



**Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”**

**Faculdade de Ciências Farmacêuticas**

**Departamento de Alimentos e Nutrição**

**DESOXINIVALENOL EM FARINHA DE TRIGO: OTIMIZAÇÃO  
DE MÉTODO ANALÍTICO, VALIDAÇÃO E OCORRÊNCIA.**

**Lara Tschopoko Pedroso Pereira**

Farmacêutica-Bioquímica

Araraquara, agosto de 2014

**Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”**

**Faculdade de Ciências Farmacêuticas**

**Departamento de Alimentos e Nutrição**

**DESOXINIVALENOL EM FARINHA DE TRIGO: OTIMIZAÇÃO  
DE MÉTODO ANALÍTICO, VALIDAÇÃO E OCORRÊNCIA.**

**Lara Tschopoko Pedroso Pereira**

Farmacêutica-Bioquímica

**Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Célia Maria de Sylos**

Orientadora

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

Araraquara, agosto de 2014

### **Ficha Catalográfica**

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

**P436d**

Pereira, Lara Tschopoko Pedroso

Desoxinivalenol em farinha de trigo: otimização do método analítico, validação e ocorrência / Lara Tschopoko Pedroso Pereira. – Araraquara, 2014  
136 f.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Alimentos e Nutrição

Orientador: Célia Maria de Sylos

1. Trigo. 2. Validação intralaboratorial. 3. Desoxinivalenol. 4. Método analítico. I. Sylos, Célia Maria, orient. II. Título.

**CAPES: 50700006**

## **DEDICATÓRIAS**

*Dedico este trabalho a*

*José Caetano Zurita da Silva “in memoriam”*

*Foi por causa dele que tudo começou...*

*Aos meus pais Jose Pedroso Pereira “in memoriam” e TateanaTschopoko Pereira,*

*que iluminaram os caminhos da minha vida e às minhas filhas*

*Sofia e Vitória, a quem eu espero poder fazer o mesmo.*

*À minha irmã Mara Pedroso Pereira, que sempre esteve comigo*

*em todos os momentos de alegria e tristezas.*

## **AGRADECIMENTOS**

*A Deus, que já sabia que eu chegaria até aqui, mesmo antes que eu começasse...*

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Celia Maria de Sylos, pela amizade e orientação.

Ao laboratório de Pesquisa em Probióticos - FCFar/UNESP pela concessão do uso do cromatógrafo a líquido de alta eficiência.

A Alexandre Cruz e Mateus Petrarca, anjos que Deus colocou no meu caminho.

À Nelci Catarina Chiquetto pela amizade incondicional.

Às amigas Sandra, Christiane e Lourdes, amigadas que durarão para sempre.

A Aline, Evandra, Mariano, Jucélia e Zulmira, que tornaram a minha caminhada em Araraquara mais feliz.

Às amigas do Departamento de Alimentos e Nutrição – FCFar/UNESP, que acompanharam minhas alegrias e tristezas nestes quatro anos, me apoiando e incentivando sempre.

*“Mudaste o meu pranto em dança,  
a minha veste de lamento em veste de alegria,  
para que o meu coração  
cante louvores a ti e não se cale.  
Senhor, meu Deus,  
eu te darei graças para sempre”*

*Salmos 30:11-12*

## SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	9
LISTA DE FIGURAS.....	10
RESUMO.....	14
ABSTRACT.....	15
INTRODUÇÃO.....	16
OBJETIVOS.....	18
CAPÍTULO I – DETERMINAÇÃO DE DESOXINIVALENOL EM ALIMENTOS – MÉTODOS DE EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO.....	19
1. INTRODUÇÃO.....	19
1.1. Trigo.....	17
1.2. Segurança Alimentar.....	20
1.3. Micotoxinas.....	24
1.4. Desoxinivalenol.....	26
2. MÉTODOS ANALÍTICOS.....	28
2.1. Amostragem.....	29
2.2. Métodos de Extração.....	29
2.2.1. Extração Líquido-Líquido.....	30
2.2.2. Extração em Fase Sólida.....	31
2.2.3. Microextração em Fase Sólida.....	31
2.2.4. Extração Sólido-Líquida.....	32
2.2.5. Dispersão da Matriz em Fase Sólida.....	33
2.2.6. Extração Líquido Pressurizado.....	33
2.2.7. Polímeros Molecularmente Gravados.....	34
2.2.8. Microextração Líquido-Líquido Dispersiva.....	34
2.2.9. QUECHERS.....	35
2.3. Métodos de Limpeza.....	36
3. MÉTODO QUECHERS.....	40
4. ANÁLISE QUALITATIVA E QUANTITATIVA.....	47
5. CONCLUSÃO.....	49
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	50
CAPÍTULO II – OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO PARA A DETERMINAÇÃO DE DESOXINIVALENOL EM FARINHA DE TRIGO POR HPLC/UV.....	70
RESUMO.....	70
1. INTRODUÇÃO.....	72
2. MATERIAL e MÉTODOS.....	74
2.1. Material.....	74
2.1.1. Farinha de Trigo.....	74
2.1.2. Padrão e Reagentes.....	74
2.1.3. Solução Padrão de Desoxinivalenol.....	74
2.2. Métodos.....	74
2.2.1. Otimização das condições Cromatográficas Cromatográfica.....	74
2.2.1.1. Seleção da Fase Móvel.....	74
2.2.1.2. Efeito do pH da água empregada na fase móvel.....	75
2.2.2. Análise Cromatográfica.....	75

2.2.3. Detecção e Quantificação de Desoxinivalenol.....	76
2.2.4.Otimização do Método Analítico para Determinação de Desoxinivalenol em Farinha de Trigo.....	76
2.2.4.1. Contaminação das Amostras.....	76
2.2.4.2. Extração e Purificação.....	76
2.2.4.3. Delineamento Experimental de Plackett&Burman.....	77
2.2.4.4. Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR).....	78
2.2.4.5 Contaminação das amostras de farinha de trigo.....	79
2.2.4.6. Recuperação de DON.....	79
2.3. Análise Estatística.....	80
2.4. Descontaminação do Material.....	80
3. RESULTADOS e DISCUSSÃO.....	80
3.1. Delineamento Experimental de Plackett&Burman.....	81
3.2. Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR).....	86
4. CONCLUSÃO.....	95
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	96
CAPÍTULO III–VALIDAÇÃO INTRALABORATORIAL DE MÉTODOANALÍTICO PARA DETERMINAÇÃO DE DESOXINIVALENOL EM FARINHA DE TRIGO POR HPLC/UV.....	99
RESUMO.....	99
1. INTRODUÇÃO.....	100
2. MATERIAL e MÉTODOS.....	103
2.1. Material.....	103
2.1.1. Farinha de Trigo.....	103
2.1.2. Padrão e Reagentes.....	103
2.1.3. Solução Padrão de Desoxinivalenol.....	104
2.2.2. Análise Cromatográfica.....	105
2.2.3. Validação Intralaboratorial.....	105
2.2.3.1. Seletividade.....	105
2.2.3.2. Linearidade.....	105
2.2.3.3. Limites de Detecção e Quantificação.....	106
2.2.3.4 Exatidão.....	106
2.2.3.5. Precisão.....	107
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	108
3.1. Seletividade.....	108
3.2. Linearidade.....	111
3.3. Limites de Detecção e Quantificação.....	111
3.4. Exatidão e Precisão.....	112
4. CONCLUSÃO.....	114
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	115
CAPITULO IV – OCORRÊNCIA DE DESOXINIVALENOL EM AMOSTRAS DE FARINHA DE TRIGO BRASILEIRA.....	117
RESUMO.....	117
1. INTRODUÇÃO.....	119
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	126
2.1. Material.....	126
2.1.1. Farinha de Trigo.....	136
2.1.2. Padrão e Reagentes.....	136

2.1.3. Solução Padrão de Desoxinivalenol.....	126
2.2. Métodos.....	127
2.2.1. Teor de Umidade.....	127
2.2.2. Determinação de Desoxinivalenol.....	127
2.2.2.1. Extração e Purificação.....	127
2.2.2.2. Análise Cromatográfica.....	127
2.2.3.4. Detecção e Quantificação de Desoxinivalenol.....	128
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	128
4. CONCLUSÃO.....	131
5. AGRADECIMENTOS.....	131
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	132
CONCLUSÃO FINAL.....	136

## LISTA DE TABELAS

### CAPITULO I

Tabela 1 - Limites máximos tolerados (LMT) para Desoxinivalenol em alimentos, segundo a resolução - RDC N <sup>o</sup> 7, DE 18 de fevereiro de 2011.....	23
Tabela 2- Aplicação, vantagens e desvantagens dos métodos de limpeza disponíveis para determinação de Desoxinivalenol (DON) em alimentos.....	38
Tabela 3- Determinação e Resíduos de Contaminantes em alimentos Aplicando QUECHERS como Método de Extração.....	42

### CAPITULO II

Tabela 1- Fases móveis avaliadas na separação cromatográfica do DON.....	75
Tabela 2- Variáveis do delineamento do tipo Plackett&Burman e seus respectivos níveis codificados.....	77
Tabela 3- Matriz do delineamento de Plackett&Burman de 12 ensaios – PB 12.....	78
Tabela 4 - Variáveis avaliadas no Delineamento Composto Central Rotacional e seus respectivos níveis codificados.....	78
Tabela 5- Matriz do Delineamento Composto Central Rotacional.....	79
Tabela 6 - Porcentagem de recuperação de desoxinivalenol do método em cada ensaio do delineamento de Plackett& Burman.....	81
Tabela 7 - Efeito de cada variável na porcentagem de recuperação de DON do método.....	82
Tabela 8- Porcentagem de recuperação de DON do método em cada ensaio do Delineamento Composto Central Rotacional.....	86
Tabela 9- Coeficientes de regressão para a porcentagem de recuperação de DON do método.....	87
Tabela 10- Coeficientes de regressão estatisticamente significativos para a porcentagem de recuperação DON do método.....	88
Tabela 11- Análise de variância para a porcentagem de recuperação de DON do método.....	89

### CAPITULO III

Tabela 1- Porcentagens de recuperação e desvios padrão relativos, sob condição de repetitividade e de precisão intermediária, em amostras de farinha de trigo.....	114
--	-----

### CAPÍTULO IV

Tabela 1- Limites máximos tolerados (LMT) para Desoxinivalenol em alimentos, segundo a resolução - RDC N <sup>o</sup> 7, DE 18 de fevereiro de 2011.....	124
Tabela 2 - Níveis de Desoxinivalenol em amostras de farinha de trigo dos estados do Rio Grande do Sul, Paraná e Minas Gerais – Brasil(Safra - 2012).....	130

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO I

Figura 1. Estrutura dos tricotecenos tipo B .....26

### CAPITULO II

Figura 1. Curva de Calibração do Desoxinivalenol.....81

Figura 2. Superfície de resposta e curva de contorno para a porcentagem de recuperação de DON em função da quantidade de sulfato de magnésio e o tempo de agitação também na etapa de extração.....90

Figura 3. Superfície de resposta e curva de contorno para a porcentagem de recuperação de DON em função da quantidade de sulfato de magnésio adicionado na etapa de extração e na etapa de limpeza.....91

Figura 4. Superfície de resposta e curva de contorno para a porcentagem de recuperação de DON em função do tempo de agitação na etapa de extração e da quantidade de sulfato de magnésio adicionado na etapa de limpeza.....92

Figura 5. Esquema do método analítico para a determinação de DON em farinha de trigo.....94

### CAPITULO III

Figura 1. Cromatograma e espectro característicos de DON.....109

Figura 2. Cromatogramas característicos de DON em extrato de farinha de trigo. A: extrato de farinha livre de DON; B: extrato de farinha adicionado de padrão DON; C: amostra de farinha de trigo naturalmente contaminada com DON.....110

Figura 3. Curva de calibração do Desoxinivalenol em extrato de farinha de trigo.....111

## RESUMO

O trigo é um dos mais nobres alimentos e responde atualmente por cerca de 30% da produção mundial de grãos. Desoxinivalenol (DON) é uma micotoxina produzida principalmente por *Fusarium graminearum* e é conhecida como vomitoxina, possui vários efeitos dentre os quais: redução de consumo alimentar, irritação na pele, diarreia, hemorragias múltiplas e os efeitos imunossupressores. Pertencem ao grupo dos Tricotecenos. Os objetivos do presente estudo foram otimizar e validar o método analítico *QUECHERS* para a determinação de desoxinivalenol em farinha de trigo e avaliar a ocorrência da micotoxina em amostras de farinha do trigo produzido em algumas regiões brasileiras. A partir dos delineamentos de Palckett & Burman e Composto Central Rotacional foi possível obter um novo método analítico para a determinação de desoxinivalenol em farinha de trigo. *QUECHERS* é método analítico de fácil execução, economicamente viável, rápido e com menor geração de resíduos orgânicos. Os parâmetros de desempenho do método analítico avaliado indicaram seletividade para a micotoxina desoxinivalenol, linearidade, efeito de matriz significativo, exatidão e precisão, com limite de detecção de 50  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  e limite de quantificação de 100  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ . O método apresentou porcentagens de recuperação de 86 a 96%. Verificou-se que das amostras provenientes do Rio Grande do Sul, 15% (3) apresentaram contaminações que variaram de 1700 a 3689  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ , com média de 2753  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ , portanto em desacordo com as legislações brasileira (1750  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ ). Das amostras provenientes do estado do Paraná, 1 (10%) apresentou contaminação de 877  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  e nenhuma amostra mineira apresentou contaminação detectável, indicando a qualidade destas amostras para estes parâmetros. Do total das amostras brasileiras avaliadas, 14% apresentaram contaminações que variaram de 147 a 3688  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  e 6% apresentaram média de 2753  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ , excedendo os limites permitidos pela legislação brasileira. Por ser um contaminante natural do trigo, DON exerce grande impacto na saúde humana e animal, portanto a ocorrência da micotoxina demonstra a importância do constante monitoramento a fim de se minimizar os riscos à saúde.

**Palavras-chave:** Trigo, Validação Intralaboratorial, Desoxinivalenol, Método Analítico.

## ABSTRACT

Wheat is a noble grain and corresponds for about 30% of world grain production. Deoxynivalenol (DON) is a mycotoxin produced mainly by *Fusarium graminearum* and is known as vomitoxin, has several effects among which are: reduction of food intake, skin irritation, diarrhea, hemorrhages and multiple immunosuppressive effects. Belong to the group of Trichothecenes. The aims of this study was to optimize a analytical method *QuEChERS* for determination of the deoxynivalenol in wheat flour, as well validate the method and then evaluate the occurrence of deoxynivalenol in samples of wheat flour grown in some Brazilian regions. From Palckett & Burman and Rotational Central Composite designs was obtained a analytical method for determination of the deoxynivalenol in wheat flour. An easy, cheap and fast method, wich employs a minimum amount of organic solvents. The analytical method performance parameters showed selectivity for the mycotoxin deoxynivalenol, linearity, significant matrix effect, accuracy and precision, with detection limit of 50  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  and limit of quantification of 100  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ . The method recovery evaluated was percentages of 86-96%. The contamination by deoxynivalenol was observed in approximately 14% of the 50 samples analyzed. Among total of twenty samples analyzed from the Rio Grande do Sul, 15% (3) showed contamination ranging 1700-3689 mg. kg<sup>-1</sup>, with mean level of 2753 mg. kg<sup>-1</sup>. Among total of ten samples analyzed form Paraná state one (10%) of samples were contaminated by deoxynivalenol showed contamination of 877 mg. kg<sup>-1</sup> and no detectable contamination in the samples from Minas Gerais. Of total Brazilian samples evaluated, 14% showed contamination ranging 147-3688 mg. kg<sup>-1</sup> and 6% had average 2753 mg. kg<sup>-1</sup>, exceeding the limits allowed by Brazilian legislation. Because the natural contaminant of wheat, DON exerts great impact on human and animal health, so the occurrence of mycotoxin demonstrates the importance of constant monitoring in order to minimize the health risks.

Keywords: Wheat, Intra-laboratory Validation, Deoxynivalenol, Analytical Method.

## INTRODUÇÃO

Considerado um alimento nobre, o trigo corresponde atualmente por cerca de 30% da produção mundial de grãos. Dados do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA), mostram que a produção mundial de trigo safra 2013/14 situa-se em torno de 711,42 milhões de toneladas/ano. No Brasil, é cultivado nas regiões Sul (RS, SC e PR), Sudeste (MG e SP) e Centro-oeste (MS, GO e DF) e a produção anual oscila entre 5 e 6 milhões de toneladas. A produção nacional em 2013 foi 22,3 % superior à safra passada, com mais de 5,3 milhões de toneladas. O consumo anual no país tem se mantido em torno de 10 milhões de toneladas, portanto o Brasil é um dos maiores importadores mundiais de trigo.

As condições climáticas das principais regiões produtoras de trigo no Brasil e dos países tradicionalmente fornecedores favorecem o aparecimento de doenças importantes dessa cultura, dentre elas a fusariose ou giberela, causada principalmente por *Fusarium graminearum*. No Brasil, a fusariose alcançou o status de principal doença nas regiões tritícolas, principalmente na região sul do país. Além dos danos causados diretamente nas culturas, os grãos infectados podem apresentar contaminação por micotoxinas, que são metabólitos secundários produzidos por fungos e que têm efeitos adversos no homem, em animais e nas colheitas, resultando em perdas econômicas, sendo tóxicas tanto para o homem quanto para os animais. A contaminação por várias micotoxinas pode ocorrer, uma vez que muitas espécies de fungos são capazes de produzir vários metabólitos simultaneamente e algumas micotoxinas são produzidas por mais que uma espécie fúngica.

Dentre os tricotecenos, DON é a micotoxina mais prevalente em todo o mundo, em culturas utilizadas para alimentação humana e animal. A contaminação com DON em trigo e milho tem sido significativa.

Estudos sugerem que a presença de DON na alimentação humana causa particularmente anorexia e vômitos. Foi classificado no Grupo 3 da categoria pela IARC (1993), indicando ser "não cancerígeno para os seres humanos", no entanto os estudos sugerem que a administração oral de DON para camundongos causa a incidência de adenocarcinoma de pulmão. Como é uma das micotoxinas mais comumente encontradas em grãos, quando ingerido em doses elevadas por animais, causa náuseas, vômitos e diarreia. Se ingerida por porcos e por outros animais, em pequenas doses, pode provocar perda de peso e recusa alimentar.

No Brasil, a Resolução - RDC N<sup>o</sup>7, de 18 de Fevereiro de 2011 dispõe sobre limites máximos tolerados para desoxinivalenol em farinha de trigo de  $1750\mu\text{g. kg}^{-1}$ . Por ser um contaminante natural do trigo, DON exerce grande impacto na saúde humana e animal. Portanto, a ocorrência do contaminante em algumas regiões brasileiras demonstra a importância do constante monitoramento da micotoxina a fim de se minimizar os riscos à saúde.

## OBJETIVOS

- Estabelecer as condições cromatográficas para a separação, detecção e quantificação de desoxinivalenol em farinha de trigo empregando cromatografia líquida de alta eficiência com detecção de UV;
- Otimizar o método analítico *QUECHERS* para a determinação de desoxinivalenol em farinha de trigo empregando planejamento fatorial associado a análise de superfície de resposta;
- Avaliar os parâmetros de desempenho do método analítico para a determinação de desoxinivalenol em farinha de trigo – seletividade, linearidade, efeito de matriz, limites de detecção e quantificação, exatidão e precisão através de validação intralaboratorial;
- Avaliar a ocorrência de desoxinivalenol em amostras de farinha de trigo produzidas no Rio Grande do sul, Paraná e Minas Gerais.

# CAPITULO I –REVISÃO: DETERMINAÇÃO DE DESOXINIVALENOL EM ALIMENTOS MÉTODOS DE EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO

## 1) INTRODUÇÃO

### 1.1) Trigo

Considerado um alimento nobre, o trigo corresponde atualmente por cerca de 30% da produção mundial de grãos. Dados do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA), mostram que a produção mundial de trigo safra 2013/14 situa-se em torno de 711,42 milhões de toneladas/ano. Os maiores produtores são China, Comunidade Europeia, Índia e Rússia, países que representam 64% do total mundial. A produção norte-americana foi mantida em 58 milhões de toneladas em 2013. Na América do Sul, a Argentina é o maior produtor de trigo e está em 5º lugar na lista dos maiores exportadores mundiais produzindo em média 12 milhões de toneladas.

No Brasil, é cultivado nas regiões Sul (RS, SC e PR), Sudeste (MG e SP) e Centro-oeste (MS, GO e DF) e a produção anual oscila entre 5 e 6 milhões de toneladas. A produção nacional em 2013 foi 22,3 % superior à safra passada, com mais de 5,3 milhões de toneladas. O consumo anual no país tem se mantido em torno de 10 milhões de toneladas, portanto o Brasil é um dos maiores importadores mundiais de trigo.

As condições climáticas das principais regiões produtoras de trigo no Brasil e dos países tradicionalmente fornecedores favorecem o aparecimento de doenças importantes dessa cultura, dentre elas a fusariose ou giberela, causada principalmente por *Fusarium graminearum*. No Brasil, a fusariose alcançou o status de principal doença nas regiões tritícolas, principalmente na região sul do país (DEL PONTE et al, 2004). Além dos danos causados diretamente nas culturas, os grãos infectados podem apresentar contaminação por micotoxinas, sendo tóxicas tanto para o homem quanto para os animais. De ocorrência generalizada, a fusariose é encontrada em regiões de

clima quente e úmido e com níveis elevados de precipitação no estágio de floração do trigo. Umidades relativas acima de 70% e temperaturas acima de 16<sup>0</sup>C influenciam no estabelecimento da infecção (BERGSTROM, 1993).

Em trigo e outros cereais, a infecção com fungos produtores de DON e a produção de micotoxinas está relacionadas principalmente com as condições ambientais no campo. A toxina uma vez produzida permanece no grão após a colheita, podendo ocorrer um aumento nos níveis de contaminação durante o armazenamento. Além disso, pode ser encontrado em produtos de trigo processados como farinhas, pães biscoitos e massas.

## 1.2) Segurança Alimentar

É crescente a preocupação dos consumidores com relação às questões de segurança alimentar e a percepção de que alguns alimentos podem estar associados a determinado tipo de risco, causando um impacto negativo na qualidade do alimento e na saúde. Algumas substâncias químicas como hormônios, resíduos de pesticidas, micotoxinas, dioxinas, metais, medicamentos veterinários, aditivos alimentares, componentes da embalagem, (DELIZA et al., 2003; FREWER et al., 2004; VAN PUTTEN et al., 2007) e contaminantes microbiológicos (WILCOCK et al, 2004) podem acidentalmente ser incluídas nos alimentos e comprometer a segurança alimentar.

A segurança dos alimentos é um requisito básico de qualidade e implica na ausência ou na presença em níveis aceitáveis e seguros de contaminantes, toxinas naturais ou qualquer outra substância que pode tornar os alimentos prejudiciais à saúde em uma exposição aguda ou crônica (DAS, 2008 apud MISHRA et al., 2013).

Milhares de pessoas são diretamente afetados por doenças de origem alimentar a cada ano no mundo (OMS, 2000). Um alimento que contém um nível de contaminante

inaceitável do ponto de vista de saúde pública, não pode ser colocado no mercado. Por outro lado, alguns contaminantes são de ocorrência natural, de forma que seria impossível impor uma proibição total dessas substâncias (CODEX, 1995). Por isso, a melhor solução é garantir essas substâncias sejam mantidas em níveis tão baixos quanto possível, amparados por legislações específicas.

Os limites máximos tolerados (LMT) para DON são normalmente estabelecidos para produtos como cereais não transformados e produtos à base de cereais, tais como massas e pães. A União Europeia impôs limites máximos de DON em cereais e produtos à base de cereais que variam de 200-1750  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (CE 1881/2006).

Em reunião do Comitê do CODEX sobre Contaminantes dos Alimentos, realizada em 2011, um dos temas abordados foi a necessidade de se estabelecer limites máximos para o desoxinivalenol (DON) e seus derivados acetilados como o 3-acetil-desoxinivalenol (3-DONAc) e 15-acetil-desoxinivalenol (15-DONAc) em cereais e produtos a base de cereais. Segundo o Comitê, havia a necessidade de se recopilar mais dados sobre a investigação de DON e de derivados acetilados no trigo, milho e outros cereais a fim de se proporcionar uma imagem mais completa das diferenças regionais e proporcionar dados mais completos. Outro ponto considerado foi que o estabelecimento de limites máximos para matérias-primas (trigo, milho e cevada) poderia criar uma restrição comercial, pois o processo de moagem poderia reduzir consideravelmente a contaminação destes produtos por micotoxinas. Algumas delegações apoiaram o estabelecimento de níveis de 2000  $\mu\text{g}/\text{kg}$  e que este limite seria viável aplicando-se as boas práticas agrícolas. Também questionou-se que os níveis máximos destas toxinas para alimentos destinados ao uso de lactentes e crianças deveriam ser mais estritos e que em determinadas regiões o consumo de cereais como o trigo era mais elevado do que em outras. Em 2013, o comitê do CODEX estabeleceu uma proposta de limites

máximos para DON em produtos de cereais e derivados de  $1250\mu\text{g.kg}^{-1}$ , não sendo aplicável para milho destinado a obtenção do amido, por passar por moagem úmida. Um nível máximo de  $1000\mu\text{g.kg}^{-1}$  foi proposto para a farinha, semolina, farinha, flocos e amido. Questionou-se que para ocratoxina A, os teores máximos do CODEX só foram estabelecidos para cereais, não para os produtos derivados da sua transformação. Portanto, em consonância com a abordagem CODEX no que diz respeito à ocratoxina A e ao fato de que os cereais crus são, do ponto de vista do comércio internacional, mais relevantes propôs-se limitar o nível máximo de DON para cereais crus. O nível proposto para os alimentos à base de cereais para lactentes e crianças jovens foi de  $200\mu\text{g.kg}^{-1}$  (CODEX, 2013).

No Brasil, a Resolução - RDC N<sup>o</sup>7, de 18 de Fevereiro de 2011 (Tabela 1) dispõe sobre limites máximos tolerados (LMT) para as micotoxinas Aflatoxinas (B1, B2, G1, G2), Ocratoxina A, Patulina, Desoxinivalenol, Fumonisinias (B1, B2) e Zearalenona, para algumas categorias de alimentos e matérias-primas. O critério para entrada em vigor imediatamente da norma foi de não haver problemas sérios em relação ao controle da contaminação e pelo reconhecimento da necessidade de se ter alimentos infantis de melhor qualidade. Segundo a Norma, o limite máximo tolerado para desoxinivalenol para alimentos a base de cereais para alimentação infantil (lactentes e crianças de primeira infância) é de  $200\mu\text{g.kg}^{-1}$ . Em janeiro de 2012, os limites para Desoxinivalenol, foram estabelecidos para o restante das categorias de alimentos de interesse. Para matérias-primas a Resolução entra em vigor em 2014. Em 2016 haveria a redução dos limites em relação àqueles estabelecidos em 2012, de forma a aproximá-los do que hoje está definido em outros países. Este escalonamento de prazos deve-se a solicitação anterior do MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento) e do setor produtivo, a fim de que os setores possam se adequar.

Tabela 1- Limites máximos tolerados (LMT) para Desoxinivalenol em alimentos, segundo a resolução - RDC N°7, DE 18 de fevereiro de 2011.

<b>ANEXO II – Aplicação em janeiro de 2012</b>	
Desoxinivalenol (DON)	Limite Máximo Tolerado (µg/kg)
Trigo integral, trigo para quibe, farinha de trigo integral, farelo de trigo, farelo de arroz, grão de cevada.	2000
Farinha de trigo, massas, crackers, biscoitos de água e sal, e produtos de panificação, cereais e produtos de cereais exceto trigo e incluindo cevada malteada.	1750
<b>ANEXO III - Aplicação em janeiro de 2014</b>	
Desoxinivalenol (DON)	Limite Máximo Tolerado (µg/kg)
Trigo e milho em grãos para posterior processamento.	3000
Trigo integral, trigo para quibe, farinha de trigo integral, farelo de trigo, farelo de arroz, grão de cevada.	1500
Farinha de trigo, massas, crackers, biscoitos de água e sal, e produtos de panificação, cereais e produtos de cereais exceto trigo e incluindo cevada malteada.	1250
<b>ANEXO IV – Aplicação em janeiro de 2016</b>	
Desoxinivalenol (DON)	Limite Máximo Tolerado (µg/kg)
Trigo integral, trigo para quibe, farinha de trigo integral, farelo de trigo, farelo de arroz, grão de cevada.	1000
Farinha de trigo, massas, crackers, biscoitos de água e sal, e produtos de panificação, cereais e produtos de cereais exceto trigo e incluindo cevada malteada.	750

No ano de 2013, foi solicitada pelo setor produtivo à ANVISA a extensão até 2017 dos Limites Máximos estabelecidos no ano de 2012 para a Micotoxina DON em trigo e seus derivados. O setor se comprometeu a realizar um planejamento da obtenção e apresentação dos dados à ANVISA, necessários para o refinamento da avaliação de risco e revisão dos limites, caso necessário. Devido ao exposto, a ANVISA prorrogou para 1º de janeiro de 2017 o prazo para adequação estabelecidos nos artigos 11 e 12 e respectivos anexos III e IV da Resolução - RDC nº 7, de 18 de fevereiro de 2011, que dispõe sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos. A

prorrogação dos prazos consta na Resolução – RDC nº 59, de 26 de dezembro de 2013, publicada no Diário Oficial da União de 30 de dezembro de 2013.

