

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

ANA CRISTINA BARBOSA

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE UMA METODOLOGIA ANALÍTICA
PARA ANÁLISE DE MICOTOXINAS EM CERVEJA UTILIZANDO QuEChERS E
UHPLC-MS/MS**

Belo Horizonte - MG

2019

UFMG/ICEx/DQ.1.377^a

D.747^a

Ana Cristina Barbosa

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE UMA METODOLOGIA ANALÍTICA
PARA ANÁLISE DE MICOTOXINAS EM CERVEJA UTILIZANDO QuEChERS E
UHPLC-MS/MS**

Dissertação apresentada ao Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Química – Química Analítica.

Orientador: Prof^o Dr. Rodinei Augusti

Belo Horizonte - MG

2019

Ficha Catalográfica

B238d Barbosa, Ana Cristina
2019 Desenvolvimento e validação de uma metodologia
D analítica para análise de micotoxinas em cerveja
utilizando QuEChERS e UHPLC-MS/MS [manuscrito] / Ana
Cristina Barbosa. 2019.
[xiv], 96 f. : il.

Orientador: Rodinei Augusti.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Minas Gerais - Departamento de Química.
Inclui bibliografia.

1. Química analítica - Teses 2. Micotoxinas - Teses
3. Cerveja - Contaminação - Teses 4. Segurança
Alimentar - Teses 5. Preparação de amostra (Química) -
Teses 6. Extração (Química) - Teses 7. Cromatografia
líquida de alta eficiência - Teses 8. Espectrometria
de massa - Teses I. Augusti, Rodinei, Orientador II.
Título.

CDU 043



"Desenvolvimento e Validação de uma Metodologia Analítica para Análise de Micotoxinas em Cerveja Utilizando QuEChERS e UHPLC-MS/MS"

Ana Cristina Barbosa

Dissertação aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:

Prof. Rodinei Augusti - Orientador
UFMG

Prof. Fabiano Aurélio da Silva Oliveira
Instituto Mineiro de Agropecuária

Profa. Mariana Ramos de Almeida
UFMG

Belo Horizonte, 18 de dezembro de 2019.

AGRADECIMENTOS

Essa é a última página que escrevo na dissertação e com o coração repleto de gratidão por tudo o que aconteceu nessa jornada, tentarei expressar em palavras os agradecimentos a todas as pessoas que fizeram parte dessa conquista.

Bom, primeiramente gostaria de agradecer a Deus por me permitir vivenciar esse momento único na minha carreira e por decidir o momento certo em que ele deveria acontecer. Foram realmente momentos de muita provação, afinal de contas, cinco tentativas de ingresso para conseguir êxito na aprovação, somente para brasileiros persistentes.

Agradeço ao meu companheiro Walisson, por sempre me apoiar, me incentivar e me mostrar que sou capaz, mesmo quando duvido da minha própria capacidade. Obrigada pela paciência, principalmente nesses últimos meses e por vivenciar comigo esse momento tão importante.

Aos meus pais, irmãos e minha lindíssima sobrinha Lavínia, pelo incentivo e pela compreensão às minhas ausências em algumas reuniões de família, necessárias para a conclusão deste trabalho. Vocês são os grandes responsáveis por todas as minhas conquistas.

Aos meus tios e tias que estão sempre na torcida pelo meu crescimento profissional.

Ao professor Rodinei Augusti por ter me aceitado em seu grupo de pesquisa e pelos ensinamentos, não só acadêmicos, mas de respeito, gentileza e hombridade.

A todo o grupo do laboratório 167, em especial ao Lucas Pinto por ter contribuído tanto para a execução deste trabalho.

Ao pessoal do LACQSA, pelo auxílio na realização deste trabalho em especial ao Fabiano pelas explicações e ensinamentos.

Ao CEFET-MG e aos chefes do DeQui, Pierre De Brot e Ildefonso Binatti, pela concessão de horário especial durante o curso.

Aos meus amigos técnicos administrativos do DeQui do CEFET-MG, Carol, Pablo, Mari e Jéssica pela compreensão, incentivo e auxílio durante essa jornada.

A todos vocês meus sinceros agradecimentos e gratidão, sem a ajuda de vocês a conclusão deste trabalho não teria sido possível.

RESUMO

Este estudo relata os resultados obtidos com o desenvolvimento e validação de um método analítico para a determinação e quantificação simultânea de dezenove micotoxinas em cervejas, comercializadas em mercados de Belo Horizonte. Foi utilizado uma metodologia empregando QuEChERS, com acetonitrila como solvente, sem acidificação da amostra. O equipamento utilizado para a análise do extrato foi um cromatógrafo líquido de ultra-alta performance acoplado com espectrômetro de massas sequencial (UHPLC-MS/MS). O espectrômetro de massas operou no modo positivo e negativo sendo escolhidas duas transições para cada analito. A validação foi baseada no Manual de Garantia da Qualidade Analítica: Resíduos e Contaminantes em Alimentos, nas Diretivas CE 401/2006 e 2002/657/CE e nos documentos SANTE 11813/2017 e 12089/2016, sendo avaliadas as seguintes figuras de mérito: seletividade, efeito matriz, linearidade, veracidade e precisão intermediária, limites de detecção e quantificação e incerteza de medição. A metodologia mostrou-se seletiva para dezessete das dezenove micotoxinas sob investigação. O efeito matriz foi observado para 79% dos analitos. A linearidade e a recuperação foram avaliadas utilizando extrato de matriz branco fortificado, sendo que a metodologia escolhida se mostrou eficiente para os dezessete analitos, com recuperações que variaram de 56 a 118%. A precisão do método foi avaliada em termos de repetitividade e precisão intermediária e os valores calculados utilizando a equação de Horwitz. Os limites de detecção e quantificação foram determinados a partir dos valores de $CC\alpha$ e $CC\beta$, respectivamente para evitar que estes limites ficassem abaixo dos compreendidos pela curva de calibração. As incertezas das medições foram baseadas na metodologia *bottom-up*. Por fim, foram testadas dez amostras obtidas em comércio local das cervejas dos tipos Pilsen, Lager, de trigo e sem álcool, não sendo observadas ocorrências de contaminação nas amostras. Avalia-se que a metodologia proposta para análise de micotoxinas em cerveja apresentou-se adequada para determinação de dezessete das dezenove micotoxinas em estudo, sendo promissora para ser utilizada em análises fiscais para o controle de qualidade e segurança alimentar, seguindo as principais normativas nacionais e internacionais de qualidade analítica.

PALAVRAS-CHAVE: Micotoxinas, validação, QuEChERS, Cerveja, Contaminação, Segurança Alimentar.

ABSTRACT

This study reports the results obtained with the development and validation of an analytical method for the simultaneous determination and quantification of nineteen mycotoxins in beers marketed in Belo Horizonte markets. A methodology was employed employing QuEChERS, with acetonitrile as solvent, without acidifying the sample. The equipment used for extract analysis was an ultra-high performance liquid chromatograph coupled with sequential mass spectrometer (UHPLC-MS / MS). The mass spectrometer operated in positive and negative mode and two transitions were chosen for each analyte. Validation was based on the Analytical Quality Assurance Manual: Food Waste and Contaminants, EC Directives 401/2006 and 2002/657 / EC and SANTE 11813/2017 and 12089/2016, and the following merit figures were assessed: selectivity, matrix effect, linearity, intermediate truth and accuracy, detection and quantification limits and measurement uncertainty. The methodology was selective for seventeen of the nineteen mycotoxins under investigation. The matrix effect was observed for 79% of the analytes. Linearity and recovery were evaluated using fortified white matrix extract, and the chosen methodology was efficient for the seventeen analytes, with recoveries ranging from 56 to 118%. The accuracy of the method was evaluated in terms of repeatability and intermediate precision and the values calculated using the Horwitz equation. The detection and quantification limits were determined from the $CC\alpha$ and $CC\beta$ values, respectively, to prevent these limits from falling below the calibration curve. Measurement uncertainties were based on the bottom-up methodology. Finally, ten samples obtained from local commerce of Pilsen, Lager, wheat and non-alcoholic beers were tested, and no contamination occurred in the samples. It is evaluated that the proposed methodology for mycotoxin analysis in beer was adequate to determine seventeen of the nineteen mycotoxins under study, promising to be used in fiscal analysis for quality control and food safety, following the main national and international regulations. international quality standards.

KEYWORDS: Mycotoxins, Validation, QuEChERS, Beer, Contamination, Food Safety.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: FLUXOGRAMA DE PROCESSO GENÉRICO DA PRODUÇÃO DE CERVEJA.....	6
FIGURA 2: ESTRUTURAS QUÍMICAS DAS MICOTOXINAS: (A) AFLATOXINA B1; (B) AFLATOXINA B2; (C) AFLATOXINA G1; (D) AFLATOXINA G2.....	8
FIGURA 3: ESTRUTURAS QUÍMICAS DAS MICOTOXINAS: (A) DEOXINIVALENOL (B) TOXINA T-2.....	9
FIGURA 4: ESTRUTURA QUÍMICA DA MICOTOXINA FUMONISINA B1.....	10
FIGURA 5: ESTRUTURA QUÍMICA DA OCRATOXINA A.....	10
FIGURA 6: ESTRUTURA QUÍMICA DA ZEARALENONA.....	11
FIGURA 7: ESTRUTURA QUÍMICA DA (A) CITRININA E (B) CITRIOVIRIDINA.....	12
FIGURA 8: REPRESENTAÇÃO DA CLASSIFICAÇÃO DOS ALCALÓIDES DE ERGOT. (A) ERGOLINA TETRACÍCLICA, (B) AGROCLAVINA, (C) ERGONOVINA E (D) ERGOCORNINA.....	12
FIGURA 9: EPÍMEROS (A) ERGOCRISTINA E (B) ERGOCRISTININA.....	13
FIGURA 10: ESTRUTURAS QUÍMICAS DOS ALCALOIDEOS DE ERGOT: (A) ERGONOVINA, (B) ERGOTAMINA, (C) ERGOSINA, (D) ERGOCRISTINA, (E) ERGOCORNINA E (F) A-ERGOCRIPTINA.....	13
FIGURA 11: ESTRUTURA QUÍMICA DO ÁCIDO PENICÍLICO.....	15
FIGURA 12: REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA SOBRE O MÉTODO QUECHERS.....	22
FIGURA 13: REPRESENTAÇÃO DO GRADIENTE DE ELUIÇÃO.....	40
FIGURA 14: DIAGRAMA DE CAUSA E EFEITO PARA O CÁLCULO DE INCERTEZA DO MÉTODO.....	55
FIGURA 15: RESULTADOS DA EFICIÊNCIA MÉDIA DE EXTRAÇÃO X RESÍDUOS NÃO VOLÁTEIS.....	58
FIGURA 16: GRÁFICO DE PARETO OBTIDO COM O PLANEAMENTO DE EXPERIMENTOS DO MÉTODO QUECHERS.....	61
FIGURA 17: ESTIMATIVA DAS ÁREAS MÉDIAS DOS PICOS CROMATOGRÁFICOS DAS MICOTOXINA EM RELAÇÃO A MELHOR CONDIÇÃO DE EXTRAÇÃO.....	61
FIGURA 18: REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO PROCEDIMENTO DE EXTRAÇÃO OTIMIZADO PARA ANÁLISE DE MICOTOXINAS EM AMOSTRAS DE CERVEJA.....	63
FIGURA 19: RELAÇÃO DE ÍONS DAS MICOTOXINAS: CITRININA (A) ÁCIDO PENICÍLICO (B) E AFLATOXINA B2 (C).....	66
FIGURA 20: CROMATOGRAMAS DAS AMOSTRAS BRANCO E NO MENOR PONTO DA CURVA.....	68
FIGURA 21: RECUPERAÇÕES OBTIDAS PARA OS QUATRO NÍVEIS DE FORTIFICAÇÃO DAS MICOTOXINAS EM CONDIÇÃO DE PRECISÃO INTERMEDIÁRIA, BEM COMO SUAS RECUPERAÇÕES MÁXIMAS E MÍNIMAS.....	76
FIGURA 22: ESTIMATIVA DE REPETIBILIDADE PARA NÍVEL BAIXO DE FORTIFICAÇÃO OBTIDO EM ENSAIOS DE RECUPERAÇÃO.....	79
FIGURA 23: ESTIMATIVA DE PRECISÃO INTERMEDIÁRIA OBTIDO EM ENSAIOS DE RECUPERAÇÃO.....	79

