas no milho e derivados, chegando a 100% de incidência em alimentos comercialmente disponíveis (SCAFF; SCUSSEL, 2004; BITTENCOURT et al., 2005; MARTINS et al., 2012).

Desde a sua identificação, as fumonisinas têm sido associadas com doenças em animais, como leucoencefalomalácia equina e o edema pulmonar suíno (DIAZ; BOERMANS, 1994). A fumonisina também é responsável por ocasionar hidrotórax em suínos (HARRISON et al., 1990), efeitos hepatotóxicos, carcinogênicos e apoptose (morte celular programada) em fígado de ratos (GELDERBLOM et al., 1988; POZZI et al., 2002), sendo também relacionada a surtos em animais ocorridos em vários países, tais como Canadá, Egito, Peru, África do Sul e EUA (CRUZ, 2010). O mecanismo de ação tóxica da FB₁ decorre de sua semelhança estrutural com a esfinganina e compete pelos sítios da enzima ceramida sintetase (esfinganina N-aciltransferase), uma enzima que catalisa a acilação da esfinganina (Sa) para gerar dihidroceramida durante a síntese de novo de esfingolipídeos (MULLER; DEKANT; MALLY, 2012). A inibição dessa via metabólica pode resultar na depleção do complexo esfingolipídeo, causando um aumento de Sa, em menor grau de esfingosina (So) livre (MULLER; DEKANT; MALLY, 2012).

Os efeitos das fumonisinas em humanos ainda não foram completamente elucidados. Entretanto, a incidência de fumonisina em alimentos vem sendo relacionada com a ocorrência de câncer esofágico em diversas regiões, tais como em Transkei, África do Sul (RHEEDER et al., 1992); Carolina do Sul, EUA (SYDENHAM et al., 1991), Linxian e Cixian, China (CHU; LI, 1994), província de Mazandaran, Irã e no nordeste da Itália (SOLFRIZZO et al., 1997), e na região Sul do Brasil (VAN DER WESTHUIZEN et al., 2003), que inclui os Estados de Santa Catarina, Paraná e Rio Grande do Sul. A FB₁ foi classificada pela *International Agency for Research on Cancer* (IARC) como pertencente ao grupo 2B, ou seja, provável carcinógeno em humanos (IARC, 2002).

Elevados níveis de FB₁ e seus metabólitos em milho e derivados vem sendo correlacionados com um aumento na incidência de defeitos do tubo neural (DTN) em algumas partes do Texas (HENDRICKS, 1999) e África do Sul (VILJOEN et al., 1995). Esta associação é relacionada à capacidade desta toxina de interferir na absorção do ácido fólico, um suplemento dietético utilizado para reduzir a incidência de defeitos no tubo neural, levando à hipótese de que as fumonisinas podem causar defeitos de nascimento e embriotoxicidade (HENDRICKS, 1999). Além disso, existe a hipótese da associação da exposição de fumonisinas com a nefropatia endêmica, entretanto esses efeitos ainda não foram experimentalmente confirmados.

O uso dos biomarcadores fornece uma estimativa da exposição à substância química, quantidades efetivamente absorvidas pelo organismo e efeitos sobre a saúde humana. A avaliação da exposição, associada aos conhecimentos relativos aos efeitos na saúde e os limites considerados seguros, permite estabelecer as prioridades e as formas de intervenção efetiva para proteger uma população dos riscos químicos, principalmente relacionados ao consumo de alimentos contaminados (WHO, 1996). A mensuração dos níveis de fumonisinas em amostras biológicas, como soro, urina e cabelo têm sido utilizada como biomarcador de exposição à toxina através dos alimentos (GONG et al., 2008; ABIA et al., 2013; EZEKIEL et al., 2014).

A relação esfinganina/esfingosina (Sa/So) também tem sido avaliada como biomarcador da exposição humana à FB₁ (CASTEGNARO et al., 1998; SANCHO et al., 2011; LEE et al., 2011). No Brasil, Solfrizzo et al. (2004) compararam a relação Sa/So na urina de participantes de diferentes regiões, demonstrando uma diferença significativa dos voluntários da região Sul do país comparado a regiões da Argentina e Itália. Entretanto, observa-se uma escassez de dados com relação aos biomarcadores de fumonisinas em seres humanos no Brasil. Dessa forma, delineou-se o presente trabalho com a finalidade de avaliar a exposição de FB₁ na população de municípios de dois estados brasileiros através de diferentes biomarcadores de exposição em voluntários que possuem baixo e elevado consumo de derivados de milho.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Fumonisinias

3.1.1 Fungos produtores

As micotoxinas são metabólitos secundários produzidos por fungos filamentosos. Esses metabólitos são sintetizados em condições específicas diferenciando-se dos primários, e são produzidos após a absorção de nutrientes, formando compostos como aminoácidos, acetatos e ácido glutâmico (MILLER, 2001).

As condições ótimas para desenvolvimento do fungo e produção de micotoxinas dependem do gênero e espécie. O fungo *Fusarium verticillioides* (anteriormente denominado *moniliforme*) é um ascomiceto cosmopolita presente em uma ampla variedade de plantas. Desde sua identificação, o gênero está relacionado com doenças em animais e humanos (NELSON et al., 1991). Em 1988, Bezuidenhout et al. (1988) caracterizaram as fumonisinias a partir de culturas de *F. verticillioides*.

A FB₁ é produzida por culturas de *Fusarium verticillioides* bem como outras espécies: *F. proliferatum*, *F. anthophilum*, *F. dlamini*, *F. globosum*, *F. napiforme*, *F. nygamai*, *F. oxysporum*, *F. polyphialidicum*, *F. Graminearum* e *F. subglutinans* provindos da África, Américas, Oceania, Ásia e Europa (SYDENHAM et al., 1996; IARC, 2001). Estudos vêm demonstrando que a *Alternaria alternata* f. sp. *Lycopersici* também pode sintetizar as fumonisinias do grupo B (ABBAS; RILEY, 1996) além do *Aspergillus niger* (LOGRIECO et al., 2009).

Os fungos *Fusarium verticillioides* e *F. proliferatum* são as espécies mais comumente encontradas em milho e outros cereais (PITT et al., 1993; SANCHIS et al., 1993). O *Fusarium* geralmente se desenvolve em regiões com temperaturas e condições de umidade elevada, principalmente em grãos danificados por insetos (MILLER et al., 2001). As condições de crescimento ótimo para a espécie *F. Proliferatum* são de a_a 0,995 e 30 °C, sendo que a maior produção de fumonisinias foi obtida com a_a 0,99 e temperatura de 25 °C em meio preparado a base de trigo (CENDOYA et al., 2014). Para fungos do gênero *F. verticillioides* as condições ótimas de crescimento foram de 25°C, a_a 0,998 - 0,99 e 0-25 g L⁻¹ de NaCl e para a produção de fumonisinias as condições mais eficientes foram temperatura de 30°C, a_a 0,99, 25 g L⁻¹ de NaCl e pH 5,0 (FANELLI et al., 2013).

O crescimento fúngico e a produção de micotoxinas são resultado de complexas interações entre diversos fatores, e a compreensão desse sistema é fundamental no entendimento do processo e no uso de práticas na prevenção do desenvolvimento dessas toxinas (CENDOYA et al., 2014).

3.1.2 Características físico-químicas

De forma geral, as micotoxinas possuem amplo espectro de toxicidade, baixo peso molecular, estabilidade a luz e calor (BOK; KELLER; LAE, 2004). Ao contrário de outras micotoxinas, as fumonisinas são hidrossolúveis, insolúveis em solventes apolares e apresentam ponto de fusão entre 103-105°C (VELSONDER et al., 1990).

Até o momento foram identificados 28 diferentes tipos de fumonisinas, classificados em A, B, C e P. As fumonisinas da série A são acetiladas no grupo amino da posição C-2; a série B apresenta uma amina livre; a série C falta o grupo metil na posição C-1 e a série P tem um grupo funcional 3-hidroxipiridinum na posição C-2 (PLATTNER et al. 1992; WHESTHUIZEN, 2011).

As fumonisinas do grupo B são produzidas naturalmente sendo o grupo mais encontrado. Consiste basicamente de uma longa cadeia de hidrocarbonetos com um ácido tricarbalílico, um grupo metil e amino. As fumonisinas B₂, e B₃ e B₄ diferem da FB₁ pela ausência de um ou mais grupos hidroxila nos carbonos 5 e 10 (Figura 1).

Figura 1- Estrutura química das fumonisinas.

A fumonisina B₁ é encontrada em mais de 70% das amostras contaminadas com fumonisinas, seguido pela FB₂ e FB₃ em menores níveis (FANELLI et al., 2013). A FB₁ é um pó branco higroscópico solúvel em água, acetonitrila ou metanol, estável em acetonitrila-água (1:1) e instável em metanol, além de ser geralmente resistente às temperaturas de processamento de alimentos e a luz (IARC, 2001).

Não há relatos disponíveis na literatura sobre o pKa da FB₁. Os valores de pKa para o ácido tricarbalílico são 3,49, 4,56 e 5,83. Autores sugerem que o grupo amina alifático tenha um pKa superior a 9 e portanto, a FB₁ seja um íon dipolar em pH entre 6 e 9 (NTP TR 496).

Os métodos utilizados no processamento de produtos derivados do milho podem converter as fumonisinas em hidrolisados e parcialmente hidrolisados (POLLING; PLATTNER, 1999). Quando a fumonisina é submetida ao processo de cocção sob condições alcalinas (nixtamalização), como quando o milho é transformado em massa de tortilhas e outros alimentos, os grupos do ácido tricarbálico (ATC) são desintegrados, levando a uma estrutura correspondente hidrolisada da FB₁ (HFB₁) e HFB₂ também conhecida como aminopolióis (MERRILL et al., 2001).

3.1.3 Mecanismo de toxicidade

O mecanismo de ação das fumonisinas ainda não foi completamente elucidado, entretanto a hipótese mais investigada e aceita, sugere que estas toxinas interferem no metabolismo dos esfingolipídeos.

Os esfingolipídeos são uma classe de lipídeos que podem ser encontrados nas células eucarióticas, onde desempenham papel estrutural importante, além de regular inúmeras funções celulares. Foram identificados mais de 300 esfingolipídeos, caracterizados por possuírem uma longa cadeia principal denominada base esfingóide (STOCKMANN-JUVALA; SAVOLAINEN, 2008).

Os esfingolipídeos representam 10-20% dos lipídeos de membrana. As bases esfingóides e os esfingolipídeos complexos desempenham papel importante em vias de sinalização e regulação de diversas funções celulares, incluindo crescimento, diferenciação, morte celular e resposta imunológica (LOISEAU et al., 2007).

Nas células dos mamíferos, as bases esfingóides mais comuns são a Esfingosina (So) e a Esfinganina (Sa). Normalmente a concentração de So é de três a cinco vezes mais elevada do que a de Sa e a manutenção de baixas concentrações de Sa e So livres é substancialmente importante, uma vez que estes compostos têm uma atividade biológica intrínseca considerável (RILEY et al., 2001; SILVA, 2008). As estruturas moleculares da esfinganina e esfingosina são similares a da fumonisina B₁ como pode ser visualizado na Figura 2.

Figura 2 - Estrutura química da Esfinganina, Esfingosina e Fumonisina B₁.
Fonte: Lino et al. (2007).

Devido a semelhança estrutural, a FB₁ pode inibir o metabolismo da esfinganina pela competição com os sítos de iligação da enzima ceramida sintetase (esfinganina N-aciltransferase), uma enzima que catalisa a acilação da esfinganina para gerar dihidroceramida durante a síntese de *novο* de esfingolípídeos (MULLER; DEKANT; MALLY, 2012). A inibição dessa via metabólica pode resultar na depleção do complexo esfingolípídeo, causando um aumento de esfinganina, em menor grau de esfingosina livre, e diminuição na ceramida que são componentes importantes das membranas biológicas (MULLER; DEKANT; MALLY, 2012), esquematizados na Figura 3. Quando acumuladas no meio intracelular, esses compostos deixam a célula e são encontrados no sangue periférico e urina (BANDO, 2007).

Os esfingolípídeos desempenham uma complexidade de funções na célula e a interrupção do metabolismo pela fumonisina, afeta um grande número de processos biológicos. Os efeitos podem ser mediados pelo esgotamento do complexo de esfingolípídeos, um aumento na esfinganina livre ou uma diminuição na reacilação da esfingosina. Além disso, pode ocorrer depreciação de esfingolípídeos mais complexos e outros provenientes da dieta, reduzindo os produtos das bases esfingóides e aumentando os derivados lipídicos. As conseqüências da interrupção do metabolismo de esfingolípídeos são específicas para cada tipo de célula (IARC, 2001).

Figura 3 - Via biossintética dos esfingolipídeos e via de degradação ilustrando a interferência pela FB₁.

O acúmulo de esfinganina pode levar à morte celular visto que em determinados tipos celulares, as bases de cadeia longa exercem efeitos citotóxicos (WANG et al., 1991). A correlação entre a perturbação do metabolismo dos esfingolipídeos e outros pontos hepatotóxicos ou nefrotóxicos foram demonstrados em ratos, cavalos, suínos e outras espécies (VOSS; SMITH; HASCHEK, 2007). Dessa forma, torna-se imprescindível conhecer as vias metabólicas que poderiam ser alteradas pela inibição da enzima ceramida sintetase, a atividade biológica da esfinganina e a função dos esfingolipídeos nas células. A interrupção dessa via poderia explicar, pelo menos em parte, os efeitos patológicos das fumonisinas (MERRIL et al., 1997).

3.1.4 Aspectos toxicodinâmicos e toxicocinéticos

Estudos avaliando a toxicocinética da FB₁ foram conduzidos em macacos-vervet (SHEPHARD et al., 1994), suínos (PRELUSKY; TRENHOLM; SAVARD, 1994; DILKIN et al., 2003) e bovinos (SORIANO et al., 2005) e demonstram que a toxina é pouco absorvida quando administrada por via oral, rapidamente encontrada na circulação, excretadas em pequenas quantidades na urina e recuperada em sua estrutura original através das fezes (WHO, 2000). A FB₁ é acumulada em pequenas quantidades em fígado e rins e pode também ser excretada na bile apesar da baixa absorção, podendo ocorrer algumas recirculações entero hepáticas (ORSI et al., 2009).

Em humanos, a cinética e dinâmica das fumonisinas em humanos não foram totalmente esclarecidas. A carência de biomarcadores de exposição às fumonisinas é um dos principais problemas que provoca essa limitação (GONG et al., 2008).

Em estudo conduzido na Província de Cape Eastern (África do Sul), foi avaliada a excreção de fumonisinas em 22 mulheres submetidas ao consumo de alimentos derivados

de milho contaminado, duas vezes ao dia e em dois dias consecutivos. A estimativa de ingestão de fumonisinas na população foi de $4,84 \mu\text{g kg}^{-1}$ de peso corpóreo dia^{-1} sendo a excreção média de FB_1 na urina de 0,075% ao dia (VAN DER WHESTHUIZEN, 2011).

Riley et al. (2012) avaliaram a cinética da excreção urinária de fumonisinas B_1 em indivíduos que possuem alimentação baseada em derivados de milho. O estudo demonstrou que a FB_1 é rapidamente absorvida e os níveis vertiginosamente decrescem após, cessado o consumo de alimentos contaminados. Nesse estudo, os autores estimaram uma taxa eliminação na urina de 0,5% da fumonisina B_1 ingerida.

3.1.5 Efeitos tóxicos em animais e testes “in vitro”

Os efeitos em animais dependem da dose exposição e da susceptibilidade do animal. Em síntese, as fumonisinas vêm sendo relacionadas ao estresse oxidativo, efeito citotóxico, indução da apoptose, efeitos imunotóxicos, nefrotoxicidade, hepatotoxicidade e efeito carcinogênico em diferentes espécies.

O papel das espécies reativas de oxigênio (EROS) mediada pela toxicidade da FB_1 ainda necessita ser esclarecido. Estudos realizados com macrófagos mostraram que a FB_1 altera a função da membrana celular e o empacotamento dos lipídeos. Além disso, podem alterar a estrutura das membranas celulares, promover a produção de radicais livres e acelerar a reação em cadeia associada com a peroxidação lipídica (YIN et al., 1998).

Os efeitos citotóxicos da FB_1 foram observados em células do glioblastoma, queratinócitos humanos e fígado de ratos *in vivo*. Em contrapartida, a FB_1 não induziu a morte celular ou qualquer outro sinal de citotoxicidade em células cerebrais, astrócitos de ratos ou de fibroblastos humanos (STOCKMANN- JUVALA; SAVOLAINEN, 2008).

A capacidade da FB_1 induzir a apoptose seletivamente ou interromper o ciclo celular normal (HUSSEIN; BRASEL, 2001) sugere que a exposição crônica a baixos níveis de FB_1 pode selecionar células com alterações nas propriedades de crescimento e, deste modo ser um cofator na carcinogênese. Galvano et al. (2002) observou que o tratamento com FB_1 induz danos ao DNA de fibroblastos humanos, quando as células são expostas a altas concentrações desta micotoxina por períodos prolongados.

Com relação aos efeitos no sistema imunológico, há poucos relatos de estudos avaliando o potencial das fumonisinas em modificar a resposta imune *in vivo*. As fumonisinas são inibidoras de ceramida sintetase e glicerofosfolipídios, sendo moléculas importantes na identificação e reconhecimento dos sítios na resposta imunocelular para diversos agentes infecciosos (WHO, 2000). Em experimento realizado com suínos, a ingestão durante um período menor que 3 semanas não afetou a imunidade. Os suínos foram alimentados com $2 \text{ mg } \text{FB}_1 \text{ kg}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ de material de cultivo por 5 semanas e então

vacinados com vacina para pseudorraiva. Neste estudo, a fumonisina não alterou nem as respostas mediadas por células ou respostas imunes (HASCHEK, 2001).

A hepatotoxicidade também é um dos efeitos relacionados a FB₁, sendo o fígado um dos principais órgãos de acúmulo da toxina (PRELUSKY; MILLER; TRENHOLM, 1996). Estudo realizado com novilhas, identificou que a Fumonisin B₁ aumentou a atividade de AST e GGT e induziu moderadamente evidências histológicas de injúria hepatocelular e hiperplasia biliar (MATHUR et al., 2001).

Estudos demonstraram que a FB₁ também pode ser nefrotóxica em ratos (RILEY et al., 1994), coelhos e ratos (STOCKMANN- JUVALA; SAVOLAINEN, 2008). Estudos histopatológicos revelaram que a FB₁ administrada em doses únicas ou múltiplas é capaz de danificar os túbulos renais. Em coelhos tratados com uma única dose de FB₁, as lesões mais severas foram detectadas no 3º dia após o tratamento, e a regeneração de tecidos observou-se a partir deste dia. Os autores sugeriram que nem todas as células epiteliais tubulares são susceptíveis aos efeitos da FB₁ (ORSI et al., 2007). Um aumento nos níveis de uréia e creatinina foi observado em cabras (GURUNG et al., 1998), ratos (ADAWI et al., 2011) e suínos (SMITH et al., 1996) em animais administrados com fumonisina, entretanto esses níveis não indicam especificamente a nefrotoxicidade, que pode ser causada pela diminuição no fluxo de sangue renal e pela taxa de filtração glomerular (ADAWI et al., 2011).

3.2 Efeitos atribuídos em seres humanos

3.2.1 Câncer esofágico

O câncer esofágico (CE) é o oitavo tipo de câncer mais comum no mundo, com 456.000 novos casos diagnosticados em 2012 (WCRF, 2014). No Brasil, o câncer esofágico corresponde a sétima causa de morte por câncer mais importante entre o sexo masculino (IPCS, 2013). A região sul do Brasil, incluindo Santa Catarina, Paraná, e Rio Grande do Sul possuem a maior incidência de câncer esofágico no país a uma taxa de 11:100.000 (INCA, 2013). O uso do tabaco, o vírus do papiloma humano (HPV), consumo de bebidas alcoólicas e obesidade podem estar relacionados com a doença (WCRF, 2014). Além disso, outros fatores como a exposição às toxinas são sugeridos como possíveis causas no aumento desse risco.

Elevados níveis de fumonisinas foram detectados em milho para consumo humano em áreas com elevada incidência de câncer esofágico localizados na África do Sul, onde a média de contaminação de *F. Verticillioides* e fumonisina B₁ foi de 42% com concentração média de 1,6 µg FB₁ g⁻¹ em local com elevado risco e 8,3% e 0,06 µg FB₁ g⁻¹ em região com baixa exposição (SYDENHAM et al., 1990).

Um total de 132 amostras de milho e arroz foram avaliadas no Irã e comparadas entre regiões de baixo e elevado risco de câncer esofágico. Os níveis de FB₁ e a proporção de amostras contaminadas foi significativamente maior em amostras de arroz obtidas de áreas com elevada incidência de CE (43,8 µg g⁻¹, 75%) em comparação com regiões de baixo risco (8,93 µg g⁻¹, 21,4%) (ALIZADEH et al., 2012).

Os relatos de estudos realizados em diferentes regiões da China são divergentes. Nas regiões de Cixian e Lixian, foram avaliadas 31 amostras de milho coletadas das residências de voluntários de regiões com elevada incidência de câncer esofágico obtendo níveis médios de 35,3 µg g⁻¹ (CHU; LI, 1994). Wang et al. (2000) encontraram a ocorrência de contaminação aproximadamente 2 vezes maior em áreas de elevado risco ao CE, sendo os níveis médios de contaminação por FB₁ 3 vezes maior em comparação com regiões do norte da China com baixa incidência de CE (WANG et al. 2000). Em contrapartida, Yoshizawa; Yamashita e Luo (1994) não observaram correlação entre os níveis de fumonisinas em alimentos e a incidência de CE. Em outro trabalho realizado, não houve associação entre a relação Sa/So em soro e a ocorrência de CE, seguindo modelos de regressão com ajustes de idade, sexo, uso de tabaco e álcool (ABNET et al., 2001). Na província de Jiangsu na China há também um relato ao qual o consumo de alimentos contaminados com fumonisinas foram associados com a incidência de câncer primário de fígado em humanos (UENO et al., 1997).

Recentemente, Wang et al. (2014) avaliaram a estimulação da proliferação de células epiteliais do esôfago humano (CEEH) por fumonisina B₁ e observaram que a FB₁ impulsionou a proliferação das CEEH por afetar o ciclo celular e apoptose. Esse mecanismo foi associado com mudanças na expressão de ciclina D1, ciclina E, P21 e p27. Em estudos realizados investigando a toxicidade da FB₁ em células humanas, os resultados demonstram uma inibição da expansão clonal em queratinócitos e proliferação em fibroblastos humanos, causando danos ao DNA por apoptose de fibroblastos humanos.

3.2.2 Defeitos no tubo neural (DTN)

Os defeitos no tubo neural são malformações congênitas que ocorrem pela falha no fechamento adequado do tubo neural embrionário, durante as primeiras semanas de desenvolvimento (WAES et al., 2005). A incidência de DTN varia com a raça, localização geográfica, classe socioeconômica, nutrição e fatores de predisposição múltiplos (CHEN, 2008). O consumo elevado de produtos derivados de milho contaminados com fumonisinas vem sendo associado com a ocorrência de DTN, principalmente em combinação com outros fatores de risco como susceptibilidade e deficiência em folato (CHEN, 2008).

Como dito anteriormente, as fumonisinas inibem a síntese de esfingolípídeos inibindo a síntese de esfinganina, aumentando a concentração de esfinganina e reduzindo de

(n <100) e moderado (n= 301-400) consumo de tortilhas. No grupo avaliado com maior consumo de tortilhas (n=401-800) não houve correlação, sugerindo que a exposição aumenta o risco até um determinado limite (MISSMER et al., 2006). Hendricks (1999) detectaram milho contaminado com fumonisinas em um surto de DTN também nos Estados Unidos entre 1990 e 1991.

Taxas relativamente elevadas de DTN também foram observadas em partes da África Austral (35-61/10.000), norte da China (57-73/10.000) e Guatemala (até 106/10.000) onde a população utiliza o milho como base alimentar, gerando risco eminente de exposição às fumonisinas (VOSS; SMITH; HASCHEK, 2007).

3.2.3 Associação com a nefropatia endêmica

Mesmo com intensas investigações, a etiologia da Nefropatia Endêmica (NE) permanece obscura. Foram propostas diversas alternativas na tentativa de entender o mecanismo da doença e alguns autores sugeriram uma possível relação com fatores ambientais incluindo a exposição às micotoxinas. Ocratoxina A (OTA) e Fumonisina B₁ (FB₁) podem estar relacionadas com o potencial nefrotóxico e provavelmente estão envolvidas em alguns casos de NE, desenvolvidos na região dos Balcãs (Croácia, Bulgária, Romênia, Yugoslavia, Bósnia e Herzegovina) (STOEV, 2010).

No ano de 1996, as amostras de milho contaminadas com fumonisinas B₁ e B₂ estavam concentradas principalmente na região de alto risco de NE (JURJEVIC et al., 1999). Ribar et al. (2001) observaram uma diferença significativa de esfingosina em soro do grupo de voluntários homens de elevado risco de NE em região da Croácia com elevada incidência de contaminação por fumonisinas. Além disso, houve diferença significativa de esfinganina e esfingosina em soro de mulheres do grupo de risco e indivíduos suspeitos; entretanto não houve diferença na relação esfinganina/esfingosina (RIBAR et al., 2001).

A co-ocorrência de fumonisinas com outras micotoxinas em milho é frequente e também pode ser um fator de risco, principalmente com a associação com a ocratoxina A. Em estudo realizado por Domijan et al. (2005), fumonisina B₁ foi encontrada nas 49 amostras de milho avaliadas logo após a colheita. Além disso, foi investigada a co-ocorrência de zearalenona e ocratoxina A demonstrando níveis quantificáveis em 55% com a presença de um tipo de toxina e 37% de dois ou mais tipos (DOMIJAN et al., 2005). A co-ocorrência de fumonisinas, ocratoxinas e zearalenona foi observada em 29% das 37 amostras de cereais e ração randomicamente coletadas em vilas na Croácia de risco à doença (KLARIC et al., 2009).

3.2.4 Micotoxicose aguda

A toxicidade aguda de FB₁ foi detectada em ratos machos (BUCCI et al., 1998), em larvas de *Tenebrio molitor* (ABADO-BECOGNEE et al., 1998), galinhas poedeiras (PRATHAPKUMAR et al., 1997), cavalos e suínos (SYDENHAM et al., 1990).

Em humanos há apenas um relato de surto ocorrido em 1995, onde houve um período de chuvas sazonais que danificaram parte da plantação de milho e sorgo. Apesar da contaminação fúngica e a má qualidade do produto, o material foi comercializado em 50 vilas. Amostras avaliadas em residências da região afetada, demonstraram elevada incidência de *Fusarium* sp. (44-84%), *Aspergillus* sp. (12-72%) e *Alternaria* sp. (32-76%) em grãos de sorgo; e em milho a ocorrência foi de 51-80% *Fusarium* sp., 44-84% *Aspergillus* sp. e 4% *Alternaria* sp. Além disso, os níveis de micotoxinas foram elevados variando em sorgo e milho de 0,14 - 6 4,7 mg kg⁻¹ de fumonisina B₁; traços - 0,93 mg kg⁻¹ de aflatoxina B₁ e de 3,75 - 100 mg kg⁻¹ de ergosterol (BHAT et al., 1997). Esse surto foi observado na Índia e caracterizado por dores abdominais e diarreia.

3.3 Ocorrência em alimentos destinados ao consumo humano

Os relatos sobre a presença de fumonisinas em alimentos destinados a humanos e animais substanciam o problema a nível mundial, dada a incidência destas toxinas no milho, uma vez que cerca de 90% do *F. verticillioides* se encontra no referido cereal (SHEPHARD et al., 1996). Segundo Shephard et al. (2011), a contaminação em milho continua sendo um problema global, entretanto as fumonisinas são encontradas também em outros alimentos como trigo (KUSHIRO et al., 2009; MONBALIU et al., 2010), mandioca (MANJULA et al., 2009), uvas e derivados como vinho (MOGENSEN et al., 2010), cerveja (AOYAMA et al., 2010), e aspargos (WAŚKIEWICZ et al., 2010).

Nos países desenvolvidos, como Estados Unidos, as perdas econômicas decorrentes da contaminação por micotoxinas, estão associadas principalmente aos limites e fiscalização feita por órgãos responsáveis. Em países menos desenvolvidos, o impacto na economia e saúde da população é mais expressivo. A agricultura geralmente é a principal atividade de subsistência e os grãos são consumidos na propriedade ou comercializados sem qualquer forma de fiscalização ou controle de qualidade. Na África subsaariana por exemplo, mais de 50% dos alimentos analisados, presentes normalmente na dieta dos habitantes contém altos níveis de fumonisinas (WU, 2006).

As fumonisinas são detectadas naturalmente em vários tipos de alimentos, principalmente milho e derivados em vários países (Tabela 1).

Tabela 1 - Ocorrência de FB₁ em produtos destinados ao consumo humano em alguns países nos últimos 10 anos.

País	Produto	Detectado/Total	FB ₁ (µg g ⁻¹)	Referência
Turquia	Grãos de milho	93/100	0,05-25,72	Demir; Simsek, Arici, 2010
Portugal	Derivados de milho	77/96	0,21	Martins et al., 2008
Portugal	Broa de milho	25/30	0,19	Lino et al., 2007
Suíça	Polenta	34/55	0,27	Pittet; Royer, 2002
	Milho (lata)	1/7	0,07	
China	Grãos de trigo	42/104	0,59	Wang et al., 2008
Síria	Grãos de trigo	23/28	2,08	Stankovic et al., 2012
Jordânia	Cereais	1/55	0,25	Salem; Ahmad, 2010
Slovenia	Cereais	84/290	4,09	Kirincic et al., 2015

Uma questão importante no que diz respeito a exposição humana às fumonisinas do grupo B, se relaciona com a estabilidade das fumonisinas durante a produção ou preparo dos alimentos. Estudos avaliando os efeitos de uma variedade de operações, demonstraram que as lavagens dos grãos, cozimento, a fritura e a extrusão reduzem os níveis de fumonisinas mas não a eliminam completamente (HUMPF; VOSS, 2004). O processamento alcalino mostrou ser eficaz na redução dos níveis e na atividade da micotoxina (MURPHY et al., 2006). Após o cozimento, as perdas de fumonisinas nos alimentos variaram de 10 a 50%, entretanto, após a torrefação (218 °C por 15 minutos) a toxina foi reduzida em aproximadamente 100% (TURNER; NIKIEMA; WILD, 1999).

3.3.1 Incidência de fumonisinas no Brasil

No Brasil, há uma elevada ocorrência de fumonisinas principalmente em milho e produtos derivados comparado com países de alto risco, como pode ser observado na Tabela 2.

Segundo o Ministério da Agricultura, a produção de milho no Brasil em 2013 foi de 75 milhões de toneladas (BRASIL, 2013). Dados da última pesquisa de aquisição domiciliar, realizada pelo IBGE em 2008/2009 (IBGE 2009), descrevem o milho e derivados como fontes alimentares importantes da população brasileira.

Tabela 2 - Ocorrência de FB₁ em milho e derivados destinados ao consumo humano no Brasil nos últimos 10 anos.

Produto	Estado	Amostras detectadas (%)	Conc. média (μg^{-1})	Referência
Milho recém colhido	Mato Grosso	92	0,73	Rocha et al., 2009
Milho recém colhido	Rio Grande do Sul	100	0,72	Rocha et al., 2009
Milho recém colhido	Bahia	100	2,75	Rocha et al., 2009
Milho recém colhido	São Paulo	100	2,81	Rocha et al., 2009
Milho recém colhido	Paraná	98,9	1,31	Moreno et al., 2009
Milho congelado	Distrito Federal	37,5	0,35	Caldas; Silva, 2007
Milho enlatado	Distrito Federal	20	0,19	Caldas; Silva, 2007
Milho de pipoca	Pernambuco	100	0,02	Kawashima; Soares, 2006
Milho de pipoca	Distrito Federal	92	0,39	Caldas; Silva, 2007
Creme de milho	Distrito Federal	100	1,43	Caldas; Silva, 2007
Flocos de milho	Distrito Federal	40	0,10	Caldas; Silva, 2007
Farinha de milho	São Paulo	100	2,11	Bittencourt et al., 2005
Farinha de milho	Pernambuco	84	0,07	Kawashima; Soares, 2006
Fubá	São Paulo	100	5,17	Bittencourt et al., 2005
Fubá	Pernambuco	91	2,70	Kawashima; Soares, 2006
Fubá	Distrito Federal	100	1,24	Caldas; Silva, 2007
Canjica	Pernambuco	100	0,19	Kawashima; Soares, 2006

3.3.2 Legislação para fumonisinas

Na União Européia, foi fixado um limite de 4.000 μg de FB₁ kg^{-1} de milho sem processamento; 1.000 μg de FB₁ kg^{-1} em milho destinado ao consumo humano, 800 μg de FB₁ kg^{-1} em cereais matinais a base de milho e 200 μg kg^{-1} de derivados de milho destinado a lactentes e crianças (EUROPEAN COMMISSION, 2006). A Comissão do Codex Alimentarius estabeleceu níveis máximos de fumonisinas de 4 mg kg^{-1} em milho em grão e 2 mg kg^{-1} para farinha de milho (CODEX ALIMENTARIUS, 2014). Para a *Food and Drugs Administration* (FDA), o máximo recomendado para milho de pipoca é de 3 μg kg^{-1} , fubá e farinha de milho secos 2 μg kg^{-1} (FDA, 2001).

Na Suíça o limite máximo permitido para alimentos é de $1.000 \mu\text{g kg}^{-1}$ para fumonisinas ($\text{FB}_1 + \text{FB}_2$) (SCUDAMORE; PATEL, 2000). No Brasil esses limites são consideravelmente superiores, a Resolução RDC 07/2011 estabelece limites para fumonisina em fubá, creme de milho, flocos, farinha de milho, canjica com nível máximo de $2.500 \mu\text{g kg}^{-1}$ e para amido de milho e outros produtos a base de milho $2.000 \mu\text{g kg}^{-1}$ (ANVISA, 2011). A legislação também estabelece o limite de $5.000 \mu\text{g FB}_1 + \text{FB}_2 \text{ kg}^{-1}$ em milho em grão para posterior processamento, com aplicação para janeiro de 2017 (ANVISA, 2013).

O “*Council for Agricultural Science and Technology Mycotoxin*” anunciou que um dos objetivos do século XXI é o desenvolvimento de normas padronizadas para contaminação por micotoxinas abrangendo todos os países. Entretanto, há uma preocupação em identificar as nações que seriam mais prejudicadas pela regulamentação, avaliando os custos e benefícios (LESLIE; SUMMERELL, 2008).

3.4 Exposição humana à fumonisina B_1 e avaliação dos riscos à saúde

3.4.1 Consumo de milho e derivados

Os maiores produtores mundiais de milho são os Estados Unidos, China e Brasil, onde em 2009, produziram: 333,01; 163,12; e 51,23 milhões de toneladas, respectivamente (MIRANDA; DUARTE; GARCIA, 2015). Do total produzido, o consumo chega a 950,0 milhões de toneladas a nível mundial, dos quais em 2013, o consumo no Brasil foi de 55 milhões de toneladas, destinadas a alimentação humana e animal (ABIMILHO, 2015).

O milho é cultivado em praticamente todo o território brasileiro, sendo que 90% da produção concentraram-se nas regiões Sul (40,76%), Sudeste (19,13%) e Centro-Oeste (30,18%) (MIRANDA; DUARTE; GARCIA, 2015). Em 2014, do total produzido e estocado em no período de março e abril/ 2013 (95.226 mil toneladas), 1.873 mil ton foi destinada ao consumo humano (ABRIMILHO, 2015).

Segundo dados do IBGE (2002-2003) a aquisição alimentar domiciliar *per capita* no Brasil, em média é de 261 g mês^{-1} para milho em grão; 45 g mês^{-1} para milho em espiga; 30 g mês^{-1} para flocos de milho e 261 g mês^{-1} para fubá de milho.

O consumo de milho varia amplamente entre diferentes regiões. Nas regiões de Lesotho, Malawi e África do Sul o consumo estimado é de 320, 293 e 222 $\text{g indivíduo}^{-1} \text{ dia}^{-1}$. No México, o consumo é estimado em 267 $\text{g indivíduo}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ e no Brasil 55 $\text{g indivíduo}^{-1} \text{ dia}^{-1}$.
¹ Em países europeus como Israel, o consumo diário estimado de milho é de 64 $\text{g indivíduo}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ e na Macedônia o consumo de milho é de 59 $\text{g indivíduo}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ (RANUM, ROSAS, CASAL, 2014).