### 1.3) Micotoxinas

Em se tratando de contaminantes naturais nos alimentos, os fungos são encontrados em uma ampla variedade de ambientes devido à capacidade de utilizar inúmeros substratos e apresentar tolerância a baixo pH, atividade de água e temperatura (HUIS VELD IN'T, 1996 apud GARCIA et al., 2009). A deterioração fúngica de alimentos provoca perdas econômicas em todo o mundo (DANTIGNY et al., 2005) e alguns fungos podem produzir micotoxinas (PITT, 1996), que são contaminantes naturais em matérias-primas, alimentos e rações. Algumas micotoxinas podem causar doenças autoimunes, apresentar propriedades alergênicas, teratogênicas, cancerígenas e/ou mutagênicas (CAST, 2003).

Micotoxinas são metabólitos secundários produzidos por fungos e que têm efeitos adversos no homem, em animais e nas colheitas, resultando em perdas econômicas. Existem vários critérios para avaliar o impacto econômico das micotoxinas presentes nos alimentos em seres humanos e em animais. As considerações incluem perda de vida humana e animal, custos com a manutenção da saúde e cuidados veterinários, perda de produção de animais, de culturas forrageiras e de rações, custos com regulamentação e os de investigação sobre o impacto e a severidade destas substâncias sobre o homem e animais. A contaminação de alimentos e rações é um problema significativo tanto em países em desenvolvimento quanto em países desenvolvidos. Além do risco direto para a saúde, as perdas econômicas e as implicações decorrentes da presença de contaminantes são inúmeras (LUTTFULLAH & HUSSAIN, 2011; SALEM & AHMAD, 2010; ZAIN, 2011).

O controle das micotoxinas deve ser administrado pelos governos de cada país, através de ministérios e organizações, tais como o Ministério da Saúde e da Agricultura. Além disso, tanto os produtores quanto a indústria de alimentos e rações devem receber treinamento e incentivo através de políticas públicas para prevenir e controlar a contaminação por micotoxinas em seus produtos (ATANDA et al., 2012).

A contaminação por várias micotoxinas pode ocorrer, uma vez que muitas espécies de fungos são capazes de produzir vários metabólitos simultaneamente e algumas micotoxinas são produzidas por mais que uma espécie fúngica (ATANDA et al., 2012).

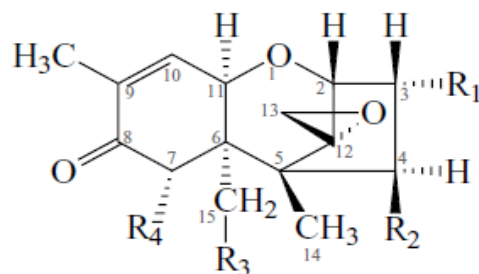
Além disso, a presença de uma micotoxina pode indicar a presença de outras e a associação de vários grãos em rações também pode veicular mais de um tipo de contaminante (FERNANDEZ-CRUZ et al., 2010). Um estudo realizado por Ryu et al (1996), revelou a presença de várias micotoxinas, principalmente nivalenol e desoxinivalenol em milho e cevada coreanos.

A maioria das micotoxinas são produzidas pelos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* e *Stachybotrys*, e as principais classes de micotoxinas produzidas são aflatoxinas, tricotecenos, fumonisinas (CAST, 2003).

#### 1.4) Desoxinivalenol

Dentre as micotoxinas, os tricotecenos (TCT) são um grupo que inclui mais de 150 metabólitos fúngicos com a mesma estrutura básica (GROVE, 1988). São classificados de acordo com a presença de um átomo de hidrogênio ou um grupo éster na posição C-8. Os tricotecenos do tipo B incluem o desoxinivalenol (DON), 3-

acetildesoxinivalenol (3-DONAc), 15-acetildesoxinivalenol (15-DONAc), nivalenol (NIV) e fusarenona-X (FUX) e contêm um grupo cetona na posição 8 (figura 1)



**Figura 1.** Estrutura dos tricotecenos tipo B: DON ( $R_1= OH$ ,  $R_2= H$ ,  $R_3= OH$ ,  $R_4= OH$ ), 3-AcDON ( $R_1= OAc$ ,  $R_2= H$ ,  $R_3= OH$ ,  $R_4= OH$ ), 15-AcDON ( $R_1= OH$ ,  $R_2= H$ ,  $R_3= OAc$ ,  $R_4= OH$ ) e NIV ( $R_1= OH$ ,  $R_2= OH$ ,  $R_3= OH$ ,  $R_4= OH$ ). (LATANZZIO et al, 2009).

DON é um dos compostos mais polares entre os tricotecenos. Contém um grupo hidroxílico primário e dois secundários e é solúvel em água e solventes polares tais como metanol e acetonitrila. Diferentemente dos outros tricotecenos, a molécula de DON contém um sistema conjugado carbonílico conferindo absorção no UV, o que auxilia a sua detecção por HPLC.

Vários gêneros de fungos são capazes de produzir TCT e a maioria tem sido isolado de *Fusarium* spp, principalmente por *Fusarium graminearum*. Nivalenol foi encontrado associado a DON e derivados acetilados produzidos por *F. graminearum*, *F. cerealis*, *F. culmorum* no sul e por *F. poae* no norte da Europa. Além disso, *F. verticillioides* também tem sido relatado. Entretanto sabe-se que outros gêneros de fungos também podem produzir tricotecenos como: *Trichoderma*, *Stachybotrys* e *Myrothecium* (MENEELY et al., 2011).

Dentre os tricotecenos, DON é a toxina mais prevalente em todo o mundo, em culturas utilizadas para alimentação humana e animal (LARSEN et al., 2004;

SUDAKIN, 2003). A contaminação com DON em trigo e milho tem sido significativa. Em 1981 no Canadá, DON foi encontrado no trigo de inverno e no milho seco infectado por *F. graminearum* (TRENHOLM et al., 1985). Os fungos podem sobreviver no resíduo deixado sobre o campo a partir da colheita da temporada anterior, proporcionando uma fonte de inóculo para a nova safra. Em condições de umidade adequada o fungo pode se desenvolver e a contaminação da cultura se dará quando conídios são disseminados pelo vento atingindo as anteras das flores ou os grãos ainda imaturos (RICHARD, 2007 apud HOSSEINI & BAGHERI, 2012).

Freqüentemente ocorre em trigo, milho, cevada, aveia e centeio, assim como em grãos de malte processados, cerveja e pães (CAST, 2003). Além disso, é um composto muito estável em pH entre 1 e 10 e temperatura de 150°C durante o processamento/cozimento de alimentos (LAUREN & SMITH, 2001).

Estudos sugerem que a presença de DON na alimentação humana causa particularmente anorexia e vômitos (PESTKA & SMOLINSKI, 2005). Foi classificado no Grupo 3 da categoria pela IARC (1993), indicando ser "não cancerígeno para os seres humanos", no entanto os estudos de Huang et al (2004), sugerem que a administração oral de DON para camundongos causa a incidência de adenocarcinoma de pulmão. Como é uma das micotoxinas mais comumente encontradas em grãos, quando ingerido em doses elevadas por animais, causa náuseas, vômitos e diarreia. Se ingerida por porcos e por outros animais, em pequenas doses, pode provocar perda de peso e recusa alimentar. Por induzir esses sintomas desoxinivalenol é conhecido como vomitoxina ou fator de recusa de alimento (MILLER et al., 2001).

Assim, os fatores mais relevantes para proteger uma população das contaminações dos alimentos incluem o estabelecimento de medidas para resolver problemas relacionados a exposição e a disponibilidade de técnicas validadas, técnicos

treinados e equipamentos adequados para analisar alimentos e rações, de forma a garantir que os limites máximos de resíduos de contaminantes nos alimentos não ultrapassem os limites máximos estabelecidos (WAGACHA & MUTHOMI, 2008).

## **2) MÉTODOS ANALÍTICOS**

Como pesticidas, biopesticidas e micotoxinas têm propriedades físico-químicas semelhantes é desejável dispor de um método global para a análise destes multi-compostos em alimentos. Para isso, é necessário o desenvolvimento de procedimentos de extração comuns, rápidos e efetivos, garantindo recuperações adequadas, com precisão e exatidão. Também é desejável que o preparo da amostra seja comum e que uma única determinação seja empregada. Um método analítico adequado inclui as etapas de amostragem/homogeneização, extração, limpeza e concentração (em alguns casos), antes da análise quali e/ou quantitativa. Para a maioria das micotoxinas em alimentos, a análise final é realizada utilizando-se uma técnica cromatográfica, combinada com um detector apropriado (GOBEL & LUSKY, 2004; REN et al., 2007).

O desenvolvimento e validação de métodos analíticos mais exatos e precisos para a determinação de micotoxinas são enormemente solicitados. Muitos métodos padronizados já estão disponíveis para algumas micotoxinas tais como: aflatoxinas, ocratoxina A, fumonisinas e patulina, em vários alimentos. Porém, os métodos de análise para tricotecenos em alimentos e outras micotoxinas em ração são mais escassos e requerem mais estudos (RAHMANI et al., 2009).

### **2.1) AMOSTRAGEM**

Métodos tradicionais de amostragem e preparo de amostras de cereias normalmente não são adequados para análise de micotoxinas porque a contaminação se dá de forma heterogênea, dificultando a obtenção de amostras representativas. Estudos sobre uma ampla variedade de produtos agrícolas como amendoim e milho indicaram

que uma pequena percentagem (0,1%) dos grãos no lote pode estar contaminado e a concentração em um único grão pode ser extremamente alta (CUCULLU et al., 1966; JOHANSSON et al., 2000). Portanto, o risco de se rejeitar um lote que está dentro dos limites regulamentados ou de se aceitar um lote que deveria ser rejeitado, existe.

Em termos de amostragem, para um lote de cereais maior que 50 toneladas, são necessárias 100 amostras elementares totalizando 10 kg; contudo, para lotes menores de 50 toneladas são necessários de 3 a 10 amostras elementares de 1 a 10 kg, dependendo do peso do lote. O peso da amostra elementar deve ser aproximadamente 300g no caso figos secos, amendoim e nozes. No caso dos lotes em varejo o peso da amostra elementar depende do peso da embalagem do produto (CE 401/2006).

## 2.2) MÉTODOS DE EXTRAÇÃO

A escolha do método de extração depende da micotoxina em estudo, do tipo de matriz alimentar e da instrumentação disponível. Deve ser adequado em termos de identificação do analito, da precisão e da sensibilidade requeridas. A extração deve permitir boas recuperações de todas as micotoxinas sob investigação na matriz específica (ROMERO-GONZALEZ et al., 2011).

No processo de extração, o analito e os compostos com propriedades semelhantes migram para o solvente extrator até que o equilíbrio seja estabelecido. Desta forma, os compostos desejáveis podem ser concentrados no solvente e os interferentes removidos.

O ideal é que o solvente de extração seja capaz de remover apenas a micotoxina de interesse da matrix. Devido à ausência de um solvente completamente específico, os solventes escolhidos são os que podem remover o máximo de micotoxinas quanto possível, com um mínimo de interferentes. Além disso, deve ser facilmente recuperável,

atóxico, não inflamável, volátil, estável e de baixo impacto ambiental (RAHMANI et al., 2009).

A maioria dos métodos disponíveis para a extração de micotoxinas depende de extração líquido-líquido e do processo de partição, através do uso de um ou mais solventes, seguido pela utilização de colunas de imunoafinidade (TAVČAR – KALCHER et al., 2007).

Técnicas de extração tais como: extração líquido-líquido (LLE), extração em fase sólida (SPE), microextração em fase sólida (SPME), extração sólido-líquido (SLE), dispersão da matriz em fase sólida (MSPD), extração líquido pressurizado (PLE), polímeros molecularmente gravados (MIPs), microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME) e QuEChERS têm sido empregadas para a extração de micotoxinas em alimentos.

#### 2.2.1)A extração líquido-líquido (LLE)

Também é conhecida como extração por solvente ou partição, é um método para separar um ou mais componentes específicos em uma mistura de líquidos baseado nas diferentes solubilidades de solventes imiscíveis, normalmente água e um solvente orgânico. A seletividade da técnica se dá por meio da escolha do solvente extrator. A adição de sais ou alterações no pH podem ser empregados para melhorar a eficiência da extração. Os solventes que demonstraram maior eficiência para a extração de micotoxinas são os relativamente polares como metanol (MeOH), acetona (CH<sub>3</sub>COCH<sub>3</sub>), acetonitrila (ACN), etilacetato, dietil éter, tolueno e clorofórmio ou misturas destes(RAHMANI et al., 2009). Para a extração de ocratoxina A em café Pittet & Royer (2002), utilizaram ácido fosfórico e diclorometano. González-Osnaya et al (2008), extraíram a mesma micotoxina do leite empregando MeOH e Anfossi et al

(2008), extraíram aflatoxina no milho com dodecil sulfato de sódio aquoso. Entretanto, aLLE pode ser uma técnica longa e não específica, pode formar emulsões e requer grandes volumes de solventes orgânicos(RIDGWAY, 2012).

### 2.2.2) Extração em fase sólida (SPE).

Nesta técnica empregam-se materiais adsorventes como o gel de sílica, C8 ou material de fase reversa C18, resinas de troca iônica e materiais poliméricos. Muitas colunas SPE foram testadas na análise de fumonisina no milho e em produtos derivados, e a C18 mostrou ser a mais apropriada após extração com ACN:H<sub>2</sub>O (DILKIN et al., 2001). A coluna Bond Elut<sup>®</sup> foi utilizada para a análise de 12 tricotecenos e ZEA após extração com ACN:H<sub>2</sub>O e obteve-se elevadas recuperações para os tricotecenos polares (KLOTZEL et al., 2006).A maior desvantagem de SPE é a dependência do analito em estudo das condições operacionais tais como temperatura e tempo de extração. Além de ser uma técnica longa se realizada —offline”, os cartuchos e discos extratores tornam a técnica mais cara, se comparada a outras técnicas de extração (KRSKA et al., 2007).

### 2.2.3)Microextração em fase sólida (SPME)

Segundo Demyttenaere et al (2004) é uma técnica alternativa à SPE. É uma microtécnica de extração tanto pelas dimensões do suporte de extração empregado, como pelos volumes de matrizes e solventes empregados. Utiliza-se uma fibra de sílica fundida, recoberta com um adsorvente adequado. A fibra se encontra acondicionada dentro de uma espécie de agulha em um amostrador semelhante a uma seringa, ficando exposta somente no momento da extração. O processo pode ser realizado por imersão da fibra diretamente na matriz ou através da exposição no espaço confinante chamado —headspace”, onde a fibra entra em contato somente com os

vapores do analito que podem ser liberados da matriz por aquecimento. Após a extração pela fibra, o soluto é desorvido empregando aquecimento (GC) ou empregando quantidades reduzidas de um solvente adequado (HPLC). O processo se baseia no coeficiente de partição do analito entre a matriz e a fibra de extração, sendo que a quantidade extraída normalmente é muito inferior à quantidade total do analito presente na amostra, permitindo que a mesma amostra seja analisada em replicata. O método SPME oferece muitas vantagens sobre outras técnicas de preparação porque não requer solvente orgânico, é relativamente barata, sensível, muitas vezes não requer qualquer outro passo de preparação da amostra e pode ser facilmente automatizada. No entanto, as principais desvantagens são a aplicação somente para amostras aquosas e pouco concentradas e os limites de quantificação são elevados (LIGOR et al., 2004).

#### 2.2.4) Extração sólido-líquido (SLE)

Consiste na separação de um ou mais componentes de uma mistura sólida através de um solvente. Neste processo ocorre o contato do solvente com o sólido, que cede o componente solúvel e a separação da solução do sólido remanescente se dá por filtração, destilação ou evaporação, para recuperação do soluto dissolvido no solvente. Sulyok et al(2006),determinaram 39 micotoxinas em amostras de trigo e milho empregando a mistura de solventes MeCN:H<sub>2</sub>O:HOAc na proporção 79:20:1 (v/v).

#### 2.2.5) Dispersão da matriz em fase sólida (MSPD)

A amostra é introduzida em um recipiente contendo um suporte sólido (adsorvente), homogeneizada, transferida (matriz e adsorvente) para uma coluna contendo sílica gel e eluída com solvente apropriado. É uma técnica bastante difundida na extração de compostos orgânicos em amostras sólidas e semi-sólidas. A técnica é capaz de extrair seletivamente um ou mais compostos de interesse ou a fração total dos

componentes da matriz. Além disso, a MSPD simplifica os passos de extração e purificação porque reduz a manipulação da amostra e é mais rápida que técnicas convencionais (RUBERT et al., 2011; WU et al., 2008). Um exemplo de aplicação desta técnica é a determinação de multi-micotoxinas em farinha de trigo. Neste caso, homogeneizou-se a amostra com C18, acondicionou-se em uma coluna e adicionou-se formato de amônia em ACN/MeOH 50/50 (v/v) (RUBERT et al., 2011). A aplicabilidade da técnica também foi avaliada para a extração aflatoxinas em avelãs (BACALONI et al., 2008) e em azeite de oliva (CAVALIERE et al., 2007).

#### 2.2.6) Extração líquido pressurizado (PLE)

Segundo Desmarchelier et al (2010) esta técnica é alternativa aos métodos de extração, como Soxhlet, maceração, percolação ou refluxo, que oferece vantagens no que diz respeito ao tempo de extração, consumo de solvente, rendimento e reprodutibilidade. Utiliza solventes orgânicos a temperaturas e pressões elevadas a fim de aumentar a eficiência do processo de extração. O aumento da temperatura acelera a cinética de extração e mantém o solvente no estado líquido, permitindo extrações mais rápidas. Além disso, a elevada pressão facilita a entrada do solvente para os poros da matriz facilitando a extração dos analitos. Elevadas temperaturas também diminuem a viscosidade do solvente permitindo uma melhor penetração na matriz e aumenta a difusão do solvente, resultando em aumento da velocidade de extração. González-Osnaya et al (2006) e Juan et al (2008), aplicaram este tipo de extração para determinar ocratoxina A em amostras de pão e Royer et al (2004), extraíram DON, ZEA e FUN em amostras de milho.

### 2.2.7) Polímeros molecularmente gravados (MIPs)

São polímeros que possuem um elevado número de ligações cruzadas que podem se ligar seletivamente a determinado composto alvo. Tem sido empregado como técnica de separação principalmente cromatográfica. Métodos de extração em fase sólida (SPE) aliada aos MIPs vêm sendo cada vez mais utilizada. É uma técnica particularmente adequada para extrações onde o analito está presente em amostras muito complexas. MIP específicos para micotoxinas são também considerados uma alternativa como técnica de purificação na qual, contrariamente às micotoxinas, não têm problemas com o tempo de armazenamento e de estabilidade com relação aos solventes orgânicos (ZHAO et al., 2011; WEISS et al., 2003). Foram desenvolvidas várias classes de polímeros baseados em MPI para extrair seletivamente diversas micotoxinas incluindo desoxinivalenol, zearalenona, ocratoxina e moniliformina, mas a análise é relativamente longa, as partículas formam aglomerados irregulares em tamanho e forma, levando a uma análise insatisfatória e picos largos (NÚNEZ et al., 2012).

### 2.2.8) Microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME)

A amostra aquosa deve ser solúvel no solvente extrator, que é miscível em água, permitindo assim a formação de uma solução turva e o equilíbrio de extração rápido. O método requer otimização para se estabelecer as melhores condições de extração. A técnica foi aplicada para a extração de diversos analitos em matrizes orgânicas aquosas, principalmente em amostras de água. Não tem sido amplamente aplicada em matrizes sólidas, tais como alimentos, provavelmente por causa da complexidade das amostras. DLLME para matrizes sólidas foi utilizada mais como técnica de purificação e/ou de concentração do que como procedimento de extração. Nestes casos, os solventes

utilizados para extrair os analitos da matriz sólida, foram utilizados como dispersantes(KARAMI-OSBOOet al, 2013; CAMPONE et al, 2011).

### 2.2.9) *QUECHERS*

As siglas em inglês se referem a Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe. É um método rápido, fácil, barato, eficaz, robusto e seguro de preparo de amostra. Foi descrito por Anastassiades et al., 2003 e empregado na determinação de multiresíduos de pesticidas em vegetais. Baseia-se em uma extração-partição com ACN seguida de limpeza através de extração em fase sólida dispersiva. A etapa de extração emprega sulfato de magnésio anidro (MgSO<sub>4</sub>) e cloreto de sódio (NaCl) para reduzir o teor de água na amostra e na etapa de purificação, e a amina primária secundária (PSA) é usada como adsorvente para reter compostos de co-extração, tais como açúcares e ácidos graxos (remove compostos polares e ácidos), (BENVENUTI et al., 2012; SOSPEDRA et al., 2010; LEHOTAY et al., 2005; ANASTASSIADES et al., 2003).

Rubert et al (2012), compararam 4 métodos de extração (SPE, SLE, MSPD e QuEChERS) para determinação de 32 micotoxinas em cevada. Observaram que SLE, MSPD e QuEChERS tiveram recuperação superiores a 60% das micotoxinas estudadas. O método SLE apresentou recuperações inferiores a 50%, mas foi superior a 65,4 % para tricotecenos tipo A e B, aflatoxinas e fumonisinas. Dentre os cartuchos SPE, o HLB não foi eficiente para extrair as micotoxinas. Já o C18 extraiu um grande número de compostos, mas com baixas recuperações. QuEChERS foi capaz de extrair de forma adequada todas as micotoxinas selecionadas com recuperações que variaram de 64,1 % a 93,4%. Demonstrou um grande potencial para extração simultânea de diversos compostos, ser de fácil execução e baixo custo se comparado aos outros métodos de extração. Foi um procedimento mais rápido porque não houve a necessidade de se pré-

concentrar as amostras. Em 1h e 30min pôde-se extrair de 10 a 15 amostras enquanto MSPD e SLE demorou o dobro do tempo e o tempo de limpeza foi três vezes maior. Além disso, não houve a necessidade de descontaminar as colunas como na SPE e MSPD.

### 2.3) MÉTODOS DE LIMPEZA

A limpeza da amostra consiste na remoção de substâncias que poderiam interferir na detecção da substância a analisar. Como um grande número de compostos interferentes tais como pigmentos podem estar presentes na amostra, a mesma deve passar por um processo de limpeza a fim de se obter resultados mais precisos e exatos. Uma variedade de métodos de limpeza tem sido utilizados como o uso de solventes apolares para remover lipídios presentes nos cereais.

Com o desenvolvimento dos métodos de limpeza, técnicas como a extração em fase sólida (SPE), colunas de troca iônica, de imunoafinidade (IAC) e colunas multifuncionais (MFC) estão sendo amplamente aplicadas na análise de micotoxinas.

Além de ser um método de extração, a SPE pode ser aplicada como método de limpeza no processo —*off line*—. O uso de pré-colunas para a pré-concentração —*online*— como C8 ou C18 acoplado ao HLPC torna o processo mais rápido, se comparado ao processo —*off line*—. Baseia-se na LLE na qual as soluções extraídas são passadas através de um cartucho específico e o analito passado fica retido na fase estacionária, dependendo das suas propriedades físicas-químicas. Etapas de condicionamento, lavagem e de eluição podem ser executadas automaticamente e alguns sistemas também permitem extrair uma amostra enquanto outro está sendo analisado por LC (RODRIGUEZ-MOZAZ et al., 2007). A desvantagem da técnica é a perda de eficiência

com mudança no formato dos picos e efeito de memória (carryover) do analito prejudicando a análise seguinte.

Colunas de troca iônica são empregadas quando o analito está presente na forma iônica. A retenção é baseada na atração eletrostática entre um grupo funcional carregado da substância a analisar e o grupo carregado sobre a superfície da sílica da coluna. Para eluir o analito a ligação com o adsorvente deve ser rompida. A força eletrostática é interrompida e o composto é eluído. Alternativamente, uma solução com elevada força iônica pode ser utilizada devido à maior afinidade com o adsorvente. Colunas SAX podem ser usadas para a determinação de ocratoxina A e fumonisina (BETINA, 1993). Como as micotoxinas ácidas e neutras não podem ser simultaneamente purificadas na coluna MycoSep, uma coluna de troca aniônica (SAX) foi utilizada a fim de fixar as micotoxinas ácidas e separá-las das neutras (PUSSEMIER et al., 2006).

As colunas de imunoafinidade estão se tornando cada vez mais populares no processo de limpeza por serem altamente seletivas. As micotoxinas presentes na matrix se ligam aos anticorpos mono ou policlonais presentes na coluna. Os interferentes não interagem e são facilmente removidos da coluna e as toxinas são eluídas através da desnaturação do anticorpo. Existem muitas colunas disponíveis para várias micotoxinas tais como aflatoxinas, fumonisinas e tricotecenos tipo a e B. A AOAC e a União Européia validaram métodos empregando colunas de imunoafinidade para diversos alimentos. Como desvantagens a coluna é utilizada apenas uma única vez, tem elevado custo e a presença de altas concentrações de micotoxinas pode sobrecarregá-la (HINOJO et al., 2006).

Para a detecção de resíduos de multi-micotoxinas em matrizes complexas desenvolveu-se colunas multifuncionais: Multisep e Mycosep. Ambas podem adsorver substâncias interferentes da matrix e permitir que DON e seus derivados

passem através da fase sólida. Enquanto as soluções de extração podem ser adicionadas diretamente na coluna Multisep, a Mycosep precisa ser colocada na solução extratora. Estas colunas são empregadas para um tipo de analito somente, como a Mycosep 229 Ochra para determinação de ocratoxina.

A aplicação, vantagens e desvantagens de alguns métodos de limpeza para a detecção de DON e os seus derivados encontram-se resumidos na Tabela 2.

**Tabela 2**– Aplicação, vantagens e desvantagens dos métodos de limpeza disponíveis para determinação de Desoxinivalenol (DON) em alimentos.

Métodos Purificação	Tipo	Vantagens	Desvantagens	Métodos de Detecção	Referências
SPE (Extração em Fase Sólida)	Carvão-Alumina-Celite	Versatilidade, baixo custo, fácil preparo e longa vida de prateleira	Tricotecenos têm diferenças quanto à polaridade e solubilidade, pode comprometer a recuperação de alguns compostos, longo tempo de análise.	HLPC-DAD	Al-Hazmi, 2011;
	Carvão-Alumina-C18			CG/ECD	Cano-Sancho et al, 2011
	Sílica-Alumina-Celite			CG	Doris et al, 2011
	Cartucho Oasis HLB (material polimérico)			HPLC-MS/MS	Zou et al, 2012
Troca Iônica	SAX		Separação de	HPLC/C	Pussemier

			micot. ácidas e neutras	G	et al, 2006; Betina, 1993
Colunas de Imunoafinidade	DONPREP / DONTTest	Boa especificidade e sensibilidade	Específica para cada analito, preço elevado	HPLC-UV	Vidal et al, 2013; Brera et al, 2013; Blandino et al, 2012; Bensassi et al, 2011; Antonius et al, 2010; Klinglmyr et al, 2010; Bohm et al, 2008
				HLPC-DAD	Ennouari et al, 2013; Cano-Sancho et al, 2011;
				LC-UV	Santos et al, 2011
					Neumann et al, 2009
Colunas Multifuncionais	Mycosep 225	Adequada para detecções simultâneas, durável	Vulnerável ao efeito de matriz	CG-MS	Cano-Sancho et al, 2011; Gonzáles-Osnaya et al, 2011
	Mycosep 227			HPLC-DAD	
	Mycosep 226			CG-ECD	Moazami & Jinap, 2009
				HPLC-UV	
				LC-MS/MS	Hallier et al, 2011

Dois novos métodos de limpeza mostraram grande potencial na detecção de DON em alimentos: Polímeros Molecularmente Impressos (MIPs) e a Imuno-Ultrafiltração (IUF). No método MIPs o analito se liga especificamente a polímeros que são sintetizados usando técnica de impressão molecular. Após a polimerização monomérica com um elevado grau de ligações cruzadas, o analito pode ser eluído por extração com solvente. É um método mais barato e mais eficaz se comparado à IAC (CAPRIOTTI et al., 2012 - A).

O método IUF utiliza uma membrana com poros pequenos o suficiente para manter os anticorpos. A solução da extração passa pela membrana e o analito alvo se liga aos anticorpos. Após lavagem para remover os compostos interferentes, os complexos antígeno-anticorpo são dissociados por adição de um modificador e o analito é eluído por centrifugação. Comparado com IAC, IUF pode ser utilizada na forma livre, sem a necessidade de suporte sólido e é tão seletivo quanto o IAC (RAN et al., 2013).