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: REVISÃO DA LITERATURA SOBRE ANÁLISE DE MICOTOXINAS EM CERVEJA	18
TABELA 2: IDENTIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS OBTIDAS EM COMÉRCIO LOCAL	29
TABELA 3: IDENTIFICAÇÃO DOS ANALITOS SOB INVESTIGAÇÃO.	31
TABELA 4: CONCENTRAÇÕES DAS SOLUÇÕES ESTOQUE DAS MICOTOXINAS.....	37
TABELA 5: CONCENTRAÇÃO DAS MICOTOXINAS NO POOL.	38
TABELA 6: VARIÁVEIS AVALIADAS NO PLANEJAMENTO DE EXPERIMENTOS DO MÉTODO QUECHERS	42
TABELA 7: CONCENTRAÇÃO DAS MICOTOXINAS NO EXTRATO DA MATRIZ BRANCA FORTIFICADO PARA ELABORAÇÃO DE CURVA DE CALIBRAÇÃO EM RELAÇÃO À QUANTIDADE DE ANALITO NA CERVEJA E EM EXTRATO.	46
TABELA 8: DILUIÇÕES REALIZADAS PARA OBTENÇÃO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO.....	46
TABELA 9: CONCENTRAÇÃO DOS ANALITOS CALCULADA PARA CADA NÍVEL DA CURVA DE CALIBRAÇÃO.	47
TABELA 10: CONCENTRAÇÃO DE FORTIFICAÇÃO DE EXTRATOS DE MATRIZ BRANCA PARA ESTUDOS DE VERACIDADE E PRECISÃO.....	48
TABELA 11: CRITÉRIOS DE DESEMPENHO DOS PROCEDIMENTOS ANALÍTICOS PARA DETERMINAÇÃO DE MICOTOXINAS EM PRODUTOS DE ORIGEM VEGETAL.	50
TABELA 12: PARÂMETROS DE OPERAÇÃO DO ESPECTRÔMETRO DE MASSAS EM POLARIDADE POSITIVA.	55
TABELA 13: PARÂMETROS DE OPERAÇÃO DO ESPECTRÔMETRO DE MASSAS EM POLARIDADE NEGATIVA.....	56
TABELA 14: PLANEJAMENTO FATORIAL 2 ⁴ ELABORADO PARA A OTIMIZAÇÃO DE METODOLOGIA DE EXTRAÇÃO TIPO QUECHERS.....	59
TABELA 15: RELAÇÃO ENTRE UMA SÉRIE DE CLASSES DE FRAGMENTOS MÁSSICOS E OS PONTOS DE IDENTIFICAÇÃO OBTIDOS	64
TABELA 16: REQUISITOS DE IDENTIFICAÇÃO PARA DIFERENTES TÉCNICAS DE MS	65
TABELA 17: DADOS OBTIDOS PARA OS PARÂMETROS DAS CURVAS DE CALIBRAÇÃO	74
TABELA 18: MÉDIA DAS RECUPERAÇÕES POR NÍVEL DE FORTIFICAÇÃO EM CONDIÇÕES DE PRECISÃO INTERMEDIÁRIA.....	75
TABELA 19: DESVIO PADRÃO RELATIVO PARA O ÚLTIMO NÍVEL DE FORTIFICAÇÃO.	77
TABELA 20: LIMITE MÁXIMO TOLERADO (LMT), LIMITES DE DETECÇÃO (LD-CCA) E DE QUANTIFICAÇÃO (LQ-CCB), INCERTEZA COMBINADA DO LMT (M).	80
TABELA 21: CRITÉRIOS DE ACEITAÇÃO DA REPRODUTIBILIDADE	81
TABELA 22: RESUMO DOS DADOS OBTIDOS PARA MICOTOXINAS VALIDADAS.....	83
TABELA 23: RESULTADOS OBTIDOS NO ESTUDO DE OCORRÊNCIA PARA MICOTOXINAS E AGROTÓXICOS.....	84

LISTA DE EQUAÇÕES

EQUAÇÃO 1.....	44
EQUAÇÃO 2.....	44
EQUAÇÃO 3.....	44
EQUAÇÃO 4.....	48
EQUAÇÃO 5.....	51
EQUAÇÃO 6.....	52
EQUAÇÃO 7.....	52
EQUAÇÃO 8.....	52
EQUAÇÃO 9.....	53
EQUAÇÃO 10.....	53
EQUAÇÃO 11.....	53
EQUAÇÃO 12.....	54
EQUAÇÃO 13.....	54
EQUAÇÃO 14.....	54
EQUAÇÃO 15.....	54
EQUAÇÃO 16.....	54
EQUAÇÃO 17.....	54
EQUAÇÃO 18.....	54
EQUAÇÃO 19.....	77
EQUAÇÃO 20.....	81

LISTA DE ABREVIACOES

AFB1	aflatoxina B1
AFB2	aflatoxina B2
AFG1	aflatoxina G1
AFG2	aflatoxina G2
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APCI	<i>Atmospheric Pressure Chemical Ionization</i>
APPI	<i>Atmospheric Pressure Photon Ionization</i>
ATA	Aleucia Tóxica Alimentar
B	analisador de massas do tipo Setor Magnético
CC α	Limite de Decisão
CC β	Capacidade de Deteco
CE	<i>Capillary Electrophoresis</i>
CE	<i>Collision Energy</i>
CTV	citreoviridina
CXP	<i>Collision Cell Exit Potential</i>
DON	deoxinivalenol
DP	<i>Declustering Potential</i>
DPR _r	Desvio padrão relativo de repetibilidade
DPR _R	Desvio padrão relativo de reprodutibilidade
D-SPE	<i>Dispersive Solid Phase Extraction</i>
EP	<i>Entrance Potential</i>
EIA	Imunoensaio enzimtico
ESI	<i>Electrospray Ionization</i>
FAO	Food and Agriculture Organization
FB1	fumonisina B1
GC	<i>Gas Chromatography</i>
HPLC	<i>High-Performance Liquid Chromatography</i>
HPLC-FLD	HPLC com detector de fluorescência
HPLC-qTOF-MS	HPLC com detector de massas quadrupolo-tempo de voo
HPLC-UV	HPLC com detector de ultravioleta visível

HPLC-UV-FLD	HPLC com detectores de ultravioleta visível e fluorescência
HRMS	High Resolution Mass Spectrometry;
HR- MS ⁿ	High Resolution sequential Mass Spectrometry.
IACs	<i>immuno affinity columns</i>
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i>
IT	analisador de massas do tipo Ion Trap
LACQSA	Laboratório de Controle de Qualidade e Segurança Alimentar
LANAGRO-MG	Laboratório Nacional Agropecuário de Minas Gerais
LC	<i>Liquid Chromatography</i>
LC/MS-LIT-FT Orbitrap	LC acoplado ao detector de massas híbrido Ion trap linear e Orbitrap
LD	Limites de Detecção
LLE	<i>liquid-liquid extraction</i>
LQ	Limites de Quantificação
LR-MS ⁿ	Low Resolution sequential Mass Spectrometry;
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MMQP	Método dos Mínimos Quadrados Ponderados
MMQO	Método dos Mínimos Quadrados Ordinários
MRC	Material de Referência Certificado
MRM	monitoramento de reação múltipla
MS/MS	espectrometria de massas sequencial
<i>m/z</i>	relações de massa/ carga
OTA	ocratoxina A
PSA	<i>primary secondary amine</i>
Q	analisador de massas do tipo Quadrupolo
QqQ	triploquadrupolo
QuEChERS	<i>Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe</i>
RDC	Resolução de Diretoria Colegiada
SFE	<i>supercritical fluid extraction</i>
SLE	<i>sólid-liquid extraction</i>
SPE	<i>solid-phase extraction</i>

TLC	<i>Thin-layer Chromatography</i>
TOF <i>Analiser</i>)	analisador de massas do tipo Tempo de Vôo (<i>Time-of-Flight</i>
UHPLC	<i>Ultra High Performance Liquid Chromatography</i>
UHPLC-MS/MS	UHPLC acoplado ao detector de massas sequencial
UPLC	<i>Ultra Performance Liquid Chromatography</i>
UPLC- MS/MS	UPLC acoplada ao detector de massas sequencial
UPLC-MS-Orbitrap	UPLC acoplada ao detector de massas Orbitrap
UPLC-TOF-MS	UPLC acoplada ao detector de massas tempo de voo
UV-VIS	Ultravioleta Visível
VIM	Vocabulário Internacional de Metrologia
V/V	Volume por Volume
ZEA	zearalenona

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	3
2.1. OBJETIVO GERAL	3
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	3
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
3.1. PRODUÇÃO DE CERVEJA	4
3.2. MICOTOXINAS	7
3.2.1. <i>Aflatoxinas</i>	7
3.2.2. <i>Tricotecenos</i>	8
3.2.3. <i>Fumonisinias</i>	9
3.2.4. <i>Ocratoxina</i>	10
3.2.5. <i>Zearalenona</i>	11
3.2.6. <i>Citrinina e Citreoviridina</i>	11
3.2.7. <i>Alcalóides de Ergot</i>	12
3.2.8. <i>Ácido Penicílico</i>	14
3.3. LEGISLAÇÕES E MÉTODOS ANALÍTICOS EMPREGADOS PARA ANÁLISE DE MICOTOXINAS	15
3.4. MÉTODO QUÉCHERS	22
3.5. TÉCNICAS DE ANÁLISE	24
3.5.1. <i>Cromatografia Líquida de Ultra-Alta Eficiência</i>	24
3.5.2. <i>Espectrometria de massas</i>	25
3.6. VALIDAÇÃO	27
4. MATERIAIS E MÉTODOS	28
4.1. AMOSTRAS	29
4.2. SISTEMA UHPLC-MS/MS	30
4.3. PADRÕES	30
4.4. MATERIAIS	36
4.5. REAGENTES	36
4.6. SOLUÇÕES	37
4.6.1. <i>Solução padrão estoque</i>	37
4.6.2. <i>Soluções pool de micotoxinas</i>	38
4.6.3. <i>Soluções de eluição</i>	39
4.7. MÉTODO	40
4.7.1. <i>Otimização dos parâmetros de tensão do espectrômetro de massas</i>	40
4.7.2. <i>Otimização do procedimento de extração</i>	41
4.7.3. <i>Parâmetros de validação</i>	43
4.7.3.1. <i>Seletividade</i>	43

4.7.3.2.	Efeito matriz.....	43
4.7.3.3.	Linearidade.....	45
4.7.3.4.	Veracidade e precisão.....	48
4.7.3.5.	Limites de Detecção (LD), Quantificação (LQ), capacidade de decisão ($CC\alpha$) e detecção ($CC\beta$) ...	51
4.7.3.6.	Incerteza de medição.....	52
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
5.1.	OTIMIZAÇÃO DO ESPECTRÔMETRO DE MASSAS.....	55
5.2.	OTIMIZAÇÃO DO PROCEDIMENTO DE EXTRAÇÃO <i>DILUTE AND SHOOT</i> :.....	57
5.3.	OTIMIZAÇÃO DO PROCEDIMENTO DE EXTRAÇÃO <i>QUÉCHERS</i> :.....	58
5.4.	VALIDAÇÃO	63
5.4.1.	Seletividade.....	63
5.4.2.	Efeito matriz.....	73
5.4.3.	Linearidade.....	73
5.4.4.	Veracidade e precisão.....	74
5.4.5.	Limites de detecção (LD) e Limites de Quantificação (LQ)	80
5.4.6.	Incerteza de medição.....	81
5.4.7.	Estudo de ocorrência.....	84
6.	CONCLUSÃO	84
7.	REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO:	87

1. INTRODUÇÃO

A cerveja é a bebida alcoólica mais popular do mundo (1). Tem como principais ingredientes a cevada, o lúpulo e a água. As cervejas produzidas apenas com estes ingredientes seguem a lei da pureza das cervejas, conhecida como *Reinheitsgebot*, promulgada em 1516 pelo rei da Baviera. Ela foi instituída com o intuito de adotar um conjunto de predefinições para a produção da cerveja, determinando suas matérias-primas (2).

Durante a fabricação da cerveja, a cevada é submetida ao processo de maltagem, que é a hidratação por imersão dos grãos para germinação e posterior secagem destes grãos germinados (3). Após esta etapa, a cevada passa a ser denominada malte.

O malte é triturado, misturado com água e aquecido. Neste processo são ativadas as enzimas α -amilase e β -amilase, responsáveis pela degradação do amido (4), produzindo açúcares fermentáveis. O resultado é um líquido denominado mosto. O mosto é separado dos grãos através da filtração e o filtrado é misturado com o lúpulo, que confere o amargor e o aroma característicos da cerveja, além de cuidar da estabilidade bacteriológica, esterilizando a solução (5).

A levedura só foi incluída mais tarde na lei de pureza (2), sendo adicionada para iniciar o processo de fermentação. Ela converte os açúcares em dióxido de carbono e etanol, conferindo à cerveja sua carbonatação e teor alcoólico (4).

Embora hoje muitas indústrias ainda sigam a lei da pureza das cervejas, aumentando as tecnologias para se sobressair perante a competitividade do mercado, outras cervejarias utilizam ingredientes diversos na produção, seja para diminuir o custo final do produto ou para contribuir no sabor, aroma, brilho e leveza dessa bebida (6). Dentre os diferentes ingredientes, podemos citar o milho e o arroz, que podem ser utilizados como cereais não maltados como fontes alternativas de açúcares para a fermentação, e o trigo, que confere maior densidade à cerveja e maior estabilidade e durabilidade à espuma (7).

Segundo a SindCerv (8), em 2016 o Brasil foi terceiro maior fabricante mundial, com 13,3 bilhões de litros produzidos, atrás, somente, da China (46 bilhões)

e dos Estados Unidos (22,1 bilhões). Esses dados mostram o importante papel da cerveja na alimentação e economia dos brasileiros.

Entretanto, embora seja um alimento popular no Brasil, os níveis de contaminantes alimentares na cerveja, em especial as micotoxinas, não têm um histórico de monitoramento, e pode-se estar subestimando a presença dessas substâncias nessa bebida.

As micotoxinas são substâncias naturais produzidas por fungos em produtos agrícolas durante a produção, colheita e armazenamento (9). Conhecidas como metabólitos secundários, as micotoxinas não têm influência direta no crescimento fúngico, embora forneçam às culturas condições necessárias para seu crescimento frente aos organismos concorrentes como outros fungos, bactérias e leveduras (1).

A contaminação de alimentos por micotoxinas tem sido relatada no mundo todo, principalmente em alimentos susceptíveis ao crescimento fúngico, como os grãos e cereais (10). A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), por meio da Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) nº 07 de 2011 (11), determina os limites máximos de micotoxinas em alguns alimentos no Brasil. Dentre eles, encontra-se a cevada, utilizada como principal fonte de açúcares fermentáveis para produção da cerveja, o milho, o arroz, e o trigo.