3.4.2 Estimativa da ingestão diária através dos alimentos

Uma forma de avaliar a exposição de populações às fumonisinas consiste em calcular a ingestão diária provável (IDP), através das concentrações de fumonisinas ingeridas nos diferentes itens alimentares. Os métodos comumente utilizados na estimativa de consumo são os registros alimentares, questionários recordatórios e frequências de ingestão do alimento/histórico da dieta (BERDANIER; DWYER; FIELDMAN, 2007).

A avaliação da ingestão de fumonisina vem sendo investigada em diferentes regiões do mundo (Tabela 3) e deve ser realizada com dados recentes de consumo de uma diversidade de alimentos.

Tabela 3 - Ingestão de FB₁ em alimentos destinados ao consumo humano analisados em diferentes regiões do mundo.

Alimento	País	Ingestão (ng/Kg peso corpóreo dia)	Indivíduos investigados	Referência
Milho	Brasil	1276	Residentes de áreas rurais	Machinski; Valente, 2000
Milho	Brasil	392	Residentes de áreas urbanas	Machinski; Valente, 2000
Milho orgânico ou convencional	Espanha	3,8	População em geral	Arino et al., 2007
Alimentos a base de milho	África do sul	14.000-440.000	População com alta incidência de câncer esofágico	Thiel et al., 1992
Alimentos a base de milho	África do sul	5.000- 59.000	População com baixa incidência de câncer esofágico	Thiel et al., 1992
Alimentos a base de milho	Brasil	120,6	População em geral	Martins et al., 2012
Tortilhas	Guatemala	5.000-55.000	Mulheres	Torres et al., 2014

Os limites máximos toleráveis (identificação de perigo) são avaliados através de experimentos realizados em animais e apresentadas para avaliação do *Joint Expert Committee on Food Additives* (JECFA). A determinação toxicológica dos dados analisados pelo JECFA origina a estimativa de Ingestão Diária Máxima Tolerável (IDMT) ou o *Provisional Maximum Tolerable Intake* (PMTDI). A avaliação é baseada na determinação dos níveis de efeitos adversos não observados (NOAEL) em estudos toxicológicos, com uso de um intervalo de confiança. Para fumonisinas, o JECFA concluiu que a exposição diária estimada de FB₁ e fumonisinas totais pode exceder a IDMT em alguns países e regiões. A

IDMT para fumonisinas (FB_1 , FB_2 e FB_3) é de $2 \mu\text{g kg}^{-1}$ de peso corpóreo dia^{-1} com base do NOAEL de $0,2\text{mg kg}^{-1}$ peso corpóreo dia^{-1} considerando a toxicidade em rins e aplicação de fator de segurança de 100 (JEFCA, 2011).

Em estudo de avaliação da contaminação de produtos à base de milho com fumonisinas realizado a nível mundial, observou que na região de Transkei (África do Sul), o consumo diário de milho é de 460 g, enquanto na Alemanha e Reino Unido é apenas 7 g e na Suíça de 4 g. Assim sendo, para indivíduos com um peso de 70 Kg que ingerem milho com uma contaminação média de $1,7 \mu\text{g FB g}^{-1}$ na região de Transkei e de $0,5 \mu\text{g g}^{-1}$ na Europa, a ingestão diária provável (IDP) nessas populações é de 11,2 e $0,05 \mu\text{g kg}^{-1}$ peso corporal dia^{-1} respectivamente (LINO; SILVA; PENA, 2004).

3.4.2.1 Frequência Alimentar

O Questionário de Frequência Alimentar (QFA) é realizado com intuito de obter informações sobre os padrões usuais de consumo. Os dados fornecem estimativas sobre o consumo ao longo de um período de tempo variando de menos de um dia até um ano (SLATER et al., 2003).

Para identificar os fatores de risco dietéticos em grupos populacionais, há uma necessidade de informações confiáveis quanto ao consumo alimentar habitual e o teor de nutrientes em alimentos e preparações alimentares. Independente do método escolhido para quantificar a ingestão alimentar, a obtenção de dados válidos e reprodutíveis em estudos epidemiológicos nutricionais não é uma tarefa fácil, uma vez que não existe um método otimizado para avaliação da ingestão de alimentos e os métodos utilizados estão sujeitos a variações e erros (LOPES et al., 2003).

A grande vantagem do Questionário de Frequência Alimentar é a tentativa de avaliação usual, no presente ou passado. O método tornou-se dominante nos estudos epidemiológicos para avaliação do consumo dietético, em especial para avaliar a relação da dieta com a ocorrência de doenças crônicas não transmissíveis. O QFA é um instrumento que tem como objetivo a avaliação da dieta habitual de grupos populacionais e apresenta como vantagens a rapidez na aplicação e a eficiência na prática epidemiológica para identificar o consumo habitual de alimentos, além do baixo custo. Comparado a outros instrumentos substitui a medição da ingestão alimentar de um ou vários dias pela informação global da ingestão de um período de tempo (SLATER et al., 2003).

3.4.2.2 Inquérito Recordatório de 24 horas

O Questionário de Inquérito Recordatório (QIR) fornece um registro retrospectivo da ingestão de alimentos ou nutrientes num período de tempo definido. Apesar de ser utilizado

por qualquer período de tempo, geralmente é realizado num período de 24 horas e geralmente é chamado de recordatório de 24 horas (QIR-24h) (BERDANIER; DWYER, FIELDMAN, 2007).

Entre os métodos de estimativa de consumo alimentar, o QIR-24h é provavelmente o mais utilizado na avaliação nutricional de populações no Brasil (OLINTO et al., 1995). Esse método é de fácil aplicação e adequado à descrição de médias ou percentuais de consumo alimentar de grupos de indivíduos (THOMPSON; BYERS, 1994).

Os dados podem ser coletados do dia anterior ou das 24 horas anteriores à entrevista. Normalmente, o indivíduo é convidado a recordar todos os alimentos consumidos durante o período de tempo de referência, descrever os alimentos, e estimar as quantidades consumidas (BERDANIER; DWYER, FIELDMAN, 2007). Um único Inquérito Recordatório de 24 horas não estima a dieta habitual individual, pois não considera a variabilidade do consumo alimentar de um dia para outro (intra-indivíduo) (CARDOSO; STOCCO, 2000).

Os principais problemas são a variedade de alimentos consumidos e o impacto do consumo não-usual causado pelos registros (BERDANIER; DWYER, FIELDMAN, 2007). Os entrevistados podem alterar suas escolhas alimentares apenas para simplificar a manutenção de registros ou por que são sensibilizados por mudanças alimentares, como dietas alimentares ou mulheres preocupadas com a estética. Outra fonte de erro pelos entrevistados inclui erros ou omissões na descrição das porções avaliadas, além dos erros gerados pela capacidade do entrevistado em estimar o tamanho das porções (PETTERSON, 2000).

3.5 Biomarcadores de exposição às fumonisinas

Biomarcadores são substâncias, produtos de biotransformação ou alterações bioquímicas, cuja determinação em fluidos biológicos, tecidos ou ar exalado permite avaliar a intensidade de exposição a um determinado agente, bem como os riscos à saúde (WHO, 1996). Os biomarcadores de exposição à fumonisina ainda não foram devidamente validados, embora diversos biomarcadores tenham sido propostos (SHEPHARD; VAN DER WESTHUIZEN; SEWRAM, 2007). Os principais biomarcadores são os resíduos de fumonisinas e a relação Sa/So presentes em material biológico como sangue e urina.

3.5.1 Resíduos da Fumonisina B₁ em materiais biológicos

A escolha do indicador biológico mais adequado requer uma compreensão da toxicocinética, toxicodinâmica e biotransformação do agente químico (AMORIM, 2003). Com base na ausência de metabólitos mensuráveis, os resíduos da FB₁ têm sido sugeridos como biomarcadores de exposição às fumonisinas (SHEPHARD et al., 2007). Os níveis de FB₁ em

urina de humanos foram avaliados em diferentes áreas de elevado consumo de produtos de risco, como México (GONG et al., 2008); África do Sul (VAN DER WESTHUIZEN, 2011); Estados Unidos e Guatemala (RILEY et al., 2012). Além disso, outros métodos de detecção dos resíduos em urina foram validados e determinada a viabilidade em amostras humanas (SHETTY; BHAT, 1998; SOLFRIZZO; AVANTAGGIATO; VISCONTI, 1997).

A determinação de FB₁ em animais foi avaliada em diferentes espécies, entretanto em humanos são escassos os trabalhos em soro ou plasma avaliando a toxina, sendo descrita até o momento por SHEPHARD et al. (1992). O cabelo humano tem recebido atenção como um modelo biológico para estudo toxicológico e atualmente vem sendo conhecida como a terceira amostra biológica fundamental para testes de toxinas, além de urina e sangue (NAKAHARA, 1999). Neste contexto, Sewram et al. (2001) desenvolveram um método analítico para a detecção de fumonisinas em cabelo de primatas não humano relatando a possibilidade de uso de cabelo como material de investigação de exposição as micotoxinas. Além disso, Sewram et al. (2003) avaliaram uma população de indivíduos com elevada exposição avaliando amostras coletadas de barbearias do local, demonstrando a viabilidade de investigação dos resíduos de FB₁ em cabelo na população estudada.

3.5.2 Relação Esfinganina/Esfingosina (Sa/So) em soro e urina

Os biomarcadores de fumonisina mais pesquisados são aqueles relacionados ao rompimento da biossíntese de esfingolipídeos, ou seja, níveis elevados de esfinganina ou da relação com a esfingosina (SHEPHARD; VAN DER WESTHUIZEN; SEWRAM, 2007).

Estudos realizados em diversas espécies animais as quais foram administradas diferentes doses de fumonisinas permitiram estabelecer a razão Sa/So como um possível biomarcador de exposição a estas micotoxinas (VAN DER WESTHUIZEN et al., 1999). A variação nos níveis das bases esfingóides possivelmente causada pelas fumonisinas foi observada em soro e urina de diversas espécies animais, incluindo cavalos, suínos, roedores, macacos, coelhos, patos e galinhas (BOLGER et al., 2001).

Garren (2001) observaram que após a administração oral de FB₁ em ratos, os níveis de esfinganina e esfingosina foram alterados em vários tecidos e na urina. Riley et al. (2001) demonstraram uma correlação entre a extensão e a severidade de lesões e a inibição do metabolismo dos esfingolipídios.

De acordo com Shephard et al. (2007), a elevação de Sa ou da relação Sa/So, é utilizada como biomarcador em estudos animais onde a exposição ou a dose aplicada são elevadas. Apesar disso, a exposição na maioria das populações é inferior e podem ser influenciados por outros fatores alimentares além da ingestão de fumonisinas. A Tabela 4 apresenta um resumo dos estudos feitos utilizando-se a relação Sa/So como biomarcadores de fumonisina em humanos avaliados de diferentes localizações.

Tabela 4 – Estudos realizados utilizando a relação entre Esfinganina (Sa), Esfingosina (So) e a relação Sa/So como biomarcadores de fumonisina em seres humanos.

Região	Consumo de FB ₁ (µg/Kg peso corpóreo/dia)	Material analisado	Nº de amostras	Relação Sa/So	Referência
<i>Africa do Sul</i>					
Transkei	3,8	Urina	153	0,41±5,34	Van der Westhuizen et al., 1999
Bomet	0,06		27	0,34±0,4	
Transkei	3,8	Soro	154	0,34±2,63	
Bomet	0,06		29	0,28±0,22	
KwaZulu-Natal	Não detectado		27	0,43±0,45	
<i>Croácia</i>	Não determinado	Urina	49	0,54 ± 1,04	Ribar et al., 2001
<i>China</i>	184	Urina	28	0,19± 0,67	Qiu; Liu, 2001
<i>Argentina (Norte)</i>	0,55	Urina	74	0,69±12	Solfrizzo et al., 2004
<i>Brasil (Sul)</i>	0,57		116	1,57±0,49	
<i>Argentina (Central)</i>	Baixo/ausente		20	0,39±0,04	
<i>Itália (Sul)</i>	Baixo/ausente		66	0,35±0,02	
Burkina Faso- <i>África (Oeste)</i>	0,81	Sangue	62	0,64	Nikiema et al., 2008
		Urina	87	0,44	
		células bucais	64	0,50	
<i>Portugal (Central)</i>	0,153	Urina	68	0,42 ± 0,22	Silva et al., 2009
<i>Africa do Sul</i>					
<i>Bizana</i>	3,9	Plasma	21	0,29 ± 0,09	Van der Westhuizen et al., 2010
<i>Centane</i>	4,1		20	0,28 ± 0,11	
<i>Bizana</i>	3,9	Urina	36	0,21 ± 0,08	
<i>Centane</i>	4,1		26	0,20 ± 0,12	

Adaptado de Nikiema et al., 2008.

3.6 Métodos de Análise de Fumonisinas

3.6.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

A análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) é o método quantitativo mais utilizado para detecção de fumonisinas em alimentos. As amostras devem

ser extraídas e purificadas para remover as impurezas da matriz e para concentrar o conteúdo da toxina (SHEPHARD, 1998).

Devido as características de polaridade, a extração das fumonisinas geralmente é realizada com solventes e misturas, principalmente com uso de metanol, acetonitrila e água. A purificação é realizada recorrendo ao uso de extração em fase sólida (SPE) com colunas de fase reversa usando sílica octadecilgada (C_{18}), cartuchos de troca aniônica forte (SAX) ou colunas de imunoafinidade (IAC) (LINO et al., 2007).

As colunas SAX são uma boa alternativa para purificação das fumonisinas, mas necessitam de monitoração do pH (acima de 5,8 para uma adequada retenção) e também um controle da vazão para a eficiência nas recuperações (ARRANZ, 2004). As colunas de imunoafinidade (CIA) consistem de antibióticos reativos às fumonisinas, provém de uma purificação mais seletiva do analito, são comercialmente disponíveis e têm uma capacidade limitada que não deve ser excedida (SHEPHARD, 1998).

As fumonisinas não possuem nenhum cromóforo e, portanto, não absorvem luz UV, nem emitem fluorescência e a derivatização prévia é necessária para avaliar os derivados fluorescentes (LINO; SILVA; PENA, 2006). A derivatização vem sendo testada e realizada por diferentes soluções de orto-ftaldialdeído (OPA) bem como fluorescamina, 4-fluoro-nitrobenzofurazano, 9-fluorenilmetil clorofornato ou naftaleno 2,3-dicarboaldeído (HINOJO et al., 2006). O reagente de derivatização preferencialmente utilizado na análise de FB_1 e de FB_2 é o orto-ftaldialdeído (OPA). A derivatização de fumonisinas com OPA na presença de 2-mercaptoetanol em tampão borato de sódio é uma reação rápida entretanto estável apenas até 4 minutos. Essa limitação é amenizada pela padronização do tempo (cerca de 2 min) entre adição de reagentes e injeção CLAE. A fração de fumonisina é tratada com (a) reagente OPA e (b) mercaptoetanol produzindo derivados fluorescentes demonstrados na Figura 5.

Figura 5 - Reação de derivatização de fumonisinas com OPA.

Fonte: Silva et al. 2008

3.6.2 Cromatografia Líquida acoplada a Espectrômetro de Massas

A cromatografia pode ser combinada a vários sistemas de detecção. O acoplamento da cromatografia líquida com a espectrometria de massas alia as vantagens da cromatografia, alta seletividade e eficiência na separação, e do espectrômetro de massas,

informações estruturais, massa molar e seletividade adicional (CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008).

O uso de LC-MS e LC-MS/MS para análise de fumonisinas está se tornando cada vez mais difundido, e é uma ferramenta importante na análise de fumonisinas pela seletividade e sensibilidade que possui (REN et al., 2011). Alguns desses métodos são originais, com detecção de multi-micotoxinas em uma única corrida cromatográfica, e pela avaliação de análogos de fumonisina ou resíduos da toxina em diferentes matrizes (SHEPHARD et al., 2011).

Em alimentos, o uso de cromatografia associada a espectrometria de massas vem sendo utilizada em derivados de milho (SENYUVA et al., 2010; LI et al., 2012) e outros produtos como leite (GAZZOTI, et al., 2009), alimentos infantis (RUBERT; SOLER; MANES, 2012), sementes de arroz (KUSHIRO et al., 2008); rações (MONBALIU et al., 2010); trigo, amendoim e pistache (SPANJER; RENSEN; SCHOLTEN, 2008).

A quantificação de micotoxinas por LC-MS/MS também vem sendo relatada em materiais biológicos como a urina (AHN et al., 2010; SILVA et al., 2010; RUBERT et al., 2011; VAN DER WESTHUIZEN et al., 2011; XU et al., 2010; SHEPHARD et al., 2013). Soro e/ou plasma investigados em suínos (DEVREESE et al., 2012) e em cabelo, Sewram et al. (2001) e Sewram et al. (2003) propuseram métodos de detecção de FB₁, FB₂, FB₃ e AP₁ e AP₂ em cabelo de primatas não-humanos e humanos respectivamente.

Existem diversos métodos para a determinação de FB₁ por espectrometria de massas, principalmente do tipo *tandem mass-spectrometry* (MS/MS), baseados em diferentes tipos de interfaces: *fast atom bombardment* (FAB), *ion spray* (IS), *thermospray* (TS), *liquid secondary ion* (LSI), *eletrospray* (ESI) e *atmospheric pressure ionization* (API) (LINO; SILVA; PENA, 2006). As fumonisinas FB₁, FB₂, FB₃ são detectadas geralmente utilizando cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas (CLAE-EM/EM), com ionização via *electrospray*. Segundo Lino; Silva; Pena (2006), a CLAE-EM/EM é uma técnica ideal para quantificar fumonisinas pois essas moléculas tendem a ionizar e produzem sinais abundantes tanto no modo positivo como no negativo. Apesar disso, existem também métodos alternativos com uso de fonte API (*atmospheric pressure ionisation mass spectrometry*) (ZOLLNER; HELM, 2006),

Os detectores utilizados são compostos por analisadores de massas do tipo quadrupolo (SPANJER; RENSEN; SCHOLTEN, 2008), triplo quadrupolo (REN et al., 2011) ou íon trap (VARGA et al., 2010).

O uso de padrão interno nesse tipo de determinação, é uma alternativa importante e extensamente utilizada para determinações com baixos níveis avaliados (REN et al., 2011). Em fumonisinas, os padrões internos avaliados são padrões marcados principalmente com deutério fumonisina B₁ (FB₁-d6) e ¹³C₃₄- Fumonisina B₁

4. OBJETIVOS

O Objetivo Geral deste trabalho foi avaliar a exposição humana à FB₁ presente nos alimentos, através da estimativa de ingestão da toxina na dieta e da análise de diferentes biomarcadores presentes em amostras de sangue, urina e cabelo de voluntários dos municípios de Pirassununga, Estado de São Paulo, e Erval Velho, Estado de Santa Catarina.

Os Objetivos Específicos foram:

- Determinar a concentração de FB₁ em milho e derivados, e de ácido fólico na farinha de milho, consumidos pelos voluntários dos municípios estudados, e comparar com a legislação vigente no Brasil.
- Estimar a ingestão diária provável média (IDP_M) de FB₁ nos municípios estudados, e comparar com dados de ingestão diária máxima tolerável (IDMT) para fumonisinas e com dados de outras regiões de alta exposição às fumonisinas na dieta.
- Determinar a relação Esfinganina/Esfingosina (Sa/So) em sangue e urina e a avaliar sua aplicabilidade como biomarcador da exposição dos voluntários estudados à FB₁.
- Verificar a correlação entre a relação Sa/So no sangue e na urina, e a IDP_M de FB₁, e os dados obtidos no Questionário de Inquérito Recordatório de 24 horas (o qual indica exposição recente à toxina).
- Determinar os níveis de ácido fólico em soro e verificar a correlação entre os dados obtidos e os níveis de FB₁ presentes em derivados de milho.
- Determinar os níveis de uréia e creatinina presentes no sangue, e verificar a correlação entre os dados obtidos e a IDP_M de FB₁, e os dados obtidos no Questionário de Inquérito Recordatório de 24 horas (o qual indica exposição recente à toxina).
- Determinar a concentração de FB₁ em soro e urina dos voluntários dos municípios estudados.
- Verificar a correlação entre as concentrações de FB₁ residual no soro e urina dos voluntários e a IDP_M de FB₁, e os dados obtidos no Questionário de Inquérito Recordatório de 24 horas (o qual indica exposição recente à toxina).
- Determinar a concentração de FB₁ em amostras individuais de cabelo dos voluntários dos municípios estudados.
- Verificar a correlação entre as concentrações de FB₁ residual no cabelo dos voluntários e a IDP_M de FB₁.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

Inicialmente, para melhor visualização das diversas etapas cumpridas no experimento, a Figura 6 apresenta uma síntese sequencial das atividades executadas no presente trabalho.

Figura 6 - Síntese sequencial das atividades executadas no experimento.

4.1 Seleção dos Voluntários

Foram avaliados voluntários pertencentes ao *campus* da USP (FZEA) de Pirassununga, São Paulo. Os funcionários residentes do *campus* e a comunidade em geral incluindo alunos e professores, foram convidados a participar como voluntários.

O processo de recrutamento ocorreu da seguinte forma: a equipe fez a divulgação da pesquisa através de reuniões, contato pessoal e visitas nas residências. Para o recrutamento dos funcionários que residem no *campus*, a equipe contou com o apoio da Prefeitura do Campus USP de Pirassununga (PUSP-P) auxiliando no levantamento populacional, localização das residências e divulgação do projeto.

Todos os indivíduos que se disponibilizaram a colaborar com o experimento foram aceitos como voluntários, mesmo com a doação de um ou dois materiais biológicos, com ou sem alimentos. Inicialmente 100 pessoas se dispuseram a participar do experimento, entretanto apenas 38 indivíduos participaram do protocolo completo, com doação de alimentos e material biológico. O experimento foi realizado de junho/2011 a março/2012 em 4 períodos, a cada 3 meses foram coletadas amostras de derivados de milho e materiais biológicos (sangue, urina e cabelo). As coletas foram realizadas em 10 dias de cada mês selecionado, para atender a demanda dos voluntários e obter o maior número de amostras. As datas selecionadas para realização das coletas foram entre diferentes épocas, englobando as variações climáticas ao longo do ano (Tabela 5).

Tabela 5 – Períodos abordados nas 4 diferentes coletas realizadas no Grupo A e características climáticas compreendidas.

Coleta	Período (mês/ano)	Estação
A	Junho/2011	Outono/Inverno
B	Setembro/2011	Inverno/Primavera
C	Dezembro/2011	Primavera/Verão
D	Março/2012	Verão/Outono

A população avaliada (Grupo A) é localizada em uma região onde os hábitos alimentares são muito variados, e o consumo de derivados de milho geralmente é baixo. Em comparação, foi selecionado um grupo de 20 indivíduos (Grupo B) residentes na zona rural de Erval Velho, Santa Catarina que possuem elevado consumo de derivados de milho (especialmente polenta).

Dessa forma, foram feitas visitas às residências de comunidades rurais da cidade, e os participantes convidados a participar do experimento. Foram coletadas amostras de alimentos e material biológico (sangue e cabelo), bem como aplicação dos Questionários de

Inquérito Recordatório e Frequência Alimentar, sendo executado em abril/2012. A equipe contou com o apoio da Prefeitura Municipal de Erval Velho, bem como da Secretaria Municipal de Saúde para o recrutamento dos voluntários e coleta das amostras.

A inclusão de cada pessoa no estudo foi realizada por manifestação voluntária de concordância, e os critérios de inclusão compreenderam: idade entre 10 e 70 anos, e histórico clínico com ausência de doenças crônicas a menos de 2 anos. Os dados antropométricos dos voluntários que declararam as informações do universo amostral estudado são demonstrados na Tabela 6.

Tabela 6 - Dados antropométricos médios (variação) declarados pelos voluntários homens e mulheres avaliados no questionário aplicado nos Grupos A (Pirassununga) e Grupo B (Erval Velho).

Sexo	Grupo A		Grupo B	
	Idade média (variação)	Peso (kg) médio (variação)	Idade média (variação)	Peso (kg) médio (variação)
Homens	30 (10 – 62)	77,7 (54 – 120)	-	73,8 (67 – 84)
Mulheres	28 (14 - 54)	60,9 (48 – 93)	-	76,1 (58 – 115)
Misto*	29 (10 – 62)	68,6 (48 – 120)	-	74,6 (58 – 115)

*Misto: Grupo de voluntários englobando todos os voluntários avaliados incluindo homens e mulheres

A localização e as principais características de cada cidade selecionada para o estudo estão descritos na Figura 7.

Figura 7 - Localização e principais características das cidades de Pirassununga (SP) e Erval Velho (SC).

Ao concordar em participar, os voluntários foram informados sobre os procedimentos, riscos, objetivos e fases da pesquisa. Todos os voluntários assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido (Apêndice A), recebendo uma cópia do documento. Os participantes foram esclarecidos sobre os procedimentos do trabalho e divulgação dos dados, utilizados no presente projeto, assegurando-lhes também que não serão reveladas as suas identidades nas publicações geradas a partir dos dados obtidos. Os procedimentos utilizados neste estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário de Ribeirão Preto, Processo nº 7962/2010 incluindo participantes do Grupo A (Anexos A) e Grupo B (Anexo B- Adendo).

4.2 Coletas das Amostras

4.2.1 Amostragem de alimentos

Através de um estudo bibliográfico dos alimentos com maior risco de contaminação, foram listados 10 derivados de milho antes e após o processamento, frequentemente consumidos pela população brasileira, incluindo os produtos presentes na legislação estabelecida no país para fumonisinas, a Resolução RDC 07/2011 (BRASIL, 2011).

No dia anterior as coletas de material biológico, foi entregue às residências dos participantes, um folheto explicativo onde estavam listados os alimentos de interesse e as porções necessárias; um pote medida onde a quantidade requerida nas análises laboratoriais foi estimada (aproximadamente 150 g), e 6 sacos herméticos (fechamento tipo *zip*) previamente identificados para acomodar as amostras. Os voluntários foram instruídos a coletar os alimentos conforme a disponibilidade, e levá-las no momento das coletas de sangue. Na Tabela 7 estão descritas as amostragens de alimentos coletadas nos grupos amostrais selecionados.

Tabela 7 – Número de amostras de alimentos coletadas nas 4 coletas do Grupo A (Pirassununga) e na coleta realizada no Grupo B (Eral Velho).

	Grupo A- Coletas				Grupo B
	A	B	C	D	
Farinha de milho fina-fubá	12	10	3	7	7
Farinha de milho em flocos	8	7	6	4	-
Pipoca	14	14	6	5	4
Polenta	1	1	0	0	6
Milho enlatado	4	1	1	2	-
Sucrilhos	4	5	3	2	-
Total de derivados de milho	43	38	19	22	17

No total, foram coletadas 122 amostras de derivados de milho no Grupo A e 17 amostras no Grupo B. As amostras foram encaminhadas sob refrigeração ao Laboratório de Microbiologia e Micotoxilogia (LMMA/FZEA/USP), identificadas e congeladas a -18 °C para posterior análise.

4.2.2 Amostragem de materiais biológicos

De posse da autorização documentada de cada indivíduo, as amostras de materiais biológicos (sangue, urina e cabelo) foram coletadas 1 dia após a retirada dos alimentos nas unidades residenciais.

Alguns indivíduos participaram apenas com um material biológico, como urina ou cabelo. No total de 86 voluntários, apenas 16 participaram com os três materiais nas quatro diferentes coletas. O número de amostras de material biológico coletados está descrito na Tabela 8.

Tabela 8 - Número de amostras de material biológico (sangue, urina e cabelo) coletadas no Grupo B e nos diferentes períodos de coleta (Coletas A, B, C e D) no Grupo A .

	Grupo A (Coletas)				Grupo B
	A	B	C	D	
Sangue	64	62	40	35	20
Urina	77	68	60	46	-
Cabelo	40	35	20	27	10

Grupo A: Pirassununga/SP; Grupo B: Erval Velho/SC.

4.2.2.1 Sangue

No Grupo A, as amostras de sangue foram coletadas na Unidade Básica de Saúde (UBAS) do *Campus* da FZEA/USP sob a coordenação do Médico do Trabalho Dr. José Carlos Mantovani e auxílio do enfermeiro Geraldo Donizetti Janez e a técnica de enfermagem Fabiana Monteiro Macatrozz. Para os voluntários pertencentes ao Grupo B, foram coletadas as amostras de sangue na própria residência dos voluntários com auxílio de um enfermeiro disponibilizado pela Secretaria Municipal de Saúde do município de Erval Velho.

Para as coletas de sangue não foi exigido jejum dos participantes, sendo realizadas em diferentes períodos do dia, conforme a disponibilidade dos voluntários. As coletas e o tratamento das amostras de sangue foram realizados segundo as recomendações da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial para coleta de sangue

venoso (Figura 8). Foram coletados 20 mL de sangue e condicionados em tubo sem anticoagulante. Os frascos contendo as amostras foram devidamente identificados e encaminhados ao Laboratório de Microbiologia e Micotoxilogia de Alimentos (LMMA-FZEA/USP).

Figura 8 - Coleta de sangue venoso.

Para obtenção de soro, o sangue foi coagulado por um período de 30 a 60 minutos em banho-maria a 37°C. Posteriormente, os frascos foram centrifugados a 4.000 rpm por 10 minutos e a camada superior foi separada. As amostras de soro foram acondicionadas em criotubos de 1 mL, identificadas e congeladas a -80°C.

Após a coleta de sangue de cada amostragem, houve um acompanhamento dos voluntários e esclarecimento sobre os possíveis efeitos causados pela coleta de sangue, além da atenção às sugestões acerca dos procedimentos utilizados nas coletas.

4.2.2.2 Urina

Para a coleta de urina, foi entregue a cada participante um frasco de polietileno de 500 mL, previamente descontaminado, identificado, contendo no corpo do recipiente as instruções de coleta. Os indivíduos foram instruídos a coletar a primeira urina da manhã sem volume estabelecido e armazenar sob refrigeração (0 a 10°C) até o transporte da amostra.

Os frascos contendo as amostras foram acondicionados em uma caixa isotérmica e encaminhados ao LMMA. As amostras foram distribuídas em frascos menores (50 mL) e congelados a -20°C até o momento das análises.

É importante ressaltar que as amostras de urina foram coletadas somente dos voluntários pertencentes ao Grupo A, pela dificuldade no transporte das amostras do Grupo B.

4.2.2.3 Cabelo

As amostras de cabelo foram coletadas no momento da coleta de sangue dos voluntários e aplicação do Questionário de Inquérito Recordatório de 24 horas.

Houve dificuldade para adquirir a quantidade de cabelo necessária para a determinação da FB₁ (500 mg) de cada voluntário. Muitos indivíduos com pouca quantidade de cabelo permitiram somente o corte de uma pequena porção, dificultando a amostragem. Além disso, a equipe relatou que muitos voluntários do sexo masculino, cortam seu cabelo rente ao couro cabeludo tornando-se inviável a coleta. Dessa forma, a alternativa foi agrupar as amostras referentes as 4 coletas em apenas 1 amostragem. As amostras que mesmo com o agrupamento das subamostras apresentaram peso inferior a 500 mg foram eliminadas do estudo. O peso médio de cabelo coletado foi para cada voluntário de 3,2 g.

As amostras de cabelo foram mantidas em ausência de luz (embaladas em papel laminado), mantidas sob temperatura de congelamento a -18°C e transportadas a temperatura ambiente para o Veterinary Medical Diagnostic Laboratory (Columbia/MO/EUA).

Os procedimentos para a coleta estão descritos no Apêndice B.

4.3 Análise da Dieta dos Participantes

4.3.1 Questionário de Inquérito Recordatório de 24 horas

No momento da coleta dos materiais biológicos, os participantes foram instruídos a preencher um Questionário de Inquérito Recordatório, relatando o consumo dos alimentos com alto risco de contaminação, ingeridos nas 24 horas anteriores à coleta das amostras clínicas.

Dentre os alimentos selecionados na pesquisa, estão listados os alimentos acrescentados na legislação para fumonisinas, a Resolução RDC 07/2011, publicada em 22 de fevereiro de 2011, pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2011), além de outros derivados de milho consumidos na região. A quantidade estimada de alimento consumido foi avaliada considerando a porção alimentar por medida caseira para cada produto, segundo a Anvisa (BRASIL, 2001). O consumo de alimentos de risco foi avaliado segundo a ingestão média de derivados de milho declarados pela população (gramas) no dia correspondente ao estudo. O Questionário de Inquérito Recordatório de 24 horas é semelhante ao Questionário de Frequência Alimentar ilustrado no Apêndice C, com exceção de que o período abordados são as últimas 24 horas e não inclui-se a frequência.

No total, foram aplicados 216 QIR 24 h em voluntários pertencentes ao grupo A, sendo 74 na coleta A, 71 na B, 56 na C e 15 na D. No Grupo B, os 20 participantes do experimento responderam o questionário.

4.3.2 Questionário de Frequência Alimentar

O principal objetivo do Questionário de Frequência Alimentar (QFA) é conhecer o consumo habitual de alimentos. O QFA foi aplicado avaliando a porção e a frequência de consumo dos alimentos, estimando a porção dos produtos de risco ingerida pelos voluntários por unidade de tempo (Apêndice C).

No Grupo A, os questionários de frequência alimentar foram aplicados em dois momentos, após o primeiro período de coletas, em junho/2011 e após o término das 4 coletas, em abril/2012. No Grupo B, o QFA foi aplicado apenas na semana das coletas de material biológico.

A massa de alimentos ingerida foi avaliada considerando a porção alimentar por medida caseira (BRASIL, 2001). As frequências de consumo utilizadas neste trabalho foram: “Nunca consumo”; “Consumo menos de 1 vez por mês”; “1-3 vezes por mês”; “2-4 vezes por semana”; “todos os dias”; “2 vezes ao dia”. A quantidade consumida de cada alimento foi calculada a partir dos dados de tamanho da porção e frequência de consumo, estimando o consumo diário dos produtos.

Dos voluntários avaliados, 39 voluntários do Grupo A e 20 do Grupo B participaram do estudo de estimativa de ingestão, com a doação de alimentos e a descrição dos hábitos alimentares.

A estimativa do consumo de alimentos de risco e a ingestão diária provável de FB₁ foram determinadas a partir da quantidade média *per capita* consumida pela população (gramas/dia) e da contaminação de FB₁ nos alimentos avaliados (fubá, farinha de milho em flocos, pipoca, milho enlatado, polenta). A ingestão diária provável de fumonisinas foi estimada segundo a eq. (1):

$$IDP = \frac{(CFB_1) \times (CM)}{30 \times PC} \quad \text{eq.(1)}$$

Onde: IDP= ingestão diária provável

CFB₁= concentração de FB₁ nos alimentos

CM= consumo mensal dos alimentos

PC= peso corpóreo dos indivíduos

4.4 Parâmetros de desempenho analítico dos métodos

A validação do método analítico é essencial para avaliar se o método é adequado aos objetivos pretendidos, a fim de obter resultados confiáveis (BRITO et al., 2003). As metodologias de determinação de fumonisina B₁ em alimentos, soro, urina e cabelo, bem

como o método de quantificação de esfingolipídeos em soro e urina foram otimizados e avaliados os parâmetros de desempenho analítico. Os procedimentos foram baseados nas especificações recomendadas pela Resolução RE nº 899 de 29 de maio de 2003 da Anvisa (ANVISA, 2003), bem como outros órgãos internacionais e trabalhos disponíveis na literatura. Os parâmetros de validação avaliados foram: linearidade, limites de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), faixa linear de trabalho, seletividade, recuperação e precisão.

4.4.1 Linearidade

A linearidade foi avaliada segundo as recomendações do "Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos" previsto pela Anvisa (BRASIL, 2003) e determinada através do coeficiente de correlação da curva de calibração para cada método. As curvas padrões foram preparadas ao menos em 4 níveis durante 3 diferentes dias para cada analito.

4.4.2 Limites de detecção e quantificação

Segundo a Anvisa (BRASIL, 2003), o limite de detecção (LD) é a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado, porém não necessariamente quantificado, sob as condições estabelecidas. Existem diferentes formas para calcular os limites, entretanto o método mais utilizado e adotado no experimento, é baseado no mínimo de pratos teóricos requeridos resultando em um sinal/ruído (S/N) de 3.

O limite de quantificação (LQ) geralmente é calculado pela comparação dos sinais medidos da amostra com baixas concentrações conhecidas do analito com o branco, estabelecendo-se a concentração mínima ao qual o analito pode ser quantificado (BRITO et al., 2003). O LQ foi determinado através do ruído na linha de base, a uma concentração que produz uma relação sinal ruído de 10:1.

4.4.3 Faixa Linear de trabalho

A faixa de linear de trabalho corresponde ao intervalo entre os valores máximo e o mínimo da substância, que atenda aos requisitos de precisão e exatidão (RIBANI et al., 2004). A faixa linear de trabalho foi estabelecida a partir de valores próximos ao limite de quantificação e o valor máximo extrapolado de cada composto. A Anvisa (BRASIL, 2003) especifica um intervalo compreendido de até 120% do limite máximo especificado para determinação de impurezas. Segundo Ribani et al. (2004), os pontos da curva analítica devem ser igualmente espaçados sobre a faixa de concentração de interesse,

compreendida de 0-150% ou 50-150% do valor esperado dependendo de qual destas duas opções for mais adequada.