### **3) MÉTODO QUECHERS**

O método QuEChERS apresenta inúmeras vantagens sobre as técnicas tradicionais de extração como o emprego de quantidades reduzidas de amostra e de solventes orgânicos e não utilização de compostos clorados. Atualmente, é empregado para determinação de várias substâncias em alimentos, tais como resíduos de antibióticos (LUIZ et al., 2008), de pesticidas (HUSHOVA et al., 2009), de acrilamidas (DUNOVSKA et al., 2006) e de micotoxinas em alimentos (VACLAVIKOVA et al.,

2013; CARRASCO et al., 2012; FRENICH et al., 2011; SOSPEDRA et al., 2010; KOKKONEN et al., 2009). Também pode ser empregado para determinação de multi-compostos em alimentos (ROMERO-GONZALEZ et al., 2011; MOL et al., 2008).

O método se tornou popular devido à segurança, simplicidade, acessibilidade, eficácia, eficiência e confiabilidade nos resultados. Além de ser um método oficial para a detecção de resíduos de pesticidas em frutas e vegetais, possui estrutura razoavelmente flexível, que pode ser adaptada para situações específicas: dependendo da matriz a ser ensaiada bem como dos equipamentos disponíveis no laboratório. Em alguns casos, a limpeza é desnecessária, reduzindo assim o tempo de tratamento de amostra e o custo da análise. Por isso esta técnica pode ser utilizada em métodos de “screening” por ser rápida e confiável para a detecção de micotoxinas em alimentos. Utiliza cerca de 6 vezes menos solvente que um método por partição (TANAKA et al., 2000), aumentando o número de amostras analisadas, reduzindo o tempo de exposição do analista aos solventes e gerando menos resíduos (BEMVENUTI et al., 2012).

A técnica de extração consiste na adição de 10ml de ACN a 10g de amostra. Agita-se por 3 min. e adiciona-se 4g MgSO<sub>4</sub> e 1g de NaCl, agita-se por 3min e centrifuga-se (5min, 11.000rpm, 20<sup>0</sup>C). No processo de limpeza a cada 1mL do sobrenadante adiciona-se 150mg de MgSO<sub>4</sub> e 50mg PSA, agita-se, centrifuga-se. O sobrenadante é filtrado e injetado no sistema cromatográfico (ANASTASSÍADES et al., 2003). Muitas modificações foram introduzidas no método como o uso de tampão acetato (LEHOTAY et al., 2005) ou citrato (LEHOTAY et al., 2010), assim como mudanças nas soluções extadoras (LOPES et al., 2012; SOSPEDRA et al., 2010), a fim de se extrair uma grande variedade de compostos ou da substância de interesse. A Tabela 3 mostra a versatilidade do método.

Tabela 3 - Determinação de resíduos de contaminantes em alimentos aplicando QuEChERS como método de extração.

Alimento	Resíduo Contam	Solução Extrat.	EXTRAÇÃO										PURIFICAÇÃO					Método de Detecção	Referência
			% V/V	Agit min	ACN + 1% HOAc. (mL)	MgSO <sub>4</sub> ou Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (g)	NaCl (g)	NaOAc (g)	Agit. (min)	Centrif. (mm/rpm)	Vol. (mL)	MgSO <sub>4</sub> (mg)	PSA (mg)	Celite ou C18 (mg)	Centrif. (min/rpm)				
Pão 2,0g	Multimicot	ACN: H <sub>2</sub> O	7,5: 10	3		4	1			5/5000								UHPLC-MS/MS	Vaclavikova et al., 2013
Semolina de trigo 5,0g	Multimicot	ACN + H <sub>2</sub> O	7,5 + 25 (mL)	15		4,0	1,0			3/4000			900	300	1/1500			CG-MS/MS	Carrasco et al., 2012
Macarrão 2,0g	Afla	MeOH: ACN: H <sub>2</sub> O	9: 51: 40 (mL)	1		1,5	0,5			5/4000	1							HPLC-FLD	Sirhan et al., 2011
Farinha trigo 5,0g	Tric. A, B	MeOH: ACN	85:15 10mL	1		2,0	1,0			10/4000	1		150	50	10/4000			LC-MS	Sospedra et al., 2010
Arroz 5,0g	Pesticidas	ACN: H <sub>2</sub> O	10:10 mL			4,0	1,0			20/4000	5		750	375	20/4000			CG-MS/MS	Hou et al., 2013
Arroz 10,0g	DON, ZEA	ACN: H <sub>2</sub> O: OHAc	20: 20: 0,2 (mL)	5		1,5			0,85	5	10/1400g	6	300		1			HPLC/UV-FL	Benvenuth et al., 2012
Ovos 1,0g	Antim., Micot.	MeOH: H <sub>2</sub> O: OHAc	80: 20: 1 (4,0 mL)			-			0,5	30	5/4500 x g	1						LC-MS/MS	Capriotti et al., 2012
Ovos 2,0g	Multimicot.	MeOH: H <sub>2</sub> O + 1% OHAc	80:20 10mL	30		4,0			1,0	2	5/3000	1						UHPLC-MS/MS	Frenich et al., 2011

Tabela 3- Continuação.

Alimento	Resíduo Contam	EXTRAÇÃO										PURIFICAÇÃO					Método de Detecção	Referência
		Solução Extrat	% V/V	Agit. (min)	ACN+ 1%OHAc (mL)	MgSO <sub>4</sub> ou Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (g)	NaCl (g)	NaOAc (g)	Agit. (min)	Centrif. (mm.rpm)	Vol. (mL)	MgSO <sub>4</sub> (mg)	PSA (mg)	Calte ou C18 (mg)	Centrif. (mm/ rpm)			
Especiarias (1,0g)	Multi-micot.	H <sub>2</sub> O	5 mL	30	ACN+ 1%Ac. Form 5mL./ 20min.	2,0	0,5		2	74000 x g					3/10000 x g	LC-MSMS	Yogendra-rajah et al., 2013	
Cereais, vegetais 5,0g	Pestic., Multi-micot.	H <sub>2</sub> O	5,0 mL	60	10	4,0		1,5	1	55000	1					UHPLC-MSMS	Romero-González et al., 2011	
Frutas e vegetais 1,0g	Pesticidas				1,0			+ MgSO <sub>4</sub> 4:1 (0,5g)				150	50				Lehotay, 2007	
Frutas e vegetais 10,0g	Pesticidas	ACN	10mL	1		4,0	1,0		1		1	150	25			GCMS	Anastassiades et al., 2003	

Vaclavikova et al(2013), ao determinarem resíduo de micotoxinas no pão fez uma modificação no método original adicionando água ao ACN na proporção 10:7,5 (v/v) e utilizou 2g de amostra. Não foi necessário limpar o extrato obtido e o método de detecção empregado foi o UHPLC-MS/MS. Carrasco et al (2012), empregaram como solução extratora H<sub>2</sub>O:ACN na proporção de 25:7,5 (v/v) e no método de limpeza MgSO<sub>4</sub> e PSA na proporção 3:1 (p/p) para determinar resíduo de micotoxinas em semolina de trigo. A quantificação foi realizada por CG-MS/MS. A modificação realizada por Sospedra et al (2010), para extrair tricotecenos no farinha de trigo foi o uso da solução extratora MeOH:ACN 85:15 (v/v), conseguindo recuperações superiores a 86% das micotoxinas ensaiadas utilizando HPLC/MS.

Devido ao arroz possuir um elevado teor de ácidos graxos vários métodos de limpeza foram propostos bem como o emprego da centrifugação refrigerada. A adição de PSA (de 25 a 150 mg/1 ml de extrato)foi estudada e observou-se que os principais ácidos graxos diminuíram com75 mg e manteve-se estável até atingir 150mg/ ml de extrato. No método de preparo da amostra,H<sub>2</sub>Oe ACN refrigerados facilitaram o inchamento do arroz e neutralizaram o calor gerado pela adição dos sais. Bemvenuti et al (2012), determinaram micotoxinas DON e ZEA em arroz, mas diferentemente de Hou et al (2013),empregaram na solução extratora OHAc 1% e NaOAc, formando um tampão. Também empregaram celite na etapa de limpeza. Os autores testaram a extração por partição, mas o volume de resíduo gerado bem como o tempo de execução da análise foram superiores se comparados ao método QuEChERS. Analisaram 124 resíduos de pesticidas em arroz empregando QuEChERS. Às amostras foram adicionados H<sub>2</sub>O e ACN e mantidas sob refrigeração por 30 min. Após centrifugação, adicionou-se ao extrato MgSO<sub>4</sub> e NaCl, o qual foi centrifugado (20 min/4000 rpm/ - 10°C). Ao sobrenadante adicionou-se PSA e MgSO<sub>4</sub>, agitou-se e centrifugou-se

novamente. Ao extrato adicionou-se ACN com 1% de HOAc (v/v). O extrato foi seco e o resíduo dissolvido com n-hexano e CH<sub>3</sub>COCH<sub>3</sub> 9+1 (v/v) e analisado por GC-MS/MS.

Os métodos de extração mais empregados para determinar micotoxinas em ovos são a extração líquido pressurizado (PLE) como empregada por Jimenez et al(2008), e a extração líquido-líquido (LLE), quer isoladamente como realizada por Dubreil et al (2009), ou seguida por extração em fase sólida (SPE). Pode ser empregada uma etapa de desgorduramento com n-hexano entre LLE e SPE (GALARINIA et al., 2011). Capriotti et al (2012), desenvolveram um método para determinação de antimicrobianos e micotoxinas em ovos. Testaram três solventes orgânicos (CH<sub>3</sub>COCH<sub>3</sub>, ACN e MeOH) na proporção solvente:água 80:20 (v/v) e avaliaram em termos de recuperação dos compostos avaliados. Em todos os experimentos adicionaram 2g de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro. O conteúdo de solvente orgânico de 80% foi utilizado por não eluir lípidos apolares e fosfolípidos a partir de C18. Muitos analitos não puderam ser recuperados ou tiveram baixa recuperação com a mistura contendo CH<sub>3</sub>COCH<sub>3</sub>, provavelmente porque nesta proporção ocorre uma desnaturação muito rápida de proteínas do ovo, com a possível formação de agregados que podem adsorver os compostos de interesse, reduzindo a extração e reprodutibilidade dos resultados. O uso de ACN:H<sub>2</sub>O foi capaz de extrair todos os analitos, embora com uma baixa recuperação, especialmente para os compostos polares, (que provavelmente ficaram retidos na fase aquosa) e do elevado efeito de matriz. Ao se empregar ACN e CH<sub>3</sub>COCH<sub>3</sub> foi necessário realizar a evaporação e posterior reconstituição do resíduo com a fase móvel antes da detecção. A evaporação do solvente orgânico pode provocar a precipitação de componentes da matriz (lipídios e proteínas) com possível perda parcial de analito. A mistura MeOH:H<sub>2</sub>O mostrou ser a melhor escolha e a etapa de evaporação não foi necessária. Frenich et al (2011), também

obtiveram os melhores resultados quando a mistura de MeOH:H<sub>2</sub>O 80:20 (v/v) foi empregada, mas com adição de 1% ácido acético. A etapa de limpeza do extrato não foi necessária uma vez que se obteve extratos límpidos nos dois casos.

QuEChERS também foi empregado para determinar multi-micotoxinas em especiarias. Adicionou-se H<sub>2</sub>O às amostras na proporção 5:1, deixando-se sob agitação por 30min. Após, adição de ACN com ácido fórmico 1% e os sais MgSO<sub>4</sub> e NaCl (2,0:0,5) (p/p). Não foi necessário limpar o extrato (YOGENDRARAJAH et al., 2013).

Romero-González et al(2011), analisaram resíduos de pesticidas, micotoxinas, toxinas e medicamentos veterinários em diferentes tipos das matrizes (cereais, vegetais e bebidas) aplicando QuEChERS com algumas modificações. Observaram que os processos de agitação e centrifugação das amostras após a adição da água, da solução extratora e dos sais, permitiram a extração de mais de 80% dos compostos ensaiados, com recuperações adequadas (70-120%). Ao se aplicar apenas a solução extratora e posterior agitação com ultrassom, apenas 40% dos compostos foram extraídos quantitativamente e a técnica não foi adequada para a maioria dos pesticidas ensaiados. Uma situação intermédia foi obtida quando o procedimento descrito por Mol et al (2008), foi aplicado. As amostras ficaram em contato com a H<sub>2</sub>O por 1 hora antes de se adicionar a solução extratora. Observou-se que aproximadamente 55% dos compostos foram extraídos com recuperações de 70 a 120%. As micotoxinas ocratoxina A, T-2 e toxina HT-2 não foram extraídas a partir de pepino, embora boas recuperações quantitativas foram obtidas do trigo e do vinho tinto. Pode ser que a recuperação destas micotoxinas sejam dependentes do tipo de matriz e do solvente extrator empregado. Mas de modo geral, o procedimento de extração proposto permitiu a extração de uma série de compostos a partir de diversas matrizes.

Técnicas tradicionais para a extração de Aflatoxinas em alimentos envolve o uso de um ou mais solventes orgânicos, seguido de limpeza e da extração em fase sólida (SPE) ou o uso de colunas de imunoafinidade. Embora os procedimentos sejam relativamente simples e baratos não é uma técnica comumente empregada na determinação de Aflatoxinas em amostras de alimentos (SIRHAN et al., 2011). Sirhan et al (2011), empregaram QuEChERS e HPLC-FLD para determinar aflatoxinas em macarrão. Diversas soluções extratoras foram testadas como MeOH:ACN 15:85 e 85:15 (v/v); MeOH:ACN:H<sub>2</sub>O 9:51:40 (v/v). A extração de Stubbings & Bigwood (2009), que emprega HOAc em ACN 1% (v/v) e as soluções MeOH:H<sub>2</sub>O nas proporções 60:40 e 80:20 (v/v) e MeOH 100% também foram testadas. As recuperações mais adequadas de 88 a 109%, foram obtidas com MeOH:ACN:H<sub>2</sub>O 9:51:40 (v/v). Como o método foi projetado para amostras com mais de 75% de umidade, foi necessário que 40% de solvente de extração fosse H<sub>2</sub>O, de modo a umidificar a amostra e facilitar o acesso do solvente de extração. Além disso, 2,0 g de amostra foram utilizados em vez de 10,0g no processo original (DIEZ et al., 2006). A etapa de limpeza não foi necessária uma vez que extratos límpidos foram obtidos na etapa de extração, reduzindo o tempo e o custo da análise.

#### **4) ANÁLISE QUALITATIVA E QUANTITATIVA**

Quanto aos métodos tradicionais ou métodos de referência para determinação de micotoxinas, o uso do HPLC (High Performance/Pressure Liquid Chromatography) ou cromatografia gasosa (CG) em combinação com vários detectores, como detecção por fluorescência (FLD), com derivatização pré ou pós-coluna, detecção por UV, por ionização de chama (FID), por captura de elétrons (ECD) e espectrometria de massas

(MS) são muito empregados (KRSKA & MOLINELLI, 2006; GILBERT & ANKLAM, 2002).

Como diferentes micotoxinas podem ser encontradas em uma mesma matriz, diversos métodos analíticos têm sido desenvolvidos para a determinação simultânea de várias micotoxinas (FERNÁNDEZ-CRUZ et al., 2010; TURNER et al., 2009; SALEM & AHMAD, 2010; GILBERT & ANKLAM, 2002). Atualmente há um crescente número de publicações sobre os métodos de cromatografia gasosa e/ou cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS) para o controle oficial de toxinas de *Fusarium* em cereais e produtos derivados (KRSKA & MOLINELLI, 2007; SFORZA et al., 2006; DEMYTTENAERE et al., 2004), embora o custo relativo desta instrumentação e os conhecimentos técnicos necessários para utilizar esta metodologia sejam maiores aos da metodologia convencional. As vantagens que estes métodos têm sobre os convencionais são de medir uma variedade de micotoxinas simultaneamente, exibindo grande diversidade química e empregando pouca ou nenhuma limpeza para produzir resultados precisos. Contudo nem todas estas metodologias estão aprovadas e validadas.

Existem também os testes rápidos empregando ensaios comerciais como o de imuno-absorção enzimática (ELISA), (SALEM & AHMAD, 2010; PAPADOPOULOU-BOURAOUI et al., 2004; RUPRICH & OSTRY, 1995). Embora existam muitas vantagens, como a facilidade de operação e de alto rendimento associados à sua utilização, apresenta como desvantagens o anticorpo, que é matriz dependente e pode apresentar reatividade cruzada com a matriz (KRSKA & MOLINELLI, 2007).

Para a adoção de um método oficial, qualquer método proposto deve ser validado não só em um estudo de ensaio colaborativo, como também nas matrizes afins

e em níveis próximos dos limites regulamentares (GILBERT & ANKLAM, 2002). Alguns métodos analíticos oficiais disponíveis para a análise de micotoxinas em alimentos e rações estão listados nos Métodos Oficiais de Análise da AOAC (AOAC, 2000). Estes métodos são amplamente empregadas em pesquisa, na aplicação legal da legislação para garantir a segurança alimentar e na regulamentação de produtos agrícolas para atingir o comércio internacional.

## **5) CONCLUSÃO**

O objetivo desta revisão foi discutir alguns métodos de extração e limpeza para análise de micotoxinas em alimentos. Ênfase foi dada ao método de extração QuEChERS, por ser um método prático, eficiente e adaptável a qualquer matriz. Há uma busca contínua em direção a métodos rápidos e confiáveis para análise de micotoxinas em alimentos. Muitas técnicas tentam evitar a etapa de limpeza, medindo os analitos diretamente após a extração. Métodos mais simples muitas vezes são excessivamente caros ou carecem em sensibilidade. Em suma, os métodos mencionados têm suas vantagens e desvantagens, ea seleção do método adequado deve ser feita de acordo com o objetivo de análise, as propriedades das amostras e as condições laboratoriais. Embora existam muitos relatos sobre a análise quali e quantitativa de micotoxinas, métodos rápidos, sensíveis e validados ainda são requeridos.

## 6) REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AL-HAZMI, N. A. Fungal flora and deoxynivalenol (DON) level in wheat from Jeddah market, Saudi Arabia. **African Journal of Biotechnology**, v. 10 (2), p. 168-173, Jan. 2011.
2. ANASTASSIADES, M.; LEHOTAY, S.J.; STAJNBAHER, D.; SCHENCK, F.J. Fast and easy multiresidue method employing ACN extraction/ partitioning and —dispersive solid-phase extraction” for the determination of pesticide residues in produce. **Journal of AOAC International**, v. 86, n. 2, p. 412-431, 2003.
3. ANFOSSI, L.; CALDERARA, M.; BAGGIANI, C.; GIOVANNOLI, C.; ARLETTI, E.; GIRAUDI, G. Development and application of solvent-free extraction for the detection of aflatoxin M1 in dairy products by enzyme immunoassay. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 1852-1857, 2008.
4. ANTONIOS, D.; GUITTON, V.; DARROZES, S.; PALLARDY, M.; AZOURI, H. Monitoring the levels of deoxynivalenol (DON) in cereals in Lebanon and validation of an HPLC/UV detection for the determination of DON in crushed wheat (bulgur). **Food Additives and Contaminants: Part B**, v. 3, n. 1, p. 45–51, 2010.
5. AOAC W. Horwitz (Editor), The Official Methods of Analysis of AOAC International (OMA), 17th Edition, **AOAC International**, Gaithersburg, USA, 2000.
6. ARESTA, A.; PALMISANO, F.; VATINNO, R.; ZAMBONIN, C. G. Ochratoxin A Determination in Beer by Solid-Phase Microextraction Coupled to Liquid Chromatography with Fluorescence Detection: A Fast and Sensitive

- Method for Assessment of Noncompliance to Legal Limits. **J. Agric. Food Chem.**, v. 54, p. 1594–1598, 2006.
7. ATANDA, S. A.; AINA, J. A. ; AGODA, S. A.; USANGA, O. E.; PESSU P. O. Mycotoxin Management in Agriculture: a Review. **J. Anim. Sci. Adv.**, n. 2 (Suppl. 3.1), p. 250-260, 2012.
  8. BACALONI, A.; CAVALIERE, C.; CUCCI, F.; FOGLIA, P.; SAMPERI, R.; LAGANA, A. Determination of aflatoxins in hazelnuts by various sample preparation methods and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, n. 1179, p. 182–189, 2008.
  9. BEMVENUTI, R. H.; HACKBART, H.C.S.; SOUZA, M.M.; FURLONG, E.B.; DORS, G.C.; FAGUNDES, C.A. Determinação de deoxinivalenol e zearalenona em arroz natural e parboilizado e suas frações utilizando QuEChERS e HPLC/UV-FL. **Quím. Nova**, São Paulo, v.35 n.6, 2012.
  10. BENSASSI, F.; RJIBA, I.; ZARROUK, A.; HAJLAOUI, M.R.; BACHA, H. Deoxynivalenol Contamination in Tunisian Barley in the 2009 Harvest. **Food additives and Contaminants: Part B**, v.4, n.3, Sept., p. 205-211, 2011.
  11. BENSASSI, F.; ZAIED, C.; ABID, S.; HAJLAOUI, M. R.; BACHA, H. Occurrence of deoxynivalenol in durum wheat in Tunisia. **Food Control**, n. 21 p.281-285, 2010.
  12. BERSTROM, C.G. Scab (head blight). In: MATHUR, S.B.; CUNFER, B.M.(Ed) Seed borne diseases and seed health testing of wheat. Comenhagen: Hellewp, Ch. 4, p.83-93, 1993.
  13. BETINA, V. Chromatography of mycotoxins, techniques and applications. **Elsevier**, n. 36–7, p. 210–213, 1993.

14. BLANDINO, M., HAIDUKOWSKI, M., PASCALE, M., PLIZZARI, L., SCUDELLARI, D.; REYNERI, A. Integrated strategies for the control of Fusarium head blight and deoxynivalenol contamination in winter wheat. **Field Crops Research**, n. 133, p.139-149, 2012.
15. BÖHM, C.; CICHNA-MARKL, M.; BRENN-STRUCKHOFOVA, Z.; RAZZAZI-FAZELI, E. Development of a selective sample clean-up method based on immuno-ultrafiltration for the determination of deoxynivalenol in maize. **Journal of Chromatography**, v. 08, n. 1202(2), p.111-117, 2008
16. BRASIL. **RESOLUÇÃO - RDC No 7 de 18 de Fevereiro de 2011**. Limites máximos tolerados para micotoxinas em alimentos. Brasília, 2011.
17. BRASIL. **RESOLUÇÃO - RDC Nº 59 de 26 de dezembro de 2013**. Prorrogação dos prazos estabelecidos nos artigos 11 e 12 e respectivos anexos III e IV da Resolução da Diretoria Colegiada RDC n. 7, de 18 de fevereiro de 2011 que dispõe limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos. Brasília, 2013.
18. BRERA, C.; PEDUTO, A.; DEBEGNACH, F.; PANNUNZI, E.; PRANTERA, E.; GREGORI, E.; DE GIACOMO, M.; DE SANTIS, B. Study of the influence of the milling process on the distribution of deoxynivalenol content from the caryopsis to cooked pasta. **Food Control**, v. 32, n. 1, p. 309-312, 2012.
19. CAMPONE, L.; PICCINELLI, A.L.; CELANO, R.; RASTRELLI, L. Application of dispersive liquid-liquid microextraction for the determination of aflatoxins B1, B2, G1 and G2 in cereal products. **Journal of Chromatography A**, n.1218, p. 7648– 7654, 2011.
20. CANO-SANCHO, G.; VALLE-ALGARRA, F.M.; JIMÉNEZ, M.; BURDASPAL, P.; LEGARDA, T.M.; RAMOS, A.J.; SANCHIS, V.; S. MARÍN.

- Presence of trichothecenes and co-occurrence in cereal-based food from Catalonia (Spain). **Food Control**, v. 22, n. 3–4, p. 490–495, Mar-Apr., 2011.
21. CAPRIOTTI, A. L.; CARUSO, G.; CAVALIERE, C.; FOGLIA, P.; SAMPERI, R.; LAGANA, A. Multiclass mycotoxin analysis in food, environmental and biological matrices with chromatography/mass spectrometry. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 31, n. 4, p. 466-503, 2012.
22. CAPRIOTTI, A. L.; CAVALIERE, C.; PIOVESANA, S.; SAMPERI, R.; LAGANÀ, A. Multiclass screening method based on solvent extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry for the determination of antimicrobials and mycotoxins in egg. **Journal of Chromatography A**, n. 1268, p. 84–90, 2012.
23. CARRASCO, Y.R.; BERRADA, H.; FONT, G.; MAÑES, J. Multi-mycotoxin analysis in wheat semolina using an acetonitrile-based extraction procedure and gas chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, n. 1270, p. 28-40, 2012.
24. CAST. Mycotoxins: Risks in Plant, Animal and Human Systems. Task Force Report N. 139. **Council for Agricultural Science and Technology**, Ames, Iowa, USA, 2003.
25. CAVALIERE, C.; FOGLIA, P.; GUARINO, C.; NAZZARI, M.; SAMPERI, R.; LAGANA, A. Determination of aflatoxins in olive oil by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, n. 596, p. 141–148, 2007.
26. CODEX - General standard for contaminants and toxins in food and feed. **CODEX STAN**, n. 193, p.1 – 44, 1995.
27. CODEX, 2013. Proposed draft maximum levels for deoxynivalenol in cereals and cereal based products and associated sampling plans, seventh session.

**Committee on Contaminants in Foods**, Joint FAO/WHO food Standards Programme.

28. **COMMISSION DECISION** 2002/657/EC implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results.
29. **COMMISSION REGULATION** (EC) No 1881/2006, of 10 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. Official Journal of the European Union L364: 5-24.
30. **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.
31. CUCULLU, A.; LEE, L.; MAYNE, R.; GOLDBLATT, L. Determination of aflatoxins in individual peanuts and peanut sections. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, v. 43, n. 2, p. 89–92, 1996.
32. CUI, L.; SELVARAJ, J. N.; XING, F.; ZHAO, Y.; ZHOU, L.; LIU, Y. A minor survey of deoxynivalenol in *Fusarium* infected wheat from Yangtze–Huaihe river basin region in China. **Food Control** v.30, n. 2, p. 469–473, Apr. 2013.
33. CUNHA, S.C.; FERNANDES, J.O. Development and validation of a method based on a QuEChERS procedure and heart cutting GC-MS for determination of five mycotoxins in cereal products. **J Sep Sci**. n. 33 p. 600–609, 2010.
34. DANTIGNY, P.; GUILMART, A.; BENSOUSSAN, M., 2005. Basis of predictive mycology. **Int. J. Food Microbiol.** 100, 187–196.
35. DAS, M. **Food contamination and adulteration**: In e-book. New Delhi: Environmental Biochemistry, National Institute of Science Digital Library, National Institute of Science Communication and Information Resource, 2008..6, p. 587-606, 2004.

36. DEL PONTE, E.M.; FERNANDEZ, J.M.C.; PIEROBOM, C.R., BERGSTROM, G.C. Giberela do trigo – aspectos epidemiológicos e modelos de previsão. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v.29, p.587-605, 2004.
37. DELIZA, R.; ROSENTHAL, A.; SILVA, A. L. S. Consumer attitude towards information on non-conventional technology. **Trends in Food Science & Technology**, n.14, p. 43–49, 2003.
38. DEMYTTENAERE, J.C.R.; MORIÑA, R. M.; KIMPE, N.; SANDRA. P. Use of headspace solid-phase microextraction and headspace sorptive extraction for the detection of the volatile metabolites produced by toxigenic *Fusarium* species. **Journal of Chromatography A**, n. 1027 p. 147–154, 2004.
39. DESMARCHELIER, A.; OBERSON, JM.; TELLA, P.; GREMAUD, E.; SEEFELDER, W.; MOTTIER, P. Development and comparison of two multiresidue methods for the analysis of 17 mycotoxins in cereals by liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry. **J Agric Food Chem**. v. 14; n. 58(13), p. 7510-7519, Jul. 2010.
40. DÍEZ, C.; TRAAG, W. A.; ZOMMERB, P.; MARINERO, P.; ATIENZA, J. Comparison of an acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid-phase extraction” method with classical multi-residue methods for the extraction of herbicide residues in barley samples. **Journal of Chromatography A**, n. 1131, p. 11-23, 2006.
41. DILKIN,P.; MALLMANN C. A., ALMEIDA, C. A.A.; CORREA, B. Robotic automated clean-up for detection of fumonisins B1 and B2 in corn and corn-based feed by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, n. 925, p. 151–157, 2001.