Segundo a *Food and Agriculture Organization* (FAO), os grãos contaminados com fungos geralmente são descartados, mas em alguns casos, são reservados para a fabricação de cerveja ou fornecido ao gado (1). Dessa forma, embora exista uma norma brasileira a respeito da concentração máxima de micotoxinas em alguns grãos utilizados na produção da cerveja, essa norma não aborda o alimento cerveja, que pode conter o somatório de uma ou mais micotoxinas presentes nos grãos, potencializando seus efeitos tóxicos e cancerígenos (12).

A diversidade química das micotoxinas e suas diferentes concentrações em uma ampla gama de matrizes de alimentos representa um grande desafio analítico durante a elaboração de métodos de extração, detecção e quantificação desses contaminantes alimentares. Para lidar com o crescente número de matrizes de amostras e micotoxinas de interesse, métodos analíticos rápidos e seletivos são

necessários. Este trabalho apresenta os resultados do desenvolvimento e validação do método QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe) para análise de micotoxinas em cerveja utilizando cromatografia líquida de ultra-alta eficiência acoplada a um detector de espectrometria de massas triplo quadrupolo (UHPLC-MS/MS), para separação, identificação e quantificação dos analitos.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Desenvolver, otimizar e validar um método analítico para análise de dezenove micotoxinas em cerveja.

2.2. Objetivos específicos

- Desenvolvimento e otimização de método para extração e análise por UHPLC-MS/MS das micotoxinas: aflatoxina B1 (AFB1), aflatoxina B2 (AFB2), aflatoxina G1 (AFG1), aflatoxina G2 (AFG2), ocratoxina A (OTA), fumonisina B1 (FB1), citreoviridina (CTV), toxina T-2, zearalenona (ZEA), deoxinivalenol (DON), citrinina, ácido penicílico, ergocristina, ergocristinina, dihidroergocristina, ergonovina (ergometrina), ergosina, α -ergocriptina, ergocornina.
- Validação da metodologia desenvolvida, utilizando os critérios estabelecidos no Manual de Garantia da Qualidade Analítica , MAPA (13).
- Avaliação qualitativa da ocorrência de micotoxinas mascaradas de DON na cerveja.

A seleção das micotoxinas foi feita baseando-se na normativa CE 1881/2006 (14) e na Resolução de Diretoria Colegiada RDC nº 07 de 18 de Fevereiro de 2011 (11), que legislam sobre os limites máximos de micotoxinas em alimentos, na Europa e no Brasil, respectivamente. Dentre esses alimentos, encontram-se a cevada, principal grão utilizado na fabricação da cerveja e também, o milho, o trigo e o arroz, que podem ser adicionados como adjuntos durante a produção dessa bebida.

Os alcaloides de Ergot, embora não tenham legislação específica, foram incluídos no escopo analítico por estarem presentes na Recomendação Européia 2012/154/UE (15), como uma orientação relativa à monitorização da presença de alcaloides de cravagem nos alimentos para animais e nos gêneros alimentícios. A

citrinina foi adicionada ao escopo analítico por ocorrer frequentemente com a ocratoxina A (16), e o ácido penicílico foi adicionado para verificar se as indústrias cervejeiras utilizam essa micotoxina como agente antimicrobiano durante a produção da bebida.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Produção de Cerveja

A legislação brasileira define cerveja como “bebida resultante da fermentação, a partir da levedura cervejeira, do mosto de cevada malteada ou de extrato de malte, submetido previamente a um processo de cocção adicionado de lúpulo ou extrato de lúpulo, hipótese em que uma parte da cevada malteada ou do extrato de malte poderá ser substituída parcialmente por adjunto cervejeiro” (17).

De modo geral para a obtenção da cerveja, a cevada é primeiramente submetida à etapa de seleção dos grãos, germinação e secagem, para obtenção do malte de cevada que é moído com o objetivo de romper a casca, proporcionando o acesso ao amido dos grãos maltados. Nesta etapa, apenas uma parte das proteínas e do amido dos grãos ficam disponíveis, já que são parcialmente solúveis em água (18).

Para ativar a ação das enzimas α - e β -amilases após a moagem, os grãos passam pela etapa de maceração, onde são misturados à água aquecida, em geral em torno de 65° C. Estas enzimas têm o objetivo de quebrar as substâncias complexas e insolúveis em outras menores, mais simples e solúveis em água, originando moléculas de glicose, maltose e dextrinas, assimiláveis pelas leveduras que realizarão a fermentação posteriormente (18).

Ainda na etapa de maceração, os adjuntos (gritz) são aquecidos em água a aproximadamente 120 °C e adicionados ao malte em maceração, para que as enzimas quebrem os amidos do adjunto (6). Os adjuntos mais comuns são o trigo, milho e o arroz. Após o término desta etapa obtém-se o mosto, solução de açúcares provenientes da sacarificação do amido presente no malte e no adjunto, por ação das enzimas do malte (18).

O mosto então é resfriado e filtrado para a retirada dos resíduos do malte e do adjunto. Logo após essa etapa, o filtrado é aquecido até a fervura. Esse processo inativa as enzimas, coagula e precipita as proteínas, concentra e esteriliza o mosto (19). Nessa etapa da produção são adicionados aditivos como caramelo, açúcar, extratos vegetais e o lúpulo, o qual confere o amargor da cerveja sendo também responsável por sua esterilização bacteriológica.

Após a fervura, o mosto passa pela etapa de clarificação, para a decantação de partículas provenientes de proteínas coaguladas, resíduos remanescentes de bagaços e outros tipos de resíduos que podem comprometer a qualidade da fermentação, gerando ésteres, álcoois de cadeias moleculares longas ou outras substâncias indesejáveis para a maioria dos estilos de cervejas (18) (20). Depois deste processo, o mosto é resfriado e fermentado.

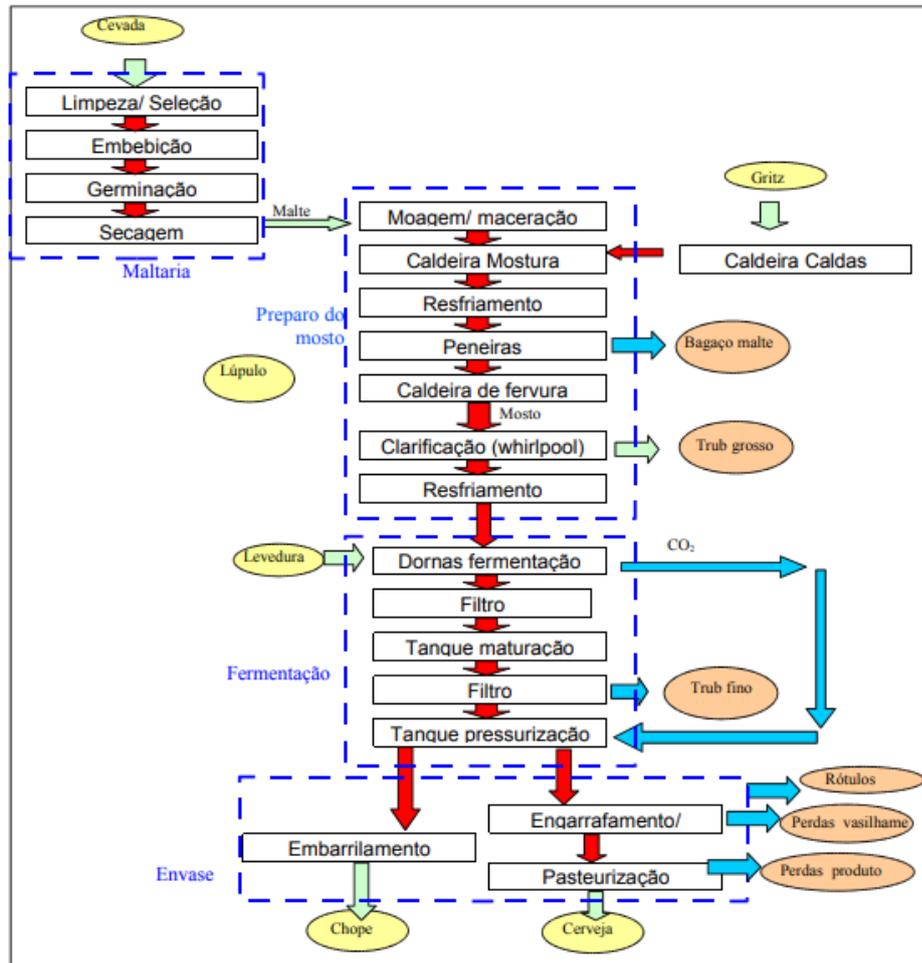
Durante a fermentação do mosto, acontece tanto a fermentação aeróbica, quando as leveduras se reproduzem aumentando de quantidade, quanto a fermentação anaeróbica, quando as leveduras realizam a fermentação convertendo os açúcares do mosto em dióxido de carbono e álcool (21).

Com o objetivo de precipitar as leveduras e proteínas presentes no fermentado, inicia-se o processo de maturação, que consiste no armazenamento da cerveja a baixa temperatura durante 15 a 60 dias (19). O produto obtido é filtrado, para a retirada dos sólidos precipitados e carbonatado de modo a aumentar a quantidade de dióxido de carbono na cerveja e evitar a ocorrência de oxidações que comprometam sensorialmente a bebida (22).

A bebida obtida é envasada, podendo ou não passar pela etapa de pasteurização. Quando a bebida é pasteurizada, ela passa a ser denominada cerveja. Caso contrário a bebida passa a ser denominada *chope*, com um menor tempo de vida de prateleira, por não ser pasteurizada (18).

A Figura 1 ilustra as etapas de produção da cerveja:

Figura 1: Fluxograma de processo genérico da produção de cerveja



Fonte: Cervejas e Refrigerantes (CETESB, 2005).

Historicamente, a produção de cerveja no Brasil começou em Outubro de 1640 quando Maurício de Nassau, governador da Colônia holandesa no Recife, decide montar, com a ajuda do mestre cervejeiro Dirck Dicx, a primeira cervejaria da América chamada “La Fontaine”, fabricando uma cerveja fermentada com cevada e açúcar (23). Com a saída dos holandeses do Brasil Colônia, a produção de cerveja perde força, já que as bebidas alcoólicas mais populares eram o vinho e a cachaça. Em 1785, a então rainha de Portugal Dona Maria I, proíbe a existência de fábricas, indústrias e manufaturas na Colônia (23).

Em Janeiro de 1808 a cerveja volta ao Brasil importada pela família Real Portuguesa. Neste mesmo ano Dom João VI, príncipe regente, revoga o tratado de 1785, abrindo as portas para o surgimento e crescimento da indústria cervejeira no Brasil (24).

Segundo o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), que regula, inspeciona e fiscaliza estabelecimentos produtores e bebidas em território brasileiro, desde 2010 iniciou-se um crescente aumento do número de registros de cervejarias, chegando a 679 estabelecimentos legalmente registrados ao final de 2017 (25). Desse total, 287 estabelecimentos encontram-se na região Sul e 279 na região Sudeste, sendo os estados do Rio Grande do Sul, São Paulo e Minas Gerais, líderes no ranking dos estados com o maior número de estabelecimentos registrados (25).

O crescente consumo e produção de cerveja demonstram a importância do monitoramento de contaminantes alimentares nesta bebida, de modo a assegurar saúde do consumidor.

3.2. Micotoxinas

As micotoxinas são definidas como metabólitos secundários de baixa massa molecular (26) produzidos por fungos em produtos agrícolas durante a produção, colheita e armazenamento, que podem causar efeitos tóxicos em animais e seres humanos. A presença de fungos nas plantas e grãos não é uma evidência da existência de micotoxinas, já que a produção dessas substâncias depende de vários fatores como a condição climática, a umidade, a integridade dos grãos e os cuidados durante o manuseio e armazenamento do produto (1).

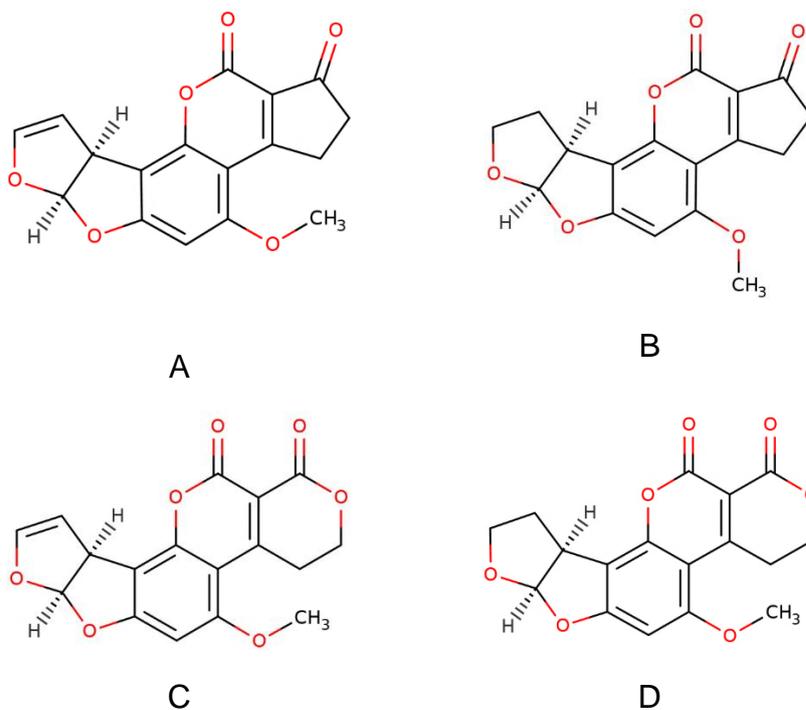
Até o momento, mais de 500 micotoxinas diferentes foram identificadas e as micotoxinas mais estudadas são as produzidas pelos fungos dos gêneros *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium* e *Claviceps*. As principais micotoxinas produzidas por esses fungos são aflatoxinas (AFBx), ocratoxinas (OTA), deoxinivalenol (DON), toxina T-2, zearalenona (ZEA), fumonisinas (FBx) e toxinas de Ergot (27).