4.4.4 Seletividade

A Anvisa define seletividade como a capacidade que o método possui de medir um composto na presença de outros interferentes como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz. Uma forma simples de verificar a seletividade de um método cromatográfico, é pela avaliação da presença/ausência de picos na região do tempo de retenção do analito de interesse (LANÇAS, 2004). Foi avaliada uma amostragem de branco em triplicata e observada a ausência de picos cromatográficos no tempo de retenção do analito, sendo posteriormente adicionado padrão analítico e confirmada seletividade do pico dentro das condições estabelecidas.

4.4.5 Recuperação e precisão

A recuperação está relacionada a exatidão, refletindo na quantidade do analito recuperado em relação a quantidade real presente na amostra (BRITO et al., 2003). Segundo a Anvisa (BRASIL, 2003), a exatidão de um método é a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro.

Para avaliar a exatidão do método, foram feitos ensaios de recuperação em triplicata, em diferentes dias (intra-dias). A recuperação foi determinada pela eq. 2:

$$R = \frac{\text{Valor obtido}}{\text{Valor adicionado}} \times 100$$

eq.(2)

Nas recuperações, valores próximos a 100% são preferidos, entretanto, a União Européia recomenda para métodos de avaliação de elementos traços recuperações entre 60 a 120 % (FDA, 2012).

A partir dos dados de recuperação foi avaliada a precisão do método através do desvio padrão, o desvio padrão relativo (DPR) ou coeficiente de variação. O valor máximo aceitável deve ser definido de acordo com a metodologia empregada, a concentração do analito na amostra, o tipo de matriz e a finalidade do método, não se admitindo valores superiores a 5% (BRASIL, 2003). Apesar disso, segundo Senyuva et al., (2010), os critérios de desempenho da UE onde afirma que a repetibilidade deve ser < 20%. Os resultados foram analisados pelo Statistica StatSoft 7.0.

4.5 Análises realizadas

4.5.1 Alimentos

4.5.1.1 Determinação dos resíduos de FB_1

A extração e quantificação de fumonisinas em derivados de milho foram realizadas através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (SHEPHARD et al., 1990), com algumas adaptações descritas na Figura 9.

Figura 9 - Procedimento para preparo da amostra para injeção em CLAE para FB_1 em derivados de milho.

4.5.1.1.1 *Preparo dos padrões analíticos e avaliação do método*

Para o preparo dos padrões analíticos, 1 mg do padrão de fumonisina B₁ (Sigma-Aldrich), foi dissolvido em 10 mL da mistura de acetonitrila: água (1:1, v/v). Uma alíquota desta solução foi transferida para um balão volumétrico de 5 mL, obtendo-se solução estoque de 100 µg mL⁻¹. A partir dessa solução, foram preparadas as demais concentrações diluídas em acetonitrila: água (1:1, v/v). A curva padrão foi construída semanalmente em triplicata a partir da injeção de padrões de FB₁ nas concentrações: 0,31; 0,62; 1,25; 2,5 e 5 µg mL⁻¹.

Para a construção da curva padrão, uma alíquota de 100 µL de cada padrão, foram derivatizados com 200 µL de solução OPA, e injetados no sistema CLAE como descrito previamente para as amostras.

Para avaliar a eficiência da metodologia para determinação de fumonisinas, foram realizados ensaios de recuperação, em amostras artificialmente contaminadas com a toxina. Amostras de derivados de milho foram fortificadas com as soluções de trabalho nos níveis de 100, 250, 500 e 1.000 µg FB₁ kg⁻¹ em triplicata em três diferentes dias.

4.5.1.2 Análise de Ácido Fólico

A determinação de ácido fólico (na forma de folatos) foi realizada nas amostras de farinha de milho. Nos demais derivados de milho coletados, não foi possível quantificar os níveis, devido a complexidade das amostras e a especificidade do método de análise. Nesse contexto, foram selecionadas 20 amostras de fubá, uma cada família em uma das coletas, e caso houvesse mais de uma amostra por residência, as amostras com maiores níveis de FB₁ foi preferida.

A extração e quantificação de ácido fólico nas amostras de alimentos foram realizadas segundo o método descrito por Heudi; Kiling; Fontannaz (2005) em laboratório especializado neste tipo de análise. As amostras foram extraídas com solução de hidróxido de sódio 2M em banho de ultrassom por 10 minutos. Uma alíquota da solução foi filtrada em filtro de seringa (PTFE 0,45 µm), e 20 µL injetados em sistema CLAE (Shimadzu, Kyoto, Japão) equipado com detector de UV/Vis e ajustado em comprimento de onda de 270 nm. A separação cromatográfica foi realizada pelo uso de coluna de fase reversa C18 (250 x 4,6 mm, 5µm de tamanho de partícula). A fase móvel foi composta de água- acetonitrila- ácido fosfórico (90:10:1, v/v/v).

O limite de quantificação obtido para o método foi de 0,3 µg kg⁻¹ e a faixa linear do método foi determinada a partir desse nível até 3,4 µg kg⁻¹. As recuperações foram realizadas em 4 replicatas em dois diferentes dias no nível de 100 µg kg⁻¹ obtendo

recuperação média de 95%. As recuperações foram repetidas semanalmente cumprindo o controle de qualidade mantido pelo laboratório.

4.5.2 Urina

4.5.2.1 Análise de Creatinina

A determinação de creatinina foi realizada para todas as amostras de urina coletadas nas coletas A, B, C e D e foi adotada em função da correção do volume e dos níveis de toxina na urina.

A determinação de creatinina em amostras de urina foi realizada por kit Creatinina Ref. 35 (Labtest) e detecção por espectrofotometria. O método baseia-se na reação da creatinina com picrato em meio alcalino formando complexo de cor vermelha que é medido espectrofotometricamente. A adição de um acidificante abaixa o pH, promovendo a decomposição do picrato de creatinina, permanecendo inalterada a cor derivada dos cromogênios, que também é medida fotometricamente. A diferença entre as leituras fornece o valor da creatinina. A descrição detalhada do método pode ser visualizada na Figura 10.

Figura 10 - Procedimento de análise de creatinina em urina.

O kit fornecido pelo fabricante foi inicialmente testado obtendo recuperações médias de 103 %, com um limite de detecção de $0,3 \text{ mg dL}^{-1}$. O resultado da medição é linear entre $0,2$ e 12 mg dL^{-1} . O padrão é rastreável ao Standard Reference Material (SRM) 914 do National Institute of Standards and Technology (NIST) (REFERENCIA DO KIT). O equipamento de medição foi o espectrofotômetro Spectrumlab 22PC (Shanghai Lengguang Technology Co. Ltd- Shanghai, China) a 510 nm para todas as medições.

4.5.2.2 *Determinação de resíduos de FB₁*

A carência de trabalhos realizados avaliando a incidência de resíduos de FB₁ em urina avaliados por CLAE, gerou uma necessidade de adaptação e otimização de acordo com diferentes autores. Foram realizados testes preliminares para determinar a melhor metodologia para preparo das amostras com uso de colunas SAX e imunoafinidade. O uso de coluna de imunoafinidade Fumonitest (Vicom) foi preferido devido aos melhores resultados obtidos e pelo excelente resultado de trabalhos disponíveis até o momento.

O método que demonstrou melhores recuperações foi a separação realizada segundo Silva et al. (2010) com detecção de acordo com Stack; Eppley (1992) descritos na Figura 11.

Figura 11 - Marcha analítica para determinação de FB₁ em amostras de urina.

4.5.2.2.1 *Parâmetros de validação e preparo dos padrões analíticos*

Para o preparo do padrão de FB₁, foi utilizado os procedimentos descritos na seção 3.6.1.1.2. A quantificação de FB₁ na urina foi determinada pela curva padrão construída com o padrão de FB₁ diluído nos níveis de 15,62; 31,25; 62,5; 125; 250; 500; 1.000; 2.000 e 5.000 ng mL⁻¹ com uma amostra extraída normalmente sem níveis quantificáveis de FB₁. Concomitantemente, uma curva diluída em acetonitrila: água (1:1, v/v) foi preparada nos mesmos níveis para fins de avaliação do efeito de matriz. Uma alíquota de 50 µL de extrato foram adicionados a 200 µL de solução OPA para a reação de derivação e injetados no sistema CLAE como previsto para a quantificação das amostras. Amostras de urina foram artificialmente contaminadas com dois níveis de contaminação de 50 e 200 ng mL⁻¹, sendo avaliado em triplicata, em três diferentes dias. Diariamente foram injetados padrões com níveis pertencentes a curva para verificação da estabilidade e das condições cromatográficas.

4.5.2.3 Avaliação dos níveis de Esfinganina e Esfingosina

A partir do levantamento bibliográfico de métodos analíticos para a separação e purificação de esfinganina e esfingosina por CLAE, foram testados diferentes métodos de quantificação de Sa e So em urina. Posteriormente aos testes, a metodologia selecionada e utilizada foi descrita por Lee et al. (2011).

O método selecionado foi testado para urina de mulheres e homens, entretanto observou-se a necessidade de adaptação do método, pela diferença na amostra utilizada de urina de mulheres (5 mL) e urina de homens (25 mL). No método original os procedimentos para separação e purificação são os mesmos para ambas as amostras, incluindo as mesmas quantidades. Apesar disso, testes realizados anteriormente, demonstraram melhores resultados obtidos pela compensação do acetato de etila utilizado na extração dos esfingolipídeos. Além disso, a porção de álcali adicionado observou-se que é ideal para amostras de urina feminina, com um volume de 5 mL, entretanto para urinas masculinas houve um melhor desempenho com uma porção maior de hidróxido de potássio (KOH) 1 M adicionado.

As condições cromatográficas também foram testadas e otimizadas, variando a porção de fase móvel, fluxo além das porções de solução de derivatização e extrato. Os parâmetros utilizados para avaliar a adequabilidade do sistema e a melhor separação de Sa e So foram: pureza do pico, tempo de retenção, cauda e resolução entre os picos.

Após a otimização e validação do método, a extração e quantificação de Sa e So em urina foram realizadas através de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), descrito por Lee et al. (2011) com adaptações descritas na Figura 12.

Figura 12 - Procedimento para preparo da amostra para quantificação de Sa/ So em urina.

4.5.2.3.1 Parâmetros de validação e preparo dos padrões analíticos

Para o preparo dos padrões de esfingolipídeos, foram utilizados 5 mg dos padrões de *D-Sphingosine* (So) e *D-erythro-Dihydrosphingosine* (Sa) (Sigma Aldrich, St Louis, USA) respectivamente, dissolvidos em metanol: água (90:10, v/v). A concentração estoque foi de $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ e a solução de trabalho foi obtida pela diluição do estoque até obtenção de $5 \mu\text{g mL}^{-1}$, armazenados em frascos âmbar a -20°C .

Os padrões utilizados na construção da curva padrão foram diluídos com um extrato obtido de uma mistura de amostras de voluntários com baixos níveis de Sa e So, preparados normalmente conforme os procedimentos previstos para as amostras. Os padrões foram diluídos com o extrato nas concentrações: 5; 10; 20; 40; 80; 160 e 320 ng mL^{-1} em triplicata para cada nível, preparada semanalmente. A concentração final de Sa e So nas amostras fortificadas foram calculadas pela subtração dos níveis endógenos nas respectivas amostras. Para avaliação do efeito de matriz, uma curva diluída em metanol: água (90:10, v/v) foi preparada nas mesmas concentrações que as curvas diluídas em extrato.

Amostras de urina de homens e mulheres foram fortificadas com 5, 20 e 80 ng mL^{-1} em três diferentes dias, e preparadas em triplicata para cada nível de toxina com vistas à obtenção dos percentuais de recuperação e coeficientes de variação dos resultados.

4.5.3 Soro

4.5.3.1 Determinação dos resíduos de FB_1

4.5.3.1.1 Otimização dos parâmetros para fragmentação da FB_1

O sistema utilizado foi Acquity I-Class UPLC® equipado com uma coluna C18 BEH ($2,1 \times 50 \text{ mm}$, $1,7 \mu\text{m}$) e acoplado a um espectrômetro de massa Xevo® TQ-S (Waters). Infusões diretas no Espectrômetro de Massas foram realizadas com solução analítica padrão de 50 ng mL^{-1} de FB_1 e $^{13}\text{C}_{34}\text{-FB}_1$ realizadas individualmente, para otimizar as melhores condições de fragmentação dos íons na análise por MS. Para esta etapa foram variados os seguintes parâmetros: o modo de ionização da fonte (*electrospray* positivo ou *electrospray* negativo); a voltagem do cone para selecionar o íon precursor; a energia de colisão para fragmentar o íon precursor e gerar íons produtos; a temperatura da fonte; a temperatura e a vazão do gás de dessolvatação para secagem do solvente; a voltagem do capilar e do cone extrator. Essa etapa de otimização é determinante para selecionar os íons a serem monitorados para qualificação e quantificação dos compostos estudados.

Após essa etapa, pequenas variações destes parâmetros foram verificadas na página de sintonia do MassLynx para certificar que a maior sensibilidade foi alcançada. Outros parâmetros não otimizados pelo IntelliStart, como a voltagem do capilar, fonte e

temperatura de dessolvatação, cone e fluxo do gás de dessolvatação foram otimizados manualmente na página de sintonia do MassLynx.

4.5.3.1.2 *Seleção da fase móvel e da vazão*

No sistema de LC-MS/MS é indicado o uso de aditivos orgânicos voláteis para a fase móvel a fim de evitar que estes cristalizem na interface. Como exemplo de aditivos emprega-se ácido acético e ácido fórmico até 1% v/v e hidróxido de amônio e acetato de amônio até 0,1 M. Foram testadas diferentes composições dos solventes da fase móvel, sendo a que demonstrou melhor eficiência na ionização e separação cromatográfica foi água + 0,2% de ácido fórmico num fluxo de 0,6 mL min⁻¹ injetado numa coluna C18 BEH (2,1 × 50 mm, 1,7 µm), mantida a 40°C.

4.5.3.1.3 *Descrição do método de análise de fumonisinas B₁ em soro*

Inicialmente foram testados diferentes concentrações e tipos de solventes para a precipitação de conteúdo proteico encontrado no soro, bem como outros interferentes que precipitam na presença de solvente:

- 0,25 / 0,5 mL⁻¹ de soro + 750 µL / 2,5 mL⁻¹ de metanol
- 0,25 / 0,5 mL⁻¹ de soro + 750 µL / 2,5 mL⁻¹ de acetonitrila
- 250 µL⁻¹ de soro + 250 µL⁻¹ sulfato de amônia supersaturado

A precipitação de proteínas em soro feito por adição de sulfato de sódio saturado segundo Cai et al. (2007), apresentando melhor eficiência na limpeza do extrato e resultados de recuperação. Apesar disso, com os testes realizados, o sistema UPLC-MS/MS sofreu alguns danos e precisou passar por reparos, provavelmente pela precipitação inadequada de proteínas ou de resíduos de sulfato de amônia.

Dessa forma o método precisou ser reavaliado e modificado. Foram testadas diferentes metodologias com uso de colunas de imunoafinidade e SAX (SHEPHARD; THIEL; SYDENHAM, 1992) com intuito de obter um extrato mais purificado e com boa reprodutibilidade. Apesar disso, os métodos testados com colunas SAX e de imunoafinidade apresentaram recuperações abaixo do mínimo exigido (60 %) em todos os testes realizados.

Novamente foram testados diferentes concentrações e métodos de precipitação de proteínas e o método selecionado foi com uso de acetonitrila e adição de padrão interno marcado ¹³C₃₄ – FB₁ para correção das recuperações obtidas. O método de extração de FB₁ foi proposto por Devreese et al. (2012) com algumas adaptações, descrito na Figura 13.

Figura 13 - Procedimento de análise de FB₁ em soro.

De acordo com a característica das fumonisinas, que são moléculas polares e termicamente instáveis, empregou-se a fonte de ionização à pressão atmosférica (API) no modo por *electrospray* (ESI).

As melhores condições para a fragmentação dos íons monitorados foram a temperatura de 150 °C na fonte, e vazão de injeção do padrão de 5 µL min⁻¹, com um volume total de 250µL. A temperatura do gás N₂ (gás de dessolvatação) variou de 500 - 650 °C, mantida a uma vazão para a dessolvatação da amostra de 800 L h⁻¹ e para o cone de seleção dos íons a 150 L h⁻¹. A energia do capilar foi de 1,5 kV, energia de colisão de 35kV e o cone 20 V.

Foram selecionados dois fragmentos característicos de cada composto. Os fragmentos mais estáveis, e por isso mais intensos, foram utilizados para a quantificação dos compostos, enquanto o segundo fragmento mais intenso serviram para a confirmação analítica e estão descritos na Tabela 9.

Na otimização da separação cromatográfica foi injetada uma amostra de soro diluída em água e contendo fumonisinas na concentração de 25 ng mL⁻¹. O tempo total de corrida foi padronizado em 2 minutos, sendo o tempo de retenção da FB₁ de 0,47 min e da FB₂ de 0,59 min nas condições pré estabelecidas. A quantificação da Fumonisina B₂ não foi possível ser efetuada pelas baixas recuperações obtidas e pela falta de padrão interno adequado para essas correções. Em todas as corridas cromatográficas incluindo padrões analíticos, recuperações e amostras avaliadas foram adicionados 40 µL de solução de ¹³C₃₄ – FB₁ na concentração de 10 ng mL⁻¹, obtendo uma concentração final ideal de 200 pg mL⁻¹.

Tabela 9 - Parâmetros utilizados nas quantificações de fumonisinas em soro por LC-MS/MS.

Componente	Molécula intacta "Pai" (m/z)	Fragmento conhecido "Filho" (m/z)	Dwell (s)	Cone (V)	Colisão (V)
Fumonisin B ₁	722,25	334,25	0,08	30	40
		352,30	0,08	30	35
¹³ C ₃₄ – Fumonisin B ₁	756,60	374,48	0,08	30	40
		356,40	0,08	30	38

4.5.3.1.4 Parâmetros de validação

Para o preparo dos padrões de Sa e So, foram utilizados os procedimentos descritos na seção 5.5.2.2.1. Os padrões utilizados na construção da curva padrão foram diluídos em extrato obtido pela mistura de amostras de voluntários, preparados conforme os procedimentos previstos para as amostras. As amostras foram diluídas no extrato nos níveis de 20; 50; 80; 110; 140; 170; 200 ng mL⁻¹ e as curvas preparadas diariamente. As recuperações foram obtidas pela fortificação das amostras nas concentrações de 80, 160; 800 e 1680 pg mL⁻¹ em três diferentes dias com seis repetições.

4.5.3.2 Avaliação dos níveis de Esfinganina e Esfingosina

Inicialmente amostras de soro (500 µL) foram contaminadas com 100 ng mL⁻¹ de Sa e So, e testados diferentes métodos de extração descritos por Sancho et al. (2011), Nikiema et al. (2008) e Hisao et al. (2007). Após a seleção do método, foram realizados ensaios de otimização das condições cromatográficas, variando os parâmetros de composição e fluxo de fase móvel, volume de injeção e relação extrato/reagente derivatizante (OPA).

As concentrações de esfinganina e esfingosina foram determinadas segundo os procedimentos recomendados por Hsiao et al. (2007) com algumas modificações descritas na Figura 14.

No total, foram avaliadas 201 amostras do Grupo A e 18 amostras do Grupo B em duplicata para confirmação dos resultados.

Figura 14 – Marcha analítica para determinação de Sa/So em amostras de soro.

4.5.3.2.1 Parâmetros de validação

Para o preparo dos padrões analíticos, 1 mg do padrão de fumonisina B₁ e (Sigma-Aldrich), foi dissolvido em 10 mL da mistura de acetonitrila: água (1:1, v/v). Uma alíquota desta solução foi transferida para um balão volumétrico de 5 mL, obtendo-se solução estoque de 100 µg mL⁻¹. A partir dessa solução, foram preparadas as demais concentrações diluídas em acetonitrila: água (1:1, v/v).

Os padrões analíticos foram diluídos em extrato de amostras de voluntários com baixos níveis de Sa e So, preparados conforme o previsto para as amostras. As amostras foram diluídas no extrato e em fase móvel nos níveis de 5; 10; 20; 40; 80; 160 ng mL⁻¹. As recuperações foram obtidas pela fortificação das amostras nas concentrações de 2, 8 e 32 ng mL⁻¹.

4.5.3.3 Análise de Ácido Fólico

A determinação de ácido fólico (na forma de folatos) nas amostras de sangue foi realizada no laboratório de análises clínicas Centrolab (Leme-SP), utilizando-se estritamente os procedimentos do *kit* de imunoensaio ADVIA *Centaur Folate* (SIEMENS, 2009), por método de quimioluminescência (SIEMENS, EUA). Nesta análise, o folato presente na amostra compete com o folato marcado com éster de acridina (provido com o *kit*) por uma quantidade limitada da proteína de ligação ao folato marcado com biotina. Na determinação, a amostra é previamente tratada para liberar o folato das proteínas de ligação endógena na amostra.

A análise foi realizada em laboratório especializado em análises de material biológico. O controle de qualidade foi feito com quatro amostras de soro em 5 diferentes dias nos níveis de 3,85; 12,00; 22,67; 33,86 nmol mL⁻¹ obtendo recuperação média de 92% com coeficiente de variação de 10,00; 7,61; 8,50 e 8,93%, respectivamente, entre as repetições realizadas. A faixa de trabalho do *kit* estabelecido pelo fabricante é de 0,35 - 24,0 ng mL⁻¹ (0,79 - 54,36 nmol mL⁻¹). As recuperações foram repetidas semanalmente em 4 diferentes níveis para o controle de qualidade das análises realizadas pelo laboratório.

4.5.3.4 Avaliação de ureia e creatinina no soro

Foram avaliados vinte voluntários do Grupo A nas 4 coletas realizadas, e vinte do Grupo B, totalizando 40 participantes em relação a uréia e creatinina. Os voluntários selecionados do Grupo A, foram indivíduos que participaram do protocolo com a doação de alimentos, soro, urina e cabelo em ao menos uma coleta, preferencialmente funcionários residentes no *campus* da USP de Pirassununga. As análises de uréia e creatinina em soro foram efetuadas em laboratório especializado.

A determinação de uréia em amostras de soro foram realizadas por *kit* urease/GLDH (Eurotech) e detecção por espectrofotometria. O método baseia-se na hidrólise da uréia na presença de água e urease para produzir amônia e dióxido de carbono. A amônia originada desta reação reage com o 2-oxoglutarato e o NADH na presença de glutamato-desidrogenase (GLDH) sendo a enzima limitante da reação. A linearidade do método é dada até o limite de 600 mg dL⁻¹ e a sensibilidade é de 2 mg dL⁻¹.

A creatinina do soro reage com o ácido pícrico em solução alcalina formando um complexo de cor amarelo-laranja quantificada por espectrofotometria. A faixa linear de trabalho é de 0,2 - 15 mg dL⁻¹.

O equipamento de medição utilizado em ambas análises foi A15-Bio Systems e a calibração é realizada diariamente, seguindo os padrões de qualidade do laboratório.

4.5.4 Cabelo

4.5.4.1 Determinação dos resíduos de FB₁

A extração de fumonisina foi realizada pelo uso de coluna SAX e detecção LC-MS de acordo com o método descrito por Sewran et al. (2003) com algumas adaptações descritas na Figura 15.

Figura 15 – Fluxograma de análise de FB₁ em cabelo.

O detector utilizado foi um sistema LC-MS Finnigan Surveyor® MSQ Plus (San Jose, CA). O nitrogênio foi fornecido por um gerador Nitrogen Peak Scientific modelo N418LA (Billerica, MA) mantido a 75 psi. A aquisição dos dados, processamento e armazenamento foi realizado utilizando software Xcalibur®, versão 1.3 (Thermo Fisher, San Jose, CA, USA). A espectrometria de massa com ionização eletrospray (ESI) em modo positivo foi monitorada em *single ion mode (SIM)* pela detecção de íon molecular protonado a *m/z*

721.83. Os parâmetros foram variados e ajustados até obter um sinal ótimo. A voltagem do cone utilizada foi 95 V, a temperatura da fonte foi 630°C e a voltagem da agulha 1.5 kV.

No total, cinquenta e seis voluntários de Pirassununga ($n = 46$, de 11 residências) e Erval Velho ($n = 10$, de 8 residências) apresentaram a quantidade necessária (500 mg) e participaram do estudo de determinação dos resíduos de FB₁ presentes em cabelo.

4.5.4.1.1 Parâmetros de Validação

O preparo do padrão de FB₁ foi realizado segundo os procedimentos descritos na seção 3.6.1.1.2. Para a quantificação de FB₁ em cabelo, a curva padrão foi construída semanalmente com 4 níveis de padrões: 5, 10, 20 e 40 ng mL⁻¹. Os cálculos realizados para quantificação dos níveis de FB₁ foram baseados na área dos picos e comparados com as curvas de calibração. As recuperações foram realizadas em dois níveis, 10 e 20 ng g⁻¹ em 5 replicatas.

4.6 Análises dos resultados

Foram determinadas as medidas de posição e dispersão (média, variância e desvio padrão) dos resultados obtidos no experimento. Os dados obtidos foram utilizados para determinar o coeficiente de correlação de Pearson (r) entre as concentrações de FB₁ nas diversas amostras, estimativa de ingestão de FB₁, relação Sa/So e as demais variáveis estudadas, ao nível de 5% de significância. Os procedimentos estatísticos foram efetuados de acordo com Berquó; Souza; Gotlieb (1981).

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Avaliação da ingestão alimentar populacional

5.1.1 Inquérito Recordatório de 24 horas

Uma das formas de avaliar a exposição às fumonisinas em humanos consiste em calcular a ingestão diária estimada através dos níveis de fumonisinas ingeridos em diferentes itens alimentares. O Questionário de Inquérito Recordatório de 24 horas é um método de fácil aplicação, adequado à descrição de médias de consumo alimentar de um grupo de indivíduos (THOMPSON; BYERS, 1994).

Na Tabela 10 são apresentados os dados de consumo de derivados de milho nas 24 horas precedentes às coletas de materiais biológicos no Grupo A e B respectivamente.

Tabela 10- Número de indivíduos pertencentes aos Grupo A e Grupo B que informaram o consumo médio de milho e derivados no dia anterior (24 horas anteriores) as coletas de material biológico.

Massa consumida (g)	Grupo A (Coletas)				Grupo B
	A	B	C	D	
0-50	51	43	47	10	11
51-100	11	13	4	2	1
101-150	8	5	1	1	1
151-200	2	3	1	0	2
201 ou mais	2	7	3	2	5

Grupo A: Pirassununga/SP; Grupo B: Erval Velho/SC.

No total, 74 voluntários responderam ao questionário na coleta A do Grupo A, 71 na coleta B, 56 na coleta C e 15 na coleta D. No Grupo B, 20 voluntários declararam o consumo de derivados de milho no dia anterior as coletas. Os resultados obtidos através do Inquérito Recordatório demonstram um baixo consumo de milho e derivados no Grupo A, apresentando a maioria dos voluntários (69%) com consumo igual ou inferior a 50 g. No Grupo B, o consumo de derivados de milho no dia anterior as coletas também foi baixo, com uma razão de 55% dos voluntários com consumo de derivados de milho igual ou inferior a 50 g.

No Grupo A, 6,5% dos indivíduos apresentaram consumo superior a 200 g, enquanto no Grupo B, 25% dos voluntários apresentaram elevado consumo. A variabilidade da dieta do indivíduo está sujeita à grandes variações, influenciada pela diversificação e heterogeneidade da dieta. Além disso, a sazonalidade; dias da semana; sequência da aplicação do inquérito podem induzir erros na avaliação da ingestão (COSTA et al., 2006).

O baixo consumo de derivados de milho pela população estudada corrobora com o estimado *per capita* no Brasil no ano de 2001 e 2002, obtendo valores de consumo de milho e derivados de 53,4 g habitante⁻¹ dia⁻¹ e 57,5 g habitante⁻¹ dia⁻¹ respectivamente (CAPOBIANGO, 2006).

Muitos voluntários não consumiram, ou não recordaram o consumo de produtos à base de milho nas últimas 24 horas. A avaliação da ingestão alimentar através do QIR-24h está sujeita a possíveis erros podendo ser devido a interpretação dos tipos de alimentos descritos no questionário, o peso estimado; à sazonalidade da alimentação e também com a variação intrapessoal.

5.1.2 Frequência Alimentar

Dos indivíduos que se disponibilizaram a participar do experimento, apenas 39 do Grupo A (21 mulheres e 18 homens) e 20 do Grupo B (6 mulheres e 14 homens) participaram na descrição dos hábitos alimentares. O peso médio dos voluntários foi de 74 kg variando de 48 a 120 kg em ambos os grupos.

Na Tabela 11 são mostrados os valores estimados da frequência de consumo de milho dos participantes. A ingestão alimentar foi calculada mensalmente, pois alguns produtos avaliados não eram consumidos diariamente pelo grupo de voluntários.

Tabela 11 – Consumo médio mensal de derivados de milho (g mês⁻¹ hab⁻¹) por voluntário declarado através do QFA obtidos nos Grupos A (Pirassununga) e B (Erval Velho).

Produto	Média de consumo (g mês ⁻¹ hab ⁻¹)	
	Grupo A	Grupo B
Polenta	457	9.648
Cuscuz	661	0
Salgadinho de milho	157	13
Pipoca	716	186
Bolo ou pão de milho	446	156
Creme de milho	43	0
Farinha de milho amarela	340	261
Milho enlatado	111	30
Milho cozido	30	66
Canjica	48	20
Flocos de milho	340	54
Somatória dos produtos à base de milho	3.349	10.434

Grupo A: Pirassununga/SP; Grupo B: Erval Velho/SC.

Os produtos à base de milho que apresentaram maior consumo pelos indivíduos do Grupo A foram a pipoca com média de 716 g mês⁻¹ hab⁻¹, seguido pelo cuscuz, polenta e bolo ou pão de milho. No Grupo B, o elevado consumo de derivados de milho é evidenciado pela estimativa do consumo de polenta, 9.648 g mês⁻¹ hab⁻¹ representando 92% do consumo total de derivados de milho pelo universo populacional avaliado. O consumo de derivados de milho pelo Grupo B é similar a regiões com elevada exposição a FB₁ de áreas rurais da África do Sul, onde o consumo estimado é de 11.370 e 13.680 g mês⁻¹ hab⁻¹ em Bizana e Cetane respectivamente (SHEPHARD; VAN DER WHESTHUIZEN; SEWRAM, 2007). Esse valor também é comparado a estudo realizado em população mexicana, onde o consumo de tortilhas foi estimado em 9.750 g mês⁻¹ hab⁻¹ (GONG et al., 2008).

5.1.2.1 Outras informações importantes

O local onde são feitas as refeições é uma informação importante na descrição do perfil alimentar dos participantes. Em algumas das questões abordadas, o número total de observações não alcança 100%, pois nem todos os entrevistados responderam a todas as questões.

A maior parte da população estudada faz a primeira refeição do dia em casa (Tabela 12). No almoço, grande parte se alimenta no restaurante universitário pela proximidade ao local de trabalho, mas também muitos se alimentam em suas próprias residências, assim como no jantar. O número total de indivíduos que responderam a pergunta nos Grupos A e B foi 153.

Tabela 12 – Número de indivíduos dos Grupos A e B que descreveram através do QFA o local onde geralmente fazem suas refeições.

	Café da manhã	Almoço	Jantar
Não faz a refeição	7	1	2
Casa	42	24	44
Trabalho	1	1	-
Restaurante Universitário	-	22	-
Outro restaurante	-	2	-
Escola	1	1	-
Não responderam	-	-	5

A origem dos alimentos fornece informações importantes sobre o risco de contaminação dos produtos. Na população avaliada, grande parte compra os alimentos no supermercado, padaria e sacolão, mas também alguns deles têm produção própria e outros,

compram de ambulantes (Tabela 13). É importante destacar que os alimentos produzidos sem fiscalização geralmente não tem um controle sobre a qualidade dos produtos, aumentando o risco de contaminação e a exposição às toxinas. No total, 98 indivíduos responderam a esse questionário.

Tabela 13 – Número de indivíduos que descreveram a origem dos alimentos fornecidos pelos voluntários e a frequência de compra em cada local.

	Compra sempre	Compra às vezes	Compra raramente	Não compra
Supermercado	50	1	-	-
Ambulante	7	2	12	30
Produtor	1	6	4	40
Produção própria	6	3	7	35
Sacolão	13	10	6	22
Padaria	21	18	3	9

Dos 51 voluntários que responderam o questionário, 17 pessoas não têm nenhum conhecimento sobre fungos e micotoxinas; 3 tem poucas informações; 20 têm algum conhecimento e 1 indivíduo conhece apenas sobre fungos.

Quanto aos problemas causados pelos fungos, 17 indivíduos não têm conhecimento sobre o assunto; 5 conhecem pouco; 22 conhecem alguns problemas causados por fungos e 6 indivíduos não responderam ao questionamento. Quanto ao descarte dos alimentos visualmente contaminados com fungos (bolores), 47 pessoas responderam que descartam todo o alimento; 1 pessoa descarta somente a parte contaminada e 3 pessoas consomem o todo o alimento, sem descarte.

Com respeito ao conhecimento sobre prevenção da contaminação de fungos, 15 pessoas não conhecem nenhuma forma de prevenção; 2 conhecem muito pouco e 31 indivíduos tem algum conhecimento sobre formas de preservação.

Essas informações são importantes na avaliação do perfil dos voluntários e a relação com a exposição à contaminação. Ressalta-se que grande parte dos participantes não tem conhecimento sobre a contaminação, bem como a produção de micotoxinas. Além disso, nem todos os participantes descartam os alimentos com contaminação aparente, evidenciando a exposição e os possíveis danos causados pelos fungos.

Muitas vezes, apenas os alimentos analisados não esclarecerem as informações de forma precisa e o levantamento do perfil do participante diz respeito às atitudes que podem levar a um maior risco de contaminação, obtendo informações importantes na avaliação da exposição à FB₁.

5.1.3 Análises de resíduos de FB_1 e biomarcadores

5.1.3.1 Alimentos

5.1.3.2 Determinação de FB_1 em derivados de milho

5.1.3.2.1 Avaliação do método

Os valores de LD e LQ em produtos a base de milho foram respectivamente 30 e 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e o coeficiente de determinação foi 0.9996. A Tabela 14 mostra os resultados de 3 diferentes dias de recuperações de FB_1 em amostras de milho (fubá, pipoca, polenta, milho enlatado e sucrilhos) fortificados com FB_1 .

Tabela 14 - Recuperação de fumonisina B_1 em amostras fortificadas em produtos a base de milho

Produto	Nível de fortificação ^a ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Média ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	DPR ^b (%)	Recuperação ^c (%)
Fubá	100	78,7	16,8	78,7
	250	194,6	11,0	77,9
	500	422,5	22,9	84,5
	1.000	832,9	7,7	83,3
Pipoca	100	78,5	6,7	78,5
	250	259,0	12,5	103,6
	500	450,6	19,4	89,3
	1.000	988,1	14,0	98,7
Polenta	100	77,6	4,0	77,6
	250	230,6	25,2	92,2
	500	511,6	15,9	102,3
	1.000	987,9	3,0	98,8
Milho enlatado	100	86,6	13,3	86,6
	250	210,2	6,3	80,5
	500	488,3	9,8	97,6
	1.000	911,5	6,0	91,1
Sucrilhos	100	90,8	5,6	90,8
	250	229,8	10,1	91,9
	500	439,8	4,2	87,9
	1.000	854,0	14,7	85,4

^a Cada nível de fortificação foi avaliado em três diferentes dias.

^b Desvio padrão relativo, $n=60$.

^c Média das recuperações em triplicata em três dias, $n= 60$.

As recuperações médias variaram entre 77,6 e 103,6%, com desvio padrão relativo (DPR) entre 3,0 e 25,2 %. Apesar de não ter sido usado material certificado no presente

estudo, as recuperações e valores de DPR obtidos foram satisfatórios para os quatro níveis de fortificação em cinco produtos diferentes de milho, de acordo com a Regulação da Comissão Europeia No. 401/2006 (EUROPEAN COMMUNITY, 2006). Recuperações similares e valores de DPR foram relatados por Scaff; Scussel (2004) para farinha de milho em flocos, sucrilhos e pipoca, e por Martins et al. (2012) para fubá, farinha de milho em flocos, pipoca e sucrilhos. Os autores utilizaram o mesmo método de extração como usado no presente experimento e descrito por Shephard et al. (1990). As recuperações médias também foram similares ao encontrado por Shephard et al. (1990) para produtos a base de milho, entretanto os procedimentos de recuperação foram realizados pela fortificação no extrato purificado, e não em amostras de milho.