42. DOMBRINK-KURTZMAN, M.A.; POLING, S.M.; KENDRA, D.F. Determination of deoxynivalenol in infant cereal by immunoaffinity column cleanup and high-pressure liquid chromatography-UV detection. **J Food Prot.**, v.73, n.6, p.1073-1076, Jun. 2010.
43. DUBREIL-CHÉNEAU, E; BESSIRAL, M; ROUDAUT, B; VERDON, E; SANDERS, P. Validation of a multi-residue liquid chromatography-tandem mass spectrometry confirmatory method for 10 anticoccidials in eggs according to Commission Decision 2002/657/EC. **J Chromatogr A**. Nov 13;1216 (46) :8149-57, 2009.
44. DUNOVSKA, L.; CAJKA, T.; HAJŠLOVA, J.; HOLADOVA, K. Direct determination of acrylamide in food by gas chromatography–high-resolution time-of-flight mass spectrometry **Anal. Chim. Acta**, n. 578, p. 234-240, 2006.
45. ENNOUARI, A.; SANCHIS, V.; MARÍN, S.; RAHOUTI, M.; ZINEDINE, A. Occurrence of deoxynivalenol in durum wheat from Morocco. **Food Control**, n. 32, p. 115-118, 2013.
46. FERNÁNDEZ-CRUZ, M.L.; MANSILLA, M.L.; TADEO, J.L. Mycotoxins in fruits and their processed products: Analysis, occurrence and health implications. **Journal of Advanced Research.**, n.1, p. 113–122, 2010.
47. FRENICH, A.G.; GONZÁLEZ, R.R.; PÉREZ, M.L.G.; VIDAL, J.L.M. Multi-mycotoxin analysis in eggs using a QuEChERS-based extraction procedure and ultra-high-pressure liquid chromatography coupled to triple quadrupole mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, n. 1218, p. 4349–4356, 2011.
48. FREWER, L. J.; LASSEN, B.; KETTLITZ, J.; SCHOLDERER, V.; BEEKMAN & BERDAL, K. G. Societal aspects of genetically modified foods. **Food and Chemical Toxicology**, v. 42, n.7, p. 1181–1193, 2004.

49. GALARINIA, R.; FIORONI, L.; MORETTI, S.; PETTINACCI, L.; DUSI, G.  
Development and validation of a multi-residue liquid chromatography–tandem mass spectrometry confirmatory method for eleven coccidiostats in eggs. **Analytica Chimica Acta**, n. 700, p. 167–176, 2011.
50. GARCIA, D.; RAMOS, A.J.; SANCHIS, V.; MARIN, S. Predicting mycotoxins in foods: A review. **Food Microbiology** n. 26, p. 757–769, 2009.
51. GILBERT, J.; ANKLAM, E. Validation of analytical methods for determining mycotoxins in foodstuffs. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 21, n. 6, 2002.
52. GOBEL, R.; LUSKY, K. Simultaneous determination of aflatoxins, ochratoxin A, and zearalenone in grains by new immunoaffinity column/liquid chromatography. **J. AOAC Int.**, v. 87, n. 2, p.411–416, 2004.
53. GONZÁLEZ-OSNAYA, L.; CORTÉS, C.; SORIANO, J.M.; MOLTÓ, J.C.; MAÑES J. Occurrence of deoxynivalenol and T-2 toxin in bread and pasta commercialized in Spain. **Food Chemistry**, v.124, p.156–161, 2011.
54. GONZÁLEZ-OSNAYA, L.; SORIANO, J.M.; MOLTÓ, J.C.; MAÑES, J. Extraction and analysis of ochratoxin A in bread using pressurised liquid extraction and liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1113, n. 1–2, p. 32–36, 2006.
55. GONZÁLEZ-OSNAYA, L.; SORIANO, J.M.; MOLTÓ, J.C.; MANES, J. Simple liquid chromatography assay for analyzing ochratoxin a in bovine milk. **Food Chem.**, v. 108, p. 272–276, 2008.
56. GOTTSCHALK, C.; BARTHEL, J.; ENGELHARDT, G.; BAUER, J.; MEYER K. Simultaneous determination of type A, B and D trichothecenes and their occurrence in cereals and cereal products. **Food Additives and Contaminants** v. 26, n. 9, p. 1273–1289, Sept. 2009.

57. GROVE, J. F. Non-macrocylic trichothecenes. **Natural Products Reports**, n. 5, p. 187–209, 1988.
58. HINOJO, M.J.; MEDINA, A.; VALLE-ALGARRA, F.; GIMENO-ADELANTADO, J.; JIMENEZ, M.; MATEO, R. Fumonisin production in rice cultures of *Fusarium verticillioides* under different incubation conditions using an optimized analytical method. **Food Microbiol**, v. 23, n. 2, p. 119–127, 2006.
59. HOSSEINI, S.S.; BAGHERI, R. Some major Mycotoxin and their Mycotoxicoses in nuts and dried fruits **Intl. J. Agron. Plant. Prod.**, v. 3, n. 5, p. 179-184, 2012.
60. HOU, X.; HAN, M.; DAI, X. H.; YANG, X. F.; Yi, S. multi-residue method for the determination of 124 pesticides in rice by modified QuEChERS extraction and gas chromatography–tandem mass spectrometry. **Food Chemistry**, n. 138, p. 1198–1205, 2013.
61. HUANG, X. H., ZHANG, X. H., LI, Y. H., WANG, J. L., YAN, X., XING, L. X. Carcinogenic effects of sterigmatocystin and deoxynivalenol in NIH mice. **Chinese Journal of Oncology**, v. 26, n. 12, p. 705-708, 2004.
62. HUIS in't VELD, J.H.J. Microbial and biochemical spoilage of foods: an overview. **Int. J. Food Microbiol.**, n.33, p. 1–18, 1996.
63. HUSKOVA, R.; MATISOVA, E.; HROUZKOVA, S.; SVORC, L. Analysis of pesticide residues by fast gas chromatography in combination with negative chemical ionization mass spectrometry **Journal of ChromatographyA**, n. 1216, p. 6326-6334, 2009.
64. IARC (International Agency for Research on Cancer). Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans; some naturally occurring substances, food items and constituents. In **Heterocyclic aromatic amines and mycotoxins**,

- Vol. 56. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer, World Health Organization, 1993.
65. JAN C.R. DEMYTTENAERE,; ROSA M. MORIÑA,; NORBERT DE KIMPEA,; PAT SANDRA Use of headspace solid-phase microextraction and headspace sorptive extraction for the detection of the volatile metabolites produced by toxigenic *Fusarium* species. **Journal of Chromatography A**, n. 1027, p. 147–154, 2004.
66. JIMÉNEZ, V.; RUBIES, A.; CENTRICH, F.; COMPANYÓ, R.; GUITERAS, J. Development and validation of a multiclass method for the analysis of antibiotic residues in eggs by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, n.1218, p. 1443–1451, 2011.
67. JOHANSSON, A.S.; WHITAKER, T.B.; HAGLER, W.M.; GIESBRECHT, F.G.; YOUNG, J.H.; BOWMAN, D.T. Testing shelled corn for aflatoxin, part I: estimation of variance components. **J AOAC Int.**,v. 83, n. 5, p.1264–1269, 2000.
68. JUAN, C.; PENA, A.; LINO, C.; MOLTÓ, J.C.; MAÑES. J. Levels of ochratoxin A in wheat and maize bread from the central zone of Portugal. **International Journal of Food Microbiology**, v.127, n. 3, p.284–289, Oct. 2008.
69. KARAMI-OSBOO, R.; MAHAM, M.; MIRI, R.; ALIABADI, M.H.S.; MIRABOLFATHY, M.; JAVIDNIA, K. Evaluation of Dispersive Liquid–Liquid Microextraction–HPLC–UV for Determination of Deoxynivalenol (DON) in Wheat Flour. **Food Analytical Methods** v. 6, n. 1, p. 176 – 180, Febr. 2013.
70. KLINGLMAYR, C.; NÖBAUER, K.; RAZZAZI-FAZELI, E.; CICHNA-MARKL, M. Determination of deoxynivalenol in organic and conventional food and feed by sol-gel immunoaffinity chromatography and HPLC-UV detection. **Journal of Chromatography B**: v. 878, n. 2, p. 187 – 193, 2010.

71. KLÖTZEL, M.; LAUBER, U.; KORTE, E. New Rapid and Cost-Effective SPE Procedure for the Clean-up of Fusarium Toxin Contaminated Cereals and Cereal-Based Foods. In Mykotoxin-Workshop. Bydgoszcz, 29-31. May 2006.
72. KOKKONEN, M.K.; JESTOI, M.N. A multi-compound LC-MS/MS method for the screening of mycotoxins in grains. **Food Analytical Methods**, v.2, n. 2, p.128-140, Jun. 2009.
73. KRŠKA, R.; MOLINELLI, A. Mycotoxin analysis: state-of-the-art and future trends. **Anal Bioanal Chem.**,n. 387, p.145–148, 2007.
74. KRŠKA, R.; WELZIG, E.; BOUDRA, H. Analysis of *Fusarium* toxins in feed. **Animal Feed Science and Technology**, n. 137, p. 241–264, 2007.
75. LARSEN, J. C.; HUNT, J.; PERRIN, I.; RUCKENBAUER, P. (2004). Workshop on trichothecenes with a focus on DON: summary report. **Toxicology Letters**, v. 153, n. 1, p. 1-22, 2004.
76. LATTANZIO, V. M. T.; PASCALE, M.; VISCONTI, A. Current analytical methods for trichothecene mycotoxins in cereals, **Trends in Analytical Chemistry**, v.28, n.6, p.758–768, 2009.
77. LAUREN, D. R.; SMITH, W. A. Stability of the Fusarium mycotoxins nivalenol, deoxynivalenol and zearalenone in ground maize under typical cooking environments. **Food Additive Contamination**, v. 18, n. 11, p. 1011-1016, 2001.
78. LEHOTAY, S.J. Determination of Pesticide in Foods by Acetonitrile Extraction and Partitioning with Magnesium Sulfate: Collaborative Study. **J. AOAC Int.**, v. 90, n. 2, p.485-520, 2001.
79. LEHOTAY, S.J.; MAŠTOVSKÁ, K.; YUN, S. J. Evaluation of Two Fast and Easy Methods for Pesticide Residue Analysis in Fatty Food Matrixes. **J. AOAC Int.** v. 88, p. 60A, 2005.

80. LEHOTAY, S.J.; SON, K.A.; KWON, H.; KOESUKWIWAT, U.; FU, W.; MASTOVSKA, K.; HOH, E.; LEEPIPATPIBOON, N. Comparison of QuEChERS sample preparation methods for the analysis of pesticide residues in fruits and vegetables. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, n.16, p. 2548–2560, Apr. 2010.
81. LIGOR, M.; WÓJCIK, J.; BUSZEWSKI, B. Application of the solid phase microextraction (spme) and gas chromatography (GC, GC/MS) in food analysis. **Pol. J. Food Nutr. Sci.**, v. 13/54, n. 4, p. 355–362, 2004.
82. LOPES, R.P.; REYES, R.C.; ROMERO-GONZÁLEZ, R.; VIDAL, J.L.M.; FRENICH, A.G. Multiresidue determination of veterinary drugs in aquaculture fish samples by ultra high performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, n. 895, p. 39–47, 2012.
83. LUIZ, M.M.A.; VIDAL, J.L.M.; GONZÁLEZ, R.R.; FRENICH, A.G. Multi-residue determination of veterinary drugs in milk by ultra-high-pressure liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, n. 1205, p. 10-16, 2008.
84. LUTTFULLAH, G.; HUSSAIN, A. Studies on contamination level of aflatoxins in some dried fruits and Nuts of Pakistan. **Food Control**, n. 22, p. 426-429, 2011.
85. MENEELY, J.P.; RICCI, F.; VAN EGMOND, H.P.; ELLIOTT, C.T. Current methods of analysis for the determination of trichothecene mycotoxins in food. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 30, n. 2, 2011.
86. MILLER, D.J. Factors that affect the occurrence of fumonisin. **Environ Health Persp.**, n. 109, p. 321–324, 2001.

87. MISHRA, S.; ANSARI, K. M.; DWIVEDI, P. D.; PANDEY, H. P., DAS, M.  
Occurrence of deoxynivalenol in cereals and exposure risk assessment in Indian population. **Food Control**, n. 30, p. 549-555, 2013.
88. MOAZAMI, E.F.; JINAP, S. Natural occurrence of deoxynivalenol (DON) in wheat based noodles consumed in Malaysia. **Microchemical Journal**, v. 93, n. 1, p. 25–28, Sep. 2009.
89. MOL, H.G.J.A.; PLAZA-BOLAÑOS, P.B.; ZOMER, P.A.; DE RIJK, T.C.A.; STOLKER, A.A.M.A.; MULDER, P.P.J.A. Toward a generic extraction method for simultaneous determination of pesticides, mycotoxins, plant toxins, and veterinary drugs in feed and food matrixes. **Analytical Chemistry**, v. 80, n. 24, p. 9450-9459, Dec. 2008.
90. NEUMANN, G., LOMBAERT, G.A.; KOTELLO, S.; FEDOROWICH, N.  
Determination of deoxynivalenol in soft wheat by immunoaffinity column cleanup and LC-UV detection: interlaboratory study. **J. AOAC Int.**, n. 92, p. 181–189, 2009.
91. NÚÑEZ, O.; GALLART-AYALA, H.; MARTINS, C.P.B.; LUCCI, P. New trends in fast liquid chromatography for food and environmental analysis. **Journal of Chromatography A**, n. 1228, p. 298– 323, 2012.
92. ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (2000). The World Health Report 2000—Health systems improving performance. Genebra, Organização Mundial da Saúde.
93. PAPADOPOULOU-BOURAOUI, A.; VRABCHEVA, T.; VALZACCHI, S.; STROKA, J.; ANKLAM, E. Screening survey of deoxynivalenol in beer from the European market by an enzyme-linked immunosorbent assay. **Food Addit. Contam.**, n.21, p. 607, 2004.

94. PESTKA, J. J.; SMOLINSKI, A. T. Deoxynivalenol: toxicity and potential effects on humans. **Journal of Toxicology and Environmental Health: Part B, Critical Reviews**, n. 8, p. 39-69, 2005.
95. PITT, J.I., What are mycotoxins? **Aus. Mycotoxin Newslett.** 1996.
96. 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. **J. Agric. Food Chem.**, v. 50, n. 2, p. 243–247, 2002.
97. PRESTES, O.D.; ADAIME, M.B.; ZANELLA, R. QuEACHERS: possibilidades e tendências no preparo de amostras para determinação multirresíduo de pesticidas em alimentos. **Scientia Chromatographica**, v. 3, n. 1, p. 51-64, 2011.
98. PRESTES, O.D.; FRIGGI, C.A.; ADAIME, M.B.; ZANELLA, R. QuEACHERS – Um Método Moderno de Preparo de Amostra para Determinação Multirresíduo de Pesticidas em Alimentos por Métodos Cromatográficos Acoplados à Espectrometria de Massas. **Quim. Nova**, v. 32, n. 6, p. 1620-1634, 2009.
99. PUSSEMIER, L.; PIE´RARD, J.-Y.; ANSELME, M.; TANGNI, E.K.; MOTTE, J.-C.; LARONDELLE, Y. Development and application of analytical methods for the determination of mycotoxins in organic and conventional wheat. **Food Additives and Contaminants**, v. 23, n. 11, p. 1208–1218, Nov. 2006.
100. RAHMANI, A.; JINAP, S.; SOLEIMANY, F. Qualitative and Quantitative Analysis of Mycotoxins. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, n. 8, p. 201-251, 2009.
101. RAN, R.; WANG, C.; HAN, Z.; WU, A.; ZHANG, D.; SHI, J. Determination of deoxynivalenol (DON) and its derivatives: Current status of analytical methods. **Food Control**, n. 34, p. 138-148, 2013.

- 102.REN, Y.; ZHANG, Y.; SHAO, S.; CAI, Z.; FENG, L.; PAN, H.; WANG, Z. Simultaneous determination of multi-component mycotoxin contaminants in foods and feeds by ultra-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. **J Chromatogr A**,v. 1143, n. 1–2, p. 48–64, 2007.
- 103.RICHARD, J.L. Some major mycotoxins and their mycotoxicoses - An overview. **International Journal of Food Microbiology**, n. 119, p. 3– 10, 2007.
- 104.RIDGWAY, K. Sample Preparation for food Contaminant Analysis. **LCGC EUROPE**, v. 25, n. 2, p.60, Feb. 2012.
- 105.RISTICEVIC, S.; NIRI, V. H.; VUCKOVIC, D.; PAWLISZYN, J. Recent developments in solid-phase microextraction. **Anal Bioanal Chem.**, n. 393, p. 781–795, 2009.
- 106.RODRIGUEZ-MOZAZ, S.; LOPEZ DE ALDA, M.J.; BARCELO, D. Advantages and limitations of on-line solid-phase extraction coupled to liquid chromatography-mass spectrometry technologies versus biosensors for monitoring of emerging contaminants in water. **J Chromatogr. A**, n. 1152, p. 97–115, 2007.
- 107.ROMERO-GONZÁLEZ, R.; FRENICH, A. G.; VIDAL, J.L.M.; PRESTES, O.D.; GRIO, S.L. Simultaneous determination of pesticides, biopesticides and mycotoxins in organic products applying a quick, easy, cheap, effective, rugged and safe extraction procedure and ultra-high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of ChromatographyA**, n. 1218, p. 1477–1485, 2011.
- 108.ROYER, D.; HUMPF, H.U.; GUY, P.A. Quantitative analysis of Fusarium mycotoxins in maize using accelerated solvent extraction before liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization tandem mass

- spectrometry. **Food Additives and Contaminants**, v. 21, n. 7, p. 678–692, Jul. 2004.
109. RUBERT, J.; DZUMAN, Z.; VACLAVIKOVA, M.; ZACHARIASOVA, M.; SOLER, C.; HAJŠLOVA, J. Analysis of mycotoxins in barley using ultra high liquid chromatography high resolution mass spectrometry: Comparison of efficiency and efficacy of different extraction procedures. **Talanta**, n. 99, p. 712–719, 2012.
110. RUBERT, J.; SOLER, C.; MANES, J. Evaluation of matrix solid-phase dispersion (MSPD) extraction for multi-mycotoxin determination in different flours using LC–MS/MS. **Talanta**, n. 85, p. 206–215, 2011.
111. RUPRICH, J.; OSTRY, V. Determination of the mycotoxin deoxynivalenol in beer by commercial ELISA tests and estimation of the exposure dose from beer for the population in the Czech Republic. **Central Eur J Public Health**, n. 4, p. 224–229, 1995.
112. RYU, J.C.; YANG, J.S.; SONG, Y.S.; KWON, O.S.; PARK, J.; CHANG, I.M. Survey of natural occurrence of trichothecene mycotoxins and zearalenone in Korean cereals harvested in 1992 using gas chromatography/mass spectrometry. **Food Addit. Contam.**, n. 13, p. 333–341, 1996.
113. SALEM, N.M.; AHMAD, R. Mycotoxins in food from Jordan: Preliminary survey. **Food Control**, n. 21, p. 1099–1103, 2010.
114. SANTOS, J. S.; SOUZA, T. M.; ONO, E. Y. S.; HASHIMOTO, E. H.; BASSOI, M. C.; MIRANDA, M. Z.; ITANO, E. N.; KAWAMURA, O.; HIROOKA, E. Y. Natural occurrence of deoxynivalenol in wheat from Paraná State, Brazil and estimated daily intake by wheat products. **Food Chemistry**, v. 138, n. 1, p. 90–95, May, 2013.

- 115.SANTOS, J.S.; OLIVEIRA, T.M.; MARTINS, L. M.; HASHIMOTO, E.H.; BASSOI, M. C.; PIRES, J. L. F.; MIRANDA, M.Z.; GARCIA, S.; ITANO, E. N.; ONO, E.Y.S.; KAWAMURA, O.; HIROOKA, E.Y. Monitoramento e nível de ingestão de desoxinivalenol por trigo. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 32, n. 4, p. 1439-1450, out./dez. 2011.
- 116.SFORZA, S.; DALL'ASTA, C.; MARCHELLI, R. Recent advances in mycotoxin determination in food and feed by hyphenated chromatographic techniques/mass spectrometry. **Mass Spectrometry Reviews**, n. 25, p. 54–76, 2006.
- 117.SIRHAN, A. Y.; TAN, G. H.; WONG, R.C.S. Method validation in the determination of aflatoxins in noodle samples using the QuEChERS method (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe) and high performance liquid chromatography coupled to a fluorescence detector (HPLC–FLD). **Food Control**, v. 22, n. 12, p. 1807–1813, Dec. 2011.
- 118.SOSPEDRA, I.; BLESAS, J.; SORIANO, J.M.; MAÑES, J. Use of the modified quick easy cheap effective rugged and safe sample preparation approach for the simultaneous analysis of type A- and B-trichothecenes in wheat flour. **Journal of Chromatography A**, n. 1217, p. 1437–1440, 2010.
- 119.STUBBINGS, G.; BIGWOOD, T. The development and validation of a multiclass liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) procedure for the determination of veterinary drug residues in animal tissue using a QuEChERS (QUick, Easy, CHEap, Effective, Rugged and Safe) approach. **Analytica Chimica Acta**, n. 637, p. 68-78, 2009.
- 120.SUDAKIN, D. L. Trichothecenes in the environment: relevance to human health. **Toxicology Letters**, n. 143, p. 97-107, 2003.

- 121.SULYOK, M.; BERTHILLER, F.; KRSKA, R.; SCHUHMACHER, R.  
Development and validation of a liquid chromatography/tandem mass spectrometric method for the determination of 39 mycotoxins in wheat and maize. **Rapid Commun. Mass Spectrom.**, n. 20, p. 2649–2659, 2006.
- 122.TANAKA, T.; YONEDA, A.; INOUE, S.; SUGIURA, Y.; UENO, Y.  
Simultaneous determination of trichothecene mycotoxins and zearalenone in cereals by gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, n. 882(1-2), p. 23-28, 2000.
- 123.TAVČAR-KALCHER, G.; VRTAČ, K.; PESTEVŠEK,U.; VENGUŠT, A.  
Validation of the procedure for the determination of aflatoxin B1 in animal liver using immunoaffinity columns and liquid chromatography with postcolumn derivatization and fluorescence detection **Food Control**, n. 18, p. 333–337, 2007.
- 124.TREBSTEIN, A.; LAUBNER, U.; HUMPF, H.U. Analysis of *Fusarium* toxins via HPLC-MS/MS multimethods: matrix effects and strategies for compensation. **Mycotox Res.**, n. 25, p. 201–213, 2009.
- 125.TRENHOLM, H. L.; THOMPSON, B. K.; HARTIN, K. E.; GREENHALGH, R.; MCALLISTER A. J. Ingestion of vomitoxin (deoxynivalenol) - contaminated wheat by nonlactating dairy cows. **J Dairy Sci.**,n. 68, p. 1000–1005, 1985.
- 126.VACLAVIKOVA, M.; MALACHOVA, A.; VEPRIKOVA, Z.; DZUMAN, Z.; ZACHARIASOVA, M.; HAJŠLOVA, J. —Emerging” mycotoxins in cereals processing chains: changes of enniatins during beer and bread making.**Food chemistry**, n. 136, p. 750-757, 2013.
- 127.VAN PUTTEN, M. C.; FREWER, L. J.; GILISSEN, L. J. W. J.; GREMMEN, B. G. J.; PEINENBERG, A. A.; WICHERS, H. J. Novel foods and food allergies.

- The issues. **Trends in Food Science and Technology**, v. 17, n. 6, p. 289–299, 2007.
128. VIDAL, A.; MARÍN, S.; RAMOS, A. J.; CANO-SANCHO, G., SANCHIS, V. Determination of aflatoxins, deoxynivalenol, ochratoxin A and zearalenone in wheat and oat based bran supplements sold in the Spanish market. **Food and Chemical Toxicology**, v. 53, p. 133–138, Mar. 2013.
129. WAGACHA, J.M.; MUTHOMI, J.W. Mycotoxin problem in Africa: Current status, implications to food safety and health and possible management strategies. **International Journal of Food Microbiology**, n 124, p. 1-12, 2008.
130. WEISS, R.; FREUDENSCHUSS, M.; KRŠKA, R.; MIZAIKOFF, B. Improving methods of analysis for mycotoxins: molecularly imprinted polymers for deoxynivalenol and zearalenone. **Food Add Contam.**, v. 20, n. 4, p. 386–395, 2003.
131. WILCOCK, A.; PUN, M.; KHANONA, J.; AUNG, M. Consumer attitudes, knowledge and behaviour: A review of food safety issues. **Trends in Food Science and Technology**, n.15, p. 56–66, 2004.
132. WU, R.; DANG, Y.; NIU, L.; HUA, H. Application of matrix solid-phase dispersion–HPLC method to determine patulin in apple and apple juice concentrate. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 21, n. 7, p. 582–586, Nov. 2008.
133. YOGENDRARAJAH, P.; POUCKE, C. V.; MEULENAER, B.; SAEGER, S. Development and validation of a QuEChERS based liquid chromatography tandem mass spectrometry method for the determination of multiple mycotoxins in spices. **Journal of Chromatography A**, v. 1297, p. 1– 11, 2013.

134. ZACHARIASOVA, M.; LACINA, O.; MALACHOVA, A.; KOSTELANSKA, M.; POUSTKA, J.; GODULA, M.; HAJŠLOVA, J. Novel approaches in analysis of *Fusarium* mycotoxins in cereals employing ultra-performance liquid chromatography coupled with high resolution mass spectrometry. **Anal Chim Acta.**, v. 662, n. 1, p. 51-61, Mar. 2010.
135. ZAIN, M.E. Impact of mycotoxins on humans and animals. **Journal of Saudi Chemical Society**. N. 15, p. 129–144, 2011.
136. ZHAO, D.; JIA, J.; YU, X.; SUN, X. Preparation and characterization of a molecularly imprinted polymer by grafting on silica supports: a selective sorbent for patulin toxin. **Anal Bioanal Chem.**, n. 401, p. 2259–2273, 2011.
137. ZOU, Z.; HE, Z.; LI, H.; HAN, P.; TANG, J.; XI, C.; LI, Y.; ZHANG, L.; LI, X. Development and application of a method for the analysis of two trichothecenes: Deoxynivalenol and T-2 toxin in meat in China by HPLC–MS/MS. **Meat Science**, n. 90 p. 613–617, 2012.

## **CAPÍTULO II – OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO PARA A DETERMINAÇÃO DE DESOXINIVALENOL EM FARINHA DE TRIGO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA COM DETECÇÃO DE UV**

### **RESUMO**

O trigo é um dos mais nobres alimentos e responde atualmente por cerca de 30% da produção mundial de grãos. Desoxinivalenol (DON) é uma micotoxina produzida principalmente por *Fusarium graminearum* e é conhecida como vomitoxina, possui vários efeitos dentre os quais: redução de consumo alimentar, irritação na pele, diarreia, hemorragias múltiplas e os efeitos imunossupressores. Pertencem ao grupo dos Tricotecenos. O objetivo do presente estudo foi otimizar um método analítico para a determinação de desoxinivalenol em farinha de trigo, empregando cromatografia líquida de alta eficiência. Na otimização, utilizou-se como referência o procedimento *QuEChERS*, usado na determinação de multiresíduos de pesticidas em vegetais, e empregou-se os delineamentos de Plackett & Burman (PB) e Composto Central Rotacional (DCCR). A partir do delineamento de Plackett & Burman verificou-se que as variáveis da etapa de extração – quantidade de sulfato de magnésio tanto nas etapas extração quanto na de purificação e o tempo de agitação na etapa extração, influenciaram significativamente ( $p < 0,05$ ) na porcentagem de recuperação da micotoxina. A partir das porcentagens de recuperação obtidas com o delineamento Composto Central Rotacional, calculou-se os coeficientes de regressão e apenas os termos quadráticos das variáveis foram estatisticamente significativos ( $p < 0,1$ ), assim, as variáveis com coeficientes de regressão não significativos foram excluídas, e então obtido o modelo codificado de 2ª ordem que descreveu a porcentagem de recuperação de desoxinivalenol em função das variáveis independentes – quantidade de sulfato de

magnésio tanto nas etapas extração quanto na de purificação e o tempo de agitação na etapa extração, reparametrizado a um nível de significância de 10%. A partir da metodologia de planejamento fatorial associado à análise de superfície de resposta foi possível otimizar as condições de cada variável estudada e assim otimizar um método analítico de fácil execução, economicamente viável, rápido, com menor geração de resíduos orgânicos e porcentagem de recuperação satisfatória para determinação de desoxinivalenol em farinha de trigo.

**Palavras-chave:** Método Analítico; Desoxinivalenol, Otimização, Farinha de trigo.

## 1. INTRODUÇÃO

A quantificação de DON em cereais geralmente envolve as etapas de extração, limpeza, separação cromatográfica e detecção. Procedimentos de TLC para detecção e análise de DON são confiáveis e de baixo custo. Outros métodos quantitativos clássicos incluem cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) acoplada com um sistema de diodos, fluorescência, MS ou MS / MS e cromatografia gasosa acoplada com a captura de elétrons, ou a detecção de ionização de chamas (KÖPPEN et al., 2010). Como indicado pelo JECFA (2010), atualmente o desenvolvimento do método analítico é centrado em grande parte no uso de métodos LC-MS/MS. Estes métodos oferecem alta sensibilidade e precisão e permitem a detecção de múltiplas micotoxinas em uma única corrida. Os limites de detecção dos métodos multi-micotoxinas variam significativamente, em parte devido às diferenças de equipamento, às etapas de limpeza, e às diferentes estruturas de determinadas micotoxinas. Os limites de detecção podem ser reduzidos pelo uso de métodos específicos como por exemplo, para tricotecenos (DALL'ASTA et al., 2004; KRŠKA, 2003; TANAKA et al., 2009).