3.2.1. Aflatoxinas

As aflatoxinas são compostos heterocíclicos oxigenados derivados de furanocumarinas (28). Produzidas principalmente pelas espécies *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*, existem em torno de 14 tipos de aflatoxinas já descobertas, mas 4 delas são potencialmente perigosas para humanos e animais pois foram encontradas nas principais culturas alimentares, são elas aflatoxina B1, B2, G1, G2 (29). Essas micotoxinas são agentes cancerígenos potentes para todas as espécies animais investigadas, sendo incluídas em substâncias altamente cancerígenas para

seres humanos (grupo 1) pela Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (International Agency for Research on Cancer, IARC) em 2002 (30). As estruturas químicas das aflatoxinas B, B₂, G₁ e G₂ estão representadas na Figura 2.

Figura 2: Estruturas químicas das micotoxinas: (A) aflatoxina B₁; (B) aflatoxina B₂; (C) aflatoxina G₁; (D) aflatoxina G₂.



Fonte: adaptado de Fermentek (31) e ChemSpider (32)

3.2.2. Tricotecenos

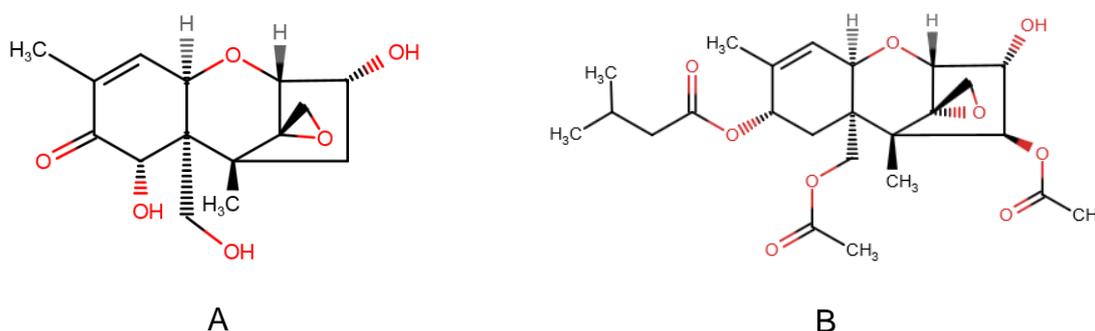
Os tricotecenos são derivados dos sesquiterpenos (26), tendo como estrutura básica o 12,13-epoxitricoteceno, (33). São produzidos por fungos do gênero *Fusarium*, sendo a toxina T-2 e o deoxinivalenol (34) os tricotecenos mais comumente encontrados de forma natural nos alimentos.

A ocorrência do deoxinivalenol é maior em culturas de milho, trigo, aveia e cevada (35). Estudos apontam que o deoxinivalenol pode ser conjugado com outras substâncias durante a fabricação de alimentos que necessitam de catálise enzimática, como a produção de cervejas e pães (36), (37). Estas novas substâncias denominadas de “mascaradas”, como o 15-acetil-deoxinivalenol, 3-acetil-deoxinivalenol, deoxinivalenol-15-glucosídeo e deoxinivalenol-3-glucosídeo, podem ser novamente transformadas em DON após a quebra dessas ligações por bactérias presentes no trato intestinal (36).

O deoxinivalenol não foi classificado como cancerígeno pela IARC, entretanto, sua co-ocorrência com aflatoxinas pode aumentar a carcinogenicidade da aflatoxina (28). Os efeitos da ingestão de DON em humanos são normalmente associados a sintomas como diarreia, vômito e inflamação gastrointestinal (37). A estrutura química de DON está representada na Figura 3 (A).

A toxina T-2, outro tricoteceno tão importante quanto DON, normalmente encontrada em milho, trigo, cevada, aveia, arroz e centeio (34), pode causar a doença denominada aleucia tóxica alimentar (ATA) (28), tendo como sintomas vômito, diarreia, degeneração completa da medula óssea, podendo levar a morte (38). Além disso, a toxina T-2 tem um efeito imunossupressor, que resulta em uma menor resistência a doenças infecciosas (26). Na Figura 3 (B) observa-se a estrutura química da micotoxina toxina T-2.

Figura 3: Estruturas químicas das micotoxinas: (A) deoxinivalenol (B) toxina T-2



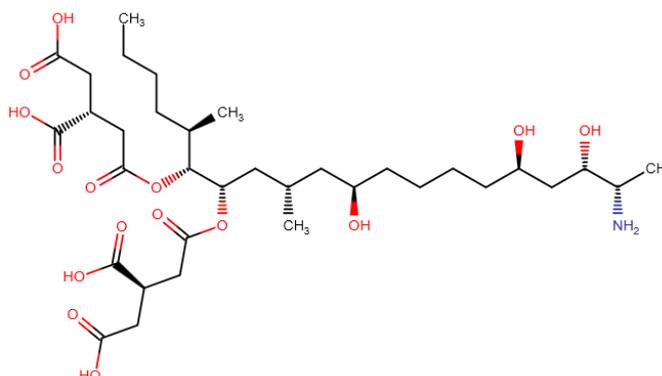
Fonte: adaptado de Fermentek (31) e ChemSpider (32)

3.2.3. Fumonisinias

As fumonisinias são metabólitos produzidos por várias espécies de *Fusarium*, mas principalmente pela *F. verticillioides* e a *F. proliferatum*. Ocorrem naturalmente pelo menos três formas de fumonisinina, a B1, B2 e B3, sendo a fumonisinina B1 (FB1) normalmente encontrada em concentrações maiores do que as demais (28). Essas micotoxinas são encontradas normalmente em milho (39) e foram classificadas pela IARC como prováveis agentes cancerígenos (2B), estando relacionadas ao aparecimento de câncer de esôfago em humanos (26, 40). A estrutura química da FB1 (Fig. 4) é bem diferente das estruturas das micotoxinas apresentadas acima, já que sua cadeia carbônica é aberta e os grupos hidroxila dos carbonos 14 e

15 encontram-se esterificados com o grupo carboxila terminal do ácido tricarbálico (41).

Figura 4: Estrutura química da micotoxina fumonisina B1.

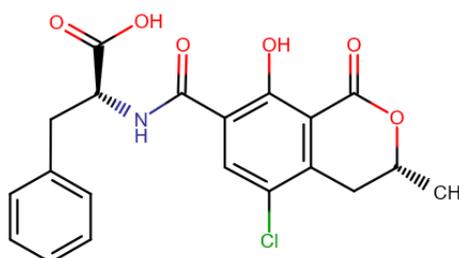


Fonte: adaptado de Fermentek (31) e ChemSpider (32)

3.2.4. Ocratoxina

A ocratoxina é um metabólito produzido por diferentes espécies de *Aspergillus* e pelo *Penicillium verrucosum* sendo a ocratoxina A a forma mais abundante e mais tóxica deste grupo. Normalmente, é encontrada em cevada, aveia, centeio, trigo, café e outros produtos vegetais, sendo a cevada o grão com maior probabilidade de contaminação (26). A eliminação da ocratoxina A do corpo humano é lenta, podendo se acumular no organismo ocasionando danos aos rins e, dependendo da concentração ingerida, pode causar também danos ao fígado (35). Assim como as fumonisinas, a ocratoxina A foi classificada pela IARC como um possível agente cancerígeno (2A) (28). A estrutura química da ocratoxina A está representada na Figura 5.

Figura 5: Estrutura química da ocratoxina A.

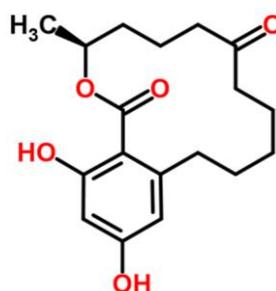


Fonte: adaptado de Fermentek (31) e ChemSpider (32)

3.2.5. Zearalenona

A zearalenona é uma micotoxina que imita os efeitos do hormônio reprodutivo estrogênio, sendo produzida principalmente pelo fungo *Fusarium graminearum* (16) e encontrada em culturas de milho, trigo, cevada e centeio. Os efeitos da ingestão de alimentos contaminados por essa micotoxina são normalmente efeitos estrogênicos como redução do nível de testosterona, redução da espermatogênese, feminização e redução da libido para homens e dilatação, vermelhidão vulvar, vulvovaginite, retenção ou ausência de leite em mulheres (16). Entretanto, a ZEA também pode ter efeitos de genotoxicidade, toxicidade reprodutiva e pode até ser responsável pelo câncer de mama humano (42). A estrutura química da zearalenona está representada na Figura 6.

Figura 6: Estrutura química da zearalenona.



Fonte: adaptado de Fermentek (31) e ChemSpider (32)

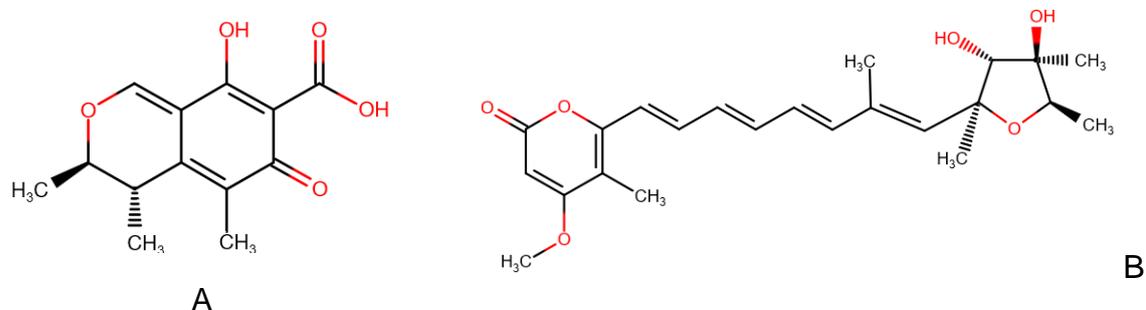
3.2.6. Citrinina e Citreoviridina

Embora seu nome seja derivado do *Penicillium Citrinum*, espécie em que foi originalmente isolada, a citrinina é um metabólito que pode ser produzido por outras espécies de *Penicillium* e *Aspergillus*, ocorrendo frequentemente com a ocratoxina A (16). Normalmente encontrada em grãos de trigo, aveia, cevada e arroz, a citrinina tem como principal característica sua toxicidade nefrológica e em altos níveis pode afetar o fígado, assim como acontece com a ocratoxina (35). A estrutura química da citrinina está representada na Figura 7(A).

Já a citreoviridina tem sua estrutura básica formada por um anel de lactona conjugado com um anel de furano (43). É produzida por inúmeras espécies de *Penicillium*, sendo isolada primeiramente na espécie *Penicillium Citreonigrum*. Sua ocorrência acontece principalmente em culturas de arroz, milho e trigo, sendo a ingestão tóxica para seres humanos e animais associada a sintomas como vômito,

convulsões, paralisia ascendente, sintomas neurológicos e respostas sensoriais deprimidas (43), além de estar relacionada com a doença de beribéri (44). Na Figura 7 (B) observa-se a estrutura química da micotoxina citrioviridina.

Figura 7: Estrutura química da (A) citrinina e (B) citrioviridina.

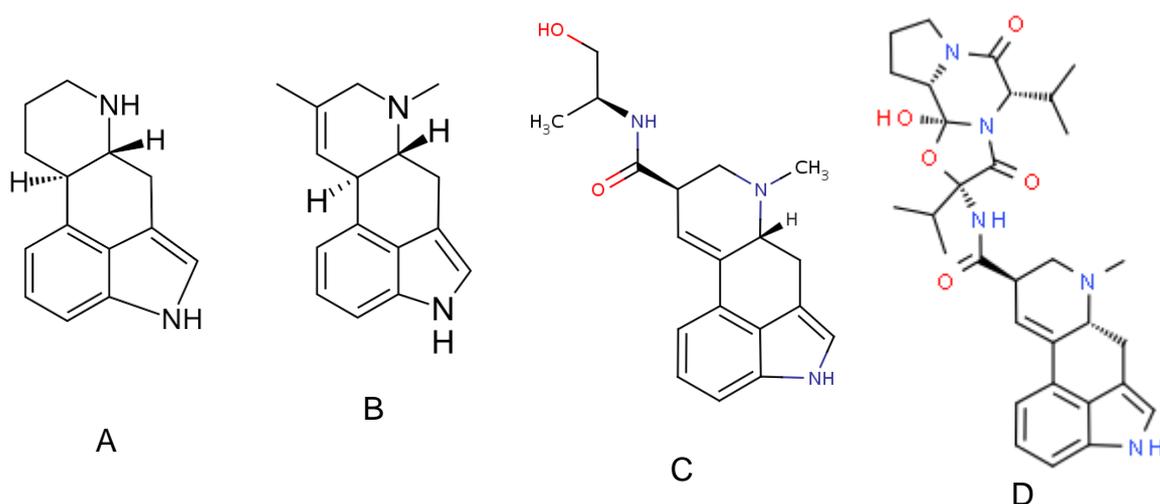


Fonte: adaptado de Fermentek (31) e ChemSpider (32)

3.2.7. Alcalóides de Ergot

Os alcalóides de Ergot são substâncias derivadas do triptofano e produzidas por todas as espécies de fungos do gênero *Claviceps* (45). Têm como estrutura comum a ergolina tetracíclica (Fig. 8a) e, dependendo dos substituintes ligados ao anel ergolina, os alcalóides de Ergot podem ser divididos em três grupos principais: as clavininas, que consistem simplesmente no sistema de anéis ergolina tetracíclicos (Fig. 8b), amidas do ácido lisérgico, que consistem na estrutura básica do ácido D-lisérgico com uma ligação de uma amida na forma de alquilamida (Fig. 8c) e ergopeptídeos, que apresentam a estrutura do ácido D-lisérgico e um substituinte tripeptídico cíclico (Fig. 8d) (46–48).