5.1.3.2.2 Avaliação de FB₁ em amostras de alimentos

Cento e vinte amostras coletadas do Grupo A e dezessete do Grupo B foram coletadas e analisadas em relação as concentrações de FB₁ em fubá, farinha de milho em flocos, pipoca, polenta e sucrilhos (Tabela 15).

Tabela 15 - Níveis de fumonisina B₁ em amostras coletadas das residências de voluntários.

Produto	Níveis de Fumonisina B ₁ (µg kg ⁻¹) ± DP						NMP
	Grupo A			Grupo B			(µg kg ⁻¹)
	<i>N</i>	<i>n</i>	Média ± DP	<i>N</i>	<i>n</i>	Média ± DP	Brasil
Fubá	32	25 (78)	474,6 ± 264,6	7	4 (57)	232,3 ± 96,0	2.500
Farinha de milho em flocos	25	19 (76)	247,0 ± 133,4	-	-	-	2.000
Pipoca	39	32 (82)	278,3 ± 221,3	4	2 (50)	1.737,6 ± 1.537,7	2.000
Polenta	2	2 (100)	181,6 ± 46,1	6	0	ND	2.000
Milho enlatado	8	2 (25)	111,5	-	-	-	2.000
Sucrinhos	14	7 (50)	103,5	-	-	-	2.000

N: total de amostras analisadas.

n: Concentrações de amostras acima do limite de detecção (LD).

NMP: Nível máximo permitido.

A incidência de contaminação no Grupo A foi em média de 72% dos produtos de milho em geral avaliado, sendo superior ao encontrado nos alimentos provenientes do Grupo B, 35%. A maior concentração de FB₁ no Grupo A foi encontrada em fubá com média de 474,6 µg kg⁻¹ e 78% das amostras apresentaram níveis quantificáveis de FB₁. Nas amostras do

Grupo B, a pipoca foi o item alimentar mais contaminado, contendo em média $1.737,6 \mu\text{g kg}^{-1}$. Uma das amostras de pipoca do Grupo B testadas para FB_1 no experimento apresentaram concentrações acima dos limites de tolerância estabelecidos no Brasil ($2.500 \mu\text{g kg}^{-1}$ para fubá e $2.000 \mu\text{g kg}^{-1}$ para outros produtos de milho) (BRASIL, 2011). Entretanto, duas amostras de fubá e duas amostra de pipoca mostraram níveis de FB_1 maiores que o proposto pela legislação europeia ($1.000 \mu\text{g kg}^{-1}$) (EUROPEAN COMMUNITY, 2006).

Nas Figuras 16 e 17 podem ser observados os cromatogramas obtidos com amostras de fubá e pipoca respectivamente, naturalmente contaminadas.

Figura 16 - Cromatograma de amostra de pipoca contaminada com $100 \mu\text{g kg}^{-1}$ de FB_1 (LQ).

Figura 17-Cromatograma amostra de polenta contaminada no nível de $100 \mu\text{g kg}^{-1}$ de FB_1 (LQ).

O conteúdo de FB_1 encontrado nesse estudo foi muito menor que estudos prévios realizados em São Paulo, onde os níveis de FB_1 variaram de 1.100 a $15.300 \mu\text{g kg}^{-1}$ em fubá e de 500 a $7.200 \mu\text{g kg}^{-1}$ em farinha de milho em flocos (BITTENCOURT et al., 2005). Outros estudos preliminares reportaram elevados níveis de FB_1 em produtos derivados de milho no Brasil (SCAFF; SCUSSEL, 2004; VAN DER WESTHUIZEN et al., 2003), indicando que o menor conteúdo encontrado no presente estudo pode ser consequência de melhores práticas de controle de qualidade pelas empresas de processamento de produtos de milho

no estado de São Paulo, para cumprir com a regulação vigente para fumonisinas. As diferenças nos níveis de ação de fumonisinas em todo o mundo reflete a preocupação geral de que os governos têm sobre os potenciais efeitos das micotoxinas sobre a saúde humana e suas implicações econômicas (FAO, 2003).

5.1.3.3 Estimativa da Ingestão Diária

O consumo médio de cada tipo de derivados de milho e cada peso corpóreo individual foram utilizados para calcular a ingestão diária provável de FB₁, e os resultados são demonstrados na Tabela 16.

Tabela 16 - Ingestão diária provável (IDP) de fumonisina B₁ estimada para os voluntários pertencentes aos Grupos A e B.

Tipo de alimento	Grupo A			Grupo B		
	N	Média (ng kg ⁻¹ p.c. dia ⁻¹) ± DP ^b	Variação ^c	N	Média (ng kg ⁻¹ p.c. dia ⁻¹) ± DP ^b	Variação ^c
Fubá	17	23,4 ± 26,5	0,5 - 64,8	2	7,0 ± 3,5	3,5-10,6
Pipoca	25	13,9 ± 9,2	1,8 - 35,6	12	122,9 ± 165,9	0,8-590,1
Polenta	26	31,9 ± 43,4	2,3 - 144,9	6	227,3 ± 216,0	7,2-567,8
Milho enlatado	24	5,0 ± 7,2	1,0 - 15,8	-	-	-
Sucrilhos	17	12,9 ± 18,5	1,0 - 61,1	-	-	-
Cuscuz ^d	13	10,6 ± 7,4	1,0 - 22,3	-	-	-
Bolo ou pão de milho ^d	21	28,8 ± 43,6	0,8 - 139,2	-	-	-
Total produtos de milho		63,3 ± 57,9	0,5 - 243,8		190,1 ± 201,7	0,8-590,1

^a Calculados pelo tamanho das porções declaradas pelos voluntários para cada produto de milho, de acordo com as medidas usuais: fatias de polenta ou colheres para milho enlatado, fubá e farinha de milho em flocos na preparação de alimentos processados nas residências.

^b Variação expressa por indivíduos que declararam consumir os tipos de alimentos do estudo pelo menos uma vez ao mês.

^c Média calculada com valores diferentes de zero.

^d Produtos derivados de milho preparados nas residências a base de fubá.

N: Número de indivíduos que declaram consumir o tipo de alimento pelo menos uma vez ao mês.

A IDP de FB₁ em voluntários de Pirassununga (Grupo A) foi 63,3 ng kg⁻¹ peso (p.) corpóreo (c.) dia⁻¹, que corresponde a 3,1 % da Ingestão Diária Máxima Tolerável (IDMT) de 2.000 ng kg⁻¹ p.c. dia⁻¹ recomendado para fumonisinas pelo *Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives* (JECFA, 2011). Houve uma baixa amostragem no Grupo B

resultante do número de amostras disponíveis no dia das coletas de alimentos. A IDP do grupo apresentou uma média de $190,1 \text{ ng kg}^{-1} \text{ p.c. dia}^{-1}$ o que corresponde a 9,5% do IDMT.

Apesar disso, o consumo de FB_1 obtido no presente estudo foi muito menor que previamente relatado por outros autores no país. Machinski; Valente Soares (2000) avaliaram a incidência de fumonisinas em produtos de milho na mesma região estudada no presente trabalho, e encontraram um consumo de FB_1 de $1.276 \text{ ng kg}^{-1} \text{ p. c. dia}^{-1}$, representando 63,8% da IDMT. Um estudo similar conduzido com produtos a base de milho no estado do Paraná, apresentou uma IDP_M de $950 \text{ ng kg}^{-1} \text{ peso corpóreo}^{-1} \text{ dia}$, representando 47,5% da IDMT (MORENO et al., 2009). No estado de Santa Catarina, a IDP_M foi estimada em $1.600 \text{ ng kg}^{-1} \text{ p. c. dia}^{-1}$ de produtos a base de milho, que representa 80% da PMTDI (VAN DER WESTHUIZEN et al. 2003). Em comparação a esses trabalhos anteriormente realizados, os resultados obtidos pelo estudo em tela indicam que as empresas de manipulação de alimentos a base de milho melhoraram as práticas de controle de qualidade em relação às fumonisinas no estado de São Paulo. Outro estudo realizado recentemente indicou uma menor exposição de FB_1 também no estado do Paraná, com uma IDP_M de $120 \text{ ng kg}^{-1} \text{ p. c. dia}^{-1}$, representando 6,0% da IDMT (MARTINS et al., 2012). Entretanto, é difícil a comparação entre os resultados obtidos e aqueles reportados por outros autores, pois todos os estudos mencionados estimaram os valores de IDP em função das análises de produtos comerciais, e não pela determinação de fumonisina em produtos coletados das residências dos voluntários, e pela aplicação do QFA.

5.1.3.4 Análise de Ácido Fólico

O ácido fólico é uma vitamina hidrossolúvel, e as reservas corporais são baixas, podendo produzir uma deficiência de folato (BAILEY, 2009). O ácido fólico é o fator de risco mais importante para defeitos no tubo neural. No Brasil são escassas as publicações sobre a prevalência do problema, entretanto dados disponíveis estimam incidência de 0,83: 1.000 a 1,87 a 1.000 (SANTOS; PEREIRA, 2007). Para a redução nessa incidência, a ANVISA estabeleceu em 2002 níveis mínimos para fortificação de ferro e ácido fólico em farinhas de trigo e milho de $1.500 \mu\text{g kg}^{-1}$ (BRASIL, 2002).

Na Tabela 17 são apresentados os valores de ácido fólico ($\mu\text{g kg}^{-1}$) presente em farinha de milho coletadas das residências dos voluntários.

As concentrações de ácido fólico nas amostras de farinha de milho variaram de $< 0,3 \mu\text{g kg}^{-1}$ (LQ) a $1.705 \mu\text{g kg}^{-1}$, com média de $641,5 \pm 455,2 \mu\text{g kg}^{-1}$. Somente uma amostra (4,2%) apresentou nível de ácido fólico acima do valor mínimo estabelecido pela legislação (BRASIL, 2002). As marcas e prazos de validade dos produtos não foram solicitados aos voluntários, não conhecendo-se o tempo que os alimentos estavam estocados nas

residências. Além disso, os baixos níveis de ácido fólico detectados nos alimentos, foram armazenados a -20°C por 2 anos, podendo também haver perdas causadas durante a estocagem. Os resultados obtidos no presente trabalho são inferiores a outros estudos anteriormente realizados avaliando amostras comercialmente disponíveis, como Soeiro et al. (2010) que encontraram teores de ácido fólico em farinha de milho de 2.940 a $3.280\text{ }\mu\text{g kg}^{-1}$ em três diferentes marcas disponíveis no comércio de Campinas/SP.

Tabela 17 - Níveis ácido fólico em amostras de farinha de milho avaliadas.

Amostra	Ácido fólico ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
1	1.130
2	636
3	1.705
4	436
5	<LQ
6	623
7	884
8	<LQ
9	340
10	578
11	1.170
12	1.346
13	584
14	222
15	<LQ
16	232
17	852
18	521
19	1.031
20	540
Média	$641,5 \pm 455,19$

¹ LQ: Limite de quantificação do método ($0,3\text{ }\mu\text{g kg}^{-1}$).

Considerando os dados obtidos pelo questionário de frequência alimentar, a estimativa de ingestão de ácido fólico ingerido por meio da farinha de milho na população estudada é em média de $6,3 \pm 13,8\text{ }\mu\text{g kg}^{-1}$. Para termos uma estimativa mais precisa do problema,

outros alimentos deveriam ser considerados, entretanto com a farinha de milho a ingestão diária é de apenas 1,5 % do recomendado pela FAO de $400 \mu\text{g dia}^{-1}$ para adolescentes e adultos entre 10 a 65 anos (JEFCA, 2001). No Brasil, Amaya-Farfan et al. (2001) sugere que o recomendado seja de $400 \mu\text{g dia}^{-1}$ sendo para gestantes recomendado de $600 \mu\text{g dia}^{-1}$ com referência em Food and nutritional board e o Institute of Medicine, da academia nacional de ciências dos EUA. Tinker et al. (2010) estimaram a ingestão de ácido fólico em 2.617 mulheres entre 15 a 44 anos nos Estados Unidos e apenas 23.8% consomem o recomendado pela FAO. Estudo avaliando a estimativa de ingestão do ácido fólico em mulheres gestantes estimaram o consumo em $693 \mu\text{g dia}^{-1}$ no Rio de Janeiro (FONSECA et al., 2003).

As menores concentrações obtidas no presente trabalho podem ser devidas às perdas de ácido fólico nas farinhas disponíveis nas residências dos voluntários, em diferentes condições e tempo de armazenagem, em comparação aos produtos disponíveis no comércio. Este resultado ressalta a necessidade de tecnologias para prolongar a vida útil do ácido fólico adicionado à farinha de milho, e de orientações aos consumidores sobre práticas para conservação dos produtos após a abertura da embalagem.

5.2 Biomarcadores em Materiais Biológicos

5.2.1 Urina

A avaliação de biomarcadores de fumonisina B₁ em urina foi realizada apenas em voluntários do Grupo A (residentes de Pirassununga-SP) pela dificuldade de coleta e transporte de amostras referentes ao Grupo B.

5.2.1.1 Análise de Creatinina

Na Tabela 18 podem ser visualizados os resultados de creatinina em urina dos voluntários.

Tabela 18 - Análise de creatinina na urina em homens e mulheres avaliados em diferentes coletas.

Coletas	Urina de homens			Urina de mulheres		
	Variação (mg dL ⁻¹)	Média (mg dL ⁻¹) ±DP	CV (%)	Variação (mg dL ⁻¹)	Média (mg dL ⁻¹) ±DP	CV (%)
A	13,2 - 151,5	151,5 ± 95,3	0,62	33,9 - 324,5	127,0 ± 80,1	0,63
B	32,5 - 385,1	198,2 ± 108,1	0,54	47,5 - 247,8	123,9 ± 48,5	0,39
C	55,2 - 420,5	193,9 ± 85,8	0,44	23,2 - 438,9	140,5 ± 86,5	1,07
D	37,2 - 305,1	148,2 ± 72,9	0,44	37,5 - 343,6	139,2 ± 85,3	0,61
Média	13,2 - 343,7	172,7 ± 82,0	0,49	30,4 - 296,6	132,5 ± 55,3	0,50

A concentração de creatinina presente em urina foi determinada em função da correção do volume e dos níveis de toxina na urina. O kit determina como níveis normais de creatinina de 39 a 259 mg dL⁻¹ para homens e 28 a 217 mg dL⁻¹ para mulheres. Comparado com esses limites, 7 amostras de urina de homens e 6 amostras de urina de mulheres apresentaram níveis alterados. Em urina de mulheres a creatinina obtida em amostragem única (primeira da manhã) variou de 23,2 a 438,9 mg dL⁻¹ com uma média de 132,5 mg dL⁻¹. Os resultados de creatinina em urina de homens variaram de 13,2 a 420,5 mg dL⁻¹, com média de 172,7 mg dL⁻¹.

Em estudo realizado nos Estados Unidos, observaram que a idade e etnia/raça interferem nesses níveis. Na fronteira México- Estados Unidos, o nível de creatinina na urina dos voluntários foi de 44,3 mg dL⁻¹ para indivíduos de 20 a 29 anos e de 129,3 mg dL⁻¹ de 50 a 59 anos. Entre não-hispânicos brancos a média foi de 55,8 mg dL⁻¹ e para não-hispânicos negros a média foi de 57,5 mg dL⁻¹ (BAR et al., 2004). Os resultados obtidos em relação aos níveis de creatinina foram utilizados no cálculo da determinação de FB₁ na urina, com o objetivo de corrigir o volume das amostras.

5.2.1.2 Determinação de FB₁

5.2.1.2.1 Avaliação do Método

O coeficiente de correlação (r^2) obtido foi de 0,9221 e 0,9952 preparados com extrato obtido a partir de amostra de urina e com solvente respectivamente (Figura 18). Pode ser observado um pequeno efeito da matriz, mas que foi compensado pela construção das curvas e cálculos, diluídos em extrato de amostras de urina.

Figura 18 - Curva padrão utilizada para avaliação de FB₁ em urina.

O limite de determinação da metodologia foi de 30 ng mL^{-1} em solução, calculado em 600 pg mL^{-1} de urina na amostra inicial. O limite de quantificação foi determinado pela concentração que produz uma relação sinal ruído de 10:1, apresentando 80 ng mL^{-1} no extrato final ou seja, $1,5 \text{ ng mL}^{-1}$ na amostra. Esse limite está de acordo com os limites obtidos por outros trabalhos de avaliação de fumonisinas em urina, realizados por derivatização com OPA e detecção por cromatografia líquida de alta eficiência (SHETTY; BHAT, 1998; SHEPHARD; THIEL; SYDENHAM, 1992).

As recuperações foram analisadas pela preparação das amostras em triplicata em dois níveis de contaminação de FB_1 , em três diferentes dias. As médias obtidas nos ensaios são apresentadas na Tabela 19.

Tabela 19 - Recuperações obtidas através da do método de determinação de FB_1 em urina.

FB_1 adicionada (ng mL^{-1})	FB_1 encontrada		
	1 dia	2 dia	3 dia
50	53,1	45,5	45,5
50	52,0	36,9	30,9
50	33,2	52,2	50,3
média	46,1	44,9	42,3
SD %	9,1	6,3	8,6
Recuperação %	92,2	89,8	84,5
200	224,34	217,85	236,68
200	228,29	209,21	220,00
200	195,68	170,31	200,00
média	216,1	199,1	218,9
SD %	14,5	20,1	13,0
Recuperação %	108,5	99,6	109,5

As recuperações obtidas demonstraram uma boa eficiência e precisão do método de análise, com média de 88 % para o nível de 50 ng mL^{-1} e de 105% ao nível de 200 ng mL^{-1} estando de acordo com o recomendado pela UE (FDA, 2012).

A seletividade do método de detecção foi avaliada pela ausência de picos interferentes próximo ao tempo de retenção da FB_1 . Na Figura 19 e 20 são demonstrados cromatogramas obtidos com extrato de amostras de urina sem contaminação e do padrão de FB_1 demonstrando o tempo de retenção do analito a 9,8 min.

Figura 19 - Cromatograma de amostra de urina sem contaminação.

Figura 20 - Cromatograma do padrão de FB1 na concentração de 125 ng mL⁻¹ diluída em fase móvel.

5.2.1.2.2 Determinação de FB₁ em amostras de urina

Na Figura 21 é apresentado um exemplo de cromatograma obtidos a partir de amostra de urina naturalmente contaminada com fumonisina B₁.

Figura 21 - Cromatograma obtido através de amostra de urina contaminada com 3,6 ng mL⁻¹.

Na Tabela 20 são demonstrados os resultados obtidos das médias, desvio padrão e a frequência de FB₁ em urina nos voluntários do Grupo A, em cada coleta realizada.

Tabela 20 - Resultados obtidos de FB₁ em urina nos indivíduos avaliados nas diferentes coletas.

	Coletas			
	A	B	C	D
<i>N</i>	77	68	60	46
n (frequência %)	19 (24,6)	26 (38,2)	8 (13,3)	6 (13,0)
Média* (ng mL ⁻¹)	3,04 ± 1,85	4,52 ± 4,38	5,73 ± 2,59	2,33 ± 1,41
Média*(ng mg ⁻¹ de creatinina)	3,12 ± 3,08	3,41 ± 3,86	5,02 ± 2,53	1,74 ± 0,90

* Média calculada com valores diferentes de zero.

N – n° de amostras total

N – n° de amostras positivas

Os níveis de FB₁ apresentaram uma média de $3,81 \pm 3,15$ ng mL⁻¹ com incidência de 23,5% nas 251 amostras avaliadas nas 4 coletas. Comparando os períodos avaliados, na Coleta C observa-se níveis mais elevados, entretanto o baixo número de amostras avaliadas impossibilita uma relação estatística entre as coletas.

Esses níveis demonstraram-se inferiores aos apresentados em estudos no México onde obteve-se uma incidência de contaminação por FB₁ em 75% das 75 amostras estudadas, com níveis variando de ND a 9.312 pg mL⁻¹ (GONG et al., 2008). No norte da Nigéria foram detectados níveis de FB₁ em 13 % das 16 amostras avaliadas com níveis médios de 4,6 ng mL⁻¹ (EZEKIEL et al., 2014). Apesar disso, os resultados obtidos no trabalho em tela foram maiores que os encontrados por Abia et al. (2013) que detectaram FB₁ na urina em 3% dos 145 voluntários soro-positivos de HIV e em 3% dos 30 voluntários soro-negativos, com níveis médios de 0,63 ng mL⁻¹. No Brasil não há relatos anteriores de estudos avaliando a incidência de fumonisinas na urina de seres humanos.

Com a normalização com a creatinina urinária, a média obtida foi de $3,19 \pm 3,15$ ng mg⁻¹ de creatinina. Em outro estudo realizado, Van der Westhuizen et al. (2011), os autores observaram menores níveis encontrados na urina, com média de 470 pg mg⁻¹ de creatinina avaliados por cromatografia acoplada a espectrometria de massas. Os níveis encontrados na urina são resultantes da exposição recente, não sendo uma avaliação de frequência de exposição. Estudos realizados em humanos, estimam que a FB₁ possui um tempo de meia-vida de menos de 48 h quando consumido em 3 dias consecutivos e entre 48 e 72 horas quando consumido por 6 dias consecutivos (RILEY et al., 2012).

A absorção da FB₁ estimada é geralmente inferior a 6%, com menos de 1% recuperada em urina (SHEPHARD; VAN DER WHESTHUIZEN; SEWRAM, 2007). Em estudo realizado, a fumonisina eliminada através da urina foi estimada em 0,075% de média

(0,054 - 0,104%) (VAN DER WHESTHUIZEN, et al., 2011). Riley et al. (2012) observaram uma eliminação através da urina de 0,5% do total ingerido avaliado em 8 voluntários sob condições controladas. A baixa absorção e consequente baixa biodisponibilidade das fumonisinas pode ser proveniente do baixo transporte ao longo do epitélio do intestino e também a associação das fumonisinas com o conteúdo intestinal permanece incerto (DILKIN et al., 2010).

Na Figura 22 são apresentados os dados dos 59 participantes avaliados ao menos em uma das 4 coletas realizadas, com média de FB₁ em urina/ mg de creatinina obtidas. Não houve um comportamento linear do número de amostras corrido em relação aos níveis de creatinina, sendo a maior parte dos voluntários (30,5%) apresentou níveis de 1 a 2 ng mg⁻¹ de creatinina na urina.

Figura 22 - Número de indivíduos com contaminação média de FB₁ em urina.

5.2.1.3 Avaliação dos níveis de Esfinganina e Esfingosina

5.2.1.3.1 Avaliação do método

Na Tabela 21 são mostrados os parâmetros de validação do método de Sa e So em urina, preparados em fase móvel e em extrato de urina de homem e de mulheres. No artigo onde originalmente está descrita a metodologia (LEE et al., 2011), os limites de detecção e quantificação também são inferiores para urina de homens. Os LQ obtidos no mesmo trabalho foram de 1,5 e 2,16 ng mL⁻¹ para esfinganina e em urina de homem e mulheres respectivamente, e em relação a esfingosina os níveis foram em média 3,33 ng mL⁻¹ em urina de homens e 3,72 ng mL⁻¹ em urina de mulheres. Os autores descrevem que os maiores níveis de LDs e LQs em urina de mulheres foram devido aos efeitos de componentes endógenos.

Tabela 21 - Validação do método otimizado para determinação de esfinganina (Sa) e Esfingosina (So) em urina.

Parâmetro analítico	Padrão		Urina de Homens		Urina de mulheres	
	Sa	So	Sa	So	Sa	So
r^a	0,993	0,994	0,995	0,990	0,995	0,995
LD ^b	0,16	0,21	0,35	0,50	0,83	0,70
LQ ^c	0,55	0,71	1,17	1,67	2,77	2,35

^a Coeficiente de correlação

^b Limite de detecção (ng mL⁻¹)

^c Limite de quantificação (ng mL⁻¹)

Os coeficientes de correlação (r^2) obtidos para Sa e So apresentaram boa reprodutibilidade do método utilizado, com r^2 superior a 0,990. Além disso, a seletividade também foi verificada e demonstrou a ausência de picos próximos ao tempo de retenção do So (5,3 min) e Sa (6,4 min) com uso do método selecionado.

Para avaliação do efeito de matriz, foram preparadas curvas padrões construídas com extrato de urina obtida a partir dos procedimentos realizados em amostras (Figura 3). Na Figura 23 pode ser observado um efeito de matriz, comparado com a curva preparada em extrato e em fase móvel, entretanto as quantificações foram realizadas pelas curvas preparadas em extrato, considerando esse efeito tanto em urina de homens quanto mulheres.

Figura 23 - Curva padrão utilizada para avaliação de FB₁ em urina.

Na Tabela 22 estão apresentadas as recuperações obtidas a partir de três diferentes níveis de contaminação, preparados em triplicata em três diferentes dias para a quantificação de esfinganina e esfingosina em urina de homens e mulheres.

Tabela 22 - Recuperações obtidas com o método de detecção de esfinganina (Sa) e esfingosina (So) em urina de homens e mulheres.

Urina de mulheres			Urina de homens	
Adicionado (ng mL ⁻¹)	Sa Detectado (ng mL ⁻¹)	So Detectado (ng mL ⁻¹)	Sa Detectado (ng mL ⁻¹)	So Detectado (ng mL ⁻¹)
5	4,7	5,6	3,8	4,1
5	3,9	4,4	4,2	4,8
5	5,4	5,2	4,6	5,2
Média	4,5	4,8	4,3	4,7
CV (%) ^a	14,9	13,1	16,0	16,0
Recuperação (%) ^b	90,9	96,8	83,5	88,8
20	20,4	21,0	17,1	14,5
20	15,6	15,0	16,3	19,4
20	15,6	16,7	16,6	18,7
Média	17,6	17,0	16,7	18,1
CV (%) ^a	19,1	16,0	14,2	17,6
Recuperação (%) ^b	88,2	90,4	94,5	90,6
80	66,2	57,8	65,7	61,9
80	93,3	76,0	65,9	70,8
80	69,1	88,1	67,2	68,3
Média	74,0	68,9	66,2	66,3
CV (%) ^a	17,9	18,3	5,2	12,9
Recuperação (%) ^b	92,6	91,0	82,7	92,7

^a Coeficiente de variação.

^b Média das recuperações em triplicate em três dias, $n=27$.

As recuperações médias de esfingosina foram de 92,7% e 90,7% em urina de mulheres e homens respectivamente. A média de recuperações de esfinganina foi de 90,5% em urina de mulheres e 86,9% em urina de homens. Essas recuperações demonstraram

uma boa eficiência do método, de acordo com o estabelecido por Brito et al. (2003), com recuperações estabelecidas de 60 a 115% e coeficiente de variação menor que 20%.

5.2.1.3.2 Determinação de Sa e So em amostras de urina

Todas as análises foram realizadas em duplicata, bem como a quantificação de cada amostra (injeção no sistema CLAE). Um exemplo de cromatograma obtido por amostra de urina apresentando níveis detectáveis de Sa e So pode ser visualizado na Figura 24.

Figura 24 - Cromatograma de determinação de Sa e So em amostra de urina.

Na Tabela 23 podem ser visualizados os resultados obtidos através das determinações dos níveis de Sa, So e relação Sa/So em urina, durante as 4 diferentes coletas entre os diferentes sexos e em combinação.

Os níveis de So, Sa bem como a relação Sa/So foram mais elevadas em urina de mulheres do que amostras de urina de homens. A incidência de Sa quantificável foi mais elevada em mulheres (25%) enquanto que amostras de urina de homens, apenas 10,4%. Em outro estudo realizado com voluntários de Portugal, a frequência de Sa em amostras de urina de mulheres também foi mais elevada, 68,4% (13/19), em comparação com urina masculina, 5,3% (1/19) (SILVA; LINO; PENA, 2009). Da mesma forma, os níveis de esfingosina quantificáveis tiveram uma frequência de 44,8% em amostras de urina de mulheres e de 6,2 % em amostras de urina de homens. No estudo realizado por Silva; Lino; Pena (2009), os autores também observaram maior ocorrência, em amostras de urina de mulheres 94,7%, em comparação com urina de homens 68,4%.

A esfinganina apresentou média de $4,67 \text{ ng mL}^{-1}$ em amostras de urina de mulheres, $1,69 \text{ ng mL}^{-1}$ em urina de homens e $3,91 \text{ ng mL}^{-1}$ em combinação. Esses valores corroboram com os resultados obtidos por Silva; Lino; Pena, (2009), onde os valores obtidos para Sa em urina de mulheres foi de 2,53 e $1,30 \text{ ng mL}^{-1}$ para população urbana e rural respectivamente. Nesse mesmo estudo, foram obtidos níveis de $0,01 \text{ ng mL}^{-1}$ de esfinganina em homens residentes da zona rural e $0,1 \text{ ng mL}^{-1}$ na zona urbana. Em outro trabalho realizado na

Malasia, os autores detectaram níveis de esfinganina em homens saudáveis em média de 11,93 ng mL⁻¹ e para mulheres de 3,24 ng mL⁻¹ (LEE et al., 2011), acima dos resultados obtidos nesse trabalho.

Tabela 23 - Análise de Esfingosina (Sa), Esfingosina (So) e relação Sa/So em urina de seres humanos.

Coletas	N	Esfingosina		Esfinganina		Relação Sa/So
		Positivas (Frequência)	Média	Positivas (Frequência)	Média	
			(ng mL ⁻¹) ± DP		(ng mL ⁻¹) ± DP	
Mulheres						
A	34	15 (44,1)	4,09 ± 2,03	5 (14,7)	6,80 ± 5,03	1,34 ± 0,26
B	28	16 (57,1)	7,89 ± 5,87	13 (46,4)	4,45 ± 2,45	0,69 ± 0,29
C	27	7 (25,9)	4,72 ± 1,49	5 (18,5)	4,36 ± 0,84	1,05 ± 0,29
D	27	14 (51,8)	4,10 ± 1,49	6 (22,2)	3,62 ± 1,16	0,82 ± 0,30
Média	116	52 (44,8)	5,35 ± 3,95	29 (25,0)	4,67 ± 2,92	0,91 ± 0,37
Homens						
A	30	0	-	2 (6,6)	1,71 ± 0,46	-
B	25	2 (8,0)	1,19 ± 0,18	4 (16)	1,92 ± 0,48	0,87 ± 0,10
C	24	1 (4,1)	2,81 ± 0	1 (4,1)	1,22 ± 0	0,43 ± 0
D	17	3 (17,6)	1,92 ± 0,37	3 (17,6)	1,53 ± 0,10	0,82 ± 0,15
Média	96	6 (6,2)	2,09 ± 0,43	10 (10,4)	1,69 ± 0,43	0,77 ± 0,18
Combinado						
A	64	15 (23,4)	4,09 ± 2,03	7 (10,9)	5,35 ± 4,84	1,34 ± 0,26
B	53	18 (33,9)	7,24 ± 5,84	17 (32,0)	3,86 ± 2,41	0,72 ± 0,27
C	51	8 (15,7)	4,48 ± 1,53	6 (11,7)	3,84 ± 1,40	0,95 ± 0,35
D	44	17 (38,6)	3,72 ± 1,60	9 (20,4)	2,93 ± 1,37	0,82 ± 0,26
Média	212	58 (27,3)	5,01 ± 3,87	39 (18,4)	3,91 ± 2,84	0,89 ± 0,35

Os níveis de esfingosina foram em média 5,35 ng mL⁻¹ para urina de mulheres, 2,09 ng mL⁻¹ para homem e de 5,01 ng mL⁻¹ para amostras de ambos os sexos. Esses valores corroboram com os dados obtidos por Silva; Lino; Pena (2009), com concentrações médias apresentadas de 5,89 e 3,85 para esfingosina em urina de mulheres residentes da zona urbana e rural respectivamente (SILVA; LINO; PENA, 2009). Na mesma amostragem, foram obtidos níveis de 0,17 de So em voluntários residentes na zona urbana e 0,42 ng mL⁻¹ em residentes da zona rural. Lee et al. (2011) também observaram níveis médios superiores ao

obtido no presente trabalho para urina masculina e inferiores para urina de mulheres, com médias dos níveis quantificáveis de $5,90 \text{ ng mL}^{-1}$ e de $3,22 \text{ ng mL}^{-1}$ respectivamente, avaliados em indivíduos saudáveis.

O estudo conduzido por Solfrizzo et al (2004) demonstrou que em diferentes regiões, incluindo a região Sul do Brasil, avaliando voluntários com elevada exposição a toxina, os voluntários apresentaram relação de 1,27 na população com IDP de $350 \mu\text{g FBs kg}^{-1}$. A relação Sa/So no presente trabalho apresentou nível de Sa/So mais baixo (0,89) bem como a IDP_M de $63,3 \text{ ng kg}^{-1} \text{ p.c. dia}^{-1}$. Apesar disso, Sancho et al (2011) observaram a relação Sa/So de apenas 0,56 em população com IDP de $1.400 \text{ ng FBs kg p.c.}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ e relação 0,40 em indivíduos com IDP de e $20 \text{ ng FBs kg p.c.}^{-1} \text{ dia}^{-1}$. Segundo SANCHO et al (2011), estudos realizados em humanos demonstram uma baixa correlação entre a ingestão de fumonisinas e a relação Sa/So quando avaliado em animais com baixa exposição, $<1 \text{ mg}^{-1} \text{ kg p.c. dia}^{-1}$ (SANCHO et al., 2011). Dessa forma, a baixa exposição a FB₁ pelo grupo avaliado não induziu efeitos significativos.

A menor incidência de níveis quantificáveis de Sa e So no presente estudo provavelmente é resultante das características da população e dos hábitos alimentares. Os níveis de Sa e So individuais, bem como a relação Sa/So variam de acordo com parâmetros desconhecidos até o momento, sendo relacionados com fatores nutricionais (SHEPHARD; VAN DER WHESTHUIZEN; SEWRAM, 2007; SANCHO et al., 2011). Além disso, o método apresentado por Silva; Lino; Pena, (2009), possui uma maior sensibilidade na metodologia utilizada, detectando níveis mais baixos das bases esfingóides.

5.2.2 Soro

5.2.2.1 Determinação de Fumonisina B₁

5.2.2.1.1 Avaliação do Método

O limite de quantificação do método de determinação de FB₁ em soro foi de 80 pg mL^{-1} e de quantificação o nível mínimo foi de 160 pg mL^{-1} de soro, obtidos através da relação sinal/ruído de 3:1 e 10:1 respectivamente. O método original obteve níveis inferiores ao encontrado nesse estudo, com 2 ng mL^{-1} de soro, avaliando multi-micotoxinas (DEVREESE et al., 2012). Shephard; Thiel; Sydenham (1992), apresentaram com método de determinação de fumonisina B₁ em plasma de ratos por CLAE - fluorescência com uso de OPA, um limite de quantificação do método de 50 ng mL^{-1} .

A partir desses limites, foram delimitados os níveis de diluição para preparação das curvas-padrões. Foram utilizadas as concentrações de 20; 50; 80; 110; 140; 170 e 200 pg mL^{-1} e relacionados com o padrão interno. A construção da curva padrão foi repetida

diariamente e as corridas avaliadas em triplicata. Um exemplo de curva padrão pode ser visualizado na Figura 25.

Figura 25 - Curva padrão utilizada para avaliação de FB₁ em soro.

O coeficiente de determinação (r^2) foi de 0,980831, demonstrando boa reprodutibilidade do método. A equação da reta resultante foi de $y = 1,14596 * x - 1,228$.

Na Tabela 24 podem ser visualizados os resultados de recuperação preparados em sextuplicata em cada nível, em cada um dos três diferentes dias (n=54).

Tabela 24- Recuperações obtidas com o método de detecção de FB₁ em soro humano.

Dias	Nível de fortificação (ng mL ⁻¹)		
	160	800	1.680
1	165,9	854,2	1872,1
2	153,5	875,9	1903,0
3	204,7	865,7	1516,5
média	119,6	865,9	1740,9
DP %	19,3	16,2	3,4
recuperação %	111,4	108,2	109,7

As recuperações foram obtidas com fortificação em amostras com padrões analíticos de FB₁ nos níveis de 160, 800 e 1.680 ng mL⁻¹ com adição do padrão interno a 1.600 pg mL⁻¹. Os resultados demonstram uma boa exatidão do método analítico utilizado, com uma recuperação média de 109,7%.

Na Figura 26 pode ser visualizado um cromatograma obtido pela injeção de padrão interno ¹³C₃₄ – FB₁ e pela fortificação da amostra com FB₁ e FB₂, demonstrando uma boa seletividade do método utilizado.

Figura 26 – Cromatograma de SIM de amostra em branco (adição de 13C34 – FB1 na concentração de 1.600 pg mL⁻¹, seguida de fortificação do extrato com padrões fumonisinas B₁ e B₂ nas concentrações de 800 pg mL⁻¹).