Métodos validados, tais como os adotados pela International Organization for Standardization (ISO), pela AOAC ou a Organização Europeia de Normalização (CEN), são requeridos e necessários. Para DON em cereais e produtos de cereais são validados os métodos de TLC (AOAC 986.17), GC (AOAC 986.18) HPLC-UV (EN 15891:2010). Muitos kits ELISA comercialmente disponíveis estão validados pela AOAC e há uma norma CEN (EN 15891:2010) para HPLC com detecção UV para análise de DON em produtos à base de cereais e cereais.

Atualmente é constante a busca por métodos analíticos menos laboriosos, de menor custo e com menor número de etapas e geração de resíduos orgânicos. Desta forma, o método QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe),

descrito por Anastassiades et al. (2003), empregado na determinação de multiresíduos de pesticidas em vegetais, apresenta as características analíticas ideais para o emprego na extração e purificação de desoxinivalenol em farinha de trigo. O método parte de uma pequena quantidade de amostra (10 g) e de solvente extrator (10 mL de acetonitrila), seguido de rápida agitação e centrifugação, e na etapa de purificação do extrato emprega-se uma pequena quantidade de adsorvente, o que o torna um método rápido, fácil e barato.

Nos estudos sobre a avaliação da ocorrência de desoxinivalenol em farinha de trigo e derivados têm sido empregados na etapa de purificação do extrato cartuchos de extração em fase sólida como o Oasis HLB (ZOU et al., 2012), colunas de imunoafinidade (VIDAL et al., 2013; BRERA et al., 2013; BLANDINO et al., 2012), o que encarecem as análises.

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

Assim, o objetivo do estudo foi otimizar o método *QuEChERS*, para a determinação de desoxinivalenol em amostras de farinha de trigo, empregando planejamento fatorial associado à análise de superfície de resposta.

## **2. MATERIAL e MÉTODOS**

### **2.1. Material**

#### **2.1.1. Farinha de trigo**

Amostras de farinha de trigo no prazo de validade foram adquiridas no município de Araraquara, SP, acondicionadas em potes plásticos, em temperatura ambiente, até o momento das análises.

#### **2.1.2. Padrão e Reagentes**

O padrão desoxinivalenol (98% de pureza) foi adquirido da Sigma-Aldrich, Inc. (St. Louis, MO, USA). Acetonitrila e metanol, grau CLAE, foram adquiridos da J.T. Baker, Mallinckrodt Baker, Inc. (Phillipsburg, NJ, USA). Cloreto de sódio da Merck S.A. (Rio de Janeiro, RJ, Brasil) e sulfato de magnésio anidro da Sigma-Aldrich, Inc. (St. Louis, MO, USA) e PSA (Bondesil-PSA 40um) da Agilent (USA). Membranas de 0,22 µm Millex (Millipore, Barueri, SP, Brasil). A água utilizada nas análises cromatográficas foi obtida através de sistema de ultra-purificação Millipore MilliQ system (Millipore, Milford, MA, USA).

#### **2.1.3. Solução Padrão de Desoxinivalenol**

O padrão de desoxinivalenol (5 mg) foi dissolvido em 5 mL de solução de acetonitrila obtendo uma solução estoque de 1000 µg.mL<sup>-1</sup>, de acordo com a AOAC (2005). A partir desta solução, preparou-se solução trabalho de 20 µg.mL<sup>-1</sup>. Todas as soluções foram secas com N<sub>2</sub> e estocadas a -18°C. As soluções de trabalho foram quantificadas pelo método de espectroscopia no UV, segundo Widstrand e Pettersson, 2001.

### **2.2. Métodos**

#### **2.2.1. Otimização das Condições Cromatográficas**

##### **2.2.1.1 Seleção da Fase Móvel**

Com a finalidade de obter adequada resolução cromatográfica, inicialmente foram testadas diferentes fases móveis binárias em diferentes proporções dos solventes, porém todas em eluição isocrática. Na seleção da fase móvel, empregou-se solução padrão de  $1,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$  de desoxinivalenol, temperatura da coluna cromatográfica de  $40^\circ\text{C}$ , volume injetado de  $50 \mu\text{L}$ , variando a vazão de eluição entre  $0,5$  e  $1,0 \text{ mL.min}^{-1}$ . As fases móveis avaliadas estão apresentadas na Tabela 1. Também foram testadas colunas de  $150$  e  $250 \text{ mm}$ .

**Tabela 1.** Fases móveis avaliadas na separação cromatográfica do DON

Fase Móvel	Referência
Acetonitrila: água (7:93)	Bemvenuti et al. (2012)
Metanol:água (30:70)	Hirooka et al. (2008)
Metanol:água (15:85)	Neumann et al. (2009)
Acetonitrila: água (10:90)	Kotal et al. (2002)

#### 2.2.1.2. Efeito do pH da água empregada na fase móvel

A fase móvel escolhida foi a acetonitrila: água (10:90), mas constatou-se que em alguns testes, no mesmo tempo de retenção de DON, aparecia outro contaminante da amostra. Por isso, foram testados 3 pHs da água da fase móvel em 6,3; 6,5 e 6,7, pois era a única variável que mudava diariamente. Utilizou-se solução padrão de  $1,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$  de desoxinivalenol, temperatura da coluna de  $40^\circ\text{C}$ , volume injetado de  $50 \mu\text{L}$  e vazão de  $0,6 \text{ mL.min}^{-1}$ . O comprimento de onda utilizado para a detecção foi  $220 \text{ nm}$ .

#### 2.2.2. Análise Cromatográfica

Na separação, identificação e quantificação do desoxinivalenol empregou-se um cromatógrafo a líquido de alta eficiência (Shimadzu, Kioto, Japão), com sistema quaternário de bombeamento de solvente, modelo LC 10AT VP, detector de UV SPD-M10A vp, injetor automático SIL 10A, e coluna cromatográfica ODS Hypersil de  $250$

mm de comprimento, 4,6 mm de diâmetro interno e partículas de 3 µm (Thermo, Reino Unido).

### **2.2.3. Detecção e Quantificação de Desoxinivalenol**

A detecção de DON foi realizada através da comparação entre os tempos de retenção da amostra e do padrão, de  $8,2 \pm 0,1$  minuto e a quantificação através do método de padronização externa, utilizando-se as áreas dos picos cromatográficos. Empregou-se uma curva de calibração do padrão DON em solvente (acetonitrila: água, 90:10), na faixa de 100 a 2000 µg.kg<sup>-1</sup>.

### **2.2.4. Otimização do Método Analítico para Determinação de Desoxinivalenol em Farinha de Trigo**

#### **2.2.4.1. Contaminação das Amostras**

Amostras de farinha de trigo, livres de DON, foram adicionadas de solução padrão de desoxinivalenol ( $0,625 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ), 12 horas antes do início das análises, a fim de se obter concentração final de  $1250 \mu\text{g.kg}^{-1}$  em cada amostra.

#### **2.2.4.2. Extração e Purificação**

O método *QuEChERS* (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged e Safe*) empregado na determinação de multiresíduos de pesticidas em vegetais, descrito por Anastassiades et al. (2003), com algumas modificações, foi modificado por Sospedra et al. (2010), para avaliar a possibilidade de extração e purificação de tricotecenos A e B em amostras de farinha de trigo. Para a extração, foram adicionados 5,0 g de amostra de farinha de trigo, 10 mL de solução de metanol:acetonitrila (85:15), em um tubo para centrifugação de 50 mL Nalgene® (Thermo Scientific, Rochester, NY, USA), seguido de agitação em vótex, posterior adição de sulfato de magnésio anidro e cloreto de sódio e centrifugação à 4000 rpm. Na etapa de purificação adicionou-se sulfato de magnésio anidro e PSA em tubo para centrifugação contendo 3 mL do sobrenadante obtido na etapa de extração,

este foi agitado em vórtex e centrifugado à 4000 rpm. Uma vez purificado, o extrato foi seco com N<sub>2</sub>, ressuspenso na fase móvel e filtrado em membrana de 0,22. Foi quantificado por HPLC/UV.

### 2.2.4.3. Delineamento Experimental de Plackett & Burman

Com o objetivo de avaliar o efeito das variáveis nas etapas de extração e purificação na porcentagem de recuperação de DON, utilizou-se um delineamento de seleção das variáveis do tipo Plackett & Burman (PB) de 12 ensaios para as oito variáveis estudadas em dois níveis cada e realizados 3 ensaios no ponto central (RODRIGUES e IEMMA, 2009).

A Tabela 2 apresenta os níveis para cada variável independente estudada, baseados nas as condições estabelecidas por Lehotay (2007). A massa da amostra (5g) e o volume de 10mL do solvente extrator (metanol:acetonitrila 85:15) foram mantidos constantes, uma vez que na literatura ambos os valores contribuíram para porcentagens de recuperação satisfatórias. E na Tabela 3 encontra-se a matriz do delineamento de P&B.

**Tabela 2.** Variáveis do delineamento do tipo Plackett & Burman e seus respectivos níveis codificados.

	Variáveis	Código	Níveis		
			-1	0	+1
<b>Extração</b>	Sulfato de sódio anidro (g)	X <sub>1</sub>	1,8	2,0	2,2
	Cloreto de sódio (g)	X <sub>2</sub>	0,8	1,0	1,2
	Agitação (minutos)	X <sub>3</sub>	1	2	3
	Centrifugação (minutos)	X <sub>4</sub>	9	10	11
<b>Purificação</b>	Sulfato de sódio anidro (g)	X <sub>5</sub>	0,40	0,45	0,50
	PSA (g)	X <sub>6</sub>	0,10	0,15	0,20
	Agitação (minutos)	X <sub>7</sub>	9	10	11
	Sonicação (minutos)	X <sub>8</sub>	1,0	1,5	2,0

**Tabela 3.** Matriz do delineamento de Plackett & Burman de 12 ensaios – PB 12.

Ensaio	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>4</sub>	X <sub>5</sub>	X <sub>6</sub>	X <sub>7</sub>	X <sub>8</sub>
1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1
2	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1
3	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1
4	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1
5	1	1	-1	1	1	-1	1	-1
6	1	1	1	-1	1	1	-1	1
7	-1	1	1	1	-1	1	1	-1
8	-1	-1	1	1	1	-1	1	1
9	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1
10	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1
11	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1
12	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1

#### 2.2.4.4. Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR)

A partir dos resultados obtidos com o delineamento de Plackett & Burman elaborou-se um Delineamento Composto Central Rotacional, segundo Rodrigues e Iemma (2009), com o objetivo de otimizar as etapas de extração e limpeza em relação à porcentagem de recuperação de DON do método.

Foram analisadas as variáveis - concentração de sulfato de magnésio anidro (g), nas etapas de extração e limpeza e o tempo (min.) de agitação na etapa de extração (tabela 4). E manteve-se fixo os parâmetros: cloreto de sódio (0,8g) e centrifugação (9 min.) na etapa de extração; e PSA (0,1 mg) e centrifugação (9 min.), na etapa de limpeza (Tabela 4).

Na matriz do delineamento incluíram-se seis pontos axiais ( $\pm \alpha = (2^K)^{1/4}$ ) e três repetições no ponto central, totalizando 17 ensaios (Tabela 5).

**Tabela 4.** Variáveis avaliadas no Delineamento Composto Central Rotacional e seus respectivos níveis codificados.

Variáveis	Código	Níveis				
		-1,68	-1	0	+1	+1,68
MgSO <sub>4</sub> (g) na extração	X <sub>2</sub>	2,0	2,2	2,5	2,8	3,0
Centrifugação (min.) na extração	X <sub>5</sub>	1,0	1,6	2,5	3,4	4,0
MgSO <sub>4</sub> (mg) na limpeza	X <sub>6</sub>	0,10	0,18	0,30	0,42	0,50

**Tabela 5.** Matriz do Delineamento Composto Central Rotacional

<b>Ensaio</b>	<b>X<sub>2</sub></b>	<b>X<sub>5</sub></b>	<b>X<sub>6</sub></b>
<b>1</b>	-1	-1	-1
<b>2</b>	+1	-1	-1
<b>3</b>	-1	+1	-1
<b>4</b>	+1	+1	-1
<b>5</b>	-1	-1	+1
<b>6</b>	+1	-1	+1
<b>7</b>	-1	+1	+1
<b>8</b>	+1	+1	+1
<b>9</b>	-1,68	0	0
<b>10</b>	+1,68	0	0
<b>11</b>	0	-1,68	0
<b>12</b>	0	+1,68	0
<b>13</b>	0	0	-1,68
<b>14</b>	0	0	+1,68
<b>15</b>	0	0	0
<b>16</b>	0	0	0
<b>17</b>	0	0	0

#### **2.2.4.5 Contaminação das amostras de farinha de trigo**

Amostras de farinha de trigo, livres de DON, foram adicionadas de solução padrão pelo menos 12 horas antes do início das análises, a fim de se obter concentração final de 1250  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  ( $0,625\mu\text{g.ml}^{-1}$ ) em cada amostra, esta considerada o limite máximo permitido pela legislação brasileira que entraria em vigor em 2014 (BRASIL, 2011).

#### **2.2.4.6. Recuperação de DON**

Na avaliação da extração e purificação empregou-se a porcentagem de recuperação do método, que foi calculada como a razão percentual entre a concentração

de DON determinada e a concentração adicionada, utilizando-se uma curva de calibração na faixa de 0,10 a 1,0 µg/ml.

### **2.3. Análise Estatística**

As análises foram realizadas em triplicata e os resultados expressos como média  $\pm$  desvio-padrão. Os resultados foram analisados estatisticamente utilizando análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey, considerando-se um nível de significância de 5%, empregando o software *Origin 7.0* (2000).

### **2.4. Descontaminação do Material**

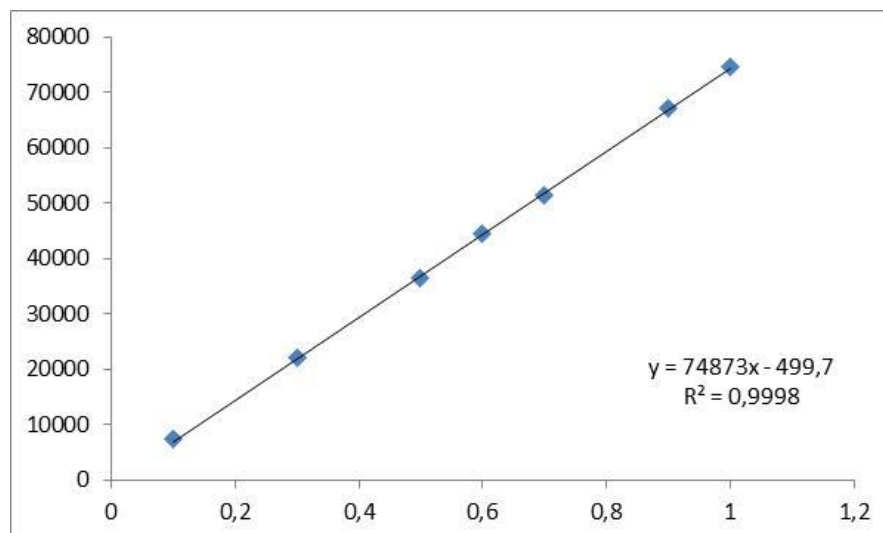
Todo material foi tratado com solução de hipoclorito de sódio 5% por pelos menos 12hs antes de ser descartado e lavado com detergente apropriado.

## **3. RESULTADOS e DISCUSSÃO**

Ao se empregar o método *QuEChERS* para determinação de tricotecenos em farinha de trigo, Sospedra et al. (2010), obtiveram de 86 a 108% de recuperação das micotoxinas ensaiadas. Ao se empregar o mesmo método neste presente estudo obteve-se 135% de recuperação de DON. Segundo a legislação nacional as porcentagens de recuperação na faixa entre 70 e 110% são ideais quando se tem concentrações iguais ou superior a 500 µg/kg (BRASIL, 2011).

Por isso decidiu-se fazer um delineamento de Plackett & Burman para verificar quais variáveis iriam influenciar significativamente na % de recuperação do método.

A equação da reta de regressão linear da curva de calibração empregada para a quantificação de DON foi  $y = 74873x - 499,7$  onde  $y$  = área do pico e  $x$  = concentração de DON ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), com coeficiente de determinação ( $R^2$ ) de 0,9998 (Figura 1).



**Figura 1.** Curva de calibração de DON (0,1 a 1,0 µg.mL<sup>-1</sup>).

### 3.1.Delineamento Experimental de Plackett & Burman (PB)

A Tabela 6 apresenta a porcentagem de recuperação de DONem cada ensaio do delineamento de Plackett & Burman, observa-se que a porcentagem de recuperação variou de 10,9 a 135,4%, de acordo com as variações no método.A Tabela 7 apresenta os efeitos, de cada variável independente avaliada, na porcentagem de recuperação de DONdo método.

**Tabela 6.** Porcentagem de recuperação de desoxinivalenoldo método em cada ensaio do delineamento de Plackett & Burman.

Ensaio	Recuperação (%) <sup>*</sup>
1	120,8±1,8
2	107,1±1,7
3	-
4	84,1±3,4
5	68,3±1,6
6	88,9±1,9
7	95,3±1,2
8	10,9±4,3
9	-

<b>10</b>	13,4±2,9
<b>11</b>	-
<b>12</b>	13,8±2,7
<b>Ponto Central</b>	135±4,4

\*média ± desvio-padrão (n=3)

Foi realizada a checagem da curvatura para evitar o efeito de “mascaramento” das médias do ponto central, que eram superiores aos das outras condições dos ensaios. O erro padrão ficou elevado porque os resultados não se ajustaram a um modelo de 1º ordem, mas a uma possível curvatura. Por isso na análise dos efeitos principais foi necessária esta checagem. Em uma curvatura estatisticamente significativa ( $p < 0,1$ ), o erro padrão e o p-valor diminuem, o  $t_{cal}$  aumenta e as variáveis estatisticamente significativas deixam de ficar “mascaradas” pelo erro padrão elevado do ponto central (RODRIGUES E IEMMA, 2009).

**Tabela 7.** Efeito de cada variável na porcentagem de recuperação de DONdo método.

	<b>Efeito (%)</b>	<b>Erro Padrão</b>	<b>t (5)</b>	<b>p - valor</b>
Média	50,24	7,27	6,91	0,000976*
Curvatura	170,53	32,53	5,24	0,003350*
<b>Extração</b>				
Sulfato de magnésio (g)	60,43	14,55	4,15	<b>0,008884*</b>
Cloreto de sódio (g)	19,44	14,55	1,34	0,239062
Agitação (min.)	32,91	14,55	2,26	<b>0,073189*</b>
Centrifugação (min.)	21,48	14,55	1,48	0,199979
<b>Limpeza</b>				
Sulfato de magnésio (mg)	-39,93	14,55	-2,74	<b>0,040597*</b>
PSA (mg)	-6,54	14,55	-0,45	0,671815
Centrifugação (min.)	2,48	14,55	0,17	0,871596
Sonicação (min.)	8,79	14,55	0,60	0,572046

\*Fatores estatisticamente significativos ( $p < 0,1$ ), considerando um nível de confiança de 90%.

O nível de significância empregado para verificar o efeito das variáveis na recuperação do método foi de 10%, para minimizar o risco de excluir alguma variável importante (Rodrigues e Iemma, 2009).

A primeira etapa do *QuEChERS* consiste na extração, a qual envolve partição líquido-líquido e efeito *salting out*. A cada 1 g de amostra são adicionados 1 mL de acetonitrila (1% acidificada com ácido acético glacial) e 0,5 g da mistura dos sais sulfato de magnésio anidro e acetato de sódio (4:1), em um tubo de centrifugação, seguido de agitação vigorosa e centrifugação, ambas por 1 minuto. Na otimização do método, na etapa de extração, utilizou-se a proporção de 1:2 de farinha:solução de metanol e acetonitrila (85:15). Encontrou-se de 10,9 a 135% de recuperação de DON. Sospedra et al. (2010) reportaram recuperações entre 84 e 106%, empregando o mesmo método.

O emprego do solvente orgânico acetonitrila na extração da micotoxina foi em função de suas vantagens como a compatibilidade com a extração em fase sólida dispersiva e com a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (PAYÁ et al., 2007).

Acetonitrila apresenta boa recuperação para tricotecenos tipo A, mas não é tão eficiente para os do tipo B, que são mais polares. Metanol consegue separar tricotecenos tipo A e B, mas as recuperações não são tão eficientes. A mistura de ambos em proporções variando entre 75:25 e 95:5 oferecem recuperações ideais para separar os dois tipos de tricotecenos, de acordo com a Comissão Diretiva 2005/26/EC.

Ao se testar a solução extratora acetonitrila:água (84:16), que é o método de referência (AOAC, 2010) para a extração e purificação de DON no trigo, não foi

possível quantificar o padrão uma vez que o pico coincidia com interferentes da matriz. A purificação foi conseguida com o uso de metanol:acetonitrila (85:15).

A adição dos sais tem a finalidade de promover a partição líquido-líquido e o efeito *salting out* no sistema, desta forma, induzindo à separação das fases aquosa e orgânica, e permitindo a extração de compostos polares.

O aumento da adição de sulfato de magnésio anidro na etapa de extração de 1,7 para 2,3g resultou em um efeito positivo significativo de 60,4% na recuperação do método. Ou seja, foi a variável que apresentou maior impacto no delineamento e foi avaliado mais cuidadosamente.

Anastassiades et al. (2003) também verificaram que o aumento na quantidade de cloreto de sódio resultou em redução na recuperação de pesticidas em vegetais. A quantidade de cloreto de sódio adicionada ao meio tem uma forte influência na separação das fases aquosa e orgânica, e em altas quantidades resulta em uma fase orgânica com menor teor de água, assim, menos receptiva para os compostos polares, desta forma, é possível controlar a polaridade da etapa de extração variando a concentração deste sal no meio. Como a farinha apresenta teor de umidade baixo (~13%) em relação aos teores encontrados em frutas e vegetais, a quantidade de cloreto de sódio pôde ser reduzida. Este fato foi observado no delineamento. O aumento na quantidade de cloreto de sódio, de 0,8 para 1,2 g, resultou em um efeito positivo mas não significativo na porcentagem de recuperação do método, sugerindo a utilização da menor quantidade (8g) de cloreto de sódio na etapa de extração. Considerando que a amostra possui baixo teor de água e a solução extratora é isenta de água, este resultado já era esperado.

Após a adição dos sais, variou-se a agitação do sistema de 1 a 3 minutos e houve um efeito positivo significativo na recuperação do método. Desta forma, esta variável também foi melhor avaliada na superfície de resposta.

Quanto á centrifugação para a separação da fase orgânica, o aumento de 9 para 11 minutos causou um efeito positivo não significativo.

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

O sulfato de magnésio anidro adicionado na etapa de purificação teve efeito negativo significativo de 35,6% na porcentagem de recuperação do método. Foi a terceira variável a ser estudada mais detalhadamente.

O PSA teve um efeito negativo de 6,5%, porém não significativo, indicando que a menor quantidade do sal (100mg) é o suficiente na etapa de purificação.

Ao variar o tempo de centrifugação, de 9 para 11 minutos, houve um efeito positivo de 2,48% na recuperação, também não significativo, indicando que nesta etapa o tempo de centrifugação pode ser o menor (9 min). O tempo da etapa de sonicação também não foi significativo e manteve-se a 1 minuto.

Para estabelecer as quantidades ideais de sulfato de magnésio anidro tanto na etapa de extração quanto na de purificação e o tempo de agitação mais adequado na etapa de

extração foi realizado um novo delineamento, neste caso do tipo Composto Central Rotacional (DCCR) no qual, a partir dos gráficos de superfície de resposta foi possível estabelecer a melhor região da superfície de resposta na qual a % de recuperação da micotoxina seria mais adequada. As demais variáveis ( $X_2$ ,  $X_4$ ,  $X_6$ ,  $X_7$  e  $X_8$ ) foram fixadas no menor nível estudado.

### 3.2. Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR)

Com a finalidade de otimizar um método analítico rápido, barato e com menor geração de resíduos orgânicos, a partir dos efeitos calculados através do delineamento Plackett & Burman fixou-se 5 variáveis na menor quantidade e tempo avaliados. Na etapa de extração, manteve-se a adição de cloreto de sódio em 0,8 g e a centrifugação em 9 minutos e na etapa de purificação, PSA em 0,1 mg e os tempos de centrifugação e sonicação em 9 e 1 minuto, respectivamente.

No entanto, as variáveis da etapa de extração: quantidade de sulfato de magnésio (g) e tempo de agitação (min) e na etapa de limpeza: quantidade de sulfato de magnésio (mg) foram as que apresentaram o maior impacto sobre a recuperação do método (Tabela 8), contudo, realizou-se um delineamento do tipo Composto Central Rotacional a fim de otimizar as condições de cada uma destas variáveis. Verificou-se que a porcentagem de recuperação de DON variou de 22,2 a 110,0 %, de acordo com as variações na quantidade de sulfato de magnésio anidro adicionada nas etapas de extração e limpeza, bem como o tempo de agitação na etapa de extração.

**Tabela 8.** Porcentagem de recuperação de DON do método em cada ensaio do Delineamento Composto Central Rotacional.

Ensaio	Recuperação (%) <sup>*</sup>
1	70,7
2	73,3
3	56,9

4	72,3
5	62,3
6	74,1
7	85,5
8	36,5
9	55,4
10	51,5
11	22,6
12	64,8
13	61,4
14	55,5
<i>Ponto Central</i>	
15	83,2
16	108,7
17	110,0

Através dos resultados de porcentagem de recuperação obtidos foram calculados os coeficientes de regressão, onde os termos lineares estão associados à letra L e os termos quadráticos à letra Q (Tabela 9).

**Tabela 9.** Coeficientes de regressão para a porcentagem de recuperação de DON do método.

Parâmetros	Coefficiente de Regressão	Erro padrão	t (7)	p – valor
<b>Média</b>	99,4	11,9	8,3	<b>0,000070</b>
<b>X<sub>1</sub> (L)</b>	-1,8	5,6	-0,3	0,750040
<b>X<sub>1</sub> (Q)</b>	-12,8	6,2	-2,1	<b>0,077542</b>
<b>X<sub>2</sub> (L)</b>	3,0	5,6	0,5	0,606056
<b>X<sub>2</sub> (Q)</b>	-16,2	6,2	-2,6	<b>0,034088</b>
<b>X<sub>3</sub> (L)</b>	-1,8	5,6	-0,3	0,752311
<b>X<sub>3</sub> (Q)</b>	-10,9	6,2	-1,7	0,118237
<b>X<sub>1</sub>X<sub>2</sub></b>	-6,0	7,3	-0,8	0,435898

$X_1X_3$	-6,9	7,3	-0,9	0,374129
$X_2X_3$	0,1	7,3	0,01	0,989484

$X_1$ -sulfato de magnésio anidro (g) na etapa de extração;  $X_2$ - tempo de agitação na etapa de extração (min);  $X_3$ - sulfato magnésio anidro (mg) na etapa de limpeza;  $X_1X_2$ ,  $X_1X_3$  e  $X_2X_3$  formaram as interações entre as variáveis em estudo.

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

**Tabela 10.** Coeficientes de regressão estatisticamente significativos para a porcentagem de recuperação DON do método.

Parâmetros	Coeficiente de Regressão	Erro padrão	t (13)	p – valor
<b>Média</b>	99,4	9,9	9,9	0,000000
<b><math>X_1</math> (Q)</b>	-12,7	5,1	-2,5	0,028046
<b><math>X_2</math> (Q)</b>	-16,2	5,1	-3,1	0,007814
<b><math>X_3</math> (Q)</b>	-10,9	5,1	-2,1	0,052972

$X_1$ : sulfato de magnésio anidro (g) na etapa de extração;  $X_2$ : tempo de agitação na etapa de extração (min);  $X_3$ : sulfato magnésio anidro (mg) na etapa de limpeza.