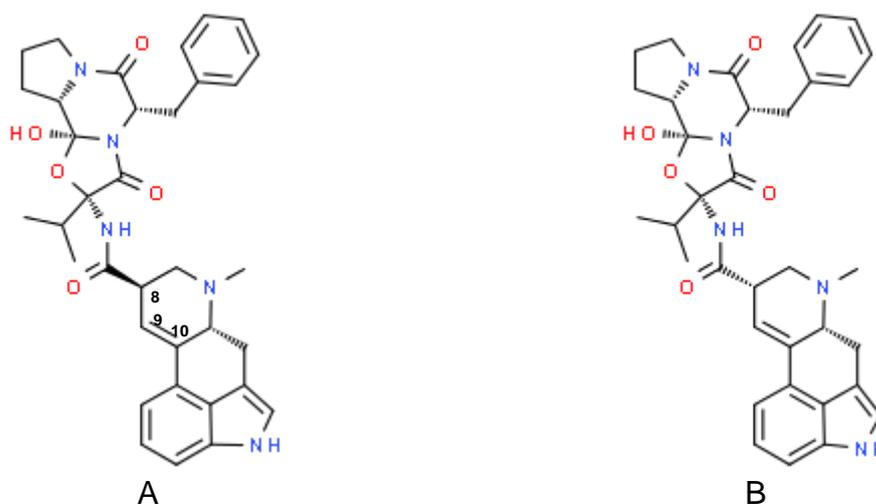
Figura 8: Representação da classificação dos alcalóides de Ergot. (A) ergolina tetracíclica, (B) agroclavina, (C) ergonovina e (D) ergocornina.



Fonte: adaptado de Fermentek (31) e ChemSpider (32)

Sob a influência de um ácido ou uma base, os alcalóides de Ergot que possuem uma ligação dupla entre os carbonos C9 e C10 passam por epimerização com relação ao centro de simetria C8, resultando em isômeros rotativos. Os alcalóides de Ergot com configuração C8-(R) giram para a esquerda e possuem a terminação -ina (exemplo ergocristina) enquanto os epímeros que possuem configuração C8-(S) têm terminação -nina (exemplo ergocristinina) (Fig. 9) (48, 49).

Figura 9: Epímeros (A) ergocristina e (B) ergocristinina.



Fonte: adaptado de Fermentek (31) e ChemSpider (32)

As espécies de *Claviceps* normalmente colonizam as culturas de cereais como milho, sorgo, cana-de-açúcar, centeio e ocasionalmente infecta culturas de aveia e cevada (48). Os principais e mais tóxicos alcalóides de Ergot produzidos pelas espécies de *Claviceps* são a ergonovina (ergometrina) (Fig. 10A), ergotamina (Fig. 10B), ergosina (Fig. 10C), ergocristina (Fig. 10D), ergocornina (Fig. 10E) e ergocriptina (Fig. 10F) (48).

Figura 10: Estruturas químicas dos alcalóides de ergot: (A) ergonovina, (B) ergotamina, (C) ergosina, (D) ergocristina, (E) ergocornina e (F) α -ergocriptina.

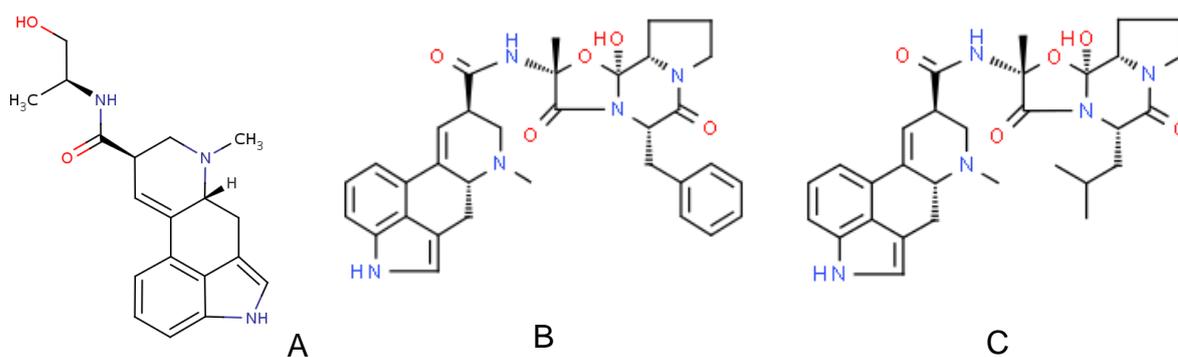
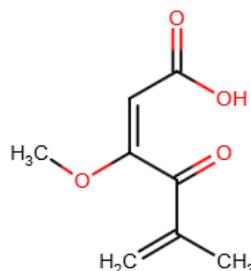


Figura 11: Estrutura química do ácido penicílico.



Fonte: adaptado de Fermentek (31) e ChemSpider (32)

3.3. Legislações e métodos analíticos empregados para análise de micotoxinas

O controle dos limites máximos de micotoxinas em alimentos é regulamentado na Europa pela normativa CE 1881/2006 (14) e no Brasil pela Resolução de Diretoria Colegiada RDC nº 07 de 18 de Fevereiro de 2011 (11). Vários tipos de alimentos encontram-se nestas legislações, incluindo a cevada, principal grão utilizado na produção da cerveja, e outros cereais que são utilizados como adjunto cervejeiro: milho, trigo e arroz.

Embora a CE 1881/2006 (14) determine limites máximos de algumas micotoxinas para produtos derivados de cereais e da transformação de cereais, encaixam-se nesta categoria cereais em flocos, farinha de trigo, barras de cereais (53), não fazendo parte a cerveja. A legislação brasileira, também não menciona cerveja em seu texto. Desta forma, não existem limites legislados de micotoxinas nessa bebida (54). Entretanto, pesquisas apontam a ocorrência micotoxinas em diversos tipos de cerveja em vários países do mundo (55).

A determinação de micotoxinas em alimentos necessita de um preparo de amostra cuidadoso, principalmente quando a análise envolve múltiplas micotoxinas. O preparo a ser adotado no método depende normalmente do tipo de matriz analisada, da complexidade dos analitos, além da capacidade de resposta instrumental do método (56). Alguns métodos utilizam etapas de *clean-up*, de maneira a obter um extrato que seja o mais livre de interferentes possível e enriquecido com os analitos desejados.

Existem diferentes técnicas para o *clean-up* da amostra objetivando extrair os analitos de interesse. Dentre essas técnicas podemos destacar extração sólido-

líquido (*sólid-liquid extraction*, SLE), extração líquido-líquido (*liquid-liquid extraction*, LLE), extração de fluido supercrítico (*supercritical fluid extraction*, SFE), extração em fase sólida (*solid-phase extraction*, SPE) e colunas de imunoafinidade (*immuno affinity columns*, IACs) (57).

O método QuEChERS seguido da etapa de *clean up* (*Dispersive Solid Phase Extraction*, D-SPE) e o *Dilute and Shoot* também têm sido relatados na literatura para extração de contaminantes alimentares (58–60), sendo que o *Dilute and Shoot* não utiliza a etapa de *clean up*, apenas uma diluição da amostra com o intuito de diluir os interferentes, aumentando porém os limites de detecção e quantificação, já que o preparo de amostras exige menos etapas. Em contrapartida, o método QuEChERS utiliza a adição de sais de modo a favorecer uma partição bifásica e diminuir a quantidade de água da amostra, aumentando a eficiência de extração dos analitos polares para a fase orgânica a ser analisada.

O tratamento da amostra é seguido pelo método de separação e detecção. Os métodos cromatográficos são amplamente explorados há mais de 50 anos para análise e separação de micotoxinas (56). Desta forma, as técnicas de separação mais utilizadas são cromatografia em camada fina (*Thin-layer Chromatography*, TLC), cromatografia gasosa (*Gas Chromatography*, GC), cromatografia líquida (*Liquid Chromatography*, LC), Cromatografia de alto desempenho (*High-Performance Liquid Chromatography*, HPLC), cromatografia líquida de ultra eficiência (*Ultra high performance liquid chromatography*, UHPLC), eletroforese capilar (*Capillary Electrophoresis*, CE) (56).

O fato de a maioria das micotoxinas ser tóxica ou cancerígena em baixas concentrações requer métodos sensíveis e confiáveis para sua detecção. Um método de detecção bem sucedido deve ser robusto, sensível e versátil para uma ampla gama de compostos, mas que pode ser muito específico quando necessário (57). Embora muitos detectores como os de fluorescência e ultravioleta ainda sejam utilizados (54, 61, 62), o uso da espectrometria de massas sequencial (MS/MS) acoplada a cromatógrafos líquidos, tem a vantagem de detectar múltiplos analitos, aumentando assim a capacidade do método em análises de multirresíduos (63). Graças à seletividade inerente à técnica de MS / MS no modo de monitoramento de reação

múltipla (MRM), consegue-se elaborar métodos rápidos e fáceis, sem ou com limpeza mínima da amostra (63).

Desta forma, para a elaboração do método de análise de dezenove micotoxinas em cerveja, utilizamos uma modificação do método QuEChERS, sem etapas de *clean up* e D-SPE, como técnica para extração das micotoxinas, sendo a separação e detecção dos analitos realizada por um UHPLC-MS/MS no modo MRM.

A Tabela 1 descreve diferentes métodos de preparo de amostra, detecção e confirmação, encontrados na literatura para análise de micotoxinas em cerveja.

Tabela 1: Revisão da literatura sobre análise de micotoxinas em cerveja

Referência	Preparo de amostra ¹	Técnicas de separação/detecção	Micotoxinas analisadas	Faixa de recuperação	Faixa LD (µg/L)	Faixa LQ (µg/L)
Fumonisin B1 and ochratoxin A in beers made in Brazil (62)	Coluna extração em fase sólida (SPE) de troca aniônica seguida de derivatização por ftaldialdeído e 2-mercaptoetanol.	HPLC-Fluorescência	Fumosina B1	98 ± 10%	0,26	-
	Coluna de imunoafinidade		Ocratoxina A	87% - 93%	0,1	0,5
Investigations on the occurrence of mycotoxins in beer (64)	Imunoensaio enzimático (EIA)	Absorvância de microplacas	ZEA, alcaloides de Ergot, AOH e DON	50% -104%	2,1 - 0,06	-
Rapid Method for the Determination of Multiple Mycotoxins in Wines and Beers by LC-MS/MS Using a Stable Isotope Dilution Assay (65)	Diluição na proporção 1 para 5 com acetonitrila / água 30:70 (v / v). Dilute & shoot	UPLC-MS/MS	Aflatoxin (AF) G1/ AFG2/ AFB1/ AFB2/ ochratoxin A (OTA)/ zearalenone (ZEN)/ deoxynivalenol (DON)/ T-2 toxin/ HT-2 toxin/ Fumonisin B1/ Fumonisin B2/	24%–125%	10 - 0,1	50 a 0,5

Referência	Preparo de amostra ¹	Técnicas de separação/detecção	Micotoxinas analisadas	Faixa de recuperação	Faixa LD (µg/L)	Faixa LQ (µg/L)
Quantification of Fusarium mycotoxins in Nigerian traditional beers and spices using a multi-mycotoxin LC-MS/MS method (66)	QuEChERS utilizando sulfato de magnésio como agente secante e acetonitrila:ácido acético 99:1 (v/v) como solvente	LC-MS/MS	FB1/ FB2/ FB3/ HFB1/ DON/ 3-ADON/ 15-ADON/ DON-3G/ ZEN/ α -ZEL/ b-ZEL/ ZEN-14G/ T-2/ HT-2/ FUS-X/ NIV/ DAS/ NEO/ ZAN/ DOM	70% - 108%	1,4 - 85	1,2 - 170
The study of deoxynivalenol and its masked metabolites fate during the brewing process realised by UPLC–TOF-MS method (67)	Coluna de imunoafinidade	UPLC–TOF-MS	DON, DON-3-Glc e 3- e 15-acetyl-deoxynivalenol (ADONs)	97% - 95%	1,0	-
Application of hybrid linear ion trap-high resolution mass spectrometry to the analysis of mycotoxins in beer (68)	Coluna SPE (C18)	LC/MS-LIT-FT	aflatoxinas, fumonisinas, tricotecenos, ocratoxina A, esterigmatocistina, beauvaricina, zearalenona, zearalenol, enniatinas (A, A1, B e B1) e fusaproliferina	65% -108%	3,0 – 50,0	-
Analysis of multiple mycotoxins in beer employing (ultra)-high resolution mass spectrometry (69)	Diluição na proporção 1 para 5 com acetonitrila. Dilute & shoot.	Sistema UPLC-MS- Orbitrap	32 micotoxinas (toxinas de Fusarium e Alternaria, aflatoxinas, alcalóides de Ergot, ocratoxinas e esterigmatocistina)	86 - 124%	-	0,5 - 65