5.2.2.1.2 Determinação em amostras de soro

Neste estudo, foram avaliados no total 221 amostras de soro provenientes das 4 coletas no Grupo A e dos 20 voluntários avaliados do grupo B. Nenhuma das amostras apresentou níveis quantificáveis de FB₁ em soro utilizando o método descrito anteriormente com limite mínimo de 160 pg mL⁻¹. Os baixos níveis de exposição à FB₁ foram confirmados pelos dados obtidos da estimativa de ingestão diária, bem como outros biomarcadores avaliados no presente estudo.

Em humanos não há relatos disponíveis até o momento investigando os níveis de fumonisina B₁ em soro. Estudos realizados com animais experimentais demonstram uma baixa disponibilidade e rápida eliminação da toxina pelo organismo. Em primatas não-humanos foram administrada por gavagem uma dose única de 1,6 mg de fumonisina B₁ kg⁻¹ peso corpóreo, sendo eliminada rapidamente com um tempo de meia-vida durante a fase de eliminação de 40 min (SHEPHARD et al., 2004). Em ratos tratados oralmente, o tempo de meia-vida de eliminação da FB₁ em plasma foi menor que 4 horas e a disponibilidade de FB₁ foi menor que 5% (CAI; TANG; WANG, 2007).

Ratos experimentais foram intoxicados por gavagem uma dose única de 0, 10 ou 25 mg FB₁ kg p.c. ou repetidas doses de 0; 1,0; ou 2,5 mg FB₁ kg p.c. dia⁻¹ por 5 semanas, entretanto nenhuma das amostras apresentou níveis quantificáveis de FB₁ (CAI; TANG; WANG, 2007). Em suínos administrados com 5 mg FB₁ kg p.c. em dose única, a fumonisina foi detectada em plasma entre 30 min e 36 horas de administração. A concentração mais elevada foi observada após 2 horas de intoxicação, com concentração média de 282 µg mL⁻¹ (DILKIN et al., 2010).

Em vacas Holandesas, um estudo avaliou a fumonisina B₁ pela administração intravenosa (0,05 ou 0,2 mg kg⁻¹) e por gavagem (1,0 ou 5,0 mg kg⁻¹). Após a administração intravenosa, o perfil da concentração plasmática de FB₁ sofreu uma rápida diminuição, com queda após 120 min a níveis não detectáveis. A semelhança nos parâmetros farmacocinéticos entre os animais de baixa e alta dosagem sugerem que a distribuição e eliminação da FB₁ não foi dependente da dose a esses níveis de administração da toxina (PRELUSKY et al., 1995).

Além da rápida eliminação da toxina, também pode haver interações da FB₁ absorvida com lipídeos ou proteínas presentes no soro, tornando o complexo não-detectável na forma livre (CAI; TANG; WANG, 2007).

5.2.2.2 Avaliação dos níveis de Esfinganina e Esfingosina

5.2.2.2.1 Avaliação do Método

Na Tabela 25 são apresentadas as recuperações médias obtidas com o método de detecção de esfinganina e esfingosina em soro respectivamente.

Tabela 25 - Recuperações obtidas com o método de detecção de esfinganina e esfingosina em soro.

Adicionado (ng mL ⁻¹)	Esfinganina (Sa)		Esfingosina (So)	
	Detectado (ng mL ⁻¹)	Recuperação (%)	Detectado (ng mL ⁻¹)	Recuperação (%)
2	1,5	75,8	1,7	88,2
2	1,0	71,0	1,7	85,3
2	1,2	62,5	1,8	92,1
Média (ng mL ⁻¹) ^b	1,4	71,2	1,7	88,6
CV (%) ^a	11,2		13,6	
8	6,7	84,4	5,7	71,5
8	5,5	68,8	6,4	80,0
8	6,0	75,3	7,8	97,9
Média (ng mL ⁻¹) ^b	5,9	74,6	6,7	84,6
CV (%) ^a	8,7		14,3	
32	22,9	71,6	24,4	76,4
32	23,4	73,3	26,0	81,4
32	26,0	81,5	28,7	89,7
Média (ng mL ⁻¹) ^b	23,9	74,7	26,1	81,6
CV (%) ^a	6,8		8,0	

^a Coeficiente de variação.

^b Média das recuperações em triplicate em três dias, *n*= 27.

As recuperações obtidas avaliadas apresentaram em média 84,93% de recuperação de esfingosina e 73,50% de esfinganina nos diferentes níveis avaliados (2, 8 e 32 ng mL⁻¹). Essas recuperações estão dentro das exigências determinadas pela União Européia que

recomenda recuperações entre 60 a 120 % com CV menor que 20%, estando de acordo com o presente trabalho (FDA, 2012).

A seletividade do método foi verificada pela injeção branco extraído com solvente seguindo os mesmos procedimentos para a amostras; e também amostras obtidas sem níveis quantificáveis e sem interferentes nos tempos de retenção do So (4,6 min) e Sa (5,4 min). Nas Figuras 27, 28 e 29 são apresentados cromatogramas obtidos através de branco, sem adição de amostra, soro sem níveis quantificáveis de Sa e So e de padrão analítico preparado na concentração de 40 ng mL⁻¹ de Sa e So.

Figura 27 - Cromatograma obtido através de branco realizado sem adição de amostra.

Figura 28 - Cromatograma obtido através de amostra de soro sem níveis quantificáveis de Sa e So.

Figura 29 - Cromatograma obtido através de padrão de Sa e So na concentração de 40 ng mL⁻¹ preparados com extrato de soro

A curva padrão preparada com o extrato de soro obteve um $r^2 = 0,9972$ para esfinganina e $r^2 = 0,9981$ demonstrando uma boa linearidade do método de detecção. A curva preparada com o extrato foi comparada a curva preparada com solvente, demonstrando um efeito de matriz com concentrações mais elevadas (Figura 30).

Os padrões preparados em extrato de soro apresentaram níveis mínimos com S/R de 3:1 de 0,11 e 0,10 ng mL⁻¹ de soro para esfinganina e esfingosina respectivamente. O LQ para esfinganina foi de 0,35 ng mL⁻¹ para esfinganina e 0,33 ng mL⁻¹ para esfingosina em soro.

Figura 30 - Curvas padrões utilizadas para avaliação de esfingosina (a) e esfinganina (b) preparadas com extrato de soro e solvente.

O método descrito por Sancho et al. (2011) com derivatização com OPA e detecção por CLAE-fluorescência, obteve maior sensibilidade em comparação ao presente estudo, apresentando LQs 0,15 e 0,14 ng mL⁻¹ em esfingosina e esfinganina respectivamente.

5.2.2.2.2 Determinação de Sa e So em amostras de soro

Nas Tabelas 26 e 27, são demonstradas as concentrações de esfinganina e esfingosina, bem como a relação Sa/So em soro de indivíduos residentes de Pirassununga e Erval Velho respectivamente.

Tabela 26 - Análise de Esfinganina (Sa), Esfingosina (So) e relação Sa/So em urina de seres humanos no Grupo A.

Coletas	N	So média (ng mL ⁻¹) ± DP	Sa média (ng mL ⁻¹) ± DP	Relação Sa/So	Variação Sa/So
Mulheres					
A	38	2,37 ± 2,79	1,09 ± 0,66	0,81 ± 0,59	0,06 - 3,19
B	31	1,59 ± 0,95	1,05 ± 0,64	0,88 ± 0,57	0,20 - 2,54
C	25	2,88 ± 3,75	1,38 ± 2,77	0,76 ± 2,77	0,18 - 2,09
D	21	1,94 ± 2,77	1,32 ± 2,77	0,79 ± 2,77	0,13 - 1,73
Média	115	2,22 ± 2,50	1,17 ± 0,75	0,63 ± 0,54	0,06 - 2,54
Homens					
A	26	2,22 ± 2,80	1,16 ± 0,87	0,86 ± 0,61	0,08 - 3,19
B	31	2,28 ± 1,48	1,12 ± 0,51	0,71 ± 0,58	0,12 - 2,23
C	15	3,38 ± 3,73	1,41 ± 0,72	0,76 ± 0,54	0,16 - 2,07
D	14	4,70 ± 3,81	1,87 ± 1,42	0,64 ± 0,51	0,13 - 2,03
Média	86	2,85 ± 2,96	1,31 ± 0,90	0,75 ± 0,58	0,08 - 3,19
Combinado					
A	64	2,37 ± 2,79	1,09 ± 0,66	0,81 ± 0,59	0,06 - 3,19
B	62	1,94 ± 1,29	0,58 ± 0,58	0,79 ± 0,58	0,12 - 2,54
C	40	3,04 ± 3,71	1,39 ± 0,76	0,76 ± 0,52	0,16 - 2,09
D	35	3,04 ± 2,94	1,55 ± 1,29	0,73 ± 0,49	0,13 - 2,03
Média	201	2,48 ± 2,72	1,23 ± 0,82	0,79 ± 0,56	0,06 - 3,19

Tabela 27- Análise de Esfinganina (Sa), Esfingosina (So) e relação Sa/So em urina de seres humanos no Grupo B.

	N	So média (ng mL ⁻¹) ± DP	Sa média (ng mL ⁻¹) ± DP	Relação Sa/So	Variação Sa/So
Mulheres	6	4,88 ± 2,10	4,68 ± 2,17	0,81 ± 0,59	0,47 - 1,52
Homens	12	5,07 ± 2,65	2,65 ± 1,71	0,88 ± 0,57	0,06 - 1,59
Combinado	18	5,01 ± 2,95	3,32 ± 2,11	0,78 ± 0,41	0,06 - 1,59

Os níveis de esfingosina foram 2,48 ng mL⁻¹ em média para o Grupo A e 5,01 ng mL⁻¹ para o Grupo B. O Grupo B apresentou maiores teores de So, assim como uma maior estimativa de IDP de 190 ng FBs kg p.c.⁻¹ dia⁻¹ em comparação ao Grupo A. Esses resultados estão menores em comparação ao estudo feito por Castegnaro et al. (1998)

avaliando indivíduos residentes da França onde observou concentrações de So médias de $17,55 \text{ ng mL}^{-1}$ entre mulheres e $23,28 \text{ ng mL}^{-1}$ em soro de homens.

A concentração média de esfinganina presente em amostras de soro foram de $1,23 \text{ ng mL}^{-1}$ para os voluntários do Grupo A e $3,32 \text{ ng mL}^{-1}$ para os indivíduos do Grupo B. A estrutura e os níveis dos esfingolipídeos podem variar consideravelmente entre organismos (MERRIL; SCHMELZ, 2000). Apesar disso, os valores estão de acordo com apresentado por Castegnaro et al. (1998) que obteve variação de ND a 29 ng mL^{-1} em voluntários saudáveis com ausência de câncer.

A relação esfinganina/esfingosina variou de 0,06 a 3,19 com média de 0,79 para os voluntários do Grupo A e 0,78 para os participantes do Grupo B. No presente estudo, não houve correlação com a estimativa de IDP calculados para os grupos A e B.

Sancho et al. (2011), observaram relação de Sa/So em plasma de 0,46 para voluntários com IDP de 0 e relação Sa/So de $0,53 \text{ ng FBs kg p.c.}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ para indivíduos com maior consumo, obtendo uma IDP de $230 \text{ ng FBs kg p.c.}^{-1} \text{ dia}^{-1}$.

A média de Sa/So em plasma dos voluntários avaliados por Van der Whesthuizen et al (1999), não variou significativamente entre os grupos avaliados, com níveis médios de Sa/So de 0,41 na região de Transkei, com IDP de $3.800 \text{ ng FBs kg p.c.}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ e de 0,34 na região de Bomet com IDP de $60 \text{ ng FBs kg p.c.}^{-1} \text{ dia}^{-1}$. O presente estudo demonstrou IDP inferiores aos estudos relacionados ($63 \text{ FB}_1 \text{ kg p.c.}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ Grupo A e $190 \text{ FB}_1 \text{ kg p.c.}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ Grupo B), entretanto maiores valores da relação Sa/So, possivelmente pois a relação não tenha sido sensível bastante para ser usado como biomarcador de exposição de fumonisinas.

Para avaliar uma correlação real entre as bases esfingóides e a ingestão por fumonisinas na população, é necessário o uso de dados analíticos e de consumo confiáveis (SANCHO et al., 2011). Além disso, o método de avaliação da ingestão dietária utilizado no presente estudo não descreve dados precisos, dependendo da descrição dos voluntários.

5.2.2.3 Análise de Ácido Fólico

O ácido fólico é uma vitamina hidrossolúvel, e as reservas corporais são relativamente baixas, podendo facilmente originar uma deficiência de folato. O teor de ácido fólico em soro é considerado o indicador mais sensível para avaliação da ingestão de folato (BAILEY, 2009).

Os valores de referência podem variar significativamente entre as populações e regiões com diferentes dietas (GALUKANDE et al., 2011). Além disso, a detecção de ácido

fólico em soro varia com o método de detecção. No método microbiológico com *L. Casei* geralmente utiliza-se como parâmetro valores normais $>3 \text{ ng mL}^{-1}$ (BAILEY, 2009).

Nesse trabalho, os valores de referência utilizados, foram o estabelecidos, segundo fabricante do *kit* de detecção (Centaur- Siemens) que estabelece um limite de $5,38 \text{ ng mL}^{-1}$ de ácido fólico e máximo de 24 ng mL^{-1} , para níveis normais, obtidos com 370 e 286 amostras com homens e mulheres. Segundo a Siemens (2009), devido a fatores demográficos das populações, a dieta e aos métodos de ensaio, cada laboratório deve determinar seus limites de referência para avaliação do diagnóstico.

No Grupo A foram avaliados 24 voluntários nas 4 coletas realizadas, e no Grupo B, 20 participantes. Nas Tabelas 28 e 29 são apresentados os valores de ácido fólico (ng mL^{-1}) em diferentes faixas etárias para ambos os sexos, nos Grupos A e B respectivamente.

Tabela 28 - Níveis médios de ácido fólico (ng mL^{-1}) e desvio padrão nas 4 coletas de voluntários homens e mulheres pertencentes ao Grupo A.

Idade (anos)	Coletas							
	A		B		C		D	
	Mulheres	Homens	Mulheres	Homens	Mulheres	Homens	Mulheres	Homens
10 - 20	13,1 $\pm$ 3,5	-	8,0 $\pm$ 3,5	-	9,3 $\pm$ 4,9	-	16,1 $\pm$ 0,8	-
21 - 40	12,5 $\pm$ 6,0	11,4 $\pm$ 12,2	11,1 $\pm$ 5,6	10,2 $\pm$ 9,9	13,9 $\pm$ 6,9	12,1 $\pm$ 11,5	15,2 $\pm$ 5,3	13,8 $\pm$ 9,5
41 - 70	8,7 $\pm$ 0,1	11,9 $\pm$ 4,9	8,5 $\pm$ 3,0	9,7 $\pm$ 5,0	8,84 $\pm$ 1,9	12,7 $\pm$ 6,0	11,5 $\pm$ 5,3	11,4 $\pm$ 3,7

Tabela 29 - Níveis ácido fólico (ng mL^{-1}) e desvio padrão das amostras avaliadas do Grupo B.

Idade (anos)	Feminino	Masculino
10 - 20	-	13,8
21 - 40	8,8	13,6 $\pm$ 5,6
41 - 70	11,08 $\pm$ 1,7	12,8 $\pm$ 3,5

Das amostras analisadas no Grupo A e Grupo B, todas estão dentro dos limites estabelecidos pelo fabricante do kit. Além disso, esses dados estão dentro dos valores normais segundo Wolinsky; Driskell (2006) onde variam de $3,0 - 17,0 \text{ ng mL}^{-1}$. Um estudo feito com 200 estudantes na Uganda estabeleceu como faixa padrão entre $3,1$ a $17,5 \text{ ng mL}^{-1}$ de soro. Na Austrália os valores observados variaram entre $5,7 > 20,0 \text{ ng mL}^{-1}$, na Europa de $3,8 - 16,0 \text{ ng mL}^{-1}$ e EUA de $8,4 - 35,2 \text{ ng mL}^{-1}$ (GALUKANDE et al., 2011).

5.2.2.3.1 Relação de ácido fólico em soro e alimentos e a exposição a FB₁

Os resultados das análises de FB₁ e ácido fólico nas amostras de farinha de milho e soro foram utilizados para determinar o coeficiente de correlação de Pearson (r) e avaliar a correlação entre os fatores, sendo a significância testada ao nível de probabilidade de 0,05 (BERQUÓ; SOUZA; GOTLIEB, 1981).

No presente estudo, não houve correlação significativa entre os níveis de ácido fólico no soro dos indivíduos e as concentrações de FB₁ na farinha de milho ($r = -0,22$; $p = 0,28$) ou mesmo de ácido fólico neste alimento ($r = 0,04$; $p = 0,83$). Considerando os níveis baixos de ácido fólico nas amostras de farinha de milho analisadas, a ausência de correlação entre esses níveis e os de ácido fólico no soro dos indivíduos indica uma baixa participação deste alimento para a ingestão global da vitamina, e que outras fontes nutricionais de ácido fólico estão presentes na dieta dos voluntários.

5.2.2.4 Determinação de uréia e creatinina

A nefrotoxicidade da Fumonisina B₁ vem sendo relatada em diferentes espécies, e em ratos e coelhos, o rim tem sido caracterizado como o órgão-alvo mais sensível (BUCCI et al., 1998). A creatinina é o produto da degradação da creatina. Após a degradação da creatina nas fibras musculares, a substância transpostada para o plasma e excretada quase que exclusivamente pelos rins (FETTMAN; REBAR, 2004; LANIS et al., 2008).

Na Tabela 30 são demonstrados os resultados de uréia e creatinina pertencentes ao Grupo A, numa amostragem de 12 participantes de cada coleta, e os 20 voluntários do Grupo B, sendo avaliados segundo a idade e sexo.

Tabela 30 - Médias das análises de uréia e creatinina em homens e mulheres pertencentes aos Grupos A e B.

Parâmetro	Grupo	Masculino (idade, anos)		Feminino (idade, anos)	
		21-40	40-60	21-40	40-60
Uréia (mg dL ⁻¹)	A	37,5 ± 0,7	37,25 ± 5,9	25 ± 6,24	30,6 ± 2,9
	B	38 ± 0	43,7 ± 7,9	-	49,7 ± 16,9
Creatinina (mg dL ⁻¹)	A	1,1 ± 0,1	0,9 ± 0,1	0,8 ± 0,1	0,7 ± 0,1
	B	0,7 ± 0,2	0,9 ± 0,2	-	0,9 ± 0,3
Relação Uréia sérica/ creatinina sérica	A	33,5 ± 1,5	42,1 ± 6,8	31,3 ± 4,3	44,4 ± 8,6
	B	55,7 ± 15,5	52,4 ± 8,2	-	52,4 ± 8,2

A: Pirasununga/SP; B: Erval Velho/SC.

O kit utilizado da Eurotech delimita como valores de referência para uréia de 15 a 39 mg dL⁻¹. Os níveis de creatinina são estabelecidos dentro da normalidade para homens de 0,9 a 1,3 mg dL⁻¹ e mulheres de 0,6 a 1,1 mg dL⁻¹. Dessa forma, no Grupo A avaliado, 41,6% dos participantes apresentaram média entre as coletas abaixo dos limites para creatinina e do Grupo B, 20% dos voluntários apresentaram creatinina elevada e 15% o nível de creatinina estava abaixo do limite. Esses resultados são corroborados com o trabalho descrito por Bellomo et al. (2004), em seu experimento realizados com voluntários de diferentes idades, sexo e raça. Segundo Thrall, estudos em humanos têm demonstrado que a idade e sexo influenciam a concentração de creatinina (FETTMAN; REBAR, 2004; LANIS et al., 2008).

Os maiores valores de uréia são encontrados no Grupo B (elevado consumo de produtos de risco). No Grupo A, 16% dos voluntários apresentaram níveis médios acima do estabelecido e no Grupo B, 65% apresentaram uréia elevada. Apesar disso, Gomes; Dantas; Cameron, (2003) estabeleceram níveis normais de uréia entre 5 a 50 mg dL⁻¹, estando os resultados obtidos dentro desses limites. Além de indicador de danos renais, níveis elevados de uréia no plasma podem ser consequência do aumento do catabolismo protéico, indicando uma grande ingestão de proteína (HARTAND; KINTER, 2004).

A relação uréia/creatinina também foi mais acentuada para o Grupo B. Se a relação entre a uréia e creatinina é elevada (>40:1), como consequência da elevação de ambos os analitos, a causa pode ser primariamente doença renal; entretanto, extremamente elevada uréia-creatinina, quando ambas são elevadas (onde somente a uréia é elevada), provavelmente há uma diminuição do fluxo sanguíneo renal (a diminuição do fluxo tubular aumenta a excreção de creatinina, enquanto aumenta a reabsorção de uréia), obstrução do trato urinário (pela mesma razão), ou extravasamento de urina para a cavidade peritoneal (porque a uréia é mais prontamente reabsorvidos que a creatinina do peritônio) (HARTAND; KINTER, 2004).

5.2.3 Cabelo

5.2.3.1 Determinação de FB₁

5.2.3.1.1 Avaliação do Método

Os valores de LD e LO para o método de detecção de FB₁ em amostras de cabelo humano foram 3,3 e 5,5 ng g⁻¹, respectivamente. Os resultados são apresentados na Tabela 31.

Tabela 31 - Recuperações obtidas para a metodologia adotada para determinação de FB₁ em cabelo.

Fortificação (ng g ⁻¹)	Detectado (ng g ⁻¹)	Recuperação (%)
20	36,5	91,4
	25,9	64,9
	28,2	70,6
	33,1	82,8
	34,2	85,5
	34,9	87,4
10	14,5	72,4
	17,8	89,4
	18,6	92,9
	22,1	110,8
	21,7	108,6
	16,5	82,5

Os resíduos de FB₁ em amostras de cabelo foram determinados por *Selected Ion Monitoring* (SIM) ajustado o detector de massas para a m/z de 721. O espectro de massas obtido para FB₁ e o *Total Ion Chromatogram* (TIC) da amostra positiva podem ser visualizados nas Figura 31 e 32.

Figura 31 - Espectro de TIC obtido para FB₁.

Figura 32 - Cromatograma de monitoramento seletivo de íons de cabelo humano contaminado com FB_1 .

O coeficiente de determinação (r^2) foi 0.9913 e os resíduos plotados não demonstraram tendência da linearidade. A recuperação média foi 86,6%, com desvio padrão relativo de 12,4%.

5.2.3.1.2 Determinação de FB_1 em amostras de cabelo

Na Figura 33 são apresentados os níveis de FB_1 em amostras de cabelo de voluntários de Pirassununga (Grupo A) e Erval Velho (Grupo B).

Figura 33 – Níveis de FB_1 em amostras de cabelo individuais de Pirassununga e Erval Velho, Brasil, e a respectiva estimativa de ingestão diária (ID) de fumonisina B_1

A fumonisina B_1 foi detectada em 4 (7,2%) das amostras de cabelo, com média de $21,3 \pm 12,1 \text{ ng g}^{-1}$. Há apenas um relato sobre a incidência de FB_1 em cabelo humano, que foi conduzido em 3 regiões da África do Sul (SEWRAM et al., 2003). Os autores descreveram as concentrações de FB_1 obtidas em amostras de cabelo das regiões de Centane e Butterworth, com nível próximos a $27,0 \mu\text{g kg}^{-1}$ cabelo, que é similar aos níveis

encontrados no presente estudo. Em contrapartida, as amostras de cabelo de Bizana apresentaram conteúdo mais elevado de FB_1 (média $33,0 \mu\text{g kg}^{-1}$ cabelo). O baixo número de amostras de cabelo que contendo níveis detectáveis de FB_1 no presente estudo indica uma baixa exposição a FB_1 na população estudada. Entretanto, a composição do cabelo varia com a idade, sexo, cor do cabelo, de origem étnica, geográfica e com fatores dietéticos (MIEKELEY; DIAS CARNEIRO; PORTO DA SILVEIRA, 1998; CHOJNACKA; GORECKA; GORECKI, 2006). Além disso, a análise de cabelo está sujeita a certas limitações, como a ocorrência de contaminação exógena de sebo, suor, resíduos de poluição pelo ar ou por cosméticos, que pode interferir na análise de contaminantes (RODRIGUES et al., 2008).

A deposição de fumonisinas no cabelo pode positivamente correlacionar com o seu comprimento ou o tempo de exposição uma vez que o cabelo da cabeça cresce continuamente a uma taxa de cerca de 1 cm por mês (BACIU et al., 2014). No entanto, não há dados experimentais indicando uma relação quantitativa entre o período de exposição a fumonisinas e os níveis encontrados no segmento de cabelo humano. Dessa forma, mais estudos são necessários para compreender a significância de fumonisina residual em cabelo humano.

Apesar de somente 4 amostras de cabelo terem sido detectados níveis de FB_1 , as concentrações foram associadas com a IDP de fumonisina B_1 de voluntários, como apresentado na Figura. Um efeito polinomial foi observado ($r^2 = 0,8851$), indicando que a concentração de FB_1 em cabelo aumenta com o aumento nos valores de IDP. Sewram et al. (2003) avaliaram a incidência de FB_1 em cabelo de humanos em três diferentes regiões da África do Sul, e a IDP estimada pelos dados de extrapolação de estudos preliminares com primatas não-humanos. Os autores encontraram uma média de IDP de $13.800 \text{ ng fumonisina kg}^{-1} \text{ p.c. dia}^{-1}$ (Sewram et al., 2003), que é muito maior que a IDP obtida no presente estudo. Apesar disso, deve ser determinado se os dados de extrapolação em animais em elevados níveis de exposição a FB_1 poderiam ser usados para a estimativa de de IDP de níveis de FB_1 residual em cabelo humano. Este estudo é o primeiro relato da incidência de FB_1 em cabelo humano individual no Brasil, em comparação com a IDP indicando a possibilidade de avaliar cabelo como biomarcador para avaliação da exposição dietária de fumonisinas.

5.3 Correlação entre os biomarcadores e a estimativa de ingestão de FB_1

O coeficiente de correlação de Pearson varia de -1 a 1. O sinal positivo indica uma relação diretamente e negativo inversamente proporcional, sendo que o valor sugere a força da relação entre as variáveis. Uma correlação é perfeita quando os níveis são -1 ou 1,

podendo determinar uma variável conhecendo a outra, por outro lado, quando a correlação foi 0 indica que não há relação entre as variáveis (FIGUEIREDO FILHO; SILVA JUNIOR, 2009).

Com relação as classificações, Cohen (1988) determina que valores entre 0,10 e 0,29 podem ser considerados pequenos; 0,30 e 0,49 podem ser considerados médios e 0,50 e 1 podem ser interpretados como grandes. Dancey; Reidy (2006) sugerem que $r = 0,10$ até classifica-se como 0,30 (fraco); $r = 0,40$ até 0,6 (moderado); $r = 0,70$ até 1 (forte).

Na Tabela 32 podem ser visualizadas as correlações obtidas entre a exposição alimentar a FB₁ e os marcadores biológicos avaliados em urina.

Tabela 32 - Correlação de Pearson obtido entre os dados de estimativa da exposição a FB₁ e dos biomarcadores avaliados em urina ($p < 0,05$).

	Freq. Consumo milho (g dia ⁻¹)	IDP (ng kg ⁻¹ p.c. - ¹ dia)	So (ng mL ⁻¹)	Sa (ng mL ⁻¹)	Sa/So	FB ₁ (ng mg ⁻¹ creatinina)	QIR - 24 h (g)
Freq. Consumo milho (g dia ⁻¹)	1,000	1,000	0,108	-0,775	-0,357	0,489	-0,308
IDP (ng kg ⁻¹ p.c. - ¹ dia)	1,000	1,000	0,108	-0,775	-0,357	0,489	-0,308
So (ng mL ⁻¹)	0,108	0,108	1,000	0,542	0,181	-0,038	0,612
Sa (ng mL ⁻¹)	-0,775*	-0,775*	0,542	1,000	0,924*	-0,861	0,539
Sa/So	-0,357	-0,357	0,181	0,924*	1,000	-0,989*	0,568
FB ₁ (ng mg ⁻¹ creatinina)	0,489	0,489	-0,038	-0,860	-0,989*	1,000	-0,448
QIR - 24 h (g)	-0,308	-0,308	0,614	0,539	0,568	-0,444	1,000

IDP: Ingestão diária provável; Sa: Esfinganina; So: Esfingosina.

* Resultados que apresentaram correlação significativa com $p < 0,05$.

Os resultados de estimativa de exposição de FB₁ através do consumo de derivados de milho declarados nos QFA e QIR-24h e a ingestão diária provável de toxina foram comparados com dados obtidos de diferentes biomarcadores presentes em sangue e urina (resíduos de FB₁ e relação Sa/So).

Houve relação entre a relação Sa/So e os níveis de FB₁ em urina, entretanto a relação foi negativa e não pode ser explicada desde que a exposição é baixa e o biomarcador utilizado apenas para elevada exposição. Além disso, não houve correlação entre os biomarcadores presentes em urina e os dados de estimativa de exposição da FB₁, com $p < 0,05$. A exposição de fumonisinas demonstrada pelos dados de IDP bem como dos

biomarcadores presentes em urina, resíduos de FB₁ e relação Sa/So, sugerem que os baixos níveis de exposição da população avaliada, foi não suficiente para haver efeito de forma significativa. Os estudos avaliando a relação Sa/So como biomarcador de exposição a fumonisina B₁ demonstram resultados divergentes, em populações com baixo e elevado consumo sugerindo que a relação não é alterada a baixos níveis de contaminação. Além disso, os elevados níveis de relação Sa/So podem ser resultantes de variações individuais ligados a alimentação e genética. Na Tabela 5 podem ser observados os resultados obtidos de correlação de Sa, So e a relação Sa/So presentes em soro bem como os níveis de uréia e creatinina.

Na Tabela 33 são apresentadas as correlações obtidas com dados de exposição no soro e os biomarcadores obtidos de amostras de soro. Houve uma relação significativa entre a ingestão diária provável (IDP) e os níveis de esfingolípídeos no soro. Os níveis de esfingosina podem variar em decorrência de diversos fatores genéticos e de consumo alimentar como idade, colesterol no soro, carotenoides, retinol, tocoferóis e consumo de vegetais e frutas secas e desidratados (ABNET et al., 2001). Dessa forma, os níveis de esfingosina podem ser relacionados a outros fatores alimentares e individuais, podendo não ser um efeito causado pela FB₁.

Tabela 33- Correlação de Pearson obtido entre os dados de estimativa da exposição a FB₁ e dos biomarcadores avaliados em soro, bem como os níveis de uréia e creatinina.

	Freq. Consumo milho (g dia ⁻¹)	IDP (ng kg ⁻¹ p.c. ⁻¹ dia)	QIR - 24 h (g)	So (ng mL ⁻¹)	Sa (ng mL ⁻¹)	Sa/So	Uréia (mg dL ⁻¹)	Creatini na (mg dL ⁻¹)
Freq. Consumo milho (g dia ⁻¹)	1,000	0,603*	0,050	0,251	0,022	-0,083	0,033	-0,108
IDP (ng kg ⁻¹ p.c. ⁻¹ dia)	0,603*	1,000	-0,155	0,465*	-0,157	-0,265	-0,081	0,125
QIR - 24 h (g)	0,050	-0,155	1,000	0,171	0,864*	0,574*	0,770*	-0,122
So (ng mL ⁻¹)	0,251	0,465*	0,171	1,000	0,145	-0,428	0,206	0,128
Sa (ng mL ⁻¹)	0,022	-0,157	0,864*	0,145	1,000	0,690*	0,829*	-0,020
Sa/So	-0,083	-0,265	0,574*	-0,428	0,690*	1,000	0,373	-0,157
Uréia	0,033	-0,081	0,770*	0,206	0,829*	0,373	1,000	0,157
Creatinina	-0,108	0,125	-0,122	0,128	-0,020	-0,157	0,157	1,000

IDP: Ingestão diária provável; Sa: Esfinganina; So: Esfingosina.

* Resultados que apresentaram correlação significativa com $p < 0,05$.

Uma correlação significativa também foi observada entre os dados do QIR - 24 h e os níveis de esfinganina bem como a relação Sa/So ($p < 0,05$). O Questionário de Inquérito Recordatório de 24 horas relata informações sobre o consumo de produtos de risco recentemente, nas últimas 24 horas. Estudos demonstram, que a FB₁ o tempo de meia vida da toxina em animais e humanos é baixo, sendo rapidamente absorvida pelo organismo e rapidamente eliminada. Dessa forma, o aumento nos níveis de esfinganina, bem como da relação Sa/So, pode ser resultante dos efeitos da FB₁ no organismo.

Em relação a uréia e creatinina encontrados em soro, houve uma relação significativa entre os níveis de uréia e o QIR - 24 h bem como dos níveis de esfinganina, apesar disso, não houve correlação com a creatinina. A creatinina é eliminada preferencialmente por filtração glomerular, e a sua retenção, sendo um bom indicador de insuficiência renal. Apesar disso, a uréia é sintetizada a partir do fígado a partir de CO₂, e a alteração nos níveis não são específicos para problemas renais. Dessa forma, com a correlação obtida de QIR-24h e a esfinganina com os níveis de uréia, podem não estar relacionados aos efeitos nefrotóxicos da toxina, uma vez que a creatinina não foi significativamente alterada.

7. CONCLUSÕES

Inicialmente, deve-se ressaltar que os métodos analíticos otimizados no experimento demonstraram bons resultados nos parâmetros de validação, podendo ser aplicados em amostras com boa confiabilidade dos dados.

Considerando os objetivos propostos, os resultados obtidos no presente trabalho permitem concluir que:

- A incidência de FB₁ nos alimentos foi, em média, 72% nas amostras do Grupo A (Pirassununga/SP) e 35% no Grupo B (Erval Velho/SC), porém com níveis baixos e somente uma amostra excedendo o limite de tolerância estabelecido no Brasil (2,500 µg kg⁻¹).
- As IDP_M de FB₁ nos Grupos A e B foram de 63,3 e 190,1 ng kg⁻¹ p.c. dia⁻¹, respectivamente, que correspondem a 3,1% e 9,5% da IDMT recomendada para fumonisinas (2.000 ng kg⁻¹ p.c. dia⁻¹).
- A concentração média de ácido fólico nas amostras de farinha de milho foi de 713 ± 435 µg kg⁻¹, sendo que somente uma amostra apresentou nível de ácido fólico acima do valor mínimo estabelecido pela ANVISA.
- A concentração de ácido fólico no soro variou de 6,7 a 24,0 ng mL⁻¹ (média de 13,4 ± 5,4 ng mL⁻¹), com ambos os grupos (A e B) apresentando resultados dentro dos valores de referências.
- Não houve correlação entre níveis de ácido fólico, uréia e creatinina no soro e as concentrações de FB₁ presentes em derivados de milho.
- Resíduos de FB₁ foram encontrados em 33,4% das amostras de urina, com níveis médios de 3,19 ± 3,15 ng mg⁻¹ de creatinina. Entretanto, não houve correlação entre as concentrações de FB₁ na urina e nos alimentos.
- A relação Sa/So na urina apresentou valores médios de 0,91, 0,77 e 0,89 em mulheres, homens e em combinação, respectivamente, não havendo correlação entre esta variável e os demais parâmetros estudados no experimento.
- Embora tenha havido correlação positiva entre a relação Sa/So no soro e os dados de consumo de milho e derivados obtidos no QIR-24 h, não foram observadas correlações entre a ingestão de FB₁ e a relação Sa/So na urina ou soro.
- Houve correlação inversamente proporcional entre os níveis de FB₁ presentes em urina e a relação Sa/So entretanto não pode ser explicada pela baixa exposição.
- Não foram observados níveis detectáveis de FB₁ nas amostras de soro, indicando baixa exposição recente dos voluntários à FB₁.

- FB_1 foi detectada em 4 amostras de cabelo humano (7,2%) dos Grupos A e B, em concentração média foi de $21,3 \pm 12,1 \text{ ng g}^{-1}$, observando-se uma correlação positiva com a IDP individual dos voluntários.
- Em síntese, os resultados obtidos nas análises de biomarcadores de FB_1 no presente trabalho estão de acordo com os valores de IDP_M encontrados, indicando uma baixa exposição humana à FB_1 pelo consumo dos principais produtos a base de milho nas populações estudadas.
- Nas condições do presente experimento, nas quais constatou-se uma baixa exposição à FB_1 da população estudada através da dieta, a relação Sa/So e a determinação de FB_1 no soro ou urina, não foram aplicáveis como biomarcadores de exposição à FB_1 . Entretanto, a determinação de FB_1 residual no cabelo humano apresentou resultados promissores para futuras aplicações como biomarcador de exposição humana às fumonisinas em estudos populacionais.

8. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Embora tenham sido encontrados baixos níveis de fumonisinas em trigo, há poucas metodologias disponíveis para essa investigação. Assim, o desenvolvimento de métodos e propostas de otimização poderia ser explorado, avaliando o risco de um maior número de produtos, com condições analíticas precisas e eficientes.

Estudos toxicológicos realizados em humanos são fundamentais para o conhecimento dos riscos da toxina. A toxicodinâmica e toxicocinética das fumonisinas ainda não foram completamente elucidadas. Nesse contexto, mais estudos devem ser realizados na tentativa de melhor compreender o mecanismo e os efeitos das fumonisinas em humanos.

A avaliação de biomarcadores fornece informações importantes sobre a exposição de determinada população. O presente trabalho constitui uma contribuição para o estudo de biomarcadores de fumonisinas no Brasil, porém são necessários outros trabalhos que avaliem a exposição a diferentes micotoxinas em materiais biológicos, especialmente avaliações abrangentes em diferentes regiões do país, levando em consideração o tamanho e a diversidade cultural e hábitos alimentares da população brasileira.

O elevado consumo de derivados de milho e massas a base de milho e trigo em algumas regiões do país, como nos estados do Nordeste, indica uma exposição potencialmente elevada às micotoxinas. Dessa forma, os autores sugerem que mais trabalhos sejam realizados nessas populações englobando outras micotoxinas importantes e frequentemente encontrados no país como aflatoxinas, tricotecenos e zearalenona.

9. REFERÊNCIAS

ABBAS, H. K.; RILEY, R. T. The presence and phytotoxicity of fumonisins and AAL-toxin in *Alternaria alternata*. **Toxicon**, Elmsford, v. 34, p. 133-136, 1996.

ABADO-BECOGNEE, K. et al. Effects of fumonisin B₁ on growth and metabolism of larvae of the yellow mealworm. *Tenebrio molitor*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 86, p. 135-143, 1998.

ABIA W. A. et al. Bio-monitoring of mycotoxin exposure in Cameroon using a urinary multi-biomarker approach. **Food and Chemical Toxicology**, Kidlington, v. 62, p. 927-934, 2013.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DO MILHO. ABIMILHO. Disponível em <<http://www.abimilho.com.br/estatistica>>. Acesso em 20/jan/2015.

ABNET, C. C. C. et al. A cross-sectional study of human serum sphingolipids, diet and physiologic parameters. **The Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 131, p. 2748-2752, 2001.

ADAWI, H. et al. Protective effect of milk thistle and grape seed extracts on fumonisin B₁ induced hepato-and nephrotoxicity in rats. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 5, p. 6316-6327, 2011.

AHN, J. et al. Quantitative determination of mycotoxins in urine by LC-MS/MS. **Food Additives and Contaminants Part A**, v.27, p. 1674-1682, 2010.

ALIZADEH A. M. et al. Fumonisin B₁ contamination of cereals and risk of esophageal cancer in a high risk area in northeastern Iran. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevent**, Bangkok, v. 13, p. 2625-2628, 2012.

AMAYA-FARFAN, J.; DOMENE, S.M.A.; PADOVANI, R.M. Síntese comentada das novas propostas sobre recomendações nutricionais para antioxidantes. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 14, p. 71-78, 2001.

AMORIM, E. C. A. O Uso dos biomarcadores na avaliação da exposição ocupacional a substâncias químicas. **Revista Brasileira de Medicina no Trabalho**, São Paulo, v. 1, p. 124-132, 2003.

AOYAMA, K.; et al. Four-year surveillance for ochratoxin and fumonisins in retail foods in Japan. **Journal of food protection**, Des Moines, v. 73, p. 344-352, 2010.

ARINO, A. et al. Estimation of dietary intakes of fumonisins B₁ and B₂ from conventional and organic corn. **Food Control**, v. 18, p. 1058-1062, 2007.

ARRANZ, I. et al. Review: HPLC determination of fumonisin mycotoxin. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 44, p. 195-203, 2004.

BACIU, T. et al. Recent trends in analytical methods and separation techniques drugs of abuse in hair. **Analytical Chimica Acta**, Amsterdam, v. 856, p. 1-26, Jan. 2014.

BAILEY, L. B. **Folate in health and disease**. 2nd ed. London: CRC Press, 2009.

BANDO, É. et al. Biomarcadores para avaliação da exposição humana às micotoxinas. **Jornal Brasileiro de Patologia Médica Laboratorial**, Rio de Janeiro, v. 43, n. 3, p. 175-180, 2007.

BANDO, É. et al. Biomarcadores para avaliação da exposição humana às micotoxinas. **Jornal Brasileiro de Patologia Médica Laboratorial**, Rio de Janeiro, v. 43, p. 175-180, 2007.

BAR, D.B. et al. Urinary creatinine concentrations in the U.S. population: implications for urinary biologic monitoring measurements. **Environmental Health Perspectives**, v. 113, p. 192-200, 2004.

BELLOMO, C. R. et al. Acute renal failure: definition, outcome measures, animal models, fluid therapy and information technology needs: the Second International Consensus Conference of the Acute Dialysis Quality Initiative (ADQI) Group. **Journal of Critical Care**, London, v. 8, n. 4, p. R204-12, 2004.

BEZUIDENHOUT, S. C. et al. Structure elucidation of the fumonisins, mycotoxins from *Fusarium moniliforme*. **Journal of the Chemical Society. Chemical Communications**, London, v. 11, p. 743-745, 1988.

BERDANIER, C. D.; DWYER, J. T.; FIELDMAN, E. B. **Handbook of nutrition and food**. 2nd ed. London: CRC Press, 2007. v. 1288.

BERQUÓ, E. S.; SOUZA, J. M. P.; GOTLIEB, S. L. D. **Bioestatística**. São Paulo. Editora Pedagógica e Universitária. 1981, 350 p.

BHAT, R. V. et al. A Foodborne disease outbreak due to the consumption of moldy sorghum and maize containing fumonisin mycotoxins. **Clinical Toxicology**, New York, v. 35, n. 3, p. 249-55, 1997.

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

BOK, J. W.; KELLER, N. P.; LAE, A. A. A regulator of secondary metabolism in *Aspergillus* spp. **Eukaryotic Cell**, Washington, v. 3, p. 527-535, 2004.

BOLGER, M. et al. Fumonisins. In: INTERNATIONAL PROGRAMME ON CHEMICAL SAFETY. **Safety evaluation of certain mycotoxins in food**. Geneve: WHO Food Additives Series, n. 47, 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde. Resolução RDC nº 39, da ANVISA, de 21 de março de 2001. *Valores De Referência Para Porções De Alimentos E Bebidas Embalados Para Fins De Rotulagem Nutricional*. Diário Oficial da União, Brasília, 21 mar. 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde. Resolução RDC nº 344, da ANVISA, 13 de dezembro de 2002. Estabelece níveis de fortificação em farinhas. Diário Oficial da União, Brasília, 13 dez. 2002.

BRASIL. Ministério da Saúde. Resolução RDC nº 899, da ANVISA, 29 de maio de 2003. Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos. Diário Oficial da União, Brasília, 31 mar. 2003.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 7, de 18 de fevereiro de 2011. *Limites máximos tolerados para micotoxinas*. Diário Oficial da União – Seção 1, nº 37, 22 fev. 2011.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Agronegócio 2012/2013**. 2013. Brasília: Assessoria de Gestão Estratégica, 2013. 96 p.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 59, de 26 de dezembro de 2013. Prorrogação dos prazos estabelecidos para micotoxinas na Portaria n 354 de 11 de agosto de 2006. Diário Oficial da União – Seção 1, nº 252, 30 de dezembro de 2013.

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

BUCCI, T.J. et al. Renal effects of fumonisin mycotoxins in animals. **Toxicologic Pathology**, Jena, v. 26, p. 160-164, 1998.

BURGOON J. M. et al. Investigation of the effects of folate deficiency on embry- onic development through the establishment of a folate deficient mouse model. **Teratology**, Oxford, v. 65, p. 219–227, 2002.

CAI, Q.; TANG, L.; WANG, J. Validation of fumonisin biormakers in F344 rats. **Toxicol Apply Pharmacol**, v. 15, p. 28-39, 2007.

CALDAS, E. D.; SILVA, A. C. S. Mycotoxins in corn-based food products consumed in Brazil: an exposure assessment for fumonisins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 55, p. 7974-7980, 2007.

CAPOBIANGO, M. **Extração das proteínas do fubá de milho e obtenção de hidrolisados protéicos com baixo teor de fenilalanina**. 2006. 79 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2006.

CARDOSO, M. A.; STOCCO, P. R. Desenvolvimento de um questionário quantitativo de frequência alimentar em imigrantes japoneses e seus descendentes residentes em São Paulo, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 16, n. 1, p. 107-114, 2000.

CASTEGNARO, M. et al. Analytical method for the determination of sphinganine and sphingosine as a potential biomarker for fumonisin exposure. **Journal of Chromatography**,

Amsterdam, v. 720, p. 15-24, 1998.

CENDOYA, E.; FARNOCHI, M.C.; SOFIA, N.C.; RAMIREZ, M.L. Two-dimensional environmental profiles of growth and fumonisin production by *Fusarium proliferatum* on a wheat-based substrate. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 182-183, p. 9-17, 2014.

CHATTERJEE, S. et al. GPI anchoring leads to sphingolipid-dependent retention of endocytosed proteins in the recycling endosomal compartment. **The EMBO Journal**, Oxford, v. 20, p. 1583–1592, 2001.

CHEN, C.P. Syndromes, disorders and maternal risk factors associated with neural tube defects. **Taiwan Journal Obstet Gynecol**, v. 47, p. 1-9, 2008.

CHIARADIA, M.C.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F. O estado da arte da cromatografia associada à espectrometria de massas acoplada à espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos em alimentos. **Química Nova**, v. 31, p. 623-636, 2008.

CHOJNACKA, K.; GORECKA, H.; GORECKI, H. The effect of age, sex, smoking habit and hair color on the composition of hair. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, Amsterdam, v. 22, p. 52–57, 2006.

CHU, F. S.; LI, G. Y. Simultaneous occurrence of fumonisin B₁ and other mycotoxins in mouldy corn collected from the Republic of China in regions with high incidences of esophageal cancer. **Applied and environmental Microbiology**, Washington, v. 60, p. 847-852, 1994.

CHU, F. S.; BHATNAGAR, D. Mycotoxins. In: DILIP, K. et al. **Fungal biotechnology in agricultural, food, and environmental applications**. Boca Raton: CRC Press, 2003. cap. 29.

CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION; FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS; WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Joint FAO/WHO food standards programme Codez alimentarius commission**. Geneva, 2014. Disponível em: <ftp://ftp.fao.org/Codex/Reports/Reports_2014/REP14_CFe.pdf>. Acesso em: 04 nov. 2014.

COHEN, J. Statistical Power analysis for the behavior sciences, Hillsdale, N.J., Erlbaum, 1988.

COSTA, A. G. et al. Questionário de frequência de consumo alimentar e recordatório de 24 horas: aspectos metodológicos para avaliação da ingestão de lipídeos. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 19, p. 631-641. 2006.

CRUZ, J. V. S. **Ocorrência de aflatoxinas e fumonisinas em produtos à base de milho e milho utilizado como ingrediente de ração para animais de companhia, comercializados na região de Pirassununga, Estado de São Paulo**. 2010. 74 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2010.

DANCEY, C.; REIDY, J. Estatística sem matemática para psicologia usando SPSS para Windows, Atmed, Porto Alegre, 2006.

DEMIR, C.; SIMSEK, O.; ARICI, M. Incidence of *Fusarium verticillioides* and levels of fumonisin B1 and B2 in corn in Turkey. **Food Science and Biotechnology**, Abuja, Burntwood, v. 19, p. 1103-1106, 2010.

DEVREESE, M. et al. Quantitative determination of several toxicological important mycotoxins in pig plasma using multi-mycotoxin and analyte-specific high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry methods. **Journal of Chromatography A**, v. 28, p. 74-80, 2012.

DIAZ, G. J.; BOERMANS, H. J. Fumonisin toxicosis in domestic animals: a review. **Veterinary and Human Toxicology**, Manhattan, v. 36, p. 548-555. 1994.

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

DILKIN P. et al. Toxicokinetics and toxicological effects of single dose of fumonisin B1 containing *Fusarium verticillioides* culture material in weaned piglets. **Chemico-Biological Interactions**, Limerick, v. 185, p. 157-162, 2010.

DOHLMAN, E. Mycotoxin hazard and regulations: impacts on food and animal feed crop trade. **International Trade and Food Safety**, Washington, n. 828, p. 97-108, 2001.

DOMIJAN, A. M. et al. Fumonisin B₁, fumonisin B₂, zearalenone and ochratoxin a contamination of maize in Croatia. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 22, p. 677-680, 2005.

DOMIJAN, A. M. Neurotoxicity of fumonisin B₁. **Archives of Industrial Hygiene and Toxicology**, Zagreb, v. 63, p. 531-544, 2012.

EUROPEAN COMMUNITY - EC. Commission Regulation (EC) No. 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 Communities**, Luxembourg, v. 70, p. 12-34, 2006.

_____. Commission Regulation -EC n. 1881/2006. Setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. **Official Journal of the European Communities**, Luxembourg, v. 364, p. 5-24, 2006.

EZEKIEL, C. N. et al. Mycotoxin exposure in rural residents in northern Nigeria: a pilot study using multi-urinary biomarkers. **Environment International**, Kidlington, v. 66, p. 138-145, 2014.

FANELLI, F. et al. Relationship between fumonisin production and *FUM* gene expression. In *Fusarium verticillioides* under different environmental conditions. **Food Additives & Contaminants: Part A**, Abingdon, v. 30, n. 2, p. 365-371, 2013.

FETTMAN, M. J.; REBAR, A. Laboratory evaluation of renal function. In: THRALL, M. et al. (Eds.). **Veterinary hematology and clinical chemistry**. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2004. Cap. 21, p. 301-314.

FIGUEIRA, E.L.Z. et al. Milho: riscos associados à contaminação por *Fusarium verticillioides* e fumonisinas. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 24, p. 359-378, 2003.

FIGUEIREDO FILHO, D.B.; SILVA JÚNIOR, J.A. Desvendando os mistérios do coeficiente de correlação de Pearson (r). **Revista Política Hoje**, v. 18, p. 115-146, 2009.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION - FAO. Folate and folic acid. In: _____. **Human vitamin and mineral requirements**. Rome: FAO, 2002. cap. 4. Disponível em: <<ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/004/y2809e/y2809e00.pdf>>. Acesso em: 01 ago. 2014.

_____. **Worldwide regulations for mycotoxins in food and feed in 2003**. Geneva: World Health Organization, 2003. (FAO Food and Nutrition Paper, 81).

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION – FDA. Guidance for industry: fumonisin levels in human foods and animal feeds: final guidance. 2001. Disponível em: <<http://www.fda.gov/food/guidanceregulation/guidancedocumentsregulatoryinformation/chemicalcontaminantsmetalsnaturaltoxinspesticides/ucm109231.htm>>. Acesso em: 01 ago. 2013.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION – FDA. Guideline for the Validation of Chemical Methods for the FDA Food Program. Department of Health & Human Services, March, 2012.

FONSECA, V. M. et al. Consumo de folato em gestantes de um hospital público do Rio de Janeiro. **Revista Brasileira De Epidemiologia**, São Paulo, v. 6, p. 319-327, 2003.

GALUKANDE, M. et al. Reference values for serum levels of folic acid and vitamin b12 in a young adult ugandan population. **African Health Science**, Grahamstown, v. 11, n. 2, p. 240-243, 2011.

GALVANO, F. et al. DNA damage in human fibroblasts exposed to fumonisin B₁. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 40, p. 25–31, 2002.

GARREN, L. The induction and persistence of altered sphingolipid biosynthesis in rats treated with fumonisin B₁. **Food Additives & Contaminants: Part A**, Abingdon, v. 18, n. 12, p. 850-6, 2001.

GAZZOTTI, T. et al. Determination of fumonisin B₁ in bovine milk by LC-MS/MS. **Food Control**, v. 20, p. 1171-1174, 2009.

GELDERBLOM W. C. A. et al. Fumonisins: novel mycotoxins with cancer promoting activity produced by *Fusarium moniliforme*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 54, p. 1806–1811, 1988.

GOMES, A. L. M.; DANTAS, E. H. M.; CAMERON, L. C. Respostas fisiológicas e mecânicas do treinamento intervalado, de alta intensidade, de distâncias curtas a longas em atletas de natação. **Fitness & Performance Journal**, Rio de Janeiro, v. 77, 2003.

GONG, Y. Y. et al. Association between tortilla consumption and human urinary fumonisin B1 levels in a Mexican population. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, Philadelphia, v. 17, p. 688-694, 2008.

GURUNG, N. K. et al. Effects of fumonisin B1 contaminated feeds on weaning Angora goats. **Journal Animal Science**, Champaign, v. 76, p. 2863-28770, 1998.

HARTAND, S. E.; KINTER, L. B. Assessing renal effects of toxicants *in vivo*. In: TARLOFF, J. B.; LASH, L. H. **Toxicology of the Kidney**. 3rd ed. London: CRC Press, 2004. cap. 3.

HARRISON, L. R. et al. Pulmonary edema and hydrothorax in swine produced by fumonisin B1, a toxic metabolite of *Fusarium moniliforme*. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, Columbia, v. 2, p. 217-221. 1990.

HASCHEK, W. M. et al. Fumonisin toxicosis in swine: an overview of porcine pulmonary edema and current perspectives. **Environmental Health Perspectives**, Durham, v. 109, p. 251-257, 2001.

HENDRICKS, K. Fumonisin and neural tube defects in South Texas. **Epidemiology**, Baltimore, v. 10, p. 198–200, 1999.

HERMANS, G. et al. Fungos e fumonisinas no período pré-colheita do milho. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, p. 7-10, 2006.

HEUDI, O.; KILINÇ, T.; FONTANNAZ, P. Separation of water-soluble vitamins by reversed-phase high performance liquid chromatography with ultra-violet detection. Application to polyvitaminated premixes. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1070, p. 49-56, 2005.

HINOJO, M.J. Fumonisin production in rice cultures of *Fusarium verticillioides* under different incubation conditions using an optimized analytical method. **Food Microbiology**, v. 23, p. 119-127, 2006.

HSIAO, S. H. et al. Use of Formalin-fixed tissues to determine fumonisin B1-induced sphingolipid alterations in swine. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, Columbia, v. 19, p. 425-430, 2007.

HUMPF, H.U.; VOSS, K.A. Effects of thermal food processing on the chemical structure and toxicity of fumonisin mycotoxin. **Mol Nutri Food Research**, vol. 48, p.255-269, 2004.

HUMPHREYS, S. H.; CARRINGTON, C.; BOLGER, M. A quantitative risk assessment for fumonisins B-1 and B-2 in US corn. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 18, p. 211–220. 2001.

HUSSEIN, H. S.; BRASEL, J. M. Toxicity, metabolism and impact of mycotoxins on humans and animals. **Toxicology**, New York, v. 167, p. 101-134, 2001.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE. Aquisição alimentar domiciliar per capita anual, por Grandes Regiões, segundo os produtos - período 2002-2003.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE. Aquisição alimentar domiciliar per capita anual, por Grandes Regiões, segundo os produtos - período 2008-2009.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER – IARC; WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans**, 2001, p. 301-366, v. 82. Disponível em: <<http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol82/mono82-7B.pdf>>. Acesso em 09 jul. 2012.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER – IARC; WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans: some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines mycotoxins**. Lyon: IARC Scientific Publication, 2003. v. 56.

_____. Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene. In: _____. **Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans**, Lyon: IARC Scientific Publication, 2002. v. 82, p. 171-274. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2012/estimativa20122111.pdf>>. Acesso em: 10 jun. 2013.

INSTITUTO NACIONAL DO CANCER. INCA. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2012/estimativa20122111.pdf>. Acesso em 10 jun. 2013.

INTERNATIONAL PROGRAMME ON CHEMICAL SAFETY – IPCS. **Fumonisin**s. Disponível em: <<http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v47je03.htm>>. Acesso em: 10 jun. 2013.

JECFA. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. **Evaluation of certain food additives and contaminants**: seventy-fourth report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Rome, 2011. (WHO Technical Report series, n. 966)

JECFA. Joint FAO/WHO Expert Consultation. **Human vitamin and mineral requirement**: Report of the Joint FAO/WHO Expert Consultation. Bangkok, 2001. (WHO Technical Report series, n. 966)

JURJEVIC, Z. et al. Ochratoxin A and fumonisins (B1 and B2) in maize from Balkan nephropathy endemic and non endemic areas of Croatia. **Mycotoxins Research**, Heidelberg, v. 15, p. 67-80, 1999.

KAWASHIMA, L.M.; VALENTE SOARES, L.M. Incidência de fumonisina B₁, aflatoxinas B1, B2, G1 e G2, ocratoxina A e zearalenona em produtos de milho. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v.26, n.2, p.516-21, 2006.

KIRINCIC, S. et al. Mycotoxins in cereals and cereal products in Slovenia- Official control of foods in the years 2008-2012. **Food Control**, Guildford, v. 50, p. 157-165, 2015.

KLARIC, M. S. et al. Co-occurrence of aflatoxins, ochratoxin A, fumonisins and zearalenone in cereals and feed, determined by competitive direct enzyme-linked immunosorbent assay and thin-layer chromatography. **Arhiv za higijenu rada i toksikologiju**, Zagreb, v. 60, p. 427-434, 2009.

KUSHIRO, M. et al. Limited surveillance of fumonisins in brown rice and wheat harvested in Japan. **Journal Food Protection**, v. 72, p. 1327-31, 2009.

KUSHIRO, M. et al. Liquid chromatography detection of fumonisins in Rice seed. **Rep. Nat. Food Research Inst.**, v. 72, p. 37-44, 2008.

LANÇAS, F. M. **Validação de métodos cromatográficos de análise**. São Paulo, Editora Rima, 2004.

LANIS, A.B. et al. Avaliação laboratorial das doenças renais em pequenos animais. **Pubvet**, v. 2, n. 28, 2008.

LEE T. P. et al. Rapid determination of sphinganine and sphingosine in urine by high performance liquid chromatography using monolithic column. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, New York, v. 34, p. 1938–1951, 2011.

LESLIE, J. F.; SUMMERELL, B. A. **The Fusarium laboratory manual**. Oxford: Blackwell Publishing, 2008.

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

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

LINO, C. M.; SILVA, L. J. G.; PENA, A. S. Metodologias analíticas para determinação das fumonisinas em milho e alimentos à base de milho. **Química Nova**, v. 29, p. 293- 299, 2006.

LINO, C. M. et al. Occurrence of fumonisins B(1) and B(2) in broa, typical Portuguese maize bread. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 118, n. 1, p. 79-82, 2007.

LOPES, A. C. S. et al. Ingestão alimentar em estudos epidemiológicos. **Revista Brasileira Epidemiologia**, São Paulo, v. 6, n. 3, p. 209-219, 2003.

LOISEAU, N. et al. Fumonisin B1 exposure and its selective effect on porcine jejuna segment: sphingolipids, glycolipids and trans-epithelial passage disturbance. **Biochemical pharmacology**, New York, v. 74, p. 144–152, 2007.

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

MANJULA, K. et al. Aflatoxin and fumonisin contamination of cassava products and maize grain from markets in Tanzania and Republic of the Congo. **Toxin Reviews**, v. 28, p. 63-69, 2009.

Ministério da Agricultura – MAPA. Disponível em : < <http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/milho>>. Acesso em 21/jan./2015.

MARASAS, W. F. O. Discovery and occurrence of the fumonisins: a historical perspective. **Environmental Health Perspectives**, Durham, v. 109, suppl 2, p. 239-243, 2001.

MARASAS, W. F. . et al. Fumonisins disrupt sphingolipid metabolism, folate transport, and neural tube development in embryo culture. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 134, p. 711–716, 2004.

MARTINS, H. M. et al. Fumonisins and deoxynivalenol in corn-based food products in Portugal. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 46, p. 2585-2587, 2008.

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

MATHUR, S. et al. Fumonisin B1 is hepatotoxic and nephrotoxic in milk-fed calves. **Toxicological Sciences**, Oxford, v. 60, p. 385-396, 2001.

MERRILL JR, A. H. et al. Sphingolipids: the enigmatic lipid class: biochemistry, physiology and pathophysiology. **Toxicology and Applied Pharmacology**, Maryland Heights, v. 142, p. 208–225, 1997.

MERRIL, A. H.; SCHMELZ, E. M. Sphingolipids: mechanism-based inhibitors of carcinogenesis produced by animals, plants and other organisms. In: WILDMAN, R. E. C. (Ed.). **Handbook of nutraceuticals and functional foods**. London: CRC Press, 2000. cap. 23.

MERRILL, JR. A.H. et al. Sphingolipid metabolism: roles in signal transduction and disruption by fumonisins. **Environmental Health Perspectives**, Durham, v. 109, p. 283–289, 2001.

MIEKELEY, N.; DIAS CARNEIRO, M. T.; PORTO DA SILVEIRA, C. L. How reliable are

human hair reference intervals for trace elements. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 218, p. 9–17, 1998.

MILLER, J. D. Factors that affect the occurrence of fumonisin. **Environmental Health Perspectives**, Durham, v. 109, p. 321-324, 2001.

MILLER, M. J.; LINZ J. E. Genetic mechanisms involved in regulation of mycotoxin biosynthesis. In: SHETTY, K.; POMETTO, R. E.; LEVIN, R. E. (Eds.). **Food Biotechnology**. 2nd ed. New York: CRC Press, 2006.

MIRANDA, R.A.; DUARTE, J.O.; GARCIA, J.C. EMBRAPA MILHO. Cutivo do milho. Economia da Produção, 2012. Disponível em <http://www.cnpms.embrapa.br/publicacoes/milho_8_ed/economia.htm>. Acesso em 20/jan/2015.

MÜLLER, S.; DEKANT, W.; MALLY, A. Fumonisin B1 and the kidney: Modes of action for renal tumor formation by fumonisin B1 in rodents. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, p.3833-3846, 2012.

MISSMER, S. A. et al. Exposure to fumonisins and the occurrence of neural tube defects along the Texas-Mexico border. **Environmental Health Perspectives**, Durham, v. 114, n. 2, 2006, p. 237-241.

MOGENSEN, J.M.; LARSEN, T.O.; NIELSEN, K.F., Widespread occurrence of the mycotoxin fumonisin B2 in wine. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 4853-4857, 2010.

MONBALIU, S. et al. Occurrence of mycotoxins in feed as analyzed by a multi-mycotoxin LC-MS/MS method. **J Agric Food Chem**, v. 58, p. 66-71, 2010.

MORENO, E. C. et al. Co-occurrence of mycotoxins in corn samples from the Northern region of Paraná State, Brazil. **Food Chemistry**, London, v. 116, p. 220-226, 2009.

MURPHY, G., A. et al. Hardware: software implementation of public-key cryptography for wireless sensor networks. In: IRISH SIGNALS AND SYSTEMS CONFERENCE, 2006, Ireland. Proceedings... Ireland, 2006. p. 463-468. 2006.

NAKAHARA, Y. Hair analysis for abused and therapeutic drugs. **Journal of Chromatography B**, Amsterdam, v. 733, p.161–180, 1999.

NELSON, P. E. et al. Production of fumonisins by *Fusarium moniliforme* strains from various substrates and geographic areas. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 57, p. 2410-2412, 1991.

NIKIEMA, P. A. et al. Fumonisin exposure and the sphinganine/sphingosine ratio in urine, serum and buccal cells in adults from Burkina Faso, West Africa. **World Mycotoxin**, Wageningen, v. 1, p. 483-491, 2008.

NATIONAL TOXICOLOGY PROGRAM -NTP. Technical report on the Toxicology and carcinogenesis studies of fumonisin B1 in F344/N rats and B6C3F1 mice. **National Toxicology Program**, n. 496, Dec. 2001.

OLINTO, M. T. et al. Twenty-four-hour recall overestimates the dietary intake of malnourished children. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 125, n. 4, p. 880-884, 1995.

ORSI, R. B. et al. Effects of oral administration of aflatoxin B1 and fumonisin B1 in rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). **Chemico-Biological Interactions**, Limerick, v. 170, p. 201-208, 2007.

ORSI, R. B. et al. Acute toxicity of a single gavage dose of fumonisin B1 in rabbits. **Chemico-Biological Interactions**, Limerick, v. 179, p. 351-355, 2009.

PLATTNER, R. D. et al. A new fumonisin from solid cultures of *Fusarium moniliforme*. **Mycopathologia**, Dordrecht, v. 117, p. 23-28, 1992.

PETTERSON, S. W. Phylogenetic relationships in *Aspergillus* based on rDNA sequence analysis. In: SAMSON, R. A.; PITT, J. I. (Eds.). **Integration of modern taxonomic methods for *Penicillium* and *Aspergillus* classification**. Amsterdam: Harwood Academic Publishers, 2000. p. 323–355.

PITT, R. et al. **A user's guide for the assessment of non-stormwater discharges into separate storm drainage systems**. Cincinnati, Ohio: Jointly published by the Center of Environmental Research Information, US EPA, and the Urban Waste Management & Research Center (UWM&RC), 1993. EPA/600/R-92/238. PB93-131472.

PITTET, A.; ROYER, D. Rapid, low cost thin-layer chromatographic screening method for the detection of ochratoxin a in green coffee at a control level of 10 µg/kg. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 50, n. 2, p. 243-247, 2002.

PHATHAPKUMAR, S. H. et al. Disease outbreak in laying hens arising from the consumption of fumonisin-contaminated food. **British Poultry Science**, London, v. 38, p. 475-479, 1997.

POLLING, S. M.; PLATTNER, R. D. Rapid purification of fumonisins and their hydrolysis products with solid-phase extraction columns. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 47, p. 2344-2349, 1999.

POZZI, C. R. et al. Aspectos relacionados à ocorrência e mecanismo de ação de fumonisinas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 32, n. 5, p. 901-907, 2002.

PRELUSKY, D. B.; TRENHOLM, H. L.; SAVARD, M. E. Pharmacokinetic fate of C-labelled fumonisin B1 in swine. **Natural Toxins**, New York, v. 2, p. 73-80, 1994.

PRELUSKY, D. B.; SAVARD, M. E.; TRENHOLM, H. L. Pilot study on the plasma pharmacokinetics of fumonisin B1 in cows following a single dose by oral gavage or intravenous administration. **Natural Toxins**, New York, v. 3, p. 389-394, 1995

PRELUSKY, D.B.; MILLER, J.D.; TRENHOLM, H.L. Disposition of 14C-derived residues in tissues of pigs fed radiolabelled fumonisin B1. **Food Additives and Contaminants**, v. 13, p. 155-162, 1996.

QIU, M.; LIU, X. Determination of sphinganine, sphingosine and sphinganine/ sphingosine ratio in urine of humans exposed to dietary fumonisin B₁. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 18, p. 263–269, 2001.

RANUM, P.; ROSAS, J.O.; CASAL, M.N.G. Global maize production, utilization and consumption. **Annals of the New York Academy of Science**, v. 1312, p. 105-112, 2014.

REN, Y. et al. Simultaneous determination of fumonisins B1, B2 and B3 contaminants in maize by ultra high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 692, p. 138-145, 2011.

RHEEDER, J. P. et al. *Fusarium moniliforme* and fumonisins in corn in relation to human esophageal cancer in Transkei. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 82, p. 353–357, 1992.

RIBANI, M. et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, São Paulo, v. 27, p. 771-780, 2004.

RIBAR, D. L. B. et al. Nutrição e saúde infantil em uma comunidade indígena Teréna, Mato Grosso do Sul, BRASIL. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 17, p. 323-331, 2001.

RILEY, R. T.; WANG, E.; MERRILL, A. H. Liquid chromatographic determination of sphinganine and sphingosine: use of the free sphinganine-to-sphingosine ratio as a biomarker for consumption of fumonisins. **Journal of AOAC International**, Arlington, v. 77, p. 533–540, 1994.

RILEY, R. T. et al. Sphingolipid perturbations as mechanisms for fumonisin carcinogenesis. **Environmental Health Perspectives**, Durham, v. 109, suppl 2, p. 301–308, 2001.

RILEY, R. T. et al. The kinetics of urinary fumonisin B₁ excretion in humans consuming maize-based diets. **Molecular nutrition & food research**, Weinheim, v. 56, p. 1445-1455, 2012.

ROCHA, L. O. et al. Mycoflora and co-occurrence of fumonisin and aflatoxins in freshly harvested corn in different regions in Brazil. **International Journal of Molecular Science**, Basel, v. 10, p. 5090-5103, 2009.

RODRIGUES, J. L. et al. Evaluation of the use of human hair for biomonitoring the deficiency of essential and exposure to toxic elements. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 405, p. 370-376, 2008.

RUBERT, J. et al. One-year monitoring of aflatoxins and ochratoxin A in tiger-nuts and their beverages. **Food Chemistry**, v. 127, p. 822-826, 2011.

RUBERT, J.; SOLER, C.; MAÑES, J. Application of an HPLC–MS/MS method for mycotoxin analysis in commercial baby foods. **Food Chemistry**, v. 133, p. 176-183, 2012.

SADLER, T. W. et al. Prevention of fumonisin B₁-induced neural tube defects by folic acid. **Teratology**, New York, v. 66, p. 169–176, 2002.

SALEM, N. M.; AHMAD, R. Mycotoxin in food from Jordan: Preliminary survey. **Food Control**, Guildford, v. 21, p. 1099–1103, 2010.

SANCHIS, V. et al. Incidence of mycotoxigenic *Alternaria alternata* and *Aspergillus flavus* in barley. **Journal of food protection**, Des Moines, v. 56, p. 246–248, 1993.

SANCHO, A. et al. Sphinganine and sphingosine levels and ratio in urine and blood samples from a Catalanian population (Spain). **Food Additives and Contaminants**, London, p. 1–41, 2011.

SANTOS, L. M. P., PEREIRA, M. Z. Efeito da fortificação com ácido fólico na redução dos defeitos no tubo neural. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 23, p. 17–24, 2007.

SCAFF, R. M. C.; SCUSSEL, V. M. Esophageal cancer in the Southern region of Brazil - Cases from Santa Catarina State. **Mycotoxin Contamination: Health Risk and Prevention Project**, p. 226–230, 1999.

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**, Curitiba, v. 47, p. 911–919, 2004.

SCUDAMORE, K. A.; PATEL, S. Survey for aflatoxins, ochratoxin A, zearalenone and fumonisins in maize imported into the United Kingdom. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 17, p. 407–416, 2000.

SENYUVA, H.Z. et al. Determination of fumonisins B₁ and B₂ in corn by LC/MS with immunoaffinity column cleanup: interlaboratory study. **J AOAC Int.**, v. 93, p. 611–621, 2010.

SEWRAM, V. et al. Assessing chronic exposure to fumonisin mycotoxins: the use of hair as a suitable noninvasive matrix. **Journal of Analytical Toxicology**, Niles, v. 25, p. 450–455, 2001.

SEWRAM, V. et al. Fumonisin mycotoxins in human hair. **Biomarkers**, London, v. 8, p. 110-118, 2003.

SIEMENS. **Sistemas ADVIA Centaur**: folate in serum: anual de instruções, 2009.

SILVA, L. J. G. **Avaliação e validação do grau de exposição de distintos tipos de populações às fumonisinas B1 e B2**: alimentos contaminados, teor na urina e relação esfinganina/esfingosina. 2008. Tese (Doutorado) - Universidade de Coimbra, Coimbra, 2008.

SILVA, L. J. G.; LINO, C.; PENA, A. Sphinganine–sphingosine ratio in urine from two Portuguese populations as biomarker to fumonisins exposure. **Toxicon**, Elmsford, v. 54, p. 390–398, 2009.

SILVA, L.J.G.; PENA, A.; LINO, C.M.; FÉRNANDEZ, M.F.; MANES, J. Fumunisins determination in urine by LC-MS-MS. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Heidelberg,. Vol. 396, p. 809-816. 2010.

SLATER, B. et al. Validation of a semi-quantitative adolescent food frequency questionnaire applied at a public school in São Paulo. **European Journal of Clinical Nutrition**, London, v. 57, p. 629-635, 2003.

SMITH, G. W. et al. Cardiovascular effects of fumonisins in swine. **Fundamental and Applied Toxicology**, Akron, v. 31, p. 160–172, 1996.

SHEPHARD, G. S. et al. Quantitative determination of fumonisins B₁ and B₂ by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. **Journal of Liquid Chromatography**, New York, v. 13, p. 2077-2087, 1990.

SHEPHARD, C. S.; THIEL, P. G.; SYDENHAM, E. W. Determination of fumonisin B₁ in lasma and urine by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography**, Amsterdam, v. 574, p. 299-304, 1992.