A equação a seguir descreve o modelo matemático codificado da recuperação dedesoxinivalenolem função das variáveis independentes - quantidade sulfato de magnésio anidro (g) e agitação (min.) na etapa de extração e a quantidade de sulfato de

magnésio anidro (mg) na etapa de limpeza, reparametrizado a um nível de significância de 10%:

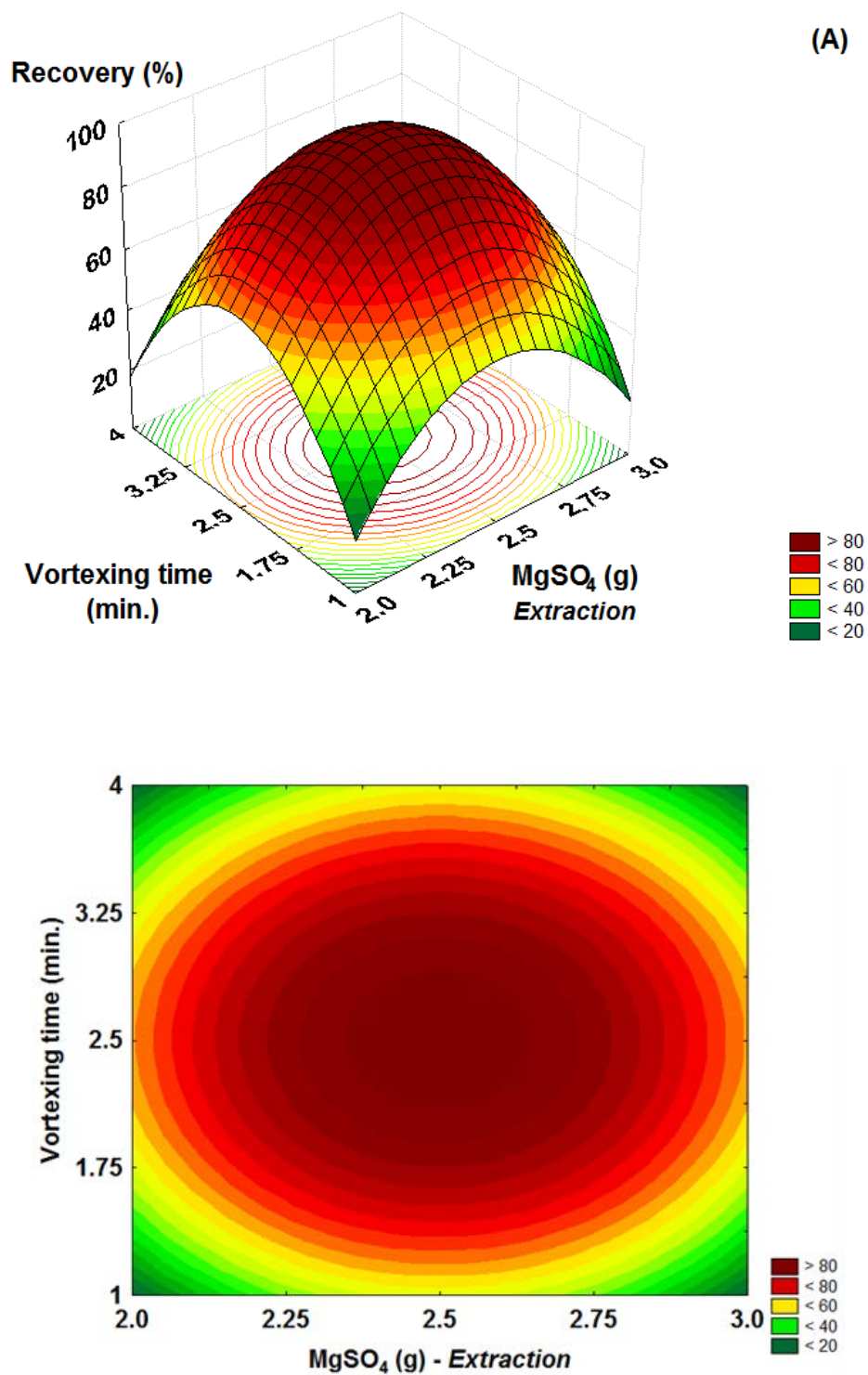
$$\% \text{ Recuperação} = 99,5 - 12,8 X_1^2 - 16,2 X_2^2 - 10,9 X_3^2$$

A partir da análise de variância (ANOVA) apresentada na Tabela 11 concluiu-se que o modelo codificado de 2ª ordem que descreve a recuperação da micotoxina em função das variáveis estudadas, com os parâmetros estatisticamente significativos, é adequado, pois a regressão foi significativa ( $p < 0,05$ ), cujo valor de  $F$  calculado (4,4) foi superior ao do  $F$  tabelado (3,4) e a falta de ajuste não foi significativa ( $p > 0,05$ ), cujo valor de  $F$  calculado (1,37) foi inferior ao do  $F$  tabelado (19,41). Assim, permitiu-se a construção das superfícies de respostas e das curvas de contorno (Figuras 2,3 e 4).

**Tabela 11.** Análise de variância para a porcentagem de recuperação de DON do método.

Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F calculado	p - valor
Regressão	3996,613	3	1332,204	4,441 <sup>a</sup>	0,023411
Resíduos	3899,828	13	299,987		
Falta de ajuste	3443,101	11	313,009	1,371 <sup>b</sup>	0,495950
Erro puro	456,727	2	228,364		
Total	7896,441	16			

<sup>a</sup> $F$  tabelado 3; 13; 0,05 = 3,41    <sup>b</sup> $F$  tabelado 11; 2; 0,05 = 19,41



**Figura 2.** Superfície de resposta e curva de contorno para a porcentagem de recuperação de DON em função da quantidade de sulfato de magnésio e o tempo de agitação também na etapa de extração.

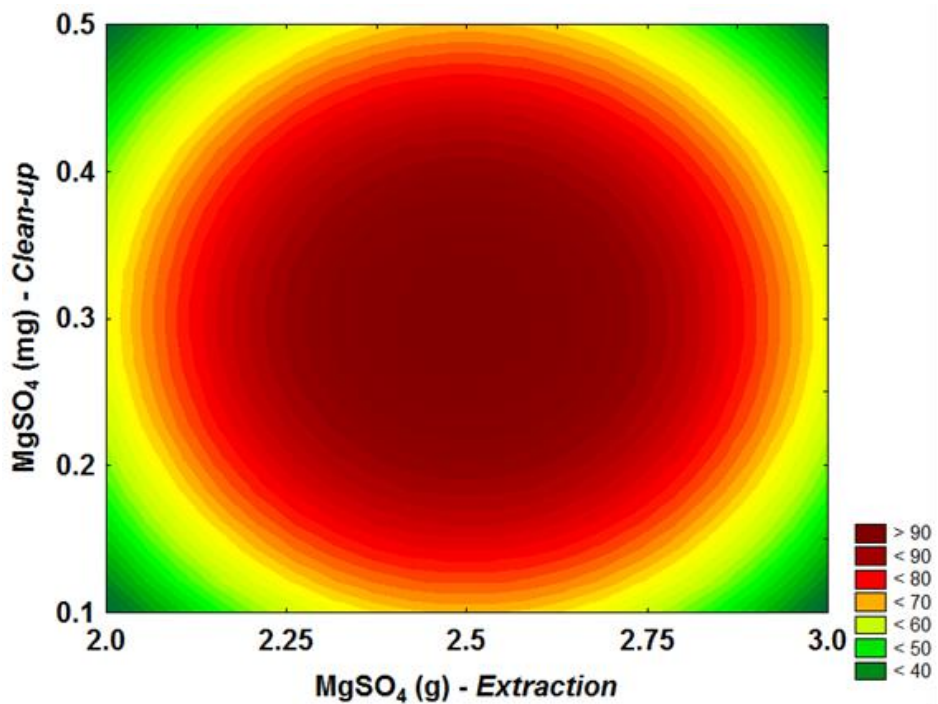
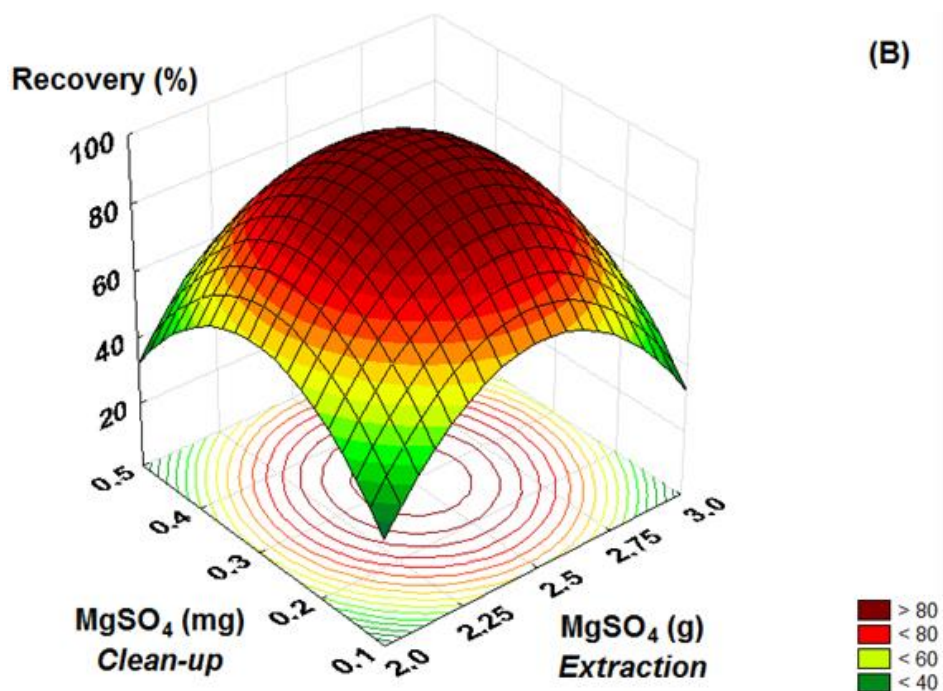


Figura 3. Superfície de resposta e curva de contorno para a porcentagem de recuperação de DON em função da quantidade de sulfato de magnésio adicionado na etapa de extração e na etapa de limpeza.

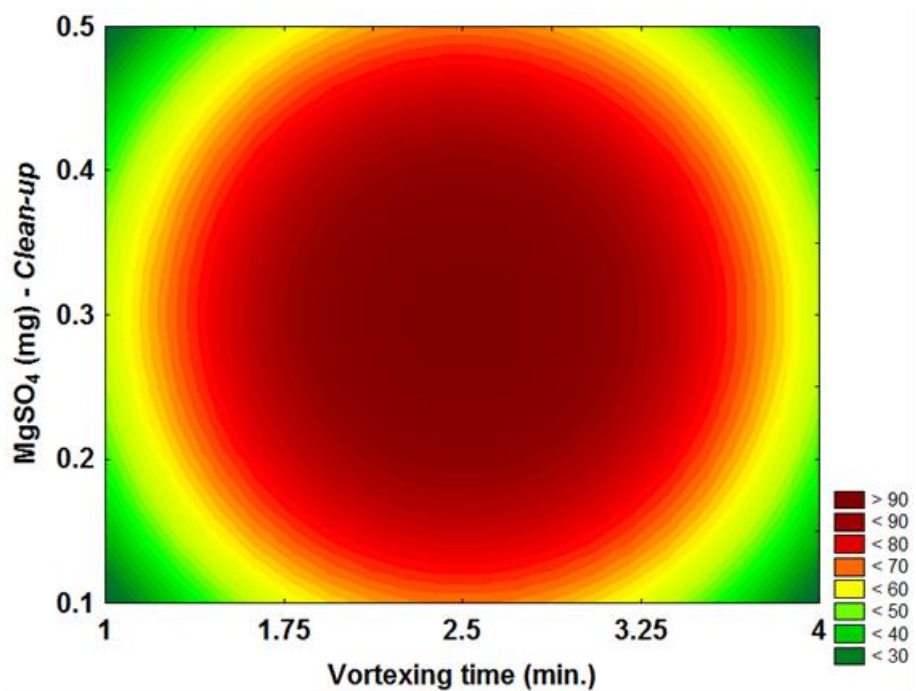
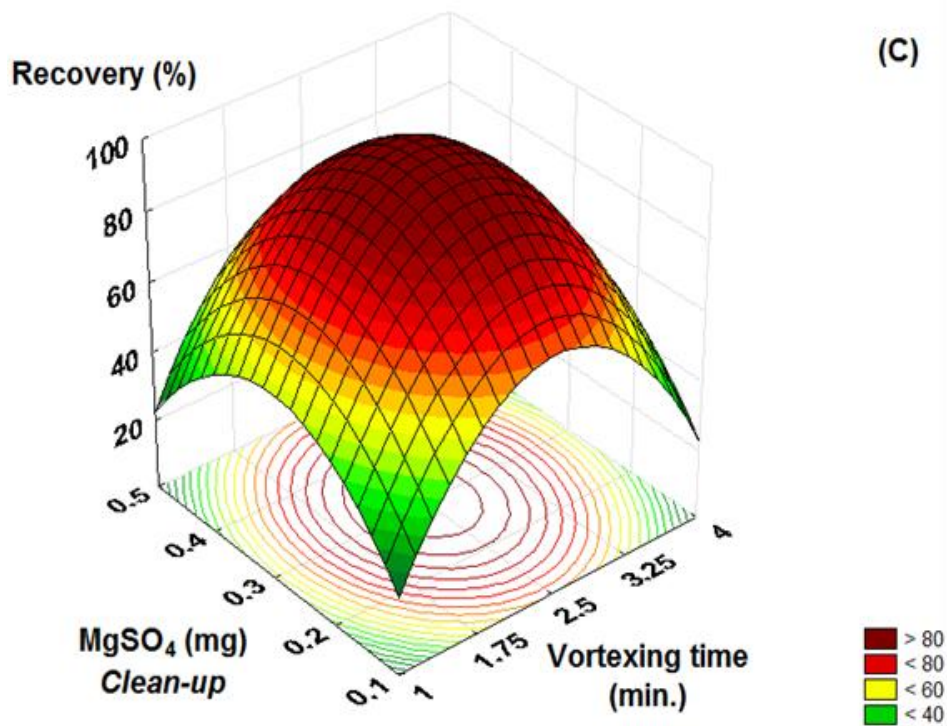


Figura 4. Superfície de resposta e curva de contorno para a porcentagem de recuperação de DON em função do tempo de agitação na etapa de extração e da quantidade de sulfato de magnésio adicionado na etapa de limpeza.

A partir do modelo matemático e pelas superfícies de resposta conclui-se que as melhores condições foram no ponto central. Pois ao substituir no modelo codificado o valor zero para as variáveis obtém-se uma recuperação de 99,5%, que é bastante satisfatória. Como experimentalmente no ponto central as recuperações foram 83,2, 108,7 e 110%, esta foi a condição final/otimizada.

Para o cálculo do erro relativo utilizou-se uma média da triplicata nas condições definidas no ponto central e aplicou-se a fórmula:

Erro relativo (%) = % recup. média experimental (ponto central) - % recup. prevista pelo modelo (99,5%) / % recup. média experimental x 100

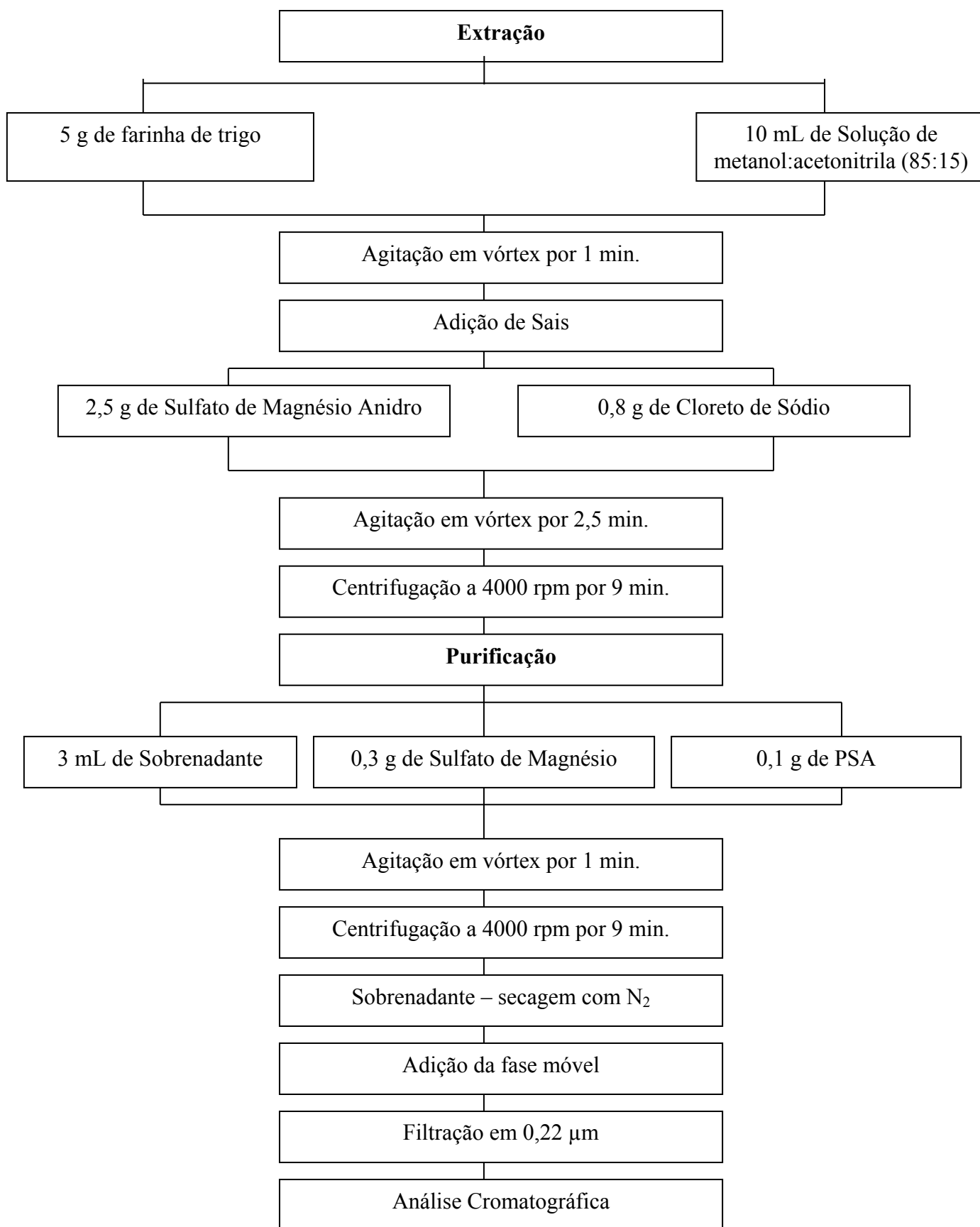
$$ER (\%) = 112,7 - 99,5 / 112,7 \times 100 = 11,7\%$$

Portanto, o erro relativo foi menor que 15%, o que é satisfatório.

Através da análise das superfícies de respostas e das curvas de contorno geradas pelo modelo codificado verificou-se que a porcentagem de recuperação do método foi influenciada pelas três variáveis independentes avaliadas pelo DCCR (Figuras 2, 3 e 4).

Avaliando os resultados dos delineamentos de Plackett & Burman e Composto Central Rotacional definiu-se as condições de cada variável das etapas de extração e purificação do método, conforme apresentado na Figura 5.

Os resultados obtidos indicaram que através da metodologia de planejamento experimental associada à análise de superfície de resposta foi possível otimizar as condições de extração e purificação que garantiram um método analítico com porcentagens de recuperação satisfatória.



**Figura 5.** Esquema do método analítico para a determinação de DON em farinha de trigo

#### 4. CONCLUSÃO

As variáveis sulfato de magnésio anidro tanto nas etapas de extração quanto na de purificação e o tempo de agitação na etapa de extração foram significativas, assim como os ensaios no ponto central foram os ótimos na porcentagem de recuperação do método.

A partir da metodologia de planejamento fatorial associado à análise de superfície de resposta foi possível otimizar as condições de cada variável estudada e assim otimizar o método *QuEChERS* para determinação de desoxinivalenol em farinha de trigo.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ANASTASSIADES, M.; LEHOTAY, S.J.; STAJNBAHER, D.; SCHENCK, F.J. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrila extraction/partitioning and —dispersive solid-phase extraction” for the determination of pesticide residues in produce. **Journal of AOAC International**, v. 86, n. 2, p. 412-431, 2003.
2. AOAC. Official Methods of Analysis of AOAC International, 18th ed. Gaithersburg, Maryland, USA: **Association of Official Analytical Chemists**, 2005.
3. BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Consulta Pública nº 100, de 21 de Dezembro de 2009. Diário Oficial da União, Brasília. Disponível em: [www.anvisa.gov.br](http://www.anvisa.gov.br) . Acesso em: 29 nov. 2011.
4. BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 7 de 18 de Fevereiro de 2011, Dispõe sobre os limites máximos tolerados para micotoxinas em alimentos. Brasília, 2011. Disponível em:< [http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2011/res0007\\_18\\_02\\_2011\\_rep.html](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2011/res0007_18_02_2011_rep.html)>. Acesso em: 10 maio 2011.
5. DESMARCHELIER, A.; OBERSON, J.M.; TELLA, P.; GREMAUD, E.; SEEFELDER, W.; MOTTIER, P. Development and comparison of two multiresíduos methods for the nalysis of 17 mycotoxins in cereals by liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 13, p. 7510-7519, 2010.
6. FURLONG, E.B.; SOARES, L.M.V. Gas chromatographic method for quantitation and confirmation of trichothecenes in wheat. **Journal of AOAC International**, v. 78, n. 2, p. 386-390, 1995.

7. LEHOTAY, S.J. Determination of pesticide residues in food by acetonitrile extraction and partitioning with magnesium sulfate; collaborative study. **Journal of AOAC International**, v. 90, n. 2, p. 485-520, 2007.
8. MOL, H.G.J.; PLAZA-BOLAÑOS, P.; ZOMER, P.; RIJIK, T.C.; STOLKER, A.A.M.; MULDER, P.J. Toward a generic extraction method for simultaneous determination of pesticides, mycotoxins, plant toxins, and veterinary drugs in feed and food matrixes. **Analytical Chemistry**, v. 80, n. 24, p. 9450-9459, 2008.
9. PAYÁ, P.; ANASTASSIADES, M.; MACK, D.; SIGALOVA, I.; TASDELEN, B.; OLIVA, J.; BARBA, A. Analysis of pesticide residues using the quick easy cheap effective rugged and safe (QuEChERS) pesticide multiresidue method in combination with gas and liquid chromatography and tandem mass spectrometric detection. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 389, p. 1697-1714, 2007.
10. RODRIGUES, M.I.; IEMMA, A.F. **Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos**. 2009. Campinas, SP: Editora Casa do Espírito Amigo Fraternidade Fé e Amor. 358p. 2ª edição.
11. SOARES, L.M.V.; RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Screening and quantitation of ochratoxin A in corn, peanuts, beans, rice, and cassava. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, v. 68, n. 6, p. 1129-1130, 1985.
12. SOSPEDRA, I.; BLESÁ, J.; SORIANO, J.M.; MAÑES, J. Use of the modified quick easy cheap effective rugged and safe sample preparation approach for the simultaneous analysis of type A- and B-trichothecenes in wheat flour. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, p. 1437–1440, 2010.
13. SPANJER, M.C.; RENSEN, P.M.; SCHOLTEN, J.M. LC-MS/MS multi-method for mycotoxins after single extraction, with validation data for peanuts,

- pistachio, wheat, maize, cornflakes, raisins and figs. **Food Additives and Contaminants**, v. 25, n. 4, p. 472-489, 2008.
14. SULYOK, M.; BERTHILLER, F.; KRSKA, R.; SCHUHMACHER, R. Development and validation of a liquid chromatography/tandem mass spectrometric method for the determination of 39 mycotoxins in wheat and maize. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 20, p. 2649-2659, 2006.
15. TREBSTEIN, A.; LAUBER, U.; HUMPF, H.U. Analysis of Fusarium toxins via HPLC-MS/MS multimethods: matrix effects and strategies for compensation. **Mycotoxin Research**, v. 25, p. 201-213, 2009.

### **CAPÍTULO III – VALIDAÇÃO INTRALABORATORIAL DE MÉTODO ANALÍTICO PARA DETERMINAÇÃO DE DESOXINIVALENOL EM FARINHA DE TRIGO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA COM DETECÇÃO DE UV**

#### **RESUMO**

O objetivo do estudo foi avaliar os parâmetros de desempenho do método analítico para a determinação de desoxinivalenol em amostras de farinha de trigo, empregando cromatografia líquida de alta eficiência com detecção de UV. Foram avaliados os critérios de desempenho do método – seletividade, linearidade, efeito de matriz, limites de detecção e de quantificação, exatidão e precisão. Avaliou-se o desempenho do método analítico *QUECHERS* em amostras de farinha de trigo. A partir da análise dos cromatogramas obtidos verificou-se seletividade do método, pois no mesmo tempo de retenção da micotoxina não eluiu nenhum interferente. Empregou-se a curva de calibração no extratos da amostra, na faixa entre 100 e 2000  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ . Os limites de detecção e de quantificação foram de 50 e 100  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ , respectivamente. O método apresentou porcentagens de recuperação de 86 a 96%. Os ensaios de repetitividade indicaram a precisão do método, com baixos valores de desvio padrão relativo. Os parâmetros de desempenho do método analítico avaliado indicaram seletividade para a micotoxina, efeito de matriz, exatidão e precisão, com um baixo limite de detecção e limite de quantificação apropriado para a determinação de desoxinivalenol em amostras de farinha de trigo.

**Palavras-chave:** Desoxinivalenol; Validação Intralaboratorial; Farinha de trigo; Método Analítico.

## 1. INTRODUÇÃO

A validação de métodos analíticos é o processo que fornece evidências de que um dado método de ensaio produz resultados adequados para o propósito de uso (ISO, 2005). Pode ser de dois tipos – *intralaboratorial*, que consiste das etapas de validação dentro de um único laboratório, seja para validar um novo método que tenha sido desenvolvido localmente ou para verificar se o método adotado de outras fontes está sendo apropriado; ou *interlaboratorial*, que é utilizada para verificar como o método analítico se comporta com uma determinada matriz em vários laboratórios, demonstrando a reprodutibilidade e a incerteza do método (RIBANI et al., 2004).

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

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

A linearidade é a habilidade de um método analítico em produzir resultados que sejam diretamente proporcionais à concentração do analito nas amostras, em uma dada faixa de concentração, podendo ser obtida por padronização interna ou externa (INMETRO, 2007). Se houver relação linear aparente após exame visual do gráfico (sinal *versus* concentração), deve-se determinar o coeficiente de correlação ( $r^2$ ). Valor igual a 0,99 é o mínimo aceitável para o coeficiente de correlação ( $r^2$ ) (BRASIL, 2003).

O ICH recomenda que para estabelecer a linearidade, um mínimo de cinco concentrações deve ser utilizado, realizando leituras em triplicata (ICH, 2005).

Para verificar o efeito de matriz (~~matrix-matched~~) adiciona-se o padrão em diversas concentrações em uma matriz similar à da amostra, isenta da substância, e construção do gráfico de calibração relacionando as áreas obtidas com as concentrações dos padrões. O método de superposição de matriz pode ser utilizado para calibração, tanto com a padronização interna como com a padronização externa. Este método é usado para compensar o efeito da matriz ou de possíveis interferentes e é de suma importância em determinações quando a matriz pode interferir na pré-concentração, extração, separação ou detecção da substância de interesse. Sua principal vantagem sobre o método de padronização externa é que fornece uma melhor correspondência com a composição da amostra. O método de superposição de matriz tem o inconveniente de não proporcionar a magnitude do efeito de co-extratos, além de aumentar o custo e o tempo das análises. Alguns autores acreditam que o efeito dos co-extratos sobre a resposta da substância de interesse deveria ser avaliado pela comparação do método de superposição de matriz com a padronização externa (padrões preparados nos solventes). Apesar de se obter uma calibração confiável com o método de superposição da matriz, ele é somente uma forma para compensar efeitos da matriz, mas não elimina situações analíticas típicas: a intensidade de um efeito e a concentração de interferentes na matriz podem diferir de uma matriz ou amostra para outra. Assim, em amostras nas quais pode ocorrer o efeito da matriz e não se tem disponível uma matriz isenta da substância de interesse para utilizar o método de superposição de matriz deve-se utilizar o método de adição padrão (RIBANI et al., 2004).

O limite de detecção representa a menor concentração do analito de interesse que possa ser detectada, mas não necessariamente quantificada, podendo ser calculado

pelo método visual, relação sinal-ruído ou método baseado em parâmetros da curva de calibração (RIBANI et al., 2004).

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

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

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

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

amostra, efetuadas sob condições variadas, como diferentes analistas, local, equipamentos, etc (RIBANI et al., 2004).

Diferentes organizações nacionais e internacionais, como ANVISA, EURACHEM, INMETRO, ICH, IUPAC, dentre outras, apresentam as especificações sobre como proceder a avaliação de cada um dos parâmetros de validação.

Com o propósito de garantir que o método empregado apresente resultados confiáveis, o objetivo deste estudo foi avaliar os parâmetros de desempenho: seletividade, linearidade, efeito de matriz, limites de detecção e quantificação, exatidão e precisão do método analítico *QUECHERS* para a determinação de desoxinivalenol em farinha de trigo.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1. Material**

#### **2.1.1. Farinha de trigo**

As amostras de farinha de trigo foram obtidas no comércio da cidade de Araraquara, embaladas em sacos plásticos e guardadas a temperatura ambiente até o momento das análises.

#### **2.1.2. Padrão e Reagentes**

O padrão desoxinivalenol (98% de pureza) foi adquirido da Sigma-Aldrich, Inc. (St. Louis, MO, USA). Acetonitrila e metanol, grau CLAE, foram adquiridos da J.T. Baker, Mallinckrodt Baker, Inc. (Phillipsburg, NJ, USA). Cloreto de sódio da Merck S.A. (Rio de Janeiro, RJ, Brasil) e sulfato de magnésio anidro da Sigma-Aldrich, Inc. (St. Louis, MO, USA) e PSA (Bondesil-PSA 40um) da Agilent (USA). Membranas de 0,22 µm Millex (Millipore, Barueri, SP, Brasil). A água utilizada nas análises cromatográficas foi obtida através de sistema de ultra-purificação Millipore MilliQ system (Millipore, Milford, MA, USA).