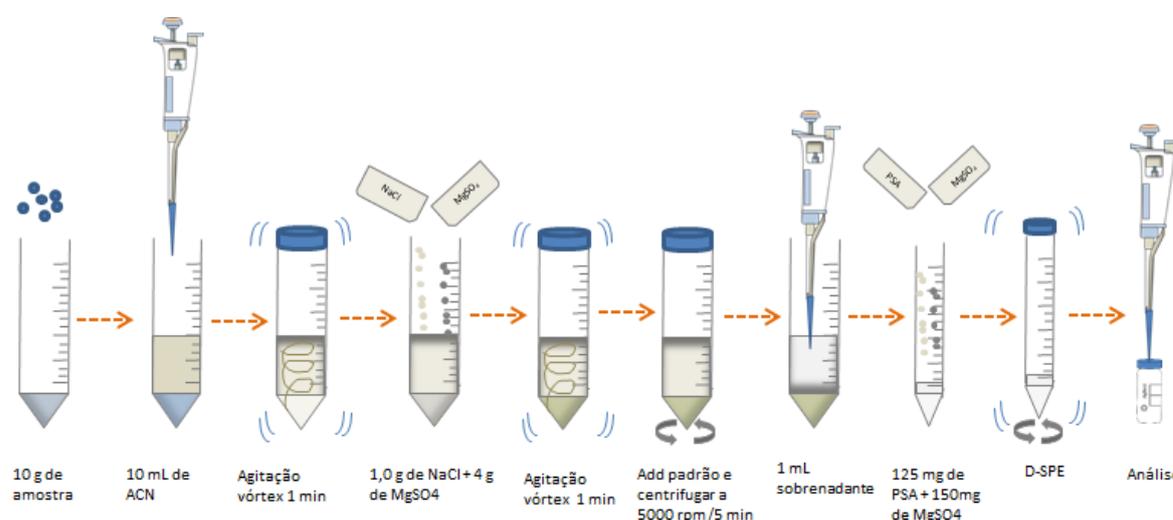
Referência	Preparo de amostra ¹	Técnicas de separação/deteção	Micotoxinas analisadas	Faixa de recuperação	Faixa LD (µg/L)	Faixa LQ (µg/L)
A rapid and sensitive method for the control of selected regulated and emerging (59)	QuEChERS seguido de extração em fase sólida dispersiva (d-SPE)	HPLC-qTOF-MS	Aflatoxin B1/ Detrynivalenol/ Enniatin A1/ Enniatin B/ Enniatin B1/ HT-2 toxin/ Ochratoxin A/ Sterigmatocystin/ T-2 toxin/ Zearalenone	81 - 119%	0,01 – 0,3	0,04- 0,99
Multi-mycotoxin stable isotope dilution LC–MS/MS method for Fusarium toxins in beer (70)	Cartucho SPE-C18	LC-MS/MS	desoxinivalenol, desoxinivalenol-3-glucósido, 3-acetildeoxinivaleneol, enniatina B, 15-acetildeoxinivalenol, toxina HT2 e T2, zearalenona, eniata B1, A1, A e beauvericina.	72-117%	0,05 a 6,9	0,15 a 20,0
A Rapid Screening Method for the Tremorgenic Indole-Diterpene Alkaloid Mycotoxin Paxilline in Beer (71)	Imunoensaio Enzimático (EIA)	Leitor de microplaca de absorvância	paxilina tremorgênica	88-97%	5,0	-
A QuEChERS based extraction procedure coupled to UPLC-MS/MS detection for mycotoxins analysis in beer (72)	QuEChERS seguido de extração em fase sólida dispersiva (d-SPE)	UPLC-MS/MS	Dezoxinivalenol (DON), Zearalenona (ZEA), Fumonisina B1 e B2 (FB1, FB2)), Aflatoxinas B1, B2, G1, G2 (AFB1, AFB2, AFG1, AFG2), Enniatins A, A1, B, B1 (ENNA, ENNA1, ENNB, ENNB1), Toxina T-2 ,Toxina HT-2 , neossolanol (NEO), moniliformina (MON), α- zearalenol (α-	70-110%	0,012 – 9,22	0,038 – 30,43

Referência	Preparo de amostra ¹	Técnicas de separação/detecção	Micotoxinas analisadas	Faixa de recuperação	Faixa LD (µg/L)	Faixa LQ (µg/L)
			ZEA), β-zearalenol (β-ZEA), 3-acetildeoxinivaleol (3-Ac-DON), 15-acetildeoxinivaleol (15)-Ac-DON) e desoxinivalenol-3-glucósido (DON-3-Gluc), Ocratoxina A (OTA) e Beauvericina (BEA)			
Mycotoxin analysis of industrial beers from Brazil: The influence of fumonisin B1 and deoxynivalenol in beer quality (61)	Coluna de Imunoafinidade	HPLC-UV-FLD	Desoxinivalenol (DON) e Fumonisina B1 (FB1)	89.6% - 93.3%	2,0 – 2,8	6,3 – 9,4
Quality and occurrence of deoxynivalenol and fumonisins in craft beer (54)	Coluna SPE troca aniônica	HPLC-UV e HPLC-FLD	Desoxinivalenol (DON) e Fumonisina B1 (FB1)	96-99%	6,6 - 67,0	21,0 - 119,0

3.4. Método QuEChERS

O método QuEChERS (73), proposto para a análise de pesticidas em alimentos, tem como objetivo ser rápido, fácil, barato, efetivo, robusto e seguro. Originalmente foi proposto a extração da amostra com acetonitrila, seguida de partição através da adição de sais (como cloreto de sódio, NaCl e sulfato de magnésio, MgSO₄) e *clean up* do extrato utilizando Extração em Fase Sólida Dispersiva (D-SPE), conforme representado no Figura 12.

Figura 12: Representação esquemática sobre o método QuEChERS



Fonte: próprio autor

A escolha do solvente a ser utilizado na extração dos multirresíduos alimentares é de extrema relevância para o método de análise, uma vez que o solvente escolhido deve atender alguns requisitos, como a capacidade de extrair uma gama de substâncias com diferentes polaridades, seletividade de extração frente aos interferentes da matriz, partição e *clean-up*, compatibilidade com diferentes técnicas cromatográficas, baixo custo, facilidade de evaporação e segurança ambiental (73).

O método QuEChERS utiliza principalmente a acetonitrila como solvente de extração e este apresenta uma série de vantagens em relação a acetona e ao acetato de etila, solventes normalmente utilizados na análise de multirresíduos. Dentre as vantagens, ressalta-se a dispensa da utilização de co-solvente não polar para induzir uma separação de fase com a água, extração em menor escala de substâncias lipofílicas, formação de fases distintas de particionamento com solventes não polares, facilidade em remoção da água residual (após etapa de particionamento) com a

utilização de agentes secantes e, por fim, a acetonitrila é um solvente mais adequado às aplicações cromatográficas do que a acetona ou o acetato de etila (73).

A utilização do cloreto de sódio na extração de multirresíduos com acetonitrila promove o efeito *salting out*, o que melhora os resultados de recuperação de analitos polares, como as fumonisinas, por exemplo, uma vez que o aumento da força iônica diminui a solubilidades dos compostos polares na fase aquosa. Além disso, a presença de cloreto de sódio auxilia na partição de fases, diminuindo a quantidade de água na fase orgânica (74).

O método QuEChERS utiliza o sulfato de magnésio como agente secante devido a sua maior capacidade em remover água quando comparado a outros sais, como o sulfato de sódio (74). Outra vantagem da utilização do $MgSO_4$ é que a remoção de água torna os extratos finais de acetonitrila menos polares e causa precipitação de certos co-extrativos polares (73). Além disso, sua reação exotérmica de hidratação, que aquece o sistema entre 40 e 45 °C, favorece a extração especialmente de compostos polares (74).

O método QuEChERS tem como última etapa um *clean up* utilizando D-SPE. Nesta etapa, onde ocorre a adição de sulfato de magnésio e uma amina primária-secundária (*primary secondary amine*, PSA), há a remoção de água residual e um *clean-up* simultaneamente. Estes sorventes retêm outros interferentes da matriz que ainda não haviam sido retirados, possibilitando assim a obtenção de um extrato mais limpo para ser injetado no sistema cromatográfico.

A utilização do método QuEChERS vem sendo largamente empregada na análise de pesticidas, medicamentos veterinários, produtos farmacêuticos, micotoxinas, dentre outros (75), (76) analisados por cromatografia líquida (LC) ou cromatografia gasosa (GC) geralmente acoplados a sistemas de detecção MS.

Embora tenha apresentado bons resultados, algumas alterações no método QuEChERS como modificações do solvente de extração (77), sais (78), pH de meio (79), mudanças de adsorventes (58) na etapa de *clean up* têm sido testados para análises de multirresíduos com a intenção de melhorar a recuperação dos analitos.

3.5. Técnicas de análise

3.5.1. Cromatografia Líquida de Ultra-Alta Eficiência

A cromatografia é uma técnica empregada na separação de substâncias de uma mistura, normalmente obtida com base na diferença de afinidade de um constituinte da amostra em relação a uma fase móvel, em comparação com uma fase estacionária (80).

Desde 1906 quando a cromatografia foi definida pela primeira vez, crescentes buscas por melhorias no sistema cromatográfico foram feitas para obter separações de alto rendimento e eficiência. A redução do tamanho das partículas e da coluna cromatográfica eram desafiadores, entretanto, também era uma maneira eficiente de melhorar a resolução dos picos e aumentar a velocidade da corrida (81).

O sistema de cromatografia líquida de ultra-alta eficiência (UHPLC) tornou o desafio realidade, permitindo a utilização de colunas cromatográficas menores com menor tamanho de partícula, o que aumenta a resistência ao fluxo sendo, portanto, um sistema capaz de suportar altas pressões (82).

Essas características do sistema de UHPLC fazem com que ele seja capaz de separar, identificar e quantificar compostos de maneira rápida e eficaz. O menor tempo de análise em relação ao sistema de HPLC, pode facilitar a separação e análise de misturas complexas, ao mesmo tempo que reduz o consumo de solvente, além de possibilitar uma melhor relação sinal/ruído já que partículas menores geram picos mais estreitos e altos (82). Desta forma, a sensibilidade dos sistemas cromatográficos é acentuada com a utilização do UHPLC.

Entretanto, como as partículas são muito pequenas (normalmente abaixo de 2 μm), a largura do pico a meia altura é menor do que um segundo, o que significa que o sistema de detecção dos analitos deve ter uma alta taxa de amostragem, dispersão mínima e alta taxa de aquisição (pelo menos 20 - 40 pontos/s) (82) (83). O espectrômetro de massas é um detector adequado para os sistemas de UHPLC, atendendo todas as características para uma análise precisa e reprodutível.

3.5.2. Espectrometria de massas

A espectrometria de massas é uma técnica empregada para identificar e quantificar compostos além de elucidar estruturas de moléculas, utilizando para isso suas relações de massa/ carga (m/z).

Para uma amostra ser analisada por um espectrômetro de massas, ela deve ser introduzida por um dispositivo (“inlet”) e direcionada para a fonte de ionização. Quando o cromatógrafo é utilizado como fonte de introdução de amostra ao MS, os compostos correspondentes a cada pico cromatográfico gerados após a separação da amostras são individualmente introduzidos na fonte de ionização para serem ionizados e posteriormente separados no analisador e transportados para detecção e quantificação (84).

As fontes de ionização para um sistema de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas diferem de sistemas acoplados a cromatógrafos gasosos, já que os GC utilizam da injeção direta de uma amostra gasosa no espectrômetro sendo, portanto, compatíveis com a necessidade de alto vácuo do espectrômetro de massas. Alguns problemas como a incompatibilidade do bombeamento de solventes líquidos para o interior da fonte do espectrômetro, compostos pouco voláteis ou sensíveis a temperaturas, impedem que as técnicas de ionização utilizadas em GC sejam aplicadas a cromatografia líquida (85).

Três fontes de ionização a pressão atmosférica, permitem o acoplamento de cromatógrafos líquidos ao espectrômetro de massas, facilitando a transferência da amostra que sai da coluna para a fase gasosa e a ionização dos analitos (84), sendo elas a ionização por eletronebulização (*Electrospray Ionization*, ESI), ionização química à pressão atmosférica (*Atmospheric Pressure Chemical Ionization*, APCI) e a ionização por fótons à pressão atmosférica (*Atmospheric Pressure Photon Ionization*, APPI).

A ESI é a forma de ionização mais empregada no acoplamento LC-MS, por ser compatível com amostras muito polares ou iônicas, de baixa estabilidade térmica e massa molecular elevada (84).

Em ESI, a fase móvel na qual o analito encontra-se dissolvido passa através de um capilar, à pressão atmosférica, mantido sob alta voltagem, onde são

formadas pequenas gotas. Um fluxo de gás, geralmente nitrogênio, passa perpendicularmente a gota, reduzindo seu tamanho por dessolvatação. O acúmulo de cargas de mesmo sinal em um pequeno espaço acarreta a repulsão, ocasionando a “explosão coulômbica”, transferindo os íons para a fase gasosa os quais são encaminhados para o analisador (85). Como em ESI a ionização ocorre diretamente na solução, compostos sensíveis à temperatura podem ser ionizados sem sofrer degradação (85).