SHEPHARD, G. S. et al. Distribution and excretion of a single dose of the mycotoxin fumonisin B1 in a non -human primate. **Toxicon**, v. 32, p. 735-741, 1994.

SHEPHARD, G. S. et al. Worldwide survey of fumonisin contamination of corn and corn-based products. **Journal of AOAC international**, Arlington, v. 79, n. 3, p. 671-686, 1996.

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

SHEPHARD, G.S. et al. Do fumonisin mycotoxin occur in wheat? **J. Agric. Food Chem.**, v. 53, p. 9293-9296, 2005.

SHEPHARD, G. S.; VAN DER WESTHUIZEN, L.; SEWRAM, V. Biomarkers of exposure to fumonisin mycotoxins: a review. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 24, p. 1196–1201, 2007.

SHEPHARD, G.S. et al. Developments in mycotoxin analysis: an update for 2009-2010. **World Mycotoxin Journal**, v. 4, p. 3-28, 2011.

SHEPHARD, G.S. et al. Multiple mycotoxin exposure determined by urinary biomarkers in rural subsistence farmers in the former Transkei, South Africa. **Food and Chemical Toxicology**, v. 62, p. 217-225, 2013.

SHETTY, P. H.; BHAT, R. V. Sensitive method for the detection of fumonisin B₁ in human urine. **Journal of Chromatography B**, Amsterdam, v. 705, p. 171-173, 1998.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE PATOLOGIA CLÍNICA/Medicina Laboratorial.Recomendações da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial para Coleta de Sangue Venoso. 2009.

SOEIRO, B. T. et al. Investigação da qualidade de farinhas enriquecidas utilizando análise por componentes principais (PCA). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 30, p. 618-624, 2010.

SOLFRIZZO, M.; AVANTAGGIATO, G.; VISCONTI, A. Rapid method to determine sphinganine/ sphingosine in human and animal urine as a biomarker for fumonisin exposure. **Journal of Chromatography B**, Amsterdam, v. 69, p. 87-93, 1997.

SOLFRIZZO, M. et al. Comparison of urinary sphingolipids in human populations with high and low maize consumption as a possible biomarker of fumonisin dietary exposure. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 21, p. 1090-1095, 2004.

SORIANO, J. M.; DRAGACCI, S. Intake, decontamination and legislation of fumonisins in foods. **Food Research International**, Barking, v. 37, n. 4, p. 367-374. 2005.

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

STACK, M. E.; EPPLEY, R. M. Liquid chromatographic determination of fumonisins B₁ and B₂ in corn and corn products. **Journal of AOAC International**, Arlington, v. 75, p. 834– 837, 1992.

STANKOVIC, S. et al. Fumonisin B₁ and its co-occurrence with other fusariotoxins in naturally-contaminated wheat grain. **Food Control**, Guildford, v. 23, p. 384-388, 2012.

STATSOFT. **Statistica quick reference**. Tulsa: StatSoft Inc., 1992.

STOCKMANN-JUVALA H.; SAVOLAINEN, K. A review of the toxic effects and mechanisms of action of fumonisin B₁. **Human and Experimental Toxicology**, Hampshire, v. 27, p. 799–809, 2008.

STOEV, S.D. et al. Mycotoxic nephropathy in Bulgarian pigs and chickens: complex aetiology and similarity to Balkan endemic nephropathy. **Food Addit Contam Part A**, v. 27, p.72-88, 2010.

SYDENHAM, E. W. et al. Evidence for the natural occurrence of fumonisin B₁, a mycotoxin produced by *Fusarium moniliforme*, in maize. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 38, p. 285–290, 1990.

SYDENHAM, E. W. et al. Fumonisin contamination of commercial corn-based human food stuffs. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 39, p. 2014-2018. 1991.

SYDENHAM, E.W.; SHEPHARD G.S.; THIEL P.G; STOKENSTROM S.; SNIJMAN P.W. Liquid chromatographic determination of fumonisins B₁, B₂ and B₃ in corn. **Journal of AOAC International**, Arlington, v. 79, p. 688-696, 1996.

THIEL, P. G. et al. The implications of naturally occurring levels of fumonisins in corn for human and animal health. **Mycopathologia**, Den Haag, v. 117, p. 3-9, 1992.

THOMPSON F. E.; BYERS T. Dietary assessment resource manual. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 124, p. 2245-2317, 1994.

TINKER, S. C. Folic acid intake among U.S. women aged 15-44 years, National Health and nutrition examination survey 2003-2006. **American Journal of Preventive Medicine**, New York, v. 38, p. 534-541, 2010.

TORRES, O. et al. Urinary fumonisin B₁ and estimated fumonisin intake in women from high- and low-exposure communities in Guatemala. **Mol. Nutr. Food Research**, v. 58, p. 973-983, 2014.

TURNER, P. C.; NIKIEMA, P.; WILD, C. P. Fumonisin contamination of food: progress in development of biomarkers to better assess human health risks. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 443, p. 81-93, 1999.

UENO, Y. et al. Fumonisins as a possible risk factor for primary liver cancer: a 3-year study of corn harvested in Haimen, China, by HPLC and ELISA. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 35, p. 1143-1150, 1997.

VAN DER WESTHUIZEN, L. et al. Sphinganine/Sphingosine ratio in plasma and urine as a possible biomarker for fumonisin exposure in humans in rural areas of Africa. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 37, p. 1153-1158, 1999.

VAN DER WESTHUIZEN, L. et al. Fumonisin contamination and *Fusarium* incidence in corn from Santa Catarina, BRAZIL. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 51, p. 5574-5578, 2003.

VAN DER WESTHUIZEN, L. et al. Simple intervention method to reduce fumonisin exposure in a subsistence maize-farming community in South Africa. **Food Addit Contam Part A**, v. 27, p. 1582-8, 2010.

VAN DER WESTHUIZEN, L. et al. Fumonisin B₁ as a urinary biomarker of exposure in a maize intervention study among South African subsistence farmers. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, Philadelphia, v. 20, p. 483-489, 2011.

VAN DER WESTHUIZEN, L. **Fumonisin exposure biomarkers in humans consuming maize staple diets**. 2011. Dissertation (PhD) - Faculty of Health Science at the University of Stellenbosch, Stellenbosch, 2011.

VARGA, J. et al. Fumonisin contamination and fumonisin producing Black Aspergilli in dried vine fruits of different origin. **International Journal of Food Microbiology**, v. 143, p. 143-149, 2010.

VELSONDER, R. F.; LABEDA, D. F.; PETERSON, R. E. Phytotoxic activity of select watersoluble metabolites of *Fusarium* against *Lemma minor*. **Mycopathologia**, Den Haag, v. 118, p. 185-189, 1990.

VILJOEN, D. L. et al. The prevalence and prevention of neural tube defects in Cape Town. **South African Medical Journal**, Cape Town, v. 85, p. 630-632. 1995.

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

XU, L. et al. Evaluation of fumonisin biomarkers in a cross-sectional study with two high-risk populations in China. **Food Addit Contam**, v.27, p. 1161-9, 2010.

ZAIN, M. E. Impact of mycotoxins on humans and animals. **Journal of Saudi Chemical Society**, Saudi Arabia, v. 15, p. 129-144, 2011.

ZÖLLNER, P.; MAYER-HELM, B. Trace mycotoxin analysis in complex biological and food matrices by liquid chromatography-atmospheric pressure ionisation mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1136, p.123-169, 2006.

WAES J.G.V. et al. Maternal fumonisin exposure and risk for neural tube defects: mechanisms in an in vivo mouse model. **Birth Defects Res A Clin Mol Teratol**, v. 73, p. 487-497, 2005.

WAES, J. G. et al. Increased sphingoid base-1-phosphates and failure of neural tube closure after exposure to fumonisin or FTY720. **Birth Defects Research (Part A)**, Hoboken, v. 94, p. 790-803, 2012.

WANG, E. et al. Inhibition of sphingolipid biosynthesis by fumonisins implications for diseases associated with *Fusarium moniliforme*. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 266, p. 1486-1490, 1991.

WANG, H. et al. The fumonisin B1 content in corn from North China, a high risk area of esophageal cancer. **Journal of Environmental Pathology and Oncology**, Danbury, v. 19, n. 1-2, p. 139-141, 2000.

WANG, J. et al. Fumonisin level in corn-based food and feed from Lixian County, a high-risk area for esophageal cancer in China. **Food Chemistry**, London, v. 106, p. 241-246, 2008.

WANG, S. K. et al. Stimulation of the proliferation of human normal esophageal epithelial cells by fumonisin B₁ and its mechanism. **Experimental and Therapeutic Medicine**, Greece, v. 7, p. 55-60, 2014.

WAŚKIEWICZ, A., et al.. Occurrence of *Fusarium* fungi and mycotoxins in marketable asparagus spears. **Polish Journal of Environmental Studies**, v. 19, p. 219-225, 2010.

WORLD CANCER RESEARCH FUND INTERNATIONAL. WCRF. Disponível em <<http://www.wcrf.org>>. Acesso 05. Jan. 2015.

WOLINSKY, J. A.; DRISKELL, I. **Sports nutrition vitamins and trace elements**. New York: [Taylor & Francis](#), 2006.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Safety evaluation of certain food additives and contaminants. **Food Additives Series**, Geneve, n. 40, 1996.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Safety evaluation of certain food additives and contaminants. **Food Additives Series**, Geneve, n. 40, 1996.

_____. Environmental health criteria 219. Fumonisin B1. In: MARASAS, W. F. O. et al. (Eds.). **International programme on chemical safety, United Nations environmental**

programme, the international labour organization and the World Health Organization. Geneva, Switzerland: World Health Organization, 2000. p. 1–150.

WU, F. Mycotoxin risk assessment for the purpose of setting international regulatory standards. *Environ. Science Technology*, Rozelle, v. 38, n. 15, p. 4049-4055, 2004.

WU, F. Bt Corn's reduction of mycotoxins: Rregulatory decisions and public opinion. In: JUST, R. E.; ALSTON, J. M. ZILBERMAN. D. (Eds.). **Regulating agricultural biotechnology: economics and policy.** 2nd ed. New York: Springer, 2006. v. 30, p. 179-200, part 1.

YIN, J. J. et al. Effects of fumonisin B₁ on lipid peroxidation in membranes. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1371, p. 134-142, 1998.

YOSHIZAWA, T. YAMASHITA, A.; LUO, Y. Fumonisin occurrence in corn from high- and low-risk areas for human esophageal cancer in China. **Applied and environmental microbiology**, Washington, v. 60, p. 1626–1629, 1994.

APÊNDICE

APÊNDICE A. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado(a) a participar, como voluntário(a), da pesquisa Avaliação da exposição humana à Fumonisina B₁ nos alimentos utilizando biomarcadores em materiais biológicos, no caso de você concordar em participar, favor assinar ao final do documento. Sua participação não é obrigatória, e a qualquer momento, você poderá desistir de participar e retirar seu consentimento. Sua recusa não trará nenhum prejuízo em sua relação com o pesquisador ou com a instituição.

Você receberá uma cópia deste termo onde consta o telefone e endereço do pesquisador principal, podendo tirar dúvidas do projeto e de sua participação.

NOME DA PESQUISA: Avaliação da exposição humana à Fumonisina B₁ nos alimentos utilizando biomarcadores em materiais biológicos

PESQUISADOR(A) RESPONSÁVEL: Prof. Dr. Carlos Augusto Fernandes de Oliveira

ENDEREÇO: Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos- FZEA/USP

TELEFONE: 19- 3654179

PESQUISADORES PARTICIPANTES: Keliani Bordin, Roice Eliana Rosim e Dr. José Carlos Mantovani

OBJETIVOS: O objetivo do trabalho é avaliar a interação da micotoxina Fumonisina B₁ com o organismo de seres humanos, conhecendo a dieta e investigando os resíduos e indicadores presentes em sangue, urina e cabelo.

PROCEDIMENTOS: Se concordar em participar da pesquisa, inicialmente você terá que responder a um questionário sobre os hábitos alimentares, qual a frequência e quantidade de produtos a base de milho e trigo, além de forma que adquire esses alimentos, plantio ou compra de produtos. Os procedimentos do estudo serão realizados da seguinte forma: será coletada uma amostra de aproximadamente 50 gramas de milho, trigo e derivados antes de processar (cozinhar, cortar) e outra amostra desses alimentos prontos para o consumo, depois do processamento, no máximo 6 amostras por residência. No dia posterior, serão coletadas as amostras de sangue, urina e cabelo. As amostras de sangue e cabelo devem ser coletadas na parte da manhã, na Unidade Básica de Saúde (UBAS) do *campus*, não é exigido jejum. Será fornecido recipiente adequado para coletar a urina. O experimento será realizado 4 vezes durante 12 meses, isto é, a cada 3 meses será realizada uma análise.

RISCOS E DESCONFORTOS: Existe um desconforto mínimo a você que se submeter à coleta de sangue, urina e cabelo, sendo que se justifica pela necessidade de coletarmos esse material para sabermos o quanto da toxina permanece no nosso organismo e o quanto é excretado.

BENEFÍCIOS: Conhecendo o quanto o organismo absorve essa toxina temos suporte para estudar como podemos reduzir essa absorção podendo evitar possíveis doenças decorrentes dessa interação. Os resultados podem auxiliar também na elaboração de uma legislação para esse tipo de toxina, já que no Brasil ainda não existe nenhuma diretriz específica nessa área.

CUSTO/REEMBOLSO PARA O PARTICIPANTE: Você não terá que arcar com nenhum gasto decorrente da sua participação, além de fornecer uma amostra dos alimentos, nas 4 repetições do experimento. Você não receberá qualquer espécie de reembolso ou gratificação devido à participação na pesquisa.

CONFIDENCIALIDADE DA PESQUISA: Os pesquisadores irão tratar a sua identidade com padrões profissionais de sigilo. Seu nome ou o material que indique a sua participação não será liberado sem a sua permissão. Você não será identificado(a) em nenhuma publicação que possa resultar deste estudo. Serão divulgados dados diretamente relacionados aos objetivos da pesquisa.

Assinatura do Pesquisador Responsável: _____

CONSENTIMENTO DE PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO SUJEITO

Eu, _____, RG _____ e CPF _____, declaro que li as informações contidas nesse documento, fui devidamente informado(a) pelo pesquisador(a) – Dr. Carlos Augusto Fernandes de Oliveira - dos procedimentos que serão utilizados, riscos e desconfortos, benefícios, custo/reembolso dos participantes, confidencialidade da pesquisa, concordando ainda em participar da pesquisa. Foi-me garantido que posso retirar o consentimento a qualquer momento, sem que isso leve a qualquer penalidade. Declaro ainda que recebi uma cópia desse Termo de Consentimento.

LOCAL E DATA:

Pirassununga, abril de 2012.

NOME E ASSINATURA DO SUJEITO OU RESPONSÁVEL (menor de 21 anos):

(Nome por extenso)

(Assinatura)

APÊNDICE B. Procedimentos para a coleta de cabelo

Procedimentos:

- a) Higienizar as mãos;
- b) Higienizar a tesoura com álcool 70%;
- c) Posicione-se atrás da pessoa da qual deverá ser coletada a amostra de cabelo;
- d) Caso seja necessário separe um chumaço de cabelo e prenda-o com o clipe acima da área a ser coletada;
- e) Selecione uma pequena porção de cabelo e corte-o o mais rente possível do couro cabeludo (lado das raízes) com um diâmetro de aproximadamente 6 mm (mais ou menos a espessura de um lápis), o mais próximo possível da raiz, da região vértice posterior da cabeça;

- f) Pressione as pontas recém cortadas do cabelo em seus dedos e coloque-as na folha de alumínio, com o lado das raízes (do corte) para o lado da folha “pontudo”. Certifique-se que as pontas estejam alinhadas. Se o cabelo foi muito comprido, pode utilizar as folhas de alumínio maiores e dobrá-las no meio, mas sempre com o lado do corte para o lado pontudo do papel;
- f) Dobre a folha de alumínio firmemente de maneira que esta fique perfeitamente fechada. Coloque a folha de alumínio dentro do pacote plástico identificado;
- g) Armazenar a -20°C;

APÊNDICE C. Questionário de Frequência Alimentar

1. Dados gerais

Nome: _____

Endereço: _____

Idade: _____ Peso: _____

Data da Aplicação: _____ Telefone: _____

2. Quais os alimentos e as porções que você costuma comer? Por favor, responda a porção estimada.

Polenta:

() 1 fatia () 2 fatias () 3 fatias Outros: _____
() Nunca () Menos de 1 vez por mês () 1-3 vezes por mês () 2-4 vezes por semana () todos os dias () 2 vezes ao dia

Pamonha:

() 1 unidade () 2 unidades () 3 unidades Outros: _____
() Nunca () Menos de 1 vez por mês () 1-3 vezes por mês () 2-4 vezes por semana () todos os dias () 2 vezes ao dia

Curau ou cus-cuz:

() 1 fatia () 2 fatias () 3 fatias Outros: _____
() Nunca () Menos de 1 vez por mês () 1-3 vezes por mês () 2-4 vezes por semana () todos os dias () 2 vezes ao dia

Bolo ou pão de milho:

() 1 fatia média () 2 fatias médias () 3 fatias médias Outros: _____
() Nunca () Menos de 1 vez por mês () 1-3 vezes por mês () 2-4 vezes por semana () todos os dias () 2 vezes ao dia

Creme de milho:

() ½ concha () 1 concha () 2 conchas Outros: _____
() Nunca () Menos de 1 vez por mês () 1-3 vezes por mês () 2-4 vezes por semana () todos os dias () 2 vezes ao dia

Farinha de milho amarela (cuscuz, cuscuz salgado, farofa):

() 2 colheres sopa () 4 colheres sopa () 6 colheres sopa Outros: _____
() Nunca () Menos de 1 vez por mês () 1-3 vezes por mês () 2-4 vezes por semana () todos os dias () 2 vezes ao dia

Milho enlatado:

() 1 colher sopa () 2 colheres sopa () 3 colheres sopa Outros: _____
() Nunca () Menos de 1 vez por mês () 1-3 vezes por mês () 2-4 vezes por semana () todos os dias () 2 vezes ao dia

Milho cozido:

() ½ espiga () 1 espiga () 2 espigas Outros: _____
() Nunca () Menos de 1 vez por mês () 1-3 vezes por mês () 2-4 vezes por semana () todos os dias () 2 vezes ao dia

Flocos de milho (cereal matinal sucrilhos ou similares):

() ½ xícara/copo () 1 xícara/copo () 2 xícaras/copos Outros: _____
() Nunca () Menos de 1 vez por mês () 1-3 vezes por mês () 2-4 vezes por semana () todos os dias () 2 vezes ao dia

Salgadinhos (Fandangos, Cheetos e similares, EXCETO BATATA FRITA):

() 1 pacote pequeno () 1 pacote médio () 1 pacote grande Outros: _____
() Nunca () Menos de 1 vez por mês () 1-3 vezes por mês () 2-4 vezes por semana () todos os dias () 2 vezes ao dia

Pipoca:

() 1 pcte pequeno () 1 pcte médio () 1 pcte grande Outros: _____
() Nunca () Menos de 1 vez por mês () 1-3 vezes por mês () 2-4 vezes por semana () todos os dias () 2 vezes ao dia

Canjica:

() ½ concha () 1 concha () 2 conchas Outros: _____
() Nunca () Menos de 1 vez por mês () 1-3 vezes por mês () 2-4 vezes por semana () todos os dias () 2 vezes ao dia

3. Qual é o local que você costuma fazer as refeições?

0- Não faz	3- Restaurante Universitário	() Café da Manhã
1- Casa	4- Outro restaurante/lanchonete	() Almoço
2- No trabalho, mas leva de casa	5- Escola	() Jantar

4. Qual é a origem dos alimentos de sua casa?

0- Não compra	() Supermercado	() Sacolão
1- Compra sempre	() Feira/ambulante	() Padaria
2- Compra às vezes	() Produtor	
3- Raramente	() Produção própria	

5. Conhecimento sobre fungo e micotoxina:

- a)** Você ou alguém da sua família sabe algo sobre fungos (mofos ou bolores) nos alimentos? E sobre toxinas ou venenos produzidos por fungos (mofos)?

- b)** E quanto aos problemas causados pelos fungos (bolores e leveduras) conhece algum?

- c)** Você e sua família descartam os alimentos contaminados mofados? Se sim, a parte contaminada ou todo o alimento?

- d)** Você ou alguém de sua família conhece alguma forma para prevenir a contaminação dos alimentos por fungos (mofos)?

ANEXOS

ANEXO A. Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa.

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA
DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

www.hcrp.usp.br

Ribeirão Preto, 06 de outubro de 2010

Ofício nº 3301/2010
CEP/MGV

Prezados Senhores,

O trabalho intitulado **"AVALIAÇÃO DA EXPOSIÇÃO HUMANA À FUMONISINA B₁ NOS ALIMENTOS UTILIZANDO BIOMARCADORES EM MATERIAIS BIOLÓGICOS"** foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, em sua 313ª Reunião Ordinária realizada em 04/10/2010 e enquadrado na categoria: **APROVADO, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**, de acordo com o Processo HCRP nº 7962/2010.

Este Comitê segue integralmente a Conferência Internacional de Harmonização de Boas Práticas Clínicas (ICH-GCP), bem como a Resolução nº 196/96 CNS/MS.

Lembramos que devem ser apresentados a este CEP, o Relatório Parcial e o Relatório Final da pesquisa.

Atenciosamente.

DRª MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA
Vice-Coordenadora do Comitê de Ética em
Pesquisa do HCRP e da FMRP-USP

ANEXO B. Adendo Comitê de Ética.

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA
DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Ribeirão Preto, 18 de julho de 2012

Ofício nº 2587/2012
CEP/MGV

PROCESSO HCRP nº 7962/2010

Prezados Pesquisadores,

O Comitê de Ética em Pesquisa, em sua 349ª Reunião Ordinária realizada em 16/07/2012, analisou e aprovou a solicitação de adendo (avaliação da exposição humana à fumonisina em um grupo de pacientes que consome diariamente o milho e seus derivados), bem como aprovou o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido enviado em 04/07/2012, referente ao projeto intitulado **"AVALIAÇÃO DA EXPOSIÇÃO HUMANA À FUMONISINA B₁ NOS ALIMENTOS UTILIZANDO BIOMARCADORES EM MATERIAIS BIOLÓGICOS"**. O CEP também tomou ciência do relatório parcial de desenvolvimento da pesquisa.

Atenciosamente.

DRª MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA
Coordenadora do Comitê de Ética
em Pesquisa do HCRP e da FMRP-USP

Ilustríssimos Senhores

CARLOS AUGUSTO FERNANDES DE OLIVEIRA
KELIANI BORDIN (Aluna de Doutorado)
Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos-USP

ANEXO C. Artigos publicados

Assessment of dietary intake of fumonisin B₁ in São Paulo, Brazil

K. Bordin^a, R.E. Rosim^a, D.V. Neeff^a, G.E. Rottinghaus^b, C.A.F. Oliveira^{a,*}

^a Department of Food Engineering, School of Animal Science and Food Engineering, University of São Paulo, Av. Duque de Caxias Norte, 225, CEP 13635-900 Pirassununga, SP, Brazil

^b Veterinary Medical Diagnostic Laboratory, College of Veterinary Medicine, University of Missouri, Columbia, MO 65211, USA

ARTICLE INFO

Article history:

Received 10 August 2013

Received in revised form 13 December 2013

Accepted 19 January 2014

Available online 26 January 2014

Keywords:

FB₁
Corn-based products
Estimation of intake

ABSTRACT

In this study, fumonisin B₁ (FB₁) consumption was assessed through determination of FB₁ in corn meal, corn flour, corn flakes, polenta, canned corn and popcorn collected from homes of residents of Pirassununga, São Paulo, Brazil, and using a Food Frequency Questionnaire (FFQ) filled out by the residents. One hundred and twenty samples were collected from 39 residents on four separate occasions. FB₁ was determined by high performance liquid chromatography using a validated method that uses SAX column clean-up. The highest levels of FB₁ were found in corn meal at a mean concentration of 474.6 µg kg⁻¹. However, none of the samples tested for FB₁ had levels above the tolerance limit established in Brazil. The mean probable daily intake (PDI_M) of FB₁ was 63.3 ng kg⁻¹ body weight day⁻¹, which is approximately 3% of the provisional maximum tolerable daily intake (PMTDI) recommended for fumonisins.

© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Fumonisin (FBs) are a group of structurally related mycotoxins produced mainly by *Fusarium verticillioides* (World Health Organization, 2002). Although 28 fumonisin analogs have been identified since 1988, fumonisin B₁ (FB₁) is the most prevalent and also the most toxic of the fumonisins (Domijan, 2012). The incidence of fumonisins in foods was for the first time related to the occurrence of esophageal cancer in the Transkei region of Africa (Rheeder, Marasas, Thiel, Sydenham, Shepherd, & Van Schalwyk, 1992). The same relation has also been reported in China (Chu & Li, 1994), Iran (Alizadeh et al., 2012), Northern Argentina (Solfrizzo et al., 2004) and Southern Brazil (Westhuizen et al., 2003). FB₁ is considered a possible carcinogen in humans, and is classified in group 2B by the International Agency for Research on Cancer (2002). Furthermore, a high occurrence of FB₁ in corn and corn products has been correlated with an increased incidence of neural tube defects (NTDs) along the Texas–Mexico border (Missmer et al., 2006).

Estimation of the degree of human exposure is an essential part of the risk evaluation of chemical substances in food products (World Health Organization, 2002). Human exposure to mycotoxins may be measured by using the data on consumption of contaminated foodstuffs, and the average occurrence of the mycotoxin. In this estimation, the degree of exposure is measured in terms of probable daily intake (PDI) per unit of body weight, and is

generally expressed in ng kg⁻¹ of body weight (b.w.) day⁻¹ (Jager, Tedesco, Souto, & Oliveira, 2013). In risk analysis, PDI can be compared with tolerable daily intake (TDI) determined in toxicological studies. The World Health Organization (2002) established a provisional maximum tolerable daily intake (PMTDI) of 2 µg kg⁻¹ of body weight for fumonisins B₁, B₂ and B₃, alone or in combination.

Corn grows in tropical and temperate regions around the world and is the second most cultivated crop in Brazil (Rocha, Nakai, Brahini, Reis, Kobashigawa, & Corrêa, 2009). It has a high nutritional value and plays an important role in human nutrition worldwide, especially in Brazil (Martins et al., 2012). Previous studies in Brazil have reported the FB₁ concentration of Brazilian corn-based food products for human consumption (Caldas & Silva, 2007; Martins et al., 2012; Moreno et al., 2009; Scaff & Scussel, 2004; Westhuizen et al., 2003) and have estimated the exposure of the general Brazilian population to fumonisins by using the data from analyses of commercial corn products. However, there is no information available on fumonisin intake of individuals from food products found in households. In this study, fumonisin intake was assessed by determination of fumonisin in corn products collected from homes of residents in Pirassununga, São Paulo, Brazil and by data from a Food Frequency Questionnaire (FFQ) supplied by residents.

2. Materials and methods

2.1. Materials and equipment

Methanol (MeOH, LC grade) and acetonitrile (ACN, LC grade) were obtained from JT Baker (Xalostoc, Mexico). Fumonisin B₁

* Corresponding author. Tel.: +55 19 3565 4179; fax: +55 19 3565 4284.

E-mail addresses: keliani.bordin@yahoo.com.br (K. Bordin), roice@usp.br (R.E. Rosim), dineef@yahoo.com.br (D.V. Neeff), rottinghausg@missouri.edu (G.E. Rottinghaus), carlosaf@usp.br (C.A.F. Oliveira).

standard was from Sigma (Sigma, St Louis, MO, USA). SAX cartridges (500 mg, 6 mL, Strata, Phenomenex) and o-phthalaldehyde (OPA) were purchased, respectively from Hexis Científica (Jundiaí, SP, Brazil) and Sigma Aldrich (St. Louis, MO). Water was purified by a Milli-Q system (Millipore, Bedford, MA, USA). Laboratory equipment used in this study included an orbital shaker (Tecnal, Piracicaba, Brazil), a sample concentrator (TECVAP TE-019, Tecnal, Piracicaba, Brazil), a chemical balance (Gehaka, maximum capacity 2.1 g, from Mettler Toledo, Switzerland), a balance (SA210, maximum capacity 210 g, readability 0.0001 g, from Scientech, United States) and a high performance liquid chromatographic (HPLC) system with a fluorescence detector (Shimadzu, model RF-10 AXL, Kyoto, Japan).

2.2. Sampling design

The study was conducted in households of employees and students of the University of São Paulo at Pirassununga, Brazil from June 2011 to March 2012. Residents ($N = 39$) were invited to participate as volunteers, providing food samples 4 times every 3 months. The participants were instructed to collect nearly 100-g samples of corn meal, corn flour, corn flakes, polenta, canned corn and popcorn if available in their residences on the day of sample collection. Food samples were packed in polyethylene bags and sent to the laboratory. At the end of sampling procedures, a total of 120 samples of corn-based products available in the residences were collected by the volunteers. All samples were then homogenized, finely milled, and frozen at -20°C until analysis.

2.3. Determination of fumonisin B₁

2.3.1. Extraction and clean-up

Sample cleanup for FB₁ was performed using SAX columns, as described by Shephard, Sydenham, Thiel, and Gerderblom (1990) with some modifications. Aliquots of the corn samples (25 g) were weighed into 250 mL flasks and 50 mL of methanol/water (3 + 1, v/v) was added. The flasks were placed on an orbital shaker for 30 min and filtered. The filtrate was adjusted for pH 6.0 if necessary, and aliquots (2 mL) were then passed through the SAX cleanup columns at a flow rate of 1–2 drops per second. The columns were washed with 8 mL of methanol/water (3 + 1, v/v) and 3 mL of methanol; FB₁ was eluted from the columns with 14 mL of methanol/acetic acid (0.5%) and the eluants were collected in amber vials. Each individual sample was placed in a sample concentrator, and the solvent was evaporated under nitrogen at 40°C . The residue was reconstituted in 200 μL of acetonitrile–water (50:50, v/v), and an aliquot of 100 μL was combined with 200 μL of OPA solution, previously prepared using 40 μg of OPA diluted in 5 mL of sodium tetraborate solution 0.1 M and 50 μL of 2-mercaptoethanol. After 2 min, 20 μL were filtered through a 0.45 μm PTFE membrane and used for immediate quantification of FB₁ in the HPLC system.

2.3.2. HPLC analysis

HPLC analysis was performed using a Shimadzu 10VP HPLC system (Kyoto, Japan) with a 10 AXL fluorescence detector (excitation at 335 nm and emission above 440 nm). Separation was achieved on a Shimadzu C₁₈ column (Kyoto, Japan, 4.6×250 mm, 5 μm particle size) with an isocratic mobile phase (water/acetonitrile/acetic acid 50:50:1, v/v/v) at a flow rate of 1.0 mL min⁻¹.

A primary standard of FB₁ (100 $\mu\text{g mL}^{-1}$) was prepared in acetonitrile/water (50:50, v/v) and stored in an amber glass vial at -20°C . Calibration curves were prepared by appropriate dilution of the primary standard in acetonitrile/water (50:50, v/v) to produce working standards at concentrations of 0.125; 0.25; 0.50;

1.0; 2.0; 5.0 $\mu\text{g L}^{-1}$. The FB₁ working standards were derivatized with OPA and injected into HPLC system exactly as described for samples.

2.3.3. Evaluation of the analytical method

The limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) were calculated based on signal:noise ratios of 3:1 and 10:1, respectively. Linearity was evaluated by verifying the coefficient of determination (r^2). Triplicate injections of each FB₁ standard concentration were used.

Recovery and precision were assessed by analysis of FB₁ in spiked samples of commercially available corn meal, popcorn, polenta, canned corn and cornflakes, previously evaluated for the endogenous FB₁ content. Samples (prepared on three separate days) of each corn product were fortified with FB₁ at concentrations of 100, 250, 500 and 1000 $\mu\text{g kg}^{-1}$ and submitted to extraction and clean-up as described for samples collected in the households. Final concentration of FB₁ in each spiked sample was calculated by subtracting the endogenous FB₁ content in the respective sample. The results were analyzed by Statistica StatSoft 7.0 (Statsoft, 2009).

2.4. Food frequency questionnaire

The FFQ was elaborated on the basis of the population consumption habits of foods susceptible to fumonisin contamination and subjected to regulation in Brazil (Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2011). In the questionnaire, with the aim to cover as many consumed foods as possible, some food items like corn meal which are used to prepare different processed foods, and also the home processed foods like couscous, corn cake or corn bread were also included. Consumption frequency was measured using a range from less than once a month to twice every day. Portion sizes were chosen for each food item according to usual measures, slices for polenta and tablespoons for canned corn, corn flour and corn meal used in the preparation of home processed foods. A blank space was also available if the volunteers needed to express a different consumption pattern. The FFQ was filled out by the thirty-nine individuals living in the residences where food samples were collected. The mean consumption of each corn product by each volunteer was estimated from the portion sizes as declared in the FFQs, and was expressed in g month⁻¹. The body weight of each individual was also recorded to calculate the PDI value by the following expression: $\text{PDI} = (\text{mean concentration of FB}_1 \times \text{mean consumption of food type}/30)/(\text{each individual body weight})$.

3. Results and discussion

3.1. Method performance

The LOD and LOQ values in corn products were, respectively 30 and 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$ and the coefficient of determination was 0.9996. Table 1 shows the results over 3 days of recoveries of FB₁ from blank corn (corn meal, popcorn, polenta, canned corn and cornflakes) that had been spiked with FB₁. The mean recoveries were between 77.6% and 103.6%, with repeatability relative standard deviations of (RSDr) between 3.0% and 25.2%. Although in the present study no certified test material was used, neither a previous participation in proficiency trials, the recoveries and RSDr values obtained were satisfactory at the four fortification levels in five different corn products, according to the European Commission Regulation No. 401/2006 (European Community, 2006). Similar recovery and RSDr values were reported by Scaff and Scussel (2004) for corn flour, corn flakes and popcorn, and by Martins et al. (2012) for corn meal, corn flour, popcorn and corn flakes. These authors used the same extraction method as used in the

Table 1
Recoveries of fumonisin B₁ in spiked samples of corn products.

Product	Spiking level ^a (μg kg ⁻¹)	Mean (μg kg ⁻¹)	RSD ^b (%)	Recovery ^c (%)
Corn meal	100	78.7	16.8	78.7
	250	194.6	11.0	77.9
	500	422.5	22.9	84.5
	1000	832.9	7.7	83.3
Popcorn	100	78.5	6.7	78.5
	250	259.0	12.5	103.6
	500	450.6	19.4	89.3
	1000	988.1	14.0	98.7
Polenta	100	77.6	4.0	77.6
	250	230.6	25.2	92.2
	500	511.6	15.9	102.3
	1000	987.9	3.0	98.8
Canned corn	100	86.6	13.3	86.6
	250	210.2	6.3	80.5
	500	488.3	9.8	97.6
	1000	911.5	6.0	91.1
Cornflakes	100	90.8	5.6	90.8
	250	229.8	10.1	91.9
	500	439.8	4.2	87.9
	1000	854.0	14.7	85.4

^a Each spiked level was run on three separate days.

^b Relative standard deviation, $n = 60$.

^c Mean of triplicate recovery in three days, $n = 60$.

present experiment and described by Shephard et al. (1990). The recoveries values were also similar to those found by Shephard et al. (1990) for corn products, although the recovery procedures were performed by spiking the purified extract, and not the corn samples.

3.2. Analysis of samples

One hundred and twenty samples of corn meal, corn flour, popcorn, polenta, canned corn, and cornflakes were analyzed for FB₁ and the results are summarized in Table 2. The highest levels of FB₁ were found in corn meal at a mean concentration of 474.6 μg kg⁻¹, although 78% of the corn meal samples had detectable levels of FB₁. Fumonisin B₁ contamination in the different types of corn products ranged from 33.0 to 1208.6 μg kg⁻¹. In addition, 76.0% and 82.1% of the corn flour and popcorn samples, respectively, had detectable levels of FB₁. The levels of FB₁ found in this study were much lower than those reported in a similar study in São Paulo, where FB₁ levels ranged from 1100 to 15,300 mg kg⁻¹ in corn meal and from 500 to 7200 mg kg⁻¹ in corn flour (Bittencourt, Oliveira, Dilkin, & Corrêa, 2005). Other previous studies have reported higher FB₁ levels in corn products in Brazil (Scaff & Scussel, 2004; Westhuizen et al., 2003), hence indicating that the lower levels found in the present study may be a

consequence of better quality control practices in the manufacture of corn products in the state of São Paulo, to comply with the regulations for fumonisins. None of the samples tested for FB₁ in our trial had levels above the tolerance limit established in Brazil (2500 μg kg⁻¹ for corn meal and 2000 μg kg⁻¹ for other corn products) (Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2011). However, two samples of corn meal and one sample of popcorn had higher FB₁ levels than proposed by European legislation (1000 μg kg⁻¹) (European Community, 2006). The differences in the action levels for fumonisins worldwide reflects the general concern that governments have about the potential effects of mycotoxins on human health and their implications for trade (Food & Agriculture Organization, 2003).