### **2.1.3. Solução Padrão de Desoxinivalenol**

O padrão de desoxinivalenol (5 mg) foi dissolvido em 5 mL de solução de acetonitrila obtendo uma solução estoque de  $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , de acordo com a AOAC (2005). A partir desta solução, preparou-se solução trabalho de  $20 \mu\text{g.mL}^{-1}$ . Todas as soluções foram secas com  $\text{N}_2$  e estocadas a  $-18^\circ\text{C}$ . As soluções de trabalho foram quantificadas pelo método de espectroscopia no UV, segundo Widstrand e Pettersson, 2001.

## **2.2. Métodos**

### **2.2.1. Extração e Purificação**

Foi utilizado o método *QuEChERS* (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged e Safe) empregado por Sospedra et al. (2010), com algumas modificações. Na etapa de extração, foram adicionados 5 g de amostra de farinha de trigo, 10 mL de solução de metanol:acetonitrila (85:15), em um tubo de centrifugação Nalgene® (Thermo Scientific, Rochester, NY, USA) de 50 mL, adição de 2,5g de sulfato de magnésio anidro e 0,8g de cloreto de sódio, seguido de agitação em vórtex por 2,5 min. e centrifugação à 4000 rpm por 9 min. Na etapa de purificação, 3 mL do sobrenadante obtido na etapa de extração mais 300 mg sulfato de magnésio anidro e 100 mg de PSA foram adicionados em tubo para centrifugação de 50 mL, e este agitado em vórtex por 1 min. e centrifugado à 4000 rpm por 9 min. Uma vez purificado, o extrato foi seco com  $\text{N}_2$ , resuspendido na fase móvel e filtrado em membrana de 0,22 antes da injeção no HPLC.

### **2.2.2. Análise Cromatográfica**

Na separação, identificação e quantificação do desoxinivalenol empregou-se um cromatógrafo a líquido de alta eficiência (Shimadzu, Kioto, Japão), com sistema

quaternário de bombeamento de solvente, modelo LC 10AT VP, detector de UV SPD-M10A vp, injetor automático SIL 10A, e coluna cromatográfica ODS Hypersil de 250 mm de comprimento, 4,6 mm de diâmetro interno e partículas de 3 µm (Thermo, Reino Unido). A temperatura manteve-se a 40°C e o tempo de corrida foi de 15 minutos. A fase móvel empregada foi acetonitrila:água (10:90 v/v), com o pH da água ajustado a 6,7 com solução de NaOH 0,01M. Com eluição isocrática, vazão 0,6mL/min e volume injetado de 50 µL.

### **2.2.3. Validação Intralaboratorial**

#### **2.2.3.1. Seletividade**

A seletividade do método foi avaliada pela comparação entre os cromatogramas dos extratos de farinha de trigo e os cromatogramas dos extratos de farinha de trigo isentos de DON (EURACHEM, 1998; INMETRO, 2010), como também cromatogramas de amostras de farinha de trigo naturalmente contaminadas por DON.

#### **2.2.3.2. Linearidade**

A linearidade foi avaliada através de curvas de calibração em matriz as quais empregaram extratos de amostras de farinha de trigo livres da micotoxina, adicionadas de padrão DON. Foram preparadas três curvas, em diferentes dias, nos níveis de 100, 200, 600, 1000, 1200, 1400, 1800 e 2000 µg.kg<sup>-1</sup> de desoxinivalenol, sendo cada nível em três replicatas independentes, analisados em ordem aleatória. Para a determinação da concentração de DON aplicou-se o modelo linear  $y = a + bx$ , onde  $y$  é a área do pico cromatográfico,  $x$  é a concentração de DON,  $a$  e  $b$  são as estimativas dos parâmetros da equação e determinou-se o coeficiente de correlação  $r^2$ .

#### **2.2.3.3. Limites de Detecção e Quantificação**

O limite de detecção do método foi definido como a menor concentração de desoxinivalenol em extrato de farinha de trigo que pode ser detectada, mas não

necessariamente quantificada. E, o limite de quantificação como a menor concentração de desoxinivalenol em extrato de farinha de trigo que pode ser detectada e quantificada com exatidão e precisão (EURACHEM, 1998).

As determinações foram realizadas em triplicata para cada extrato de farinha e os limites estabelecidos pela avaliação visual dos picos cromatográficos (ICH, 1996; RIBANI et al. 2004).

#### **2.2.3.4. Exatidão**

A exatidão foi avaliada pela porcentagem de recuperação do método (THOMPSON et al., 2002). Extrato de farinha de trigo isentos de DON, foram fortificadas com padrão da micotoxina em três diferentes níveis de concentração: 100, 600 e 1200  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ , 12 horas antes do início das análises. As determinações foram realizadas em triplicata, para cada nível avaliado, totalizando 9 ensaios independentes. A porcentagem de recuperação do método foi calculada como a razão percentual entre a concentração de DON determinada e a concentração adicionada, utilizando-se adequada curva de calibração na faixa de 100 a 2000  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ , cuja linearidade e efeito de matriz foram comprovados.

#### **2.2.3.5. Precisão**

A precisão do método foi avaliada pelos ensaios de repetitividade e precisão intermediária (ICH, 1996; INMETRO, 2010). Amostras de farinha de trigo foram fortificadas com padrão DON nas concentrações de 100, 600 e 1200  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ , 12 horas antes do início das análises.

Os ensaios de repetitividade foram realizados pelo mesmo analista, em um único laboratório, em curto intervalo de tempo em um mesmo dia, empregando o mesmo

cromatógrafo líquido, sob as mesmas condições cromatográficas. As determinações foram realizadas em triplicata, para cada nível avaliado, totalizando 9 ensaios independentes.

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

A repetitividade e a precisão intermediária foi expressa como desvio padrão relativo (DPR), calculado como:

$$DPR (\%) = DP/C$$

Sendo: *DP* o desvio padrão e *C* a concentração média determinada ( $\mu\text{g.kg}^{-1}$ ).

### **3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

#### **3.1. Seletividade**

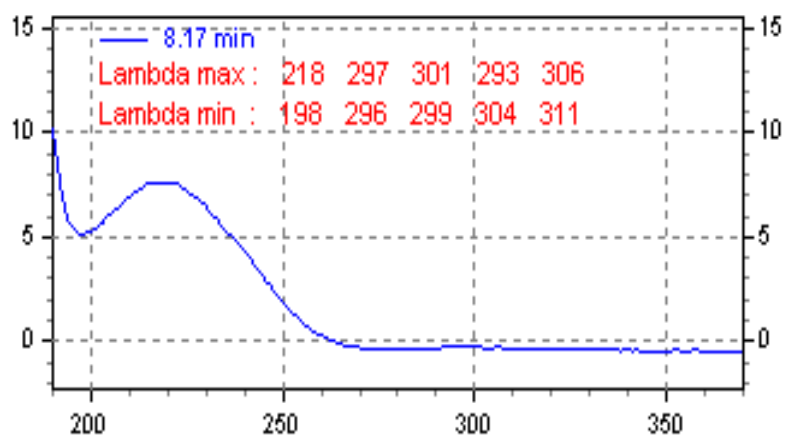
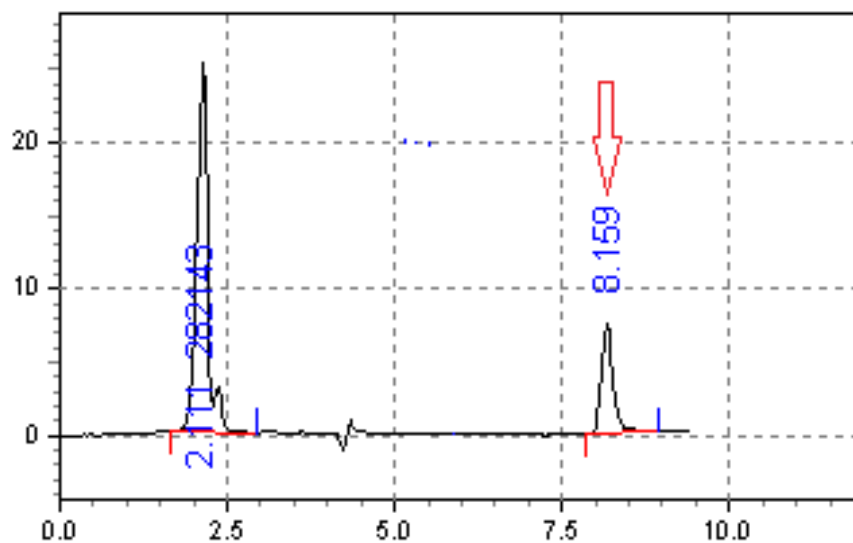
A seletividade foi o primeiro parâmetro de desempenho do método a ser avaliado, uma vez que, se a seletividade do método não fosse assegurada, a linearidade, a exatidão e a precisão estariam seriamente comprometidas (RIBANI et al. 2004).

Considerando que as amostras de farinha de trigo conteriam componentes e impurezas que poderiam interferir no desempenho do método analítico avaliado, foi imprescindível garantir que o pico de interesse era exclusivamente do padrão DON.

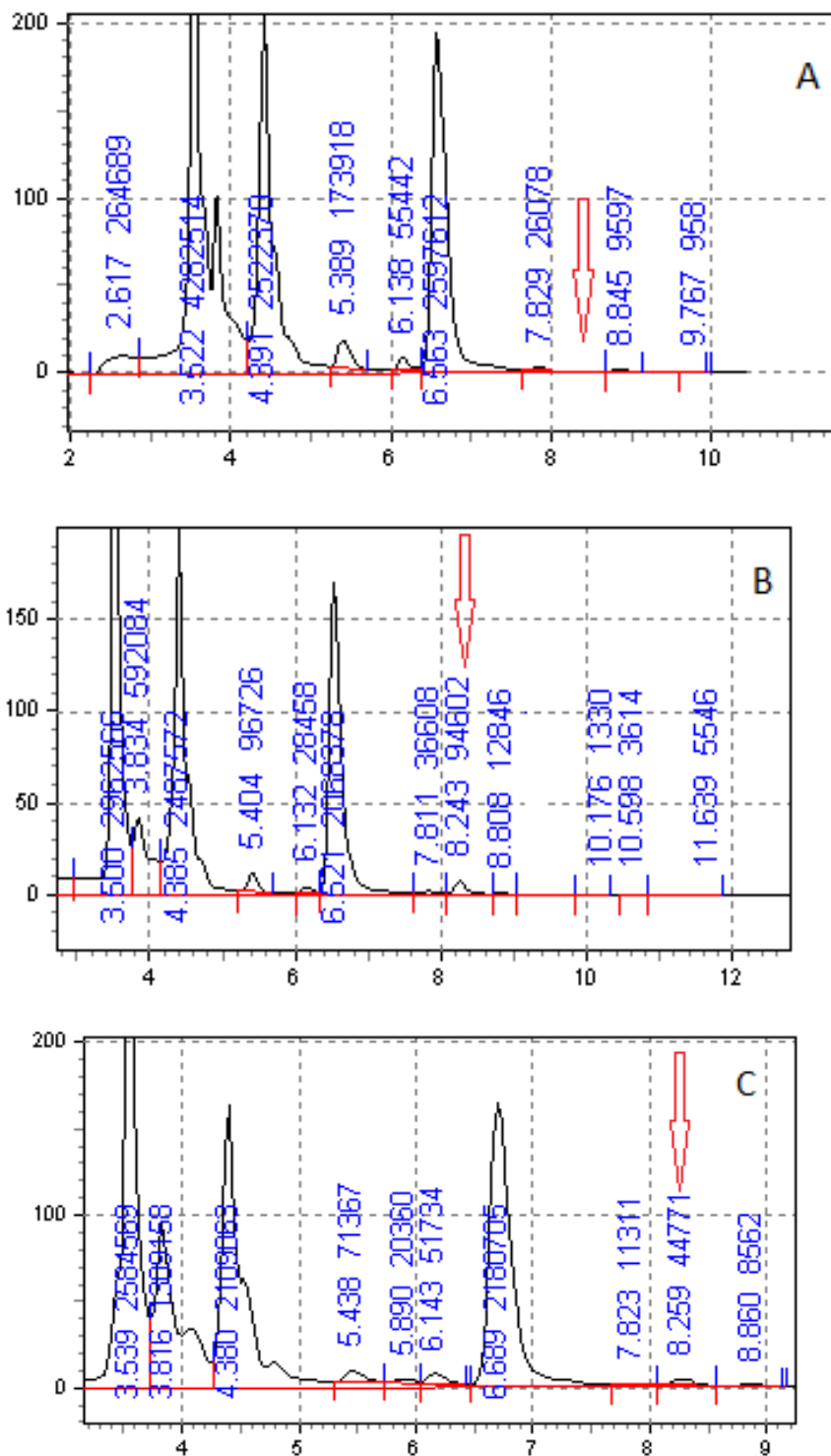
A seletividade do método analítico foi avaliada pela comparação entre as análises cromatográficas dos extratos de farinha de trigo isentos de DON e as análises cromatográficas dos extratos da farinha de trigo adicionados de padrão DON.

Os cromatogramas apresentados nas Figuras 1 e 2 indicaram a seletividade do método analítico, confirmando a capacidade do método em separar, detectar e quantificar a micotoxina na presença de outros componentes e impurezas da matriz. Observou-se a separação de DON, de forma inequívoca, dos outros compostos presentes nas amostras da farinha que poderiam interferir na determinação do composto.

Para os extratos adicionados de DON, verificou-se que nenhum interferente eluiu no tempo de retenção do padrão de  $8,2 \pm 0,1$  minuto, como também nas amostras naturalmente contaminadas demonstrando a seletividade do método analítico para a micotoxina estudada.



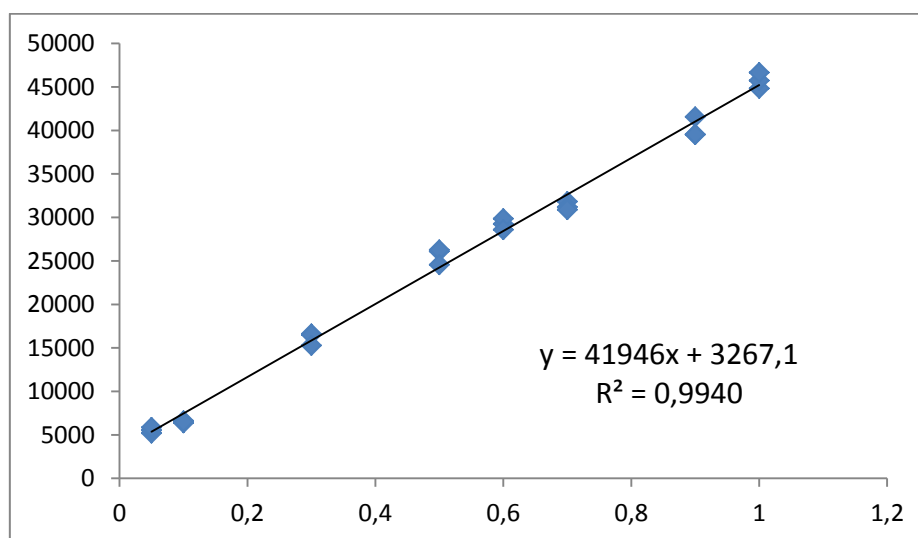
**Figura 1.** Cromatograma e espectro característicos de DON. **Condições cromatográficas:** fase móvel: acetonitrila:água (10:90 v/v), com o pH da água ajustado a 6,7 vazão: 0,6 mL.min<sup>-1</sup>, coluna ODS Hypersil (25 x 4,6 mm, 3 µm) temperatura da coluna: 40°C e volume injetado: 50 µL.



**Figura 2.** Cromatogramas característicos de DON em extrato de farinha de trigo. **A:** extrato de farinha livre de DON; **B:** extrato de farinha adicionado de padrão DON; **C:** amostra de farinha de trigo naturalmente contaminada com DON. **Condições cromatográficas:** fase móvel: acetonitrila:água (10:90 v/v), com o pH da água ajustado a 6,7 vazão: 0,6 mL.min<sup>-1</sup>, coluna ODS Hypersil (25 x 4,6 mm, 3 µm) temperatura da coluna: 40°C e volume injetado: 50 µL.

### 3.2. Linearidade

Empregou-se a curva de matriz nas concentrações de 100 a 2000  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  e a equação da reta de regressão linear da curva de calibração empregada na quantificação de desoxinivalenol em farinha de trigo foi  $y = 41946x + 3267,1$  onde  $y$  = área do pico cromatográfico e  $x$  = concentração de desoxinivalenol ( $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ), com coeficiente de determinação ( $R^2$ ) de 0,9940 (Figura 3). A curva de matriz foi empregada para compensar o efeito de possíveis interferentes da amostra na detecção do DON.



**Figura 3.** Curva de calibração de desoxinivalenol( $0,05$  a  $2,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) em extrato de farinha de trigo, com a respectiva equação da reta de regressão linear e coeficiente de determinação ( $R^2$ ).  $y$  = área do pico;  $x$  = concentração de desoxinivalenol( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ).

### 3.3. Limites de Detecção e Quantificação

O limite de detecção (LD) do método foi definido como a menor concentração de DON que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada (RIBANI et al. 2004). A partir das análises cromatográficas de padrões em concentrações decrescentes em extrato de farinha de trigo, estabeleceu-se o LD de  $50 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ , sendo a menor concentração que permitiu a visualização inequívoca do pico cromatográfico de interesse. O limite de quantificação (LQ) do método foi definido como a menor concentração de DON que pode ser detectada e quantificada com exatidão e precisão

(RIBANI et al. 2004). A partir das análises cromatográficas de padrões em extrato de farinha de trigo estabeleceu-se o LQ de  $100 \mu\text{g.kg}^{-1}$ , sendo a menor concentração da faixa linear das curvas de calibração avaliadas, a qual permitiu a quantificação de DON com exatidão e precisão.

### **3.4. Exatidão e Precisão**

A exatidão do método foi avaliada empregando os ensaios de recuperação. Amostras de farinha de trigo livres de DON foram adicionadas do padrão da micotoxina em três diferentes níveis de concentração ( $100, 600$  e  $1200 \mu\text{g.kg}^{-1}$ ). A fortificação das amostras de farinha foi realizada por pelo menos 12 horas antes do início das análises, com a finalidade de promover maior interação entre a micotoxina e a matriz. Uma limitação dos ensaios de recuperação é a do padrão adicionado na matriz não estar necessariamente na mesma forma que a micotoxina presente naturalmente na amostra, o que pode resultar em uma melhor detecção e recuperações otimistas do método (INMETRO, 2010) no entanto, os ensaios de recuperação permitem que o analito de interesse seja avaliado na presença de possíveis interferentes, como impurezas e outros componentes da matriz. As porcentagens de recuperação do método variaram de 86 a 96%, com recuperação média de 92,7%. Estas porcentagens de recuperação obtidas foram satisfatórias, uma vez que, se aceita porcentagens de recuperação entre 60 e 120% para concentrações de DON menor ou igual a  $500 \mu\text{g.kg}^{-1}$  e de 70 a 110% para concentrações maiores que  $500 \mu\text{g.kg}^{-1}$  (BRASIL, 2009; THE COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES, 2005).

Ao se avaliar uma amostra de referência certificada de farelo de trigo cujo rótulo indicava ter uma concentração de desoxinivalenol de  $1431 \pm 256 \mu\text{g.kg}^{-1}$ , obteve-se um percentual de recuperação médio de 86,1 ou seja, de  $1012 \mu\text{g.kg}^{-1}$  de desoxinivalenol na amostra. O resultado obtido foi satisfatório, uma vez que, se aceita porcentagens de

recuperação de 70 a 110% para concentrações maiores que  $500 \mu\text{g.kg}^{-1}$ . Também deve ser considerado o fato de que o método foi validado para farinha de trigo e não para farelo de trigo.

A precisão do método analítico foi avaliada mediante ensaios de repetitividade e de precisão intermediária, expressos em termo de desvio padrão relativo. Os ensaios de repetitividade foram realizados com a finalidade de demonstrar a concordância entre os resultados obtidos de sucessivas determinações de DON independentes, empregando o método analítico avaliado. Todas as determinações foram realizadas em um mesmo cromatógrafo líquido, sob as mesmas condições cromatográficas, em um mesmo laboratório, em um curto intervalo de tempo entre as análises, num mesmo dia e pelo mesmo analista. Os desvios padrão relativos, sob as condições de repetitividade, variaram de 3,1 a 9,6%. Os resultados foram satisfatórios, considerando-se os critérios de desempenho de métodos analíticos aceitos no Brasil (BRASIL, 2009) e pela Comunidade Europeia (THE COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES, 2005), sendo de  $\leq 30\%$ , em concentrações inferior ou igual a  $500 \mu\text{g.kg}^{-1}$  de DON e de  $\leq 20\%$ , em concentrações superiores a  $500 \mu\text{g.kg}^{-1}$  de DON.

A precisão intermediária foi avaliada com o propósito de verificar a capacidade do método analítico estudado, em um mesmo laboratório, de fornecer os mesmos resultados da concentração de DON, em diferentes dias de análises. Ensaios de repetitividade empregando o mesmo cromatógrafo líquido, sob as mesmas condições cromatográficas, no mesmo laboratório, pelo mesmo analista, foram realizados em três diferentes dias. Os desvios padrão relativos, sob condição de precisão intermediária, variaram de 3,8 a 19,1%. Observou-se, sob as condições de precisão intermediária, valores de desvio padrão relativo maiores, em relação aos valores obtidos sob as condições de repetitividade. Entretanto, todos esses valores apresentaram-se dentro dos

critérios de desempenho aceitos no Brasil e pela Comunidade Europeia, apresentados anteriormente. De acordo com o INMETRO, 2007, na avaliação da precisão de um método, a precisão intermediária é reconhecida como a mais representativa da variabilidade dos resultados em um mesmo laboratório, desta forma é aconselhável utilizá-la. Os resumos das análises de Exatidão e Precisão constam na Tabela 1.

**Tabela 1.** Porcentagens de recuperação e desvios padrão relativos, sob condição de repetitividade e de precisão intermediária, em amostras de farinha de trigo.

<b>Concentração</b>			
<b>(<math>\mu\text{g.kg}^{-1}</math>)</b>	<b>R (%)</b>	<b>DPR<sub>r</sub>(%)</b>	<b>DPR (%)</b>
<b>100</b>	96	3,1	3,8
<b>600</b>	86	5,2	16,9
<b>1200</b>	96	9,6	19,1

R: %de recuperação média; DPR<sub>r</sub>: desvio padrão relativo sob condições de repetitividade; DPR: desvio padrão relativo sob condições de precisão intermediária.

#### 4. CONCLUSÃO

Os parâmetros de desempenho do método analítico avaliado indicaram seletividade para a micotoxina desoxinivalenol, efeito de matriz, exatidão e precisão, com um baixo limite de detecção e limite de quantificação apropriado para a determinação da micotoxina em amostras de farinha de trigo.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **AOAC**. Official Methods of Analysis of AOAC International, 18<sup>th</sup> ed. Gaithersburg, Maryland, USA: Association of Official Analytical Chemists, 2005.
2. **BRASIL**. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Consulta Pública nº 100, de 21 de Dezembro de 2009. Diário Oficial da União, Brasília. Disponível em: [www.anvisa.gov.br](http://www.anvisa.gov.br) . Acesso em: 29 nov. 2011.
3. **EURACHEM**. The fitness for purpose of analytical methods, a laboratory guide to method validation and related topics. Teddington: LGC, 1998. 61 p.
4. **ICH** (International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use). Validation of analytical procedures: methodology. Geneva: ICH/IFPMA, 1996. 8 p.
5. IHA, M.H.; SOUZA, S.V.C.; SABINO, M. Single-laboratory validation of a liquid chromatography method for the determination of patulin in apple juice. **Food Control**, v. 20, p. 569-574, 2009.
6. **INMETRO** (Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial). DOQ-CGCRE-008. Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos. Rio de Janeiro: INMETRO, 2007. 24 p.
7. **INMETRO** (Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial). DOQ-CGCRE-008. Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos. Rio de Janeiro: INMETRO, 2010. 20 p.
8. **ISO** (International Standard Organization). ISO/IEC 17025. General requirements for the competence of testing and calibration laboratories. Geneva: ISO, 2005. 28 p.

9. RIBANI, M.; BOTTOLI, C.B.G.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F.; MELO, L.F.C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.
10. SOSPEDRA, I.; BLESÁ, J.; SORIANO, J.M.; MAÑES, J. Use of the modified quick easy cheap effective rugged and safe sample preparation approach for the simultaneous analysis of type A- and B-trichothecenes in wheat flour. **Journal of Chromatography A**, n. 1217, p. 1437–1440, 2010.
11. SOUZA, S.V.C. procedimento para validação intralaboratorial de métodos de ensaio: delineamento e aplicabilidade em análise de alimentos [Tese de **Doutorado**]. Belo Horizonte, Minas Gerais: Faculdade de Farmácia da UFMG, 2007.
12. SOUZA, S.V.C.; JUNQUEIRA, R.G. A procedure to assess linearity by ordinary least squares method. **Analytica Chimica Acta**, v. 552, p. 25-35, 2005.
13. THE COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES. Commission Directive 2005/38/EC of 6 June 2005. Laying down the sampling methods and the methods of analysis for the official control of the levels of *Fusarium* toxins in foodstuffs. **Official Journal of the European Union**, 7 Jun. 2005. L43/18.
14. THOMPSON, M.; ELLISON, S.L.R.; WOOD, R. Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis. **Pure and Applied Chemistry**, v. 74, n. 5, p. 835-855, 2002.

## CAPITULO IV – OCORRÊNCIA DE DESOXINIVALENOL EM AMOSTRAS DE FARINHA DE TRIGO BRASILEIRA

### RESUMO

Em julho de 2014, o Departamento de Agricultura dos EUA (USDA) estimou que a produção mundial de trigo nas safras 2014/2015, seria de 705,2 mil toneladas. As condições climáticas das regiões produtoras de trigo no Brasil e nos países tradicionalmente fornecedores favorecem o aparecimento de doenças importantes dessa cultura, dentre elas a fusariose ou giberela, causada principalmente por *Fusarium graminearum*. Além dos danos causados diretamente nas culturas, os grãos infectados podem apresentar contaminação pela micotoxina desoxinivalenol, que é tóxica tanto para o homem quanto para os animais. Estudos sugerem que a presença de DON na alimentação humana causa anorexia e vômitos. O composto foi classificado no Grupo 3 da categoria pela IARC, indicando não ser cancerígeno para os seres humanos, no entanto há estudos que sugerem a administração oral de DON para camundongos causa a incidência de adenocarcinoma de pulmão. Na legislação brasileira, o limite máximo permitido para desoxinivalenol em farinha de trigo é de 1750 µg. kg<sup>-1</sup>. Foram avaliadas 50 amostras de trigo das regiões produtoras do Brasil. Empregou-se o método QUECHERS para extração e purificação das amostras e a quantificação foi por HPLC/UV. Das amostras provenientes do Rio Grande do Sul, 15% (3) apresentaram contaminações que variaram de 1700 a 3689 µg. kg<sup>-1</sup>, com média de 2753 µg. kg<sup>-1</sup>, portanto em desacordo com as legislações brasileira (1750 µg.kg<sup>-1</sup>). Das amostras provenientes do estado do Paraná, 1 (10%) apresentou contaminação de 877 µg. kg<sup>-1</sup> e nenhuma amostra mineira apresentou contaminação detectável, indicando a qualidade do trigo produzido na região. Do total das amostras brasileiras avaliadas, 14% apresentaram contaminações que variaram de 147 a 3688 µg. kg<sup>-1</sup> e 6% apresentaram

média de 2753  $\mu\text{g. kg}^{-1}$ , excedendo os limites permitidos pela legislação brasileira. Por ser um contaminante natural do trigo, DON exerce grande impacto na saúde humana e animal, portanto a ocorrência da micotoxina demonstra a importância do constante monitoramento a fim de se minimizar os riscos à saúde.

**Palavras-chaves:** Deoxinivalenol, Ocorrência, Trigo, Brasil

## 1. INTRODUÇÃO

Segundo a FAO, a produção mundial de grãos nas safras 2013/2014 foi de 2521,1 milhões de toneladas e a produção mundial de trigo na mesma época, foi estimada em 711,4 milhões de toneladas. Em julho de 2014, o Departamento de Agricultura dos EUA (USDA) estimou que a produção mundial de trigo nas safras 2014/2015, seria de 705,2 mil toneladas, redução de 9,03 milhões de toneladas se comparadas ao ano de 2013. A estimativa de produção americana é de 54,2 e a brasileira de 6,3 milhões de toneladas.

A produção nacional de trigo em 2013 foi 22,3 % superior à safra passada, com mais de 5,4 milhões de toneladas. O consumo anual no país tem se mantido em torno de 10 milhões de toneladas, portanto o Brasil é um grande importador de trigo. Dentre os maiores exportadores de trigo podemos citar a Argentina, Austrália, Canadá, Comunidade Econômica Europeia, Rússia, Ucrânia e Estados Unidos.

No ano de 2013, a média de rendimentos das lavouras brasileiras de trigo, segundo a CONAB (Companhia Nacional de abastecimento), foi de 2,4 mil quilos por há (kg/há). No Rio Grande do Sul, no entanto, este número sobe para 2,8 mil quilos, chegando a 6 mil kg/ há nas melhores lavouras. Em Santa Catarina, o clima seco e frio favoreceu a produção, resultando em aumento de 54% em relação ao ano passado, chegando a 215 mil toneladas, de acordo com dados da EPAGRI (Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina), sendo que a média de produtividade das lavouras foi de 4,2 mil kg/ha. Em Minas Gerais o aumento de produção foi de 68% chegando aos 119,8 mil toneladas de trigo de excelente qualidade industrial. Na região de Goiás e Distrito Federal a media de produção foi de 7,2 mil Kg/há. No Paraná, segundo maior produtor de trigo no País, as perdas chegaram a 40% principalmente em função das geadas ocorridas no mês de julho de 2013. Em São Paulo, além das geadas,

o trigo também sofreu com o ataque de pragas, causando perdas acima de 30% (CONAB).

De julho de 2012 a julho de 2013, as importações de trigo do Brasil somaram 7 milhões de toneladas, o maior volume nos últimos seis anos, e os gastos aumentaram 41%, somando US\$ 2,26 bilhões. Com a escassez do grão na Argentina, os Estados Unidos tornaram-se um dos maiores fornecedores. De acordo com a ABITRIGO (Associação Brasileira da Indústria do Trigo), o volume importado aumentou em função da escassez de produção no Paraná e no Rio Grande do Sul, estados onde a produção de trigo nacional está concentrada.

Como a Argentina está enfrentando uma escassez do grão suspendeu as exportações. Em janeiro de 2013, o Brasil importou 481 mil toneladas de grãos do país, em julho chegou apenas a 53 mil, o que representa uma queda de 89%. O Brasil começou a importar o grão do Canadá e Estados Unidos, cujo preço é mais elevado. Durante o primeiro semestre de 2013, o volume de trigo importado dos Estados Unidos aumentou de 10 mil toneladas para 555 mil toneladas.

Em janeiro de 2014, os portos brasileiros receberam 544 mil toneladas de trigo sendo os EUA os principais fornecedores, à frente da Argentina e Uruguai. Apesar da volta da Tarifa Externa Comum (TEC) de 10%, o cereal dos EUA representou 42,4% do trigo desembarcado no Brasil no período, ou 231 mil toneladas. A TEC havia sido suspensa em parte do ano passado devido à escassez do cereal no mercado interno e da quebra de safra na Argentina. Segundo dados da SECEX/MDIC (Secretaria de Comércio Exterior/Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior), do total de 7,0 milhões de toneladas do cereal importadas 3,4 milhões foram de trigo americano. Para não pressionar os preços internos do trigo e de seus derivados, o

governo brasileiro isentou a importação do cereal de fora do Mercosul do recolhimento da TEC, até dezembro de 2012.

Em janeiro 2014 o governo argentino liberou a exportação de 1,5 milhão de toneladas, sendo 137,8 mil toneladas para o Brasil. Outro parceiro brasileiro foi o Uruguai, que elevou em 500% o volume de trigo exportado para o Brasil neste ano. De janeiro a junho, os uruguaios exportaram 631 mil toneladas de trigo para o Brasil.

Segundo o Sindicato da Indústria do Trigo (SINDITRGO), a produção brasileira de trigo em 2014 deverá somar 7,9 milhões de toneladas, segundo o IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística). A produção gaúcha que será comercializada com os estados de Minas Gerais, Rio de Janeiro e São Paulo com o ICMS a 2% é remanescente da safra 2012/13. As dificuldades em escoar a produção e desocupar os silos para armazenamento da nova safra, foram os fatores que incentivaram a redução do imposto. Com relação a Minas Gerais, a expectativa é que não haverá impacto negativo nos preços, pois a produção ainda é pequena em relação à demanda interna. Além disso, o produto mineiro apresenta vantagens, como qualidade superior, menor frete se comparado aos demais estados produtores e a colheita que antecede a safra do Sul do país, garantindo ao produtor preços de entressafra. A demanda pelos moinhos em Minas Gerais gira em torno 500 mil toneladas por ano, sendo que a produção mineira é inferior a 200 mil toneladas. Apesar da qualidade, o crescimento ainda da produção é pequeno, já que o cultivo do cereal ainda não está inserido na cultura do produtor mineiro. Além disso, a oferta de sementes adaptadas ao clima é insuficiente para que ocorra crescimento amplo no curto prazo.

As importações brasileiras, que somaram 6,4 milhões no ano passado, após terem atingido 7 milhões em 2012, devem cair para 5,5 milhões de toneladas neste ano, segundo o Ministério da Agricultura. A produção nacional, após ter ficado em 5,4

milhões de toneladas em 2013, deverá subir para 7,4 milhões em 2014, estima o governo. O aumento se deve à maior área a ser semeada no Paraná e no Rio Grande do Sul.

As condições climáticas das principais regiões produtoras de trigo no Brasil e nos países tradicionalmente fornecedores favorecem o aparecimento de doenças importantes dessa cultura, dentre elas a fusariose ou giberela, causada principalmente por *Fusarium graminearum*, que é um fungo de campo. No Brasil, a fusariose alcançou o status de principal doença nas regiões tritícolas, principalmente na região sul do país (DEL PONTE et al, 2004). Além dos danos causados diretamente nas culturas, os grãos infectados podem apresentar contaminação pela micotoxina desoxinivalenol (DON), que é tóxica tanto para o homem quanto para os animais.

Dentre os tricotecenos, DON é a toxina mais prevalente em todo o mundo, em culturas utilizadas para alimentação humana e animal (LARSEN et al., 2004; SUDAKIN, 2003). Os fungos podem sobreviver no resíduo deixado sobre o campo a partir da colheita da temporada anterior, proporcionando uma fonte de inóculo para a nova safra. Em condições de umidade adequada o fungo pode se desenvolver e a contaminação da cultura se dará quando conídios são disseminados pelo vento atingindo as anteras das flores ou os grãos ainda imaturos (RICHARD, 2007 apud HOSSEINI & BAGHERI, 2012).

Vários gêneros de fungos são capazes de produzir DON, e a maioria tem sido isolado de *Fusarium* spp, principalmente por *Fusarium graminearum*. Nivalenol foi encontrado associado a DON e derivados acetilados produzidos por *F. graminearum*, *F. cerealis*, *F. culmorum* no sul e por *F. poae* no norte da Europa. Além disso, *F. verticillioides* também tem sido relatado. Entretanto sabe-se que outros gêneros de

fungos também podem produzir tricotecenos como: *Trichoderma*, *Stachybotrys* e *Myrothecium* (MENEELY et al., 2011).

Freqüentemente DON ocorre em trigo, milho, cevada, aveia e centeio, assim como em grãos de malte processados, cerveja e pães (CAST, 2003). Além disso, é um composto muito estável em pH entre 1 e 10 e temperatura de 150°C durante o processamento/cozimento de alimentos (LAUREN & SMITH, 2001).

Estudos sugerem que a presença de DON na alimentação humana causa anorexia e vômitos (PESTKA & SMOLINSKI, 2005). O composto foi classificado no Grupo 3 da categoria pela IARC (1993), indicando ser "não cancerígeno para os seres humanos", no entanto os estudos de Huang et al (2004), sugerem que a administração oral de DON para camundongos causa a incidência de adenocarcinoma de pulmão. Como é uma das micotoxinas mais comumente encontradas em grãos, quando ingerido em doses elevadas por animais, causa náuseas, vômitos e diarreia. Se ingerida por porcos e por outros animais, em pequenas doses, pode provocar perda de peso e recusa alimentar. Por induzir esses sintomas desoxinivalenol é conhecido como vomitoxina ou fator de recusa de alimento (MILLER et al., 2001).

A União Europeia impôs limites máximos de DON em cereais e produtos à base de cereais que variam de 200-1750  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ . (CE 1881/2006). No Brasil, a Resolução - RDC N°7, de 18 de Fevereiro de 2011 (Tabela 1) dispõe sobre limites máximos tolerados (LMT) para as micotoxinas Aflatoxinas (B1, B2, G1, G2), Ocratoxina A, Patulina, Desoxinivalenol, Fumonisinias (B1, B2) e Zearalenona, para algumas categorias de alimentos e matérias-primas. O critério para entrada em vigor imediatamente da norma foi de não haver problemas sérios em relação ao controle da contaminação e pelo reconhecimento da necessidade de se ter alimentos infantis de melhor qualidade. Segundo a Norma, o limite máximo tolerado para DON em alimentos

a base de cereais para alimentação infantil (lactentes e crianças de primeira infância) é de  $200\mu\text{g.kg}^{-1}$ . Em janeiro de 2012, os limites para DON foram estabelecidos para o restante das categorias de alimentos de interesse. Para matérias-primas a Resolução entraria em vigor em 2014. Em 2016 haveria a redução dos limites em relação àqueles estabelecidos em 2012, de forma a aproximá-los do que hoje está definido em outros países. Este escalonamento de prazos deveu-se a solicitação anterior do MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento) e do setor produtivo, a fim de que os setores pudessem se adequar.

Tabela 1- Limites máximos tolerados (LMT) para Desoxinivalenol em alimentos, segundo a resolução - RDC N°7, DE 18 de fevereiro de 2011.

<b>ANEXO II – Aplicação em janeiro de 2012</b>	
Desoxinivalenol (DON)	Limite Máximo Tolerado ( $\mu\text{g. kg}^{-1}$ )
Trigo integral, trigo para quibe, farinha de trigo integral, farelo de trigo, farelo de arroz, grão de cevada.	2000
Farinha de trigo, massas, crackers, biscoitos de água e sal, e produtos de panificação, cereais e produtos de cereais exceto trigo e incluindo cevada malteada.	1750
<b>ANEXO III - Aplicação em janeiro de 2014</b>	
Desoxinivalenol (DON)	Limite Máximo Tolerado ( $\mu\text{g. kg}^{-1}$ )
Trigo e milho em grãos para posterior processamento.	3000
Trigo integral, trigo para quibe, farinha de trigo integral, farelo de trigo, farelo de arroz, grão de cevada.	1500
Farinha de trigo, massas, crackers, biscoitos de água e sal, e produtos de panificação, cereais e produtos de cereais exceto trigo e incluindo cevada malteada.	1250
<b>ANEXO IV – Aplicação em janeiro de 2016</b>	
Desoxinivalenol (DON)	Limite Máximo

	Tolerado ( $\mu\text{g. kg}^{-1}$ )
Trigo integral, trigo para quibe, farinha de trigo integral, farelo de trigo, farelo de arroz, grão de cevada.	1000
Farinha de trigo, massas, crackers, biscoitos de água e sal, e produtos de panificação, cereais e produtos de cereais exceto trigo e incluindo cevada malteada.	750

Mas em 2013, foi solicitada pelo setor produtivo à ANVISA a extensão até o ano de 2017 dos Limites Máximos estabelecidos no ano de 2012 para a Micotoxina DON em trigo e seus derivados. O setor se comprometeu a realizarum planejamento da obtenção e apresentação dos dados à ANVISA, necessários para o refinamento da avaliação de risco e revisão dos limites, caso necessário. Devido ao exposto, a ANVISA prorrogou para 1º de janeiro de 2017 o prazo para adequação estabelecidos nos artigos 11 e 12 e respectivos anexos III e IV da Resolução - RDC nº 7, de 18 de fevereiro de 2011, que dispõe sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos. A prorrogação dos prazos consta na Resolução – RDC nº 59, de 26 de dezembro de 2013, publicada no Diário Oficial da União de 30 de dezembro de 2013.

De modo a avaliar se a qualidade do trigo produzido no Brasil está de acordo com o Regulamento brasileiro, este trabalho tem como objetivo avaliar a presença de desoxinivalenol em farinhas de trigo obtidas de grãos produzidos nas regiões do Rio Grande do Sul, Paraná e Minas Gerais. Para tanto será empregado o método validado *QuEChERS* para a extração e a cromatografia líquida de alta eficiência com detecção de UV para quantificação.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1. Material**

#### **2.1.1. Farinha de trigo**

As amostras de farinha de trigo foram fornecidas pela EMBRAPA Soja e EMBRAPA Trigo (Passo Fundo/RS), cultivadas em campos experimentais, na safra de 2012. Foram avaliadas 20 amostras do estado do Rio Grande do Sul (abrangendo as cidades de Santo Augusto, São Borja e São Luiz Gonzaga), 10 do estado do Paraná (cidades de Ponta Grossa, Cascavel e Wartha) e 20 de Minas Gerais (cidades de Madre de Deus, São Gotardo, Perdizes e Uberaba). As amostras foram embaladas em sacos plásticos e armazenadas a temperatura de  $-18^{\circ}\text{C}$  até o momento das análises.

### **2.1.2. Padrão e Reagentes**

O padrão desoxinivalenol (98% de pureza) foi adquirido da Sigma-Aldrich, Inc. (St. Louis, MO, USA). Acetonitrila e metanol, grau CLAE, foram adquiridos da J.T. Baker, Mallinckrodt Baker, Inc. (Phillipsburg, NJ, USA). Cloreto de sódio da Merck S.A. (Rio de Janeiro, RJ, Brasil) e sulfato de magnésio anidro da Sigma-Aldrich, Inc. (St. Louis, MO, USA) e PSA (Bondesil-PSA 40um) da Agilent (USA). Membranas de  $0,22\ \mu\text{m}$  Millex (Millipore, Barueri, SP, Brasil). A água utilizada nas análises cromatográficas foi obtida através de sistema de ultra-purificação Millipore MilliQ system (Millipore, Milford, MA, USA).

### **2.1.3. Solução Padrão de Desoxinivalenol**

O padrão de desoxinivalenol (5 mg) foi dissolvido em 5 mL de solução de acetonitrila obtendo uma solução estoque de  $1000\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , de acordo com a AOAC (2005). A partir desta solução, preparou-se solução trabalho de  $20\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Todas as soluções foram secas com  $\text{N}_2$  e estocadas a  $-18^{\circ}\text{C}$ . As soluções de trabalho foram quantificadas pelo método de espectroscopia no UV, segundo Widstrand e Pettersson, 2001.

## **2.2. Métodos**

### **2.2.1. Teor de Umidade**

O teor de umidade das amostras de farinha de trigo foi determinado por gravimetria empregando balança de infravermelho modelo ID 200 (Marte®, SP, Brasil). Foram pesados 3,00 g da farinha e a porcentagem de umidade da amostra era informada automaticamente pelo equipamento.

## **2.2.2. Determinação de Desoxinivalenol**

### **2.2.2.1. Extração e Purificação**

Foi utilizado o método *QuEChERS* (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged e Safe) empregado por Sospedra et al. (2010), com algumas modificações. Na etapa de extração, foram adicionados 5 g de amostra de farinha de trigo, 10 mL de solução de metanol:acetonitrila (85:15), em um tubo de centrifugação Nalgene® (Thermo Scientific, Rochester, NY, USA) de 50 mL, adição de 2,5g de sulfato de magnésio anidro e 0,8g de cloreto de sódio, seguido de agitação em vótex por 2,5 min. e centrifugação à 4000 rpm por 9 min. Na etapa de purificação, 3 mL do sobrenadante obtido na etapa de extração mais 300 mg sulfato de magnésio anidro e 100 mg de PSA foram adicionados em tubo para centrifugação de 50 mL, e este agitado em vórtex por 1 min. e centrifugado à 4000 rpm por 9 min. Uma vez purificado, o extrato foi seco com N<sub>2</sub>, resuspendido na fase móvel e filtrado em membrana de 0,22 antes da injeção no HPLC.

### **2.2.2.2. Análise Cromatográfica**

Na separação, identificação e quantificação do desoxinivalenol empregou-se um cromatógrafo a líquido de alta eficiência (Shimadzu, Kioto, Japão), com sistema quaternário de bombeamento de solvente, modelo LC 10AT VP, detector de UV SPD-M10A vp, injetor automático SIL 10A, e coluna cromatográfica ODS Hypersil de 250 mm de comprimento, 4,6 mm de diâmetro interno e partículas de 3 µm (Thermo, Reino Unido). A temperatura manteve-se a 40°C e o tempo de corrida foi de 15 minutos. A

fase móvel empregada foi acetonitrila:água (10:90 v/v), com o pH da água ajustado a 6,7 com solução de NaOH 0,01M. Com eluição isocrática, vazão 0,6mL/min e volume injetado de 50 µL.

### **2.2.2.3. Detecção e Quantificação de Desoxinivalenol**

A detecção de DON foi realizada através da comparação entre os tempos de retenção da amostra e do padrão e a quantificação através do método de padronização externa, utilizando-se as áreas dos picos cromatográficos. Empregou-se uma curva de calibração em extrato da farinha na faixa de 100 a 2000 µg.kg<sup>-1</sup>, cuja linearidade e efeito de matriz foram comprovados.

## **3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Entende-se por farinha de trigo o produto obtido a partir da espécie *Triticum seativan* ou de outras espécies do gênero *Triticum* reconhecidas (exceto *Triticum durum*) através do processo de moagem do grão de trigo beneficiado. A farinha obtida poderá ser acrescido outros componentes, de acordo com o especificado na presente Norma. O teor de umidade do produto deverá ser regulado pelas Boas Práticas de Fabricação não podendo exceder a 15,0% (ANVISA, 1996). Todas as amostras apresentaram teores de umidade abaixo de 13%, portanto estavam em conformidade com a Portaria citada.

Sob as condições empregadas, o tempo de retenção de DON foi de 8,2±0,1 min. Empregou-se a curva de matriz nas concentrações de 100 a 2000 µg.kg<sup>-1</sup> e a equação da reta de regressão linear da curva de calibração empregada na quantificação de desoxinivalenol em farinha de trigo foi  $y = 41946 + 3267,1x$  onde  $y$  = área do pico cromatográfico e  $x$  = concentração de desoxinivalenol (µg.kg<sup>-1</sup>), com coeficiente de

determinação ( $R^2$ ) de 0,9940. A curva de matriz foi empregada para compensar o efeito de possíveis interferentes da amostra na detecção do DON.

Os limites de detecção e de quantificação foram de 50 e 100 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ , respectivamente. As recuperações foram obtidas fortificando-se as amostras de farinha com concentrações de 100, 600 e 1200  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  de DON, analisadas em triplicata. As recuperações foram de: 96, 86 e 96% , com média de 92,7% de recuperação.

Das 20 amostras provenientes do Rio Grande do Sul, 30% (6) apresentaram contaminações que variaram de 143 a 3689  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  (Tabela 2). Destas, 15% (3) apresentaram contaminações que variaram de 1700 a 3689  $\mu\text{g. kg}^{-1}$ , com média de 2753  $\mu\text{g. kg}^{-1}$ , portanto em desacordo com as legislações brasileira (1750  $\mu\text{g. kg}^{-1}$ ) e europeia de 750  $\mu\text{g. kg}^{-1}$  (RDC 1881/2006). As amostras também estariam em desacordo com a Resolução-RDC nº 7, se atualizada no ano de 2014, para 1250 $\mu\text{g. kg}^{-1}$ .

Verificou-se que das 10 amostras provenientes do estado do Paraná, 1 (10%) apresentou contaminação por desoxinivalenol, com nível de 877  $\mu\text{g. kg}^{-1}$ , estando de acordo com a legislação brasileira, mas em excedendo a legislação europeia.

Das 20 amostras provenientes de Minas Gerais nenhuma apresentou contaminação detectável indicando a qualidade das mesmas para os parâmetros avaliados, embora a produção seja pequena se comparada com as outras regiões produtoras como Rio Grande do Sul, Paraná e Santa Catarina.

Do total das amostras avaliadas, 14% apresentaram contaminações que variaram de 147 a 3688 $\mu\text{g. kg}^{-1}$  e 6% apresentaram média de 2753  $\mu\text{g. kg}^{-1}$ , excedendo os limites permitidos pela legislação brasileira e europeia.

Tabela 2 - Níveis de Desoxinivalenol em amostras de farinha de trigo dos estados do Rio Grande do Sul, Paraná e Minas Gerais – Brasil(safras - 2012).

Estado	n de amostras	Frequência	Amostras positivas	Média de contaminação das amostras positivas
		n(%)	( $\mu\text{g. kg}^{-1}$ )	( $\mu\text{g. kg}^{-1}$ )
Paraná	10	1 (10)	877	-
Rio G. do Sul	20	6 (30)	3689 143 175 460 1700 2871	1506,3
Minas Gerais	20	nd*	-	-
TOTAL	50	7 (14)	143-3689	1416,4

\*não detectado

Savi et al. (2014) avaliaram a ocorrência de DON em amostras de trigo do sul do Brasil, safra 2012 e encontraram DON em 47,2% das amostras em níveis que variaram de 243,7 a 2.281,3  $\mu\text{g. kg}^{-1}$ . Santos et al. (2013) avaliaram o trigo do estado do Paraná e encontraram 66,4% de amostras contaminadas com DON em concentrações que variaram de 206,3 a 4732,3  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ . Em 2007, Calori-Domingues et al. avaliaram 50 amostras de trigo provenientes dos estados de São Paulo, Paraná e Rio Grande do Sul e 94% dos grãos estavam contaminados com DON em níveis de 90-4573  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ . Outro estudo feito em São Paulo apresentou contaminação por DON em 45% das 42 amostras de trigo analisadas em níveis que variaram de 82 a 1500 $\mu\text{g.kg}^{-1}$  (Lamardo et al., 2006). Um estudo brasileiro realizado por Baraj & Furlong (2003), avaliou a incidência de DON em 112 amostras de farinhas de trigo e verificaram que apenas 1,8% das amostras

de trigo estavam contaminadas, em níveis de 128 a 323  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ . Ennouari et al. (2013), ao avaliarem trigo no Marrocos encontraram em 11,1% das amostras DON em níveis que variaram 321 a 1310  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  e Mishra et al., (2013) encontrou 40% de positividade para DON em amostras de cereais que variaram de 70 a 4730  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ .

#### **4. CONCLUSÃO**

As amostras do Rio Grande do Sul apresentaram maior contaminação se comparado aos estados do Paraná e Minas Gerais, com 15% das amostras excedendo os limites da legislação brasileira.

As amostras paranaenses apresentaram 10% das amostras contaminadas, mas não excederam os limites da legislação brasileira.

As amostras mineiras não apresentaram contaminação por DON, demonstrando a qualidade das amostras para os parâmetros avaliados.

Por ser um contaminante natural do trigo, DON exerce grande impacto na saúde humana e animal. Portanto, a ocorrência do contaminante no Rio Grande do Sul e no Paraná, mesmo que em concentrações baixas, em alguns casos, demonstra a importância do constante monitoramento da micotoxina em todas as regiões produtoras a fim de se minimizar os riscos à saúde.

#### **5. AGRADECIMENTO**

Os autores agradecem à Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) de Passo Fundo/RS pelo fornecimento das amostras de farinha de trigo.

## 6. REFERÊNCIAS

1. **AOAC**. Official Methods of Analysis of AOAC International, 18th ed. Gaithersburg, Maryland, USA: Association of Official Analytical Chemists, 2005.
2. BARAJ, E.; FURLONG, E.B. Procedimento para determinação simultânea dos tricotecenos desoxinivalenol e toxina T-2 / Procedure for simultaneous determination of trichothecenes: deoxynivalenol and T-2 toxin. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 62(2): 95-104, 2003
3. **BRASIL**, 2013. RESOLUÇÃO - RDC Nº 59 de 26 de dezembro de 2013. Prorrogação dos prazos estabelecidos nos artigos 11 e 12 e respectivos anexos III e IV da Resolução da Diretoria Colegiada RDC n. 7, de 18 de fevereiro de 2011 que dispõe limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos. Brasília, 2013. Acessado em 14 de fevereiro de 2014. Disponível em <http://www.sgc.goias.gov.br/upload/arquivos/2014-01/diario-oficial---rdc-59.pdf>
4. **BRASIL**, 2011. RESOLUÇÃO - RDC Nº7, de 18/02/2011. Dispõe sobre os limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos (Internet). Acessado em 14 de fevereiro de 2014. Disponível em <https://www.anvisa.gov.br>.
5. CALORI-DOMINGUES M.A.; ALMEIDA R.R.; TOMIWAKA M.M.; GALLO C.R.; GLORIA E.M.; DIAS C.T.S. Ocorrência de desoxinivalenol em trigo nacional e importado utilizado no Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 7, 181-5, 2007.

6. CAST. Mycotoxins: Risks in Plant, Animal and Human Systems. Task Force Report N. 139. **Council for Agricultural Science and Technology**, Ames, Iowa, USA, 2003.
7. COMMISSION REGULATION (EC) No 1881/2006, of 10 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. **Official Journal of the European Union**, L364: 5-24.
8. DEL PONTE, E.M.; FERNANDEZ, J.M.C.; PIEROBOM, C.R., BERGSTROM, G.C. Giberela do trigo – aspectos epidemiológicos e modelos de previsão. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.29, p.587-605, 2004.
9. ENNOUARI, A.; SANCHIS, V.; MARÍN, S.; RAHOUTI, M.; ZINEDINE, A. Occurrence of deoxynivalenol in durum wheat from Morocco. **Food Control**, n. 32, p. 115-118, 2013.
10. HOSSEINI, S.S.; BAGHERI, R. Some major Mycotoxin and their Mycotoxicoses in nuts and dried fruits. **Intl. J. Agron. Plant. Prod.**, v. 3, n. 5, p. 179-184, 2012.
11. HUANG, X. H., ZHANG, X. H., LI, Y. H., WANG, J. L., YAN, X., XING, L. X. Carcinogenic effects of sterigmatocystin and deoxynivalenol in NIH mice. **Chinese Journal of Oncology**, v. 26, n. 12, p. 705-708, 2004.
12. **IARC** (International Agency for Research on Cancer). Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans; some naturally occurring substances, food items and constituents. In Heterocyclic aromatic amines and mycotoxins, Vol. 56. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer, World Health Organization, 1993.

13. LAMARDO, L. C. A.; NAVAS, S.; SABINO, M. Desoxinivalenol (DON) em trigo e farinha de trigo comercializados na cidade de São Paulo. **Revista do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo**, v. 65, n. 1, p. 32-35, 2006.
14. LARSEN, J. C.; HUNT, J.; PERRIN, I.; RUCKENBAUER, P. (2004). Workshop on trichothecenes with a focus on DON: summary report. **Toxicology Letters**, v. 153, n. 1, p. 1-22, 2004.
15. LAUREN, D. R.; SMITH, W. A. Stability of the Fusarium mycotoxins nivalenol, deoxynivalenol and zearalenone in ground maize under typical cooking environments. **Food Additive Contamination**, v. 18, n. 11, p. 1011-1016, 2001.
16. MENEELY, J.P.; RICCI, F.; VAN EGMOND, H.P.; ELLIOTT, C.T. Current methods of analysis for the determination of trichothecene mycotoxins in food. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 30, n. 2, 2011.
17. MILLER, D.J. Factors that affect the occurrence of fumonisin. **Environ Health Persp**, n. 109, p. 321–324, 2001.
18. MISHRA, S.; ANSARI, K. M.; DWIVEDI, P. D.; PANDEY, H. P., DAS, M. Occurrence of deoxynivalenol in cereals and exposure risk assessment in Indian population. **Food Control**, n. 30, p. 549-555, 2013.
19. PESTKA, J. J.; SMOLINSKI, A. T. Deoxynivalenol: toxicity and potential effects on humans. **Journal of Toxicology and Environmental Health: Part B, Critical Reviews**, n. 8, p. 39-69, 2005.
20. RICHARD, J.L. Some major mycotoxins and their mycotoxicoses - An overview. **International Journal of Food Microbiology**, n. 119, p. 3– 10, 2007.

21. SANTOS, J.S.; SOUZA, T. M.; ONO, E. Y. S.; HASHIMOTO, E. H.; BASSOI, M. C.; MIRANDA, M. Z. D.; ITANO, E. N.; KAWAMURA, O.; HIROOKA, E. Y. Natural occurrence of deoxynivalenol in wheat from Paraná State, Brazil and estimated daily intake by wheat products **Food Chem.**, v. 138, p. 90– 95, 2013.
22. SAVI, G. D.; PIACENTINI, K. C.; TIBOLA, C. S.; SCUSSEL V. M. Mycoflora and deoxynivalenol in whole wheat grains (*Triticum aestivum* L.) from Southern Brazil. **Food Additives & Contaminants: Part B: Surveillance** v.7, I. 3, p. 232-237, 2014.
23. SUDAKIN, D. L. Trichothecenes in the environment: relevance to human health. **Toxicology Letters**, n. 143, p. 97-107, 2003.

## **CONCLUSÃO FINAL**

- Conseguiu-se desenvolver um método de extração e purificação que fosse fácil, rápido, barato, efetivo, seguro e robusto para determinação de DON em farinha de trigo, com porcentagem de recuperação médias que variaram de 83 a 110%.
- O método desenvolvido possui seletividade, limite de quantificação baixo, exatidão e precisão.
- Das amostras avaliadas do Rio Grande do Sul, 15% (3) estavam fora dos limites máximos permitidos pela legislação.
- O método proposto atende aos limites máximos permitidos pela legislação brasileira vigente.