No analisador os íons são separados de acordo com a sua relação massa/carga (m/z). Existem cinco principais analisadores, sendo eles o de Setor Magnético (B), Quadrupolo (Q), o Ion Trap (IT), Tempo de Vôo (*Time-of-Flight Analyser*, TOF) e o Orbitrap. Frequentemente os analisadores são acoplados de modo a aumentar a seletividade, sensibilidade ou rapidez da análise. As características de construção e operação diferem de um analisador para outro, assim como seus benefícios e limitações. Desta forma, não existe um analisador de massas que seja ideal para todas as aplicações (84).

Um acoplamento muito utilizado em análises químicas é do analisador triploquadrupolo (QqQ), onde há a junção de três quadrupolos seguidos aumentando a seletividade do detector. Embora seja formado por três analisadores em série, nem todos eles são utilizados na separação dos íons de mesma razão m/z . O segundo quadrupolo funciona como uma cela de colisão, em que ocorre a fragmentação dos íons selecionados no primeiro quadrupolo além de também ser empregado como direcionador dos íons produzidos ao terceiro quadrupolo (85). O triploquadrupolo é um dos analisadores híbridos que permite o monitoramento da fragmentação de vários íons precursores simultaneamente, sendo este modo de varredura denominado monitoramento de reações múltiplas (*multiple-reaction monitoring*, MRM) (85).

O emprego da espectrometria de massas acoplado a cromatografia líquida utilizando o modo de varredura MRM possibilita a detecção de compostos presentes em baixas concentrações em matrizes complexas, uma vez que a detectabilidade é aumentada com consecutiva diminuição da interferência espectral de compostos presentes na matriz, além de aumentar a quantidade de informação estrutural que se pode obter (85).

Após saírem do analisador, os íons formados são encaminhados ao detector, último módulo de um espectrômetro de massas, que registra a carga induzida ou a corrente produzida quando um íon atravessa uma superfície ou atinge sua superfície (84).

3.6. Validação

A validação de métodos analíticos é definida pelo VIM (*Vocabulário Internacional de Metrologia*) como verificação na qual os requisitos especificados são adequados para um uso pretendido (86). De modo geral, a validação é necessária para verificar se o método analítico proposto é aplicável a um tipo específico de matriz numa taxa de concentração definida do analito, garantindo que os resultados analíticos expressem o conteúdo das amostras com um padrão aceitável de precisão (87).

Para afirmar a qualidade e a comparabilidade dos resultados analíticos produzidos por laboratórios aprovados para o controle oficial de resíduos, devem-se aplicar métodos validados que assegurem a conformidade dos procedimentos e critérios de desempenho, garantindo a rastreabilidade dos métodos frente às normas comuns aos laboratórios (88).

Para métodos analíticos de controle dos teores de micotoxinas em matrizes alimentares, os critérios de desempenho estão descritos no Regulamento (CE) Nº 401/2006 da Comissão de 23 de Fevereiro de 2006 (89), bem como em critérios específicos da Diretiva 2002/657/CE (88) e dos documentos SANTE/11813/2017 (90) de pesticidas e SANTE/12089/2016 de micotoxinas (91).

Os indicadores de desempenho são definidos pelo manual de garantia da qualidade como (13) :

Linearidade: capacidade de o método produzir resultados diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado.

Seletividade: capacidade do procedimento analítico de discriminar entre a substância a analisar e substâncias análogas (isômeros, metabólitos, produtos de degradação, substâncias endógenas, componentes da matriz, isóbaros e componentes que possam gerar interferência poliatômica, entre outras).

Efeito Matriz: objetiva averiguar possíveis interferências causadas pelas diversas substâncias que compõem a matriz amostral, gerando, basicamente, fenômenos de diminuição ou ampliação do sinal instrumental ou resposta instrumental.

Veracidade/Recuperação: concordância entre a média de um número suficientemente grande de resultados de um ensaio e o valor de referência aceito convencionalmente como verdadeiro.

Precisão: estimativa da dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, em condições definidas.

Limites de Detecção (LD): valor medido, obtido por um dado procedimento de medição, para o qual a probabilidade de declarar falsamente a ausência de um componente em um material é β , sendo α a probabilidade de declarar falsamente a sua presença.

Limites de Quantificação (LQ): menor concentração ou teor que pode ser quantificado com a maior incerteza aceitável ou incerteza máxima aceitável.

Robustez: avalia o quão sensível o resultado analítico é frente às variações nas condições experimentais do procedimento analítico. Esta pode ser avaliada durante as etapas de otimização do método, na qual são feitas variações nas condições de extração e de análise instrumental. Dispensando, muitas vezes, a necessidade da realização de experimentos adicionais.

Limite de Decisão (CC α) e Capacidade de Detecção (CC β): parâmetros que medem o desempenho do procedimento analítico, levando em consideração a incerteza da medição no nível de concentração trabalhado.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

A identificação e quantificação das micotoxinas foram realizadas no Laboratório de Controle de Qualidade e Segurança Alimentar (LACQSA), que é um dos laboratórios oficiais do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Referência em análises de micotoxinas em produtos de origem vegetal e animal, o LACQSA pertence ao Laboratório Federal de Defesa Agropecuária de Minas Gerais (LFDA-MG).

4.1. Amostras

Para o desenvolvimento, otimização e validação do método de análise, foram utilizadas cervejas do tipo Pilsen, adquiridas em comércio local.

Cinco amostras foram combinadas para a obtenção de um *pool* e posteriormente desgaseificadas, sendo armazenadas em um frasco de vidro e mantidas em geladeira sob-resfriamento a (2-8°C) durante os estudos de otimização e validação do método.

Para o estudo da ocorrência de micotoxinas, foram adquiridas dez amostras em comércio local das cervejas dos tipos Pilsen, Lager, de trigo e sem álcool, conforme demonstra Tabela 2.

Tabela 2: Identificação das amostras obtidas em comércio local

Identificação (Lote)	Tipo	Ingredientes
TM 20:52 B	Pilsen	Água, malte e lúpulo
TM A 14:10	Lager	Águas, malte, cereais não maltados e lúpulo
JA13:282 A	Sem álcool	Água, malte, cereais não maltados, carboidratos e lúpulo
L9090076CC 21:44	Pilsen	Água, malte, cereais não maltados e lúpulo
PI00:552 A	Lager	Água, malte e lúpulo
L9119076F0931	Pilsen	Água, malte, milho e lúpulo
JC15:534	Lager	Água, malte de cevada, lúpulo e extrato de casca de laranja
MG02:231	Pilsen	Água, malte, cereais não maltados e lúpulo
L82	Cerveja de trigo (weiss)	Água, maltes (cevada e trigo), lúpulo, levedura e antioxidante INS316
1763	Cerveja de trigo (Hefe weizen)	Água, maltes de cevada, malte de trigo e lúpulo.

Fonte: próprio autor

Todas as amostras também passaram pelo processo de desgaseificação e foram armazenadas individualmente em frascos de vidro e mantidas em geladeira sob-resfriamento a (2-8°C) durante a realização do experimento.

4.2. Sistema UHPLC-MS/MS

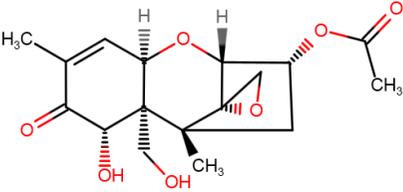
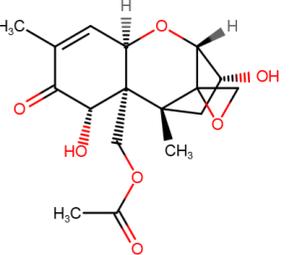
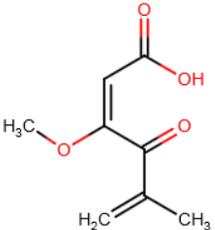
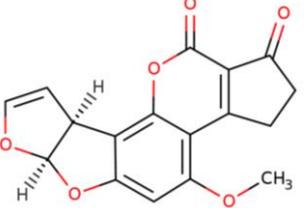
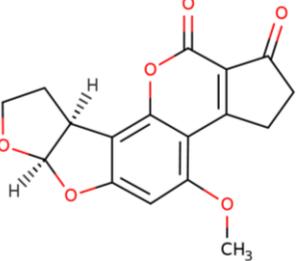
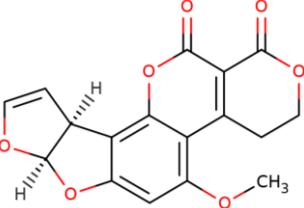
Para separação, identificação e quantificação das micotoxinas foi empregado um cromatógrafo líquido de ultra-alta eficiência da Agilent, modelo 1290 (Santa Clara, USA) acoplado a um espectrômetro de massas sequencial da Sciex, modelo QTRAP 6500 (Toronto, Canadá).

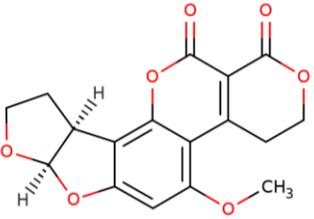
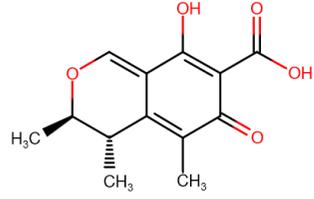
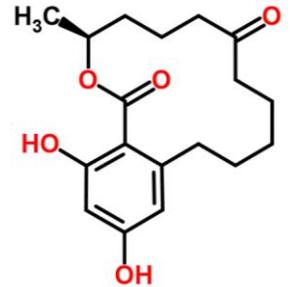
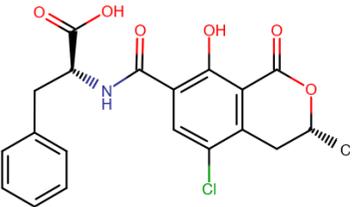
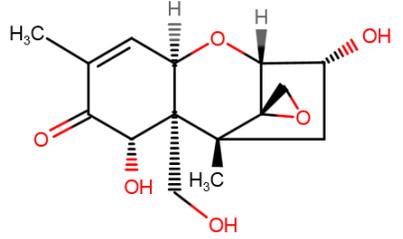
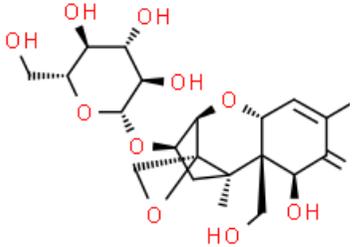
4.3. Padrões

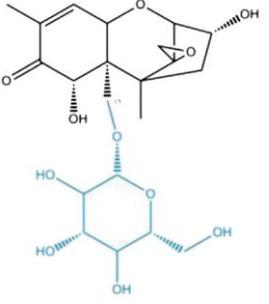
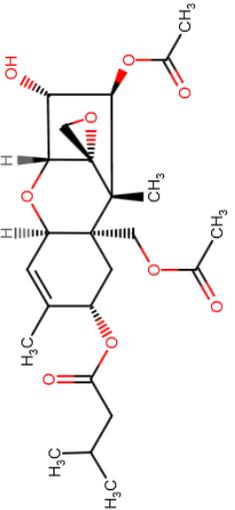
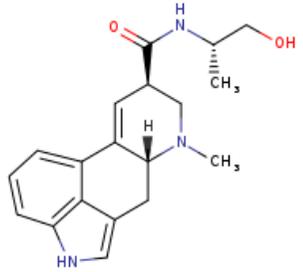
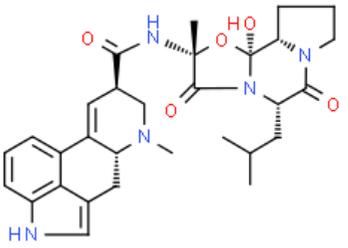
Os padrões de aflatoxina B1, G1 e G2, citrinina, ergonovina, zearalenona, citreoviridina A, α -ergocriptina, deoxinivalenol e toxina T-2 foram adquiridos junto a Sigma Aldrich (Saint Louis, USA). Os padrões de ácido penicílico, aflatoxina B2, dihidroergocristina, ergocristina, ergocristinina, ergocornina, ocratoxina A e fumonisina B1, foram obtidos junto à empresa Biopure (Getzersdorf, Austria). E a micotoxina ergosina foi adquirido junto a empresa LGC Standards (Middlesex, Reino Unido). A pureza dos padrões variou de 96,6 - 99,7%. Também foi usado material de referência certificado (MRC) de Deoxinivalenol adquirido junto a empresa Sulpelco Trace Cert (Bellefonte, USA) no segundo e terceiro dia de validação: Lote XA19691V, 99,5% de pureza em solução de acetato de etila:metanol 95:5 (v/v).

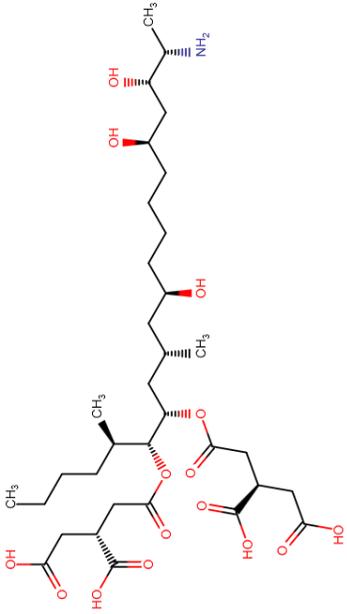
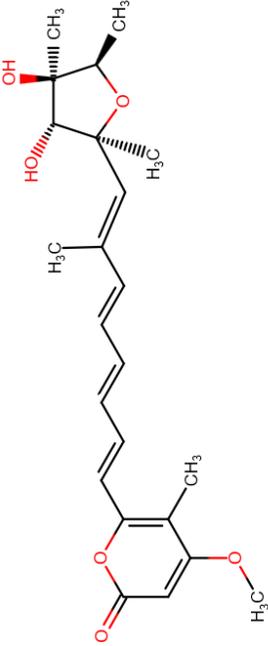
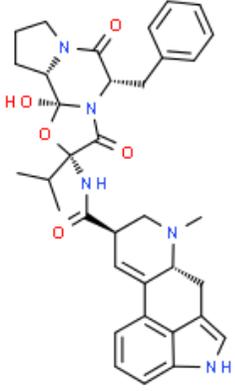
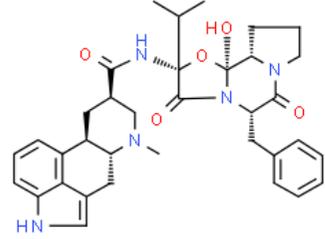
A relação dos analitos encontra-se descrita na Tabela 3.

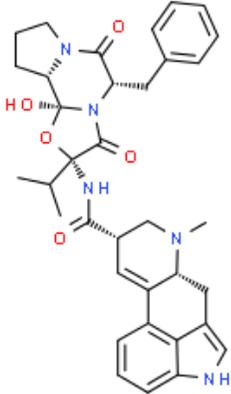
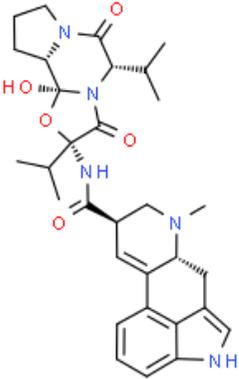
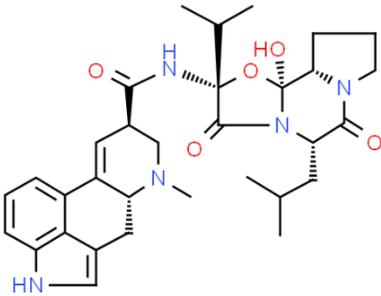
Tabela 3: Identificação dos analitos sob investigação.

Analito	Nº CAS	Estrutura	MM (g/mol)	Analito	Nº CAS	Estrutura	MM (g/mol)
3-acetil-deoxinivalenol	50722-38-8		322,4	15-acetil-deoxinivalenol	88337-96-6		338,4
Ácido penicílico	90-65-3		170,2	Aflatoxina B1	1162-65-8		312,3
Aflatoxina B2	7220-81-7		314,3	Aflatoxina G1	1165-39-5		328,3

Analito	Nº CAS	Estrutura	MM (g/mol)	Analito	Nº CAS	Estrutura	MM (g/mol)
Aflatoxina G2	7241-98-7		330,3	Citrinina	518-75-2		250,2
Zearalenona	17924-94-4		318,4	Ocratoxina A	303-47-9		403,8
Deoxinivalenol	51481-10-8		296,3	Deoxinivalenol-3-glucosídeo	131180-21-7		458,5

Analito	Nº CAS	Estrutura	MM (g/mol)	Analito	Nº CAS	Estrutura	MM (g/mol)
Deoxinivalenol-15-glucosídeo	-		458,5	Toxina T-2	21259-20-1		466,5
Ergonovina (ergometrina)	60-79-7		325,4	Ergosina	561-94-4		547,6

Analito	Nº CAS	Estrutura	MM (g/mol)	Analito	Nº CAS	Estrutura	MM (g/mol)
Fumonisina B1	116355-83-0		721,8	Citreoviridina A	25425-12-1		402,5
Ergocristina	511-08-0		609,7	Dihidroergocristina a	17479-19-5		611,7

Analito	Nº CAS	Estrutura	MM (g/mol)	Analito	Nº CAS	Estrutura	MM (g/mol)
Ergocristinina	511-07-09		609,7	Ergocornina	564-36-3		561,7
α -ergocriptina	511-09-1		575,7				

Fonte: adaptado de Fermentek (31) e ChemSpider (32)

4.4. Materiais

- i. Homogeneizador de amostra automatizado da SPEX SamplePrep, modelo Geno/Grinder (Metuchen, USA);
- ii. Centrífuga com rotores para tubos de 50 mL e capacidade de rotação de até 4000 rpm, Thermo (Waltham, USA);
- iii. Concentrador de amostras capacidade de rotação de até 1500 rpm e aquecimento na faixa de 30°C a 60°C, marca Christ modelo RVC 2-18 CDplus (Osterode am Harz, Alemanha) acoplado a bomba de vácuo marca vacuubrand, modelo MZ 2C NT + AK+ EK (Wertheim, Alemanha);
- iv. Espectrofotômetro de ultravioleta tipo UV-1800 da Shimadzu (Quioto, Japão).
- v. Micropipetas com capacidade de 20 a 10000 µL, Gilson (Middleton, USA);
- vi. Tubos de polipropileno com tampa para centrífuga com capacidade de 50 mL;
- vii. Coluna cromatográfica com recheio C18 da marca Thermo, modelo Hypersil Gold e dimensões de 50 x 2.1mm x 1.9 µm, Agilent (Waltham, MA USA);
- viii. Pré-coluna com recheio de C18, da marca Waters (Elstree, Inglaterra);
- ix. Densímetro automático digital Anton Paar modelo DMA 4500 (Graz, Áustria).

4.5. Reagentes

- i. Água ultrapura (tipo I);
- ii. Acetonitrila grau HPLC, J. T. Baker (Center Valley, USA).;
- iii. Metanol grau HPLC, J.T. Baker (Center Valley, USA).;
- iv. Ácido acético glacial p.a., Êxodo Científica (Sumaré, Brasil);
- v. Acetato de amônio p.a., CRQ Química (Diadema, Brasil);
- vi. Sulfato de magnésio anidro p.a., Spectrum (New Brunswick, USA);
- vii. Sulfato de magnésio anidro p.a., Sigma Aldrich (Saint Louis, USA);
- viii. Cloreto de sódio p.a., Dinâmica (Indaiatuba, Brasil).

4.6. Soluções

4.6.1. Solução padrão estoque

As soluções padrão estoque utilizadas foram aproveitadas de outro projeto realizado no Lacqsa (92). Por ser instável e facilmente degradável, a solução estoque de deoxinivalenol precisou ser renovada e padronizada mensalmente. Todas as soluções estoque foram preparadas em acetonitrila, exceto a solução de fumonisina B1, que foi preparada em acetonitrila:água na proporção 1:1 (v/v). As substâncias que absorvem na região do ultravioleta visível (UV-VIS) foram previamente padronizadas de acordo com o Manual da Garantia da Qualidade Analítica (13). As concentrações das micotoxinas podem ser observadas na Tabela 4.

Tabela 4: Concentrações das soluções estoque das micotoxinas.

Micotoxina	Concentração disponível (µg/mL)	Massa molecular (g/mol)	Absorvividade Molar (Λ) ¹
15-acetil-desoxinivalenol	1000	338,4	**
3-acetil-desoxinivalenol	100,5	322,4	**
Ácido penicílico	99,6	170,2	**
Aflatoxina B1	100	312,3	20700 (350 nm)
Aflatoxina B2	100	314,3	22500 (350 nm)
Aflatoxina G1	100	328,3	17600 (350 nm)
Aflatoxina G2	100	330,3	18900 (350 nm)
Alfa-ergocriptina	1220	575,7	**
Citreoviridina A	100	402,5	44925 (383 nm)
Citrinina	20	250,2	**
Deoxinivalenol	*	296,3	6400 (208 nm)
Deoxinivalenol-3-glucosídeo	ND	458,5	**
Deoxinivalenol-15-glucosídeo	ND	458,5	**
Dihidroergocristinina	200,2	611,7	**
Ergocornina	100,4	561,7	**
Ergocristina	167,7	609,7	**
Ergocristinina	50,2	609,7	**
Ergonovina (ergometrina)	51	325,4	**

Micotoxina	Concentração disponível (µg/mL)	Massa molecular (g/mol)	Absorvitiividade Molar (λ) ¹
Ergosina	173	547,6	**
Fumonisina B1	102,3	721,8	**
Ocratoxina A	100	403,8	5440 (333nm)
Toxina T-2	1000	466,5	**
Zearalenona	2000	2000	6000 (314 nm)

Fontes: próprio autor e ¹ Manual da Garantia da Qualidade Analítica (13).

* A concentração da solução estoque variava de acordo com o mês de análise

** Não absorvem na região do UV/VIS

ND = padrão não disponível

Os padrões das micotoxinas 15-acetil-deoxinivalenol, 3-acetil-deoxinivalenol, deoxinivalenol-15-glucosídeo e deoxinivalenol-3-glucosídeo, não estavam disponíveis ou estavam disponíveis em pequena quantidade. Desta forma, a presença destes analitos foi avaliada apenas qualitativamente em amostras de cerveja, uma vez que não foi possível a inclusão desses compostos na etapa de validação.

4.6.2. Soluções *pool* de micotoxinas

As soluções estoque disponíveis foram diluídas em acetonitrila para o preparo de um *pool* de micotoxinas, com a ausência apenas das micotoxinas deoxinivalenol e fumonisina B1. A fumonisina B1 foi diluída separadamente, pois sua concentração na solução estoque era relativamente baixa para a composição do *pool*, necessitando de um volume muito grande para alcançar a concentração desejada. Já o deoxinivalenol precisou ser separado do *pool* devido a sua baixa estabilidade. A concentração do *pool* foi definida de modo a permitir a fortificação dos extratos no maior nível de concentração avaliado.

A concentração de cada analito no *pool* pode ser observada na Tabela 5.

Tabela 5: Concentração das micotoxinas no *pool*.

Pool	Analito	Concentração do padrão no <i>pool</i> (µg/mL)
1	Aflatoxina B1	0,16
	Aflatoxina B2	0,10

Pool	Analito	Concentração do padrão no <i>pool</i> ($\mu\text{g/mL}$)
	Aflatoxina G1	0,10
	Aflatoxina G2	0,10
	Citreoviridina A	1,00
	Ocratoxina A	0,50
	Zearalenona	5,20
	Toxina T-2	8,00
	Citrinina	0,53
	ácido penicílico	0,73
	α -ergocriptina	0,73
	Dihidroergocristina	0,76
	Ergonovina (ergometrina)	0,76
	Ergosina	0,76
	Ergocornina	0,76
	Ergocristinina	0,65
	Ergocristina	0,74
2	Fumonisina B1	50,47
3	Deoxinivalenol	37,40

Fonte: próprio autor

4.6.3. Soluções de eluição

Foram utilizadas como fase móvel, uma adaptação das soluções utilizadas em projeto desenvolvido anteriormente no LACQSA (92):

A. Água ultrapura com 0,1% (v/v) de ácido acético p.a., 2% (v/v) de metanol grau HPLC e 5 mM de acetato de amônio p.a.

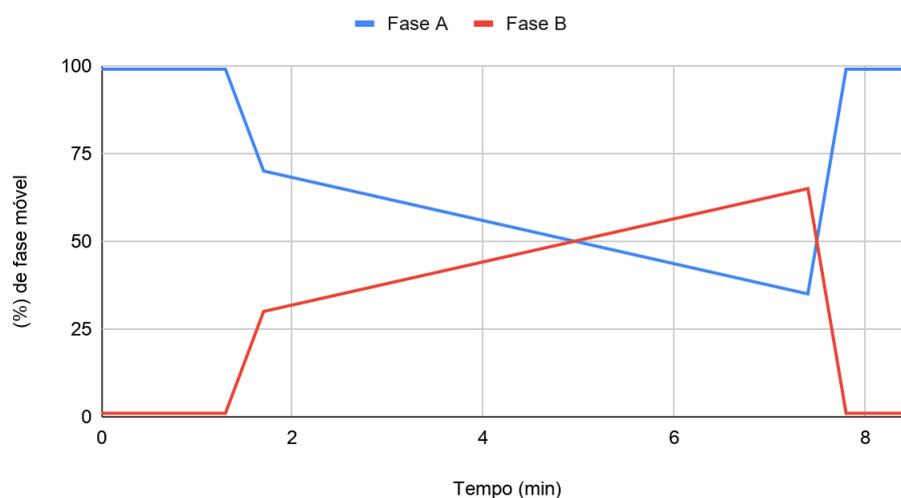
B. Acetonitrila grau HPLC com 0,1% (v/v) de ácido acético.

O gradiente utilizado foi iniciado em 99% da fase A e mantido por 1,3 min., sendo que, em 1,7 min., passou para 70% de A. De 1,7 a 7,4 min. reduziu linearmente até 35%, e em 7,8 min., retomou a condição inicial do método até 8,5 min, sendo este o tempo total da análise. O volume de injeção da amostra foi de 5,0 μL , a temperatura da coluna foi mantida a 30 $^{\circ}\text{C}$ e do auto-amostrador 10 $^{\circ}\text{C}$ e o fluxo da fase móvel foi mantido constante a uma vazão de 0,40 mLmin^{-1} .

Na Figura 13 pode-se observar o gradiente utilizado no método:

Figura 13: Representação do gradiente de eluição

Gradiente utilizado no método para determinação de micotoxinas em cerveja



Fonte: próprio autor

4.7. Método

4.7.1. Otimização dos parâmetros de tensão do espectrômetro de massas

Para a determinação dos parâmetros de tensão do espectrômetro de massas (*Declustering Potential*, “DP”; *Entrance Potential*, “EP”; *Collision Energy*, “CE” e *Collision Cell Exit Potential*, “CXP”) foi utilizado uma solução de cada micotoxina