3.3. Estimation of food consumption

Food Frequency Questionnaire was filled out by 39 volunteers, 21 women (53.8%) and 18 men (46.2%) with ages ranging from 10 to 55 years old. Food ingestion habits were tabulated and minimum, average and maximum consumption values of each type of food are presented in Table 3. Food intake was calculated on a monthly basis because some of the evaluated foods were not usually consumed on a daily basis form by the group of volunteers. Table 3 shows that the most frequently consumed corn product by this group of individuals was popcorn (716.0 ± 1178.5 g person month⁻¹) and couscous (661.5 ± 1255.3 g person month⁻¹), which is prepared from corn meal. Polenta, cake or corn bread, cornflakes and canned corn were only a small part of the diet of the sampled population. Corn flour consumption was estimated to reach 340.0 ± 496.5 g person month⁻¹, which is higher than values previously reported in Brazil. According to data from the Household Budget Survey 2008/2009 (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2013), corn flour and corn meal are the most consumed corn-based products in Brazil, with daily intake levels of 51 g person month⁻¹ and 189.3 g person month⁻¹, respectively.

The total amount of corn products consumption was 2188 g person month⁻¹ and ranged from 100 to 9130 g person month⁻¹. These results show that the estimated intake of corn and derived foods in the Brazilian Common of Pirassununga is lower than that reported for the South African Region of Transkei (13,800 g person month⁻¹) (Shephard, Van Der Westhuizen, & Sewram, 2007; Thiel, Marasas, Sydenham, Shephard, & Gelderblom, 1992), but higher than that observed in India (1100 g person month⁻¹) (Amarasinghe, Shah, & Singh, 2007). The causes of differences in the corn intake by different populations are difficult to access at this time, since the patterns of corn consumption is highly dependent on the cultural food habits in different countries. In fact, the variations in the intake of corn products by different populations may

Table 2
Fumonisin B₁ levels in samples collected at residences of volunteers.

Product	N	n	%	Fumonisin B ₁ levels (μg kg ⁻¹)		MPL (μg kg ⁻¹)	
				Mean ± SD	Variation	Brazil	EC
Corn meal	32	25	78.1	474.6 ± 264.6	33.0–1208.6	2500	1000
Corn flour	25	19	76.0	247.0 ± 133.4	114.4–558.6	2000	1000
Popcorn	39	32	82.1	278.3 ± 221.3	102.0–1127.3	2000	1000
Polenta	2	2	100.0	181.6 ± 46.1	149.0–214.2	2000	1000
Canned corn	8	2	25.0	111.5	–	2000	1000
Cornflakes	14	7	50.0	103.5	–	2000	1000

N: total number of samples analyzed.

n: Samples showing concentrations above the limit of detection (LOD).

MPL: Maximum permitted level.

EC: European Community.

Table 3Estimation of consumption of corn products and probable daily intake (PDI) of fumonisin B₁ by volunteers.

Type of food	N	Consumption (g month ⁻¹) ^a		PDI (ng kg ⁻¹ b.w. day ⁻¹)	
		Mean ± SD ^b	Variation ^c	Mean ± SD ^b	Variation ^c
Corn flour	17	340.0 ± 496.5	40–1600	23.4 ± 26.5	0.5–64.8
Popcorn	25	716.0 ± 1178.5	100–3600	13.9 ± 9.2	1.8–35.6
Polenta	26	457.7 ± 779.8	100–3600	31.9 ± 43.4	2.3–144.9
Canned corn	24	111.2 ± 74.8	30–360	5.0 ± 7.2	1.0–15.8
Cornflakes	17	340.0 ± 496.5	40–1600	12.9 ± 18.5	1.0–61.1
Couscous ^d	13	661.5 ± 1255.3	200–4800	10.6 ± 7.4	1.0–22.3
Corn cake or bread ^d	21	446.6 ± 609.6	70–2100	28.8 ± 43.6	0.8–139.2
Total corn products		2,188.0 ± 2,556.3	100–9,130	63.3 ± 57.9	0.5–243.8

N: Number of individuals who declared to consume the type of food at least once a month.

^a Calculated by using portion sizes as declared by volunteers for each corn product, according to usual measures: slices for polenta and tablespoons for canned corn, corn flour and corn meal used in the preparation of home processed foods.^b Variation expressed for individuals who declared to consume the type of food at least once a month.^c Mean calculated from values different from zero.^d Home processed corn products prepared with corn meal.

determine important differences in the human exposure levels to contaminants that may be present in corn products.

3.4. Assessment of fumonisin intake

The mean consumption of each type of corn product and each individual body weight were used to calculate the probable daily intake of FB₁, and results are summarized in Table 3. The mean probable daily intake (PDI_M) of FB₁ in the Brazilian population of Pirassununga resulted 63.3 ng kg⁻¹ body weight day⁻¹, representing 3.1% of the PMTDI, which is similar to the estimated intake of fumonisin (9.0% of the PMTDI) reported in the Federal District of Brazil (Caldas & Silva, 2007). However, the estimated FB₁ consumption observed in the present study was much lower than those previously reported by other authors in Brazil. Machinski and Soares (2000) evaluated the incidence of fumonisin in corn products in the same region studied in the present work, and found that FB₁ consumption was 1,276 ng kg⁻¹ body weight day⁻¹, representing 63.8% of the PMTDI. A similar study conducted on corn products in the state of Paraná, estimated a PDI_M of 950 ng kg⁻¹ body weight day⁻¹, representing 47.5% of PMTDI (Moreno et al., 2009). In the state of Santa Catarina, the PDI_M was estimated at 1600 ng kg⁻¹ body weight day⁻¹ from corn products, which represents 80% of the PMTDI (Westhuizen et al. 2003). Compared with those previous reports, results of our trial indicate that the companies that manufacture corn products have markedly improved the quality control practices for fumonisins in the state of São Paulo. Another study have recently indicated a lower FB₁ exposure also in the state of Paraná, as the PDI_M was estimated at 120 ng kg⁻¹ body weight day⁻¹, thus representing 6.0% of the PMTDI (Martins et al., 2012). However, a comparison between the results of the present study and those reported by other authors is difficult, because all the studies mentioned estimated the PDI_M values by using the data from analyses of commercial corn products, and not by determination of fumonisin in corn products collected from homes of residents, and from the application of the FFQ.

4. Conclusion

Results of this trial indicate that corn meal was the most susceptible food commodity to fumonisin contamination, although none of the corn products analyzed had FB₁ levels above the tolerance limit established in Brazil. The most frequently consumed corn product by the volunteers was popcorn and couscous, which is prepared from corn meal. However, the PDI_M estimated for the group studied was 63.3 ng FB₁ kg⁻¹ b.w day⁻¹, which is lower than the PMTDI value and FB₁ consumption values previously reported

in Brazil. The consumption data reported indicate a low human exposure to FB₁ by the corn products in the population studied.

Acknowledgements

The authors thank the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) for financial support and fellowships.

References

- Agência Nacional de Vigilância Sanitária. (2011). Resolução RDC No. 7, de 18 de fevereiro de 2011. Diário Oficial da União – Seção 1, no 37, 22 de fevereiro de 2011. pp. 72–73.
- Alizadeh, M. A., Roshandel, G., Roudbarmohammadi, S., Roudbary, M., Sohanaki, H., Ghiasian, S. A., et al. (2012). Fumonisin B₁ contamination of cereals and risk of esophageal cancer in a high risk area in Northeastern Iran. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 13, 2625–2628.
- Amarasinghe, U. A., Shah, T., & Singh, O. P. (2007). *Changing consumption patterns: implications on food and water demand in India*. Colombo, Sri Lanka: International Water Management Institute. (IWMI Research Report, 119).
- Bittencourt, A. B. F., Oliveira, C. A. F., Dilkin, P., & Corrêa, B. (2005). Mycotoxin occurrence in corn meal and flour traded in São Paulo, Brazil. *Food Control*, 16, 117–120.
- Caldas, E. D., & Silva, A. C. S. (2007). Mycotoxins in corn-based food products consumed in Brazil: An exposure assessment for fumonisins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 7974–7980.
- Chu, F. S., & Li, G. Y. (1994). Simultaneous occurrence of fumonisin B₁ and other mycotoxins in mouldy corn collected from the Republic of China in regions with high incidences of esophageal cancer. *Applied and Environmental Microbiology*, 60, 847–852.
- European Community. (2006a). Commission Regulation (EC) No. 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 Communities*, 70, 12–34.
- European Community. (2006b). Commission Regulation (EC) No. 1881/2006. Setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. *Official Journal of the European Communities*, 364, 5–24.
- Domijan, A. M. (2012). Neurotoxicity of fumonisin B₁. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology*, 63, 531–544.
- Food and Agriculture Organization. (2003). *Worldwide regulations for mycotoxins in food and feed in 2003*. Geneva: World Health Organization. (FAO Food and Nutrition Paper, 81).
- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. (2013). Pesquisa de Orçamentos Familiares - POF 2008e2009. Available from http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/condicaoodevida/pof/2008_2009_aquisicao/tabelas.pdf/tab111.pdf. [Accessed 17.05.13].
- International Agency for Research on Cancer. (2002). Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene. *Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans*, 82, 171–274.
- Jager, A. V., Tedesco, M. P., Souto, P. C. M. C., & Oliveira, C. A. (2013). Assessment of aflatoxin intake in São Paulo, Brazil. *Food Control*, 33, 87–92.
- Machinski, M., & Soares, L. M. V. (2000). Fumonisin B₁ and B₂ in Brazilian corn-based food products. *Food Additives and Contaminants*, 17, 875–879.
- Martins, F. A., Ferreira, F. M. D., Ferreira, F. D., Bando, E., Nerilo, S. B., Hirooka, E. Y., et al. (2012). Daily intake estimates of fumonisins in corn-based food products in the population of Parana, Brazil. *Food Control*, 26, 614–618.
- Missmer, S. A., Suarez, L., Felkner, M., Wang, E., Merrill, A. H., Jr., Rothman, K. J., et al. (2006). Exposure to fumonisins and the occurrence of neural tube defects along the Texas–Mexico border. *Environmental Health Perspectives*, 114, 237–241.

- Moreno, E. C., Garcia, G. T., Ono, M. A., Vizoni, E., Kawamura, O., Hirooka, E. Y., et al. (2009). Co-occurrence of mycotoxins in corn samples from the Northern region of Paraná State, Brazil. *Food Chemistry*, 116, 220–226.
- Rheeder, J. P., Marasas, W. F. O., Thiel, P. G., Sydenham, E. W., Shephard, G. S., & Van Schalkwyk, D. J. (1992). *Fusarium moniliforme* and fumonisins in corn in relation to human esophageal cancer in Transkei. *Phytopathology*, 82, 353–357.
- Rocha, L. O., Nakai, V. K., Brahini, R., Reis, T. A., Kobashigawa, E., & Corrêa, B. (2009). Mycoflora and co-occurrence of fumonisins and aflatoxins in freshly harvested corn in different regions of Brazil. *International Journal of Molecular Science*, 10, 5090–5103.
- Scaff, R. M. C., & Scussel, V. M. (2004). Fumonisin B₁ and B₂ in corn-based products commercialized in the State of Santa Catarina – Southern Brazil. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 47, 911–919.
- Shephard, G. S., Sydenham, E. W., Thiel, P. G., & Gelderblom, W. C. A. (1990). Quantitative determination of fumonisins B₁ and B₂ by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Liquid Chromatography*, 13, 2077–2087.
- Shephard, G. S., Van Der Westhuizen, L., & Sewram, V. (2007). Biomarkers of exposure to fumonisin mycotoxins: A review. *Food Additives and Contaminants*, 24, 1196–1201.
- Solfrizzo, M., Chulze, S. N., Mallmann, C., Visconti, A., Girolamo, A., Rojo, F., et al. (2004). Comparison of urinary sphingolipids in human populations with high and low maize consumption as a possible biomarker of fumonisin dietary exposure. *Food Additives and Contaminants*, 21, 1090–1095.
- Statsoft. (2009). *Statistica Quick Reference*. Tulsa, OK: StatSoft Inc.
- Thiel, P. G., Marasas, W. F. O., Sydenham, E. W., Shephard, G. S., & Gelderblom, W. A. (1992). The implications of naturally occurring levels of fumonisins in corn for human and animal health. *Mycopathologia*, 117, 3–9.
- Westhuizen, L., Shepard, G. S., Scussel, V. M., Costa, L. L. F., Vismer, H. F., Rheeder, J. P., et al. (2003). Fumonisin contamination and *Fusarium* incidence in corn from Santa Catarina, Brazil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 5574–5578.
- World Health Organization. (2002). *Evaluation of certain mycotoxins in food*. Geneva: World Health Organization. (WHO Technical Report Series, 906).

Short communication

Evaluation of fumonisin exposure by determination of fumonisin B₁ in human hair and in Brazilian corn products

Keliani Bordin^a, George E. Rottinghaus^b, Benjamin R. Landers^b, David R. Ledoux^c,
Estela Kobashigawa^c, Carlos H. Corassin^a, Carlos A.F. Oliveira^{a,*}

^a Department of Food Engineering, School of Animal Science and Food Engineering, University of São Paulo, A. Duque de Caxias Norte, 225, CEP 13635-900 Pirassununga, SP, Brazil

^b Veterinary Medical Diagnostic Laboratory, University of Missouri, 65211 Columbia, MO, USA

^c Division of Animal Sciences, University of Missouri, 65211 Columbia, MO, USA

ARTICLE INFO

Article history:

Received 24 October 2014

Received in revised form

12 January 2015

Accepted 13 January 2015

Available online 21 January 2015

Keywords:

FB₁

Hair

Corn products

Exposure assessment

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the dietary exposure to fumonisin B₁ (FB₁) through determination of residual FB₁ in hair and corn products consumed by 56 volunteers from Pirassununga and Erval Velho, Brazil. Data from FB₁ analyses in corn products and a Food Frequency Questionnaire (FFQ) were used for estimating the mean probable daily intake (PDI_{MD}) for FB₁. FB₁ was detected in 4 human hair samples (7.2%), at a mean level of 21.3 ± 12.1 ng g⁻¹. The mean FB₁ level found in corn products was 360.4 ± 555.1 µg kg⁻¹. The PDI_{MD} value of FB₁ in volunteers was 159 ± 47 ng kg⁻¹ body weight day⁻¹ which represents 7.9% of the provisional maximum tolerable daily intake (PMTDI) recommended for fumonisins. The FB₁ levels found in human hair samples from each volunteer were associated with their individual PDI of FB₁, indicating that exposure to FB₁ in the sample studied do not represent a health concern. This is the first report on the incidence of FB₁ in individual human hair in Brazil.

© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Fumonisin B₁ (FB₁) is a mycotoxin produced by *Fusarium* species found in several types of foods worldwide, mainly in corn products (World Health Organization, 2002). FB₁ contamination in food has been associated with human esophageal cancer (Chu & Li, 1994; Westhuizen et al., 2003), and with an increase in neural tube defects (NTD) (Hendricks, 1999; Missmer et al., 2006). The International Agency for Research on Cancer (2002) has classified FB₁ as a possible carcinogen in humans.

FB₁ contamination in Brazilian corn products has been reported by several authors (Martins et al., 2012; Moreno et al., 2009; Scaff & Scussel, 2004; Westhuizen et al., 2003). Studies on the human exposure of fumonisin through the diet have been conducted in urban areas of São Paulo and Santa Catarina States, and the

resulting probably daily intake (PDI) varied from 63.3 to 1276 ng kg⁻¹ body weight (b.w.)⁻¹ day⁻¹ (Bordin, Rosim, Neeff, Rottinghaus, & Oliveira, 2014; Machinski & Soares, 2000). These PDI values represent 3.1–63.8% of the provisional maximum tolerable daily intake (PMTDI) established by the World Health Organization (2002) for fumonisins. Although corn consumption is highly variable among urban or rural populations in Brazil, there is no previous assessment on the dietary exposure to FB₁ in Brazilian rural areas.

Experimental studies with nonhuman primates and rats have shown fumonisin residues in hair as a valuable biomarker of FB₁ exposure (Sewram et al., 2001). In humans, Sewram, Mshicileli, Shephard, and Marasas (2003) estimated the dietary fumonisin exposure by using composite hair samples analyses in highly-exposed populations of Transkei region, South Africa. However, there is no information available on FB₁ residue in human hair in Brazil. In the present study, human exposure to fumonisins was assessed by determination of FB₁ in hair from residents of urban areas of Pirassununga/São Paulo, and rural areas of Erval Velho/Santa Catarina, Brazil, and by evaluation of FB₁ levels in corn

* Corresponding author. Tel.: +55 19 3565 4173; fax: +55 19 3565 4284.

E-mail address: carlosaf@usp.br (C.A.F. Oliveira).

products collected from homes of individuals, along with data from a Food Frequency Questionnaire (FFQ).

2. Materials and methods

2.1. Sampling design

The study was conducted in households from 2 cities in Brazil: Pirassununga, which is located in the State of São Paulo, and Erval Velho, located in the State of Santa Catarina. Pirassununga has a population of nearly 70,000 inhabitants, of which approximately 90% are residents in urban areas, while the city of Erval Velho has 4352 inhabitants living mostly in rural areas. Fifty-six volunteers from Pirassununga ($n = 46$, from 11 households in urban areas) and Erval Velho ($n = 10$, from 8 households in rural areas) were invited and agreed to participate as volunteers in the study. After being informed about the study, each volunteer signed a consent form to provide hair samples and food products from their residences for FB₁ analysis. All procedures were in accordance with the Ethics Committee of the School of Medicine of the University of São Paulo at Ribeirão Preto, Brazil. Hair samples were collected four times every three months, by cutting with scissors approximately 7 cm length of the scalp hair from the edge, in an area of nearly 5 cm². The mean weight of hair collected from each volunteer was 3.2 g. Hair samples were stored in an aluminum foil at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ for a maximum period of 8 months until analysis.

By the time of hair collection, the volunteers were instructed to collect at least 100-g samples of corn products available in their residences, such as corn meal, corn flour, popcorn, cornflakes and polenta. Thirty-three volunteers from Pirassununga ($n = 23$) and Erval Velho ($n = 10$) had samples of corn products at the time of hair sampling, and therefore provided food samples which were packed in polyethylene bags and sent to the laboratory. A total of 50 samples of corn products were provided by the volunteers during the study. Upon arriving at the laboratory, all food samples were homogenized, finely milled and submitted to immediate analysis for FB₁.

2.2. Analysis of fumonisin B₁ in human hair

FB₁ extraction and quantification in human hair was accomplished as described by Sewram et al. (2003) with some modifications. Duplicate hair samples were stirred in ethanol at room temperature for 15 min. The specimens were dried at $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 3 h, cut up with scissors into small pieces and stored in whirl packs at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Hair samples (500 mg) were extracted with 20 mL of methanol overnight at $45\text{ }^{\circ}\text{C}$. The extract was filtered (Whatman 4) and 15 mL of the extract was taken to dryness in a sample concentrator (Reacti-Therm™ Heating/Stirring Module, Pierce, Rockford, IL). The residue was diluted in 20 mL of methanol: water (70:30), an additional 8 mL of water was added and then filtered through Whatman 4 filter. The solution was washed with 5 mL of hexane to remove lipophilic compounds, centrifuged at 3000 rpm and the top hexane layer discarded. The pH was adjusted to 6.0 and an aliquot of 20 mL of the extract was passed through a strong anion exchange (SAX) solid phase extraction column (Phenomenex, Torrance, CA) that had been previously conditioned with 8 mL of methanol and 8 mL of methanol: water (3:1). The column was washed with 8 mL of methanol: water (3:1), 3 mL of methanol and the fumonisin eluted with 14 mL of methanol: acetic acid 0.5%. The eluant was taken to dryness, resuspended in 300 μL of water: acetonitrile (90:10), centrifuged in micro-centrifuge tubes and 20 μL injected into a liquid chromatograph system coupled to a mass spectrometer detector (LC-MS) (Finnigan Surveyor® MSQ Plus, San Jose, CA) system. The chromatographic run was performed

using reversed-phase column Thermo Hypersil GOLD, 1.9 μm , $50 \times 2.1\text{ mm}$ (Bellefonte, PA). Binary gradient consisted of A (water: formic acid 0.1%) and B (acetonitrile: formic acid 0.1%) solvents. The initial mobile phase composition of 95% A and 5% B was adjusted linearly over 4 min period to 10% A and 90% B. The composition was thereafter adjusted linearly to 95% A and 5% B over 2 min at, resulting a total run time of 6 min. The mobile phase was pumped at a flow rate of $300\text{ }\mu\text{L min}^{-1}$.

The MS detector was a Finnigan Surveyor® MSQ Plus (San Jose, CA). Nitrogen was supplied by a Nitrogen Peak Scientific model N418LA (Billerica, MA) maintained at 75 psi. Data acquisition, processing and storage were performed using Xcalibur® software, version 1.3 (Thermo Fisher, San Jose, CA, USA). Positive ion electrospray ionization (ESI) mass spectrometry was monitored in the single ion mode (SIM) by observing its protonated molecular ion at m/z 721.83. The parameters were varied and fine-tuned until the optimal signal was found. Cone voltage used was 95 V, the source temperature $630\text{ }^{\circ}\text{C}$ and the needle voltage 1.5 kV. Calibration curves were prepared daily with 4 levels of FB₁ standards (Sigma Aldrich, St. Louis, MO) at levels of 5, 10, 20 and 40 ng mL^{-1} . Calculations were based on peak area and compared with the calibration curves.

2.3. Analysis of fumonisin B₁ in corn products

Extraction and purification of FB₁ in corn products were performed as described by Shephard, Sydenham, Thiel, and Gelderblom (1990). Aliquots of corn samples (25 g) were extracted with 50 mL of methanol:water (3 + 1, v/v). The flasks were placed on orbital shaker for 30 min and then filtered. The extract was adjusted the pH to 6.0 if necessary, and 2 mL were passed through SAX cleanup columns (Phenomenex, Torrance, CA). FB₁ was eluted with 14 mL of methanol:acetic acid (0.5%), which was evaporated until dryness. The residue were reconstituted in 200 μL of acetonitrile:water (50:50, v/v) and an aliquot of 100 μL derivatized with 200 μL of o-phthalaldehyde (OPA) solution, previously prepared using 40 mg of OPA diluted in 1 mL of methanol and 5 mL of sodium tetraborate 0.1 M solution and 50 μL of 2-mercaptoethanol. After 2 min, 20 μL aliquot was injected into a high performance liquid chromatograph system (Shimadzu, Kyoto, Japan) equipped with a 10 AXL fluorescence detector (excitation at 335 nm and emission above 440 nm) and a Shimadzu C₁₈ column ($4.6 \times 250\text{ mm}$, 5 μm particle size, Shimadzu, Kyoto, Japan). The isocratic mobile phase consisted of water:acetonitrile:acetic acid (50:50:1, v/v/v) with a flow rate of 1.0 mL min^{-1} .

Calibration curves were prepared in acetonitrile:water (50:50, v/v) at concentrations of 0.125; 0.25; 0.50; 1.0; 2.0; $5.0\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$. The FB₁ working standards were derivatized with OPA and injected into HPLC system exactly as described for food samples.

2.4. Validation procedures

Recovery and precision for the FB₁ analysis of human hair were evaluated on two different days, by adding FB₁ at levels of 20 and 40 ng g^{-1} in triplicate hair samples ($N = 12$) previously analyzed for endogenous FB₁. All these fortified samples were submitted to analysis as described for hair samples, and final concentrations were calculated by triplicate injection of each extract. The limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) were calculated based on signal: noise ratio of 3:1 and 10:1, respectively. Linearity was evaluated by verifying the coefficient of determination (r^2) by triplicate injection of four levels of standards (5, 10, 20 and 40 ng mL^{-1}).

The analytical method for FB₁ in corn products was previous validated and the results were described by Bordin et al. (2014). The LOD and LOQ were 30 and 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$, respectively. The mean recoveries varied from 77.6 to 103.6%, with relative standard deviation (RSDr) ranging from 3.0 to 25.2% for FB₁ levels from 100 to 1000 $\mu\text{g kg}^{-1}$.

2.5. Food frequency questionnaire

The 33 volunteers from Pirassununga and Erval Velho who provided samples of corn products were requested to answer a food frequency questionnaire (FFQ) prior to sample collection. The FFQ was elaborated aiming to cover the most important corn products susceptible to fumonisin contamination and subjected to regulation in Brazil (Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2011), including ready-to-eat products like polenta. Portion sizes (slices, tablespoons or cup) were used for each food item according to usual measures. Consumption frequency was measured using a range from less than once a month to twice every day. A blank space was also available if the volunteers needed to express a different consumption pattern. The body weight of each individual was also recorded for calculating the PDI by the following expression: $\text{PDI} = (\text{mean concentration of FB}_1 \times \text{mean of food consumption daily}) / (\text{individual body weight})$.

3. Results and discussion

3.1. Analysis of fumonisin B₁ in human hair

The LOD and LOQ values for FB₁ in human hair samples were 3.3 and 5.5 ng g^{-1} , respectively. The coefficient of determination (r^2) was 0.9913 and residuals plot did not show tendency or deviation from linearity. The mean recovery was 86.6%, with a relative standard deviation of 12.4%. Residual FB₁ in hair samples was determined by selected ion monitoring (SIM) adjusted the mass detector to 721 of m/z . A mass spectrum obtained for FB₁ and a total ion chromatogram (TIC) of a positive sample can be seen at Figs. 1 and 2, respectively.

FB₁ was detected in 4 (7.2%) hair samples from volunteers in Pirassununga and Erval Velho, at a mean level of $21.3 \pm 12.1 \text{ ng g}^{-1}$ (data not shown). There is only one previous report on the incidence of FB₁ in human hair, which was conducted in 3 regions from South Africa (Sewram et al., 2003). The authors described FB₁ levels

in hair samples from Centane and Butterworth regions, at concentrations nearly to $27.0 \mu\text{g kg}^{-1}$ hair, which is similar to the levels found in the present study. In contrast, hair samples from Bizana were found to contain higher levels of FB₁ (mean $33.0 \mu\text{g kg}^{-1}$ hair). The low number of hair samples containing detectable levels of FB₁ in the present study indicates a low dietary exposure to FB₁ in the population studied. However, hair composition varies due to age, sex, hair color, ethnical, geographic origin and dietary factors (Chojnacka, Gorecka, & Gorecki, 2006; Miekeley, Dias Carneiro, & Porto da Silveira, 1998). Furthermore, hair analysis is subject to certain limitations, such as the occurrence of exogenous contamination deposits of sebum, sweat, polluted air residues or residues of cosmetic, which could interfere in the analysis of contaminants (Rodrigues, Batista, Nunes, Passos, & Barbosa, 2008). Head hair grows continuously at a rate of approximately 1 cm per month (Baciu, Borrull, Aguilar, & Calull, 2015). However, whether or not the process of fumonisin deposition in the hair occurs as a function of length or time of exposure is difficult to access at this time, since there is no experimental data indicating a quantitative relationship between the fumonisin intake and the level of fumonisin found in a segment of human hair. Therefore further studies are needed to understand the significance of residual fumonisin in the human hair.

3.2. Analysis of fumonisin B₁ in corn products and assessment of intake

FB₁ was found in 30 (60%) samples of corn-based products at a mean concentration of $360.4 \pm 555.1 \mu\text{g kg}^{-1}$, as shown in Table 1. Popcorn and corn meal had high percentages of positive samples (72 and 73%, respectively), although popcorn presented highest levels of FB₁ (mean: $537.4 \pm 922.2 \mu\text{g kg}^{-1}$), with one sample exceeding the maximum level set in Brazil ($2000 \mu\text{g kg}^{-1}$ for corn products) (Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2011). These levels are lower than those observed in previous studies conducted in São Paulo and Santa Catarina states showing FB₁ at levels up to $5453 \mu\text{g kg}^{-1}$ (Machinski & Soares, 2000; Scaff & Scussel, 2004), hence indicating better quality control practices in the manufacture of corn products in the regions studied.

The mean consumption of all corn products studied was $110 \pm 70 \text{ g day}^{-1}$ (Table 1). The mean consumption of polenta was $84 \pm 184 \text{ g day}^{-1}$ per person, representing 76.4% of the total corn products intake. Some volunteers in Erval Velho presented higher

Fig. 1. TIC Spectrum obtained for FB₁.

Fig. 2. SIM chromatogram of a human hair contaminated with FB₁.

Table 1

Fumonisin B₁ levels in corn products, estimation of consumption and probable daily intake (PDI) of fumonisin B₁ by volunteers from Pirassununga and Erval Velho.

Type of food	N	n (%)	Level of FB ₁ (μg kg ⁻¹) ^a	Consumption (g day ⁻¹) ^{a,b}	PDI (ng kg ⁻¹ b.w. day ⁻¹) ^{a,c}
Corn meal	18	13 (72)	422.9 ± 239.0	7 ± 14	29 ± 37
Cornflakes	6	3 (50)	170.8 ± 43.5	6 ± 7	31 ± 24
Popcorn	15	11 (73)	537.4 ± 922.2	7 ± 10	59 ± 127
Canned corn	4	0	—	5 ± 8	—
Potenta	7	3 (43)	214.2 ± 89.5	84 ± 184	34 ± 26
Total corn products	50	30 (60)	360.4 ± 555.1	110 ± 70	159 ± 47

N: Total number of samples analyzed.

n: Number of samples with levels above the limit of quantification (LOQ, 100 μg kg⁻¹).

^a Results are expressed as mean ± standard deviation of samples analyzed in duplicate.

^b Calculated by using portion sizes as declared by volunteers for each corn product, according to usual measures: slices for polenta and tablespoons for canned corn, corn flour and corn meal used in the preparation of home processed foods.

^c Calculated for individuals who declared to consume the type of food at least once a month.

corn consumption values, similar to regions with high FB₁ exposure in the rural populations from South Africa, like Bizana and Centane regions, where the corn consumption was estimated to be 379 and 456 g day⁻¹ per person, respectively (Shephard et al., 2007). The mean PDI of FB₁ for all corn products evaluated was 159 ± 47 ng kg⁻¹ b.w. day⁻¹ (Table 1), which represents 7.9% of PMTDI recommended for fumonisins (2000 ng kg⁻¹ b.w. day⁻¹) (World Health Organization, 2002). The PDI found in the present study was similar to the values previously reported in Pirassununga (63.3 ng kg⁻¹ b.w. day⁻¹) Bordin et al. (2014) and in Paraná, another Brazilian southern state (121 ng kg⁻¹ b.w. day⁻¹) (Martins et al., 2012). The low PDI value obtained in our study is also in

accordance with the limited number of hair samples with detectable levels of FB₁.

Although only 4 hair samples had detectable levels of FB₁, the concentrations were associated with the individual PDI of FB₁ of volunteers, as presented in Fig. 3. A polynomial effect was observed ($r^2 = 0.8851$), indicating that FB₁ concentrations in hair increases with increasing PDI values. Sewram et al. (2003) evaluated the incidence of FB₁ in human hair from 3 different regions in South Africa, and estimated the PDI by extrapolating data from a previous study with non-human primates. The author found a mean PDI value of 13,800 ng fumonisin kg⁻¹ b.w. day⁻¹ (Sewram et al., 2003), which is much higher than the PDI obtained in the present study. However, it remains to be determined if the extrapolation data from animals at high exposure levels to FB₁ could be used for estimation of PDI from residual FB₁ levels in human hair. This study is the first report on the incidence of FB₁ in individual human hair in Brazil, with a comparison with the PDI indicating the possibility to evaluate hair as a biomarker to assess the dietary exposure to fumonisins.

4. Conclusion

FB₁ was detected in 4 human hair samples (7.2%) from Pirassununga and Erval Velho, at a mean level of 21.3 ± 12.1 ng g⁻¹. The mean PDI values for FB₁ for the volunteers from Pirassununga and Erval Velho were lower than the PMTDI value for fumonisin. The incidence of FB₁ in human hair corroborates the PDI values found, indicating that exposure to FB₁ in the sample studied do not represent a health concern.

Fig. 3. Fumonisin B₁ levels in individual human hair samples of volunteers from Pirassununga and Erval Velho, Brazil, and their respective probable daily intake (PDI) of fumonisin B₁.

Acknowledgments

The authors thank the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) – grant no. 2010/06291-9, for financial support and fellowships.

References

- Agência Nacional de Vigilância Sanitária. (2011). Resolução RDC nº 7, de 18 de fevereiro de 2011 (pp. 72–73). Diário Oficial da União.
- Baciu, T., Borrelli, F., Aguilera, C., & Calull, M. (2015). Recent trends in analytical methods and separation techniques drugs of abuse in hair. *Analytica Chimica Acta*, 856, 1–26.
- Bordin, K., Rosim, R. E., Neeff, D. V., Rottinghaus, G. E., & Oliveira, C. A. (2014). Assessment of dietary intake of fumonisin B₁ in São Paulo. *Food Chemistry*, 155, 155–178.
- Chojnacka, K., Gorecka, H., & Gorecki, H. (2006). The effect of age, sex, smoking habit and hair color on the composition of hair. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 22, 52–57.
- Chu, F. S., & Li, G. Y. (1994). Simultaneous occurrence of fumonisin B₁ and other mycotoxins in mouldy corn collected from the Republic of China in regions with high incidences of esophageal cancer. *Applied and Environmental Microbiology*, 60, 847–852.
- Hendricks, K. (1999). Fumonisin and neural tube defects in South Texas. *Epidemiology*, 10, 198–200.
- International Agency for Research on Cancer. (2002). Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene. In *Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans* (Vol. 82, pp. 171–274).
- Machinski, M., & Soares, L. M. V. (2000). Fumonisin B₁ and B₂ in Brazilian corn-based food products. *Food Additives and Contaminants*, 17, 875–879.
- Martins, E. A., Ferreira, F. M. D., Ferreira, F. D., Bando, E., Nerilo, S. B., Hirooka, E. Y., et al. (2012). Daily intake estimates of fumonisins in corn-based food products in the population of Paraná, Brazil. *Food Control*, 26, 614–618.
- Miekeley, N., Dias Carneiro, M. T., & Porto da Silveira, C. L. (1998). How reliable are human hair reference intervals for trace elements. *The Science of the Total Environment*, 218, 9–17.
- Missmer, S. A., Suarez, L., Felkner, M., Wang, E., Merrill, A. H., Rothman, K. J., et al. (2006). Exposure to fumonisins and the occurrence of neural tube defects along the Texas-Mexico border. *Environmental Health Perspectives*, 114, 237–241.
- Moreno, E. C., Garcia, G. T., Ono, M. A., Vizoni, E., Kawamura, O., Hirooka, E. Y., et al. (2009). Co-occurrence of mycotoxins in corn samples from the Northern region of Paraná State, Brazil. *Food Chemistry*, 116, 220–226.
- Rodrigues, J. L., Batista, B. L., Nemes, J. A., Passos, C. J. S., & Barbosa, F. Jr. (2008). Evaluation of the use of human hair for biomonitoring the deficiency of essential and exposure to toxic elements. *Science of the Total Environment*, 405, 370–376.
- Scaff, R. M. C., & Scussel, V. M. (2004). Fumonisin B₁ and B₂ in corn-based products commercialized in the State of Santa Catarina – southern Brazil. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 47, 911–919.
- Sewram, V., Mshicileli, N., Shephard, G. S., & Marasas, W. F. (2003). Fumonisin mycotoxins in human hair. *Biomarkers*, 8, 110–118.
- Sewram, V., Nair, J. J., Nieuwoudt, T. W., Gelderblom, W. C., Marasas, W. F., & Shephard, G. S. (2001). Assessing chronic exposure to fumonisin mycotoxins: the use of hair as a suitable noninvasive matrix. *Journal of Analytical Toxicology*, 25, 450–455.
- Shephard, G. S., Marasas, W. F. O., Burger, H. M., Somdyala, N. I., Rheeder, J. P., Van der Westhuizen, L., et al. (2007). Exposure assessment for fumonisins in the former Transkei region of South Africa. *Food Additives & Contaminants*, 24, 621–629.
- Shephard, G. S., Sydenham, E. W., Thiel, P. G., & Gelderblom, W. C. A. (1990). Quantitative determination of fumonisins B₁ and B₂ by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Liquid Chromatography*, 13, 2077–2087.
- Westhuizen, L., Shephard, G. S., Scussel, V. M., Costa, L. L. F., Vismer, H. F., Rheeder, J. P., et al. (2003). Fumonisin contamination and Fusarium incidence in corn from Santa Catarina, Brazil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 5574–5578.
- World Health Organization. (2002). Evaluation of certain mycotoxins in food. Geneva: World Health Organization (WHO Technical Report Series, 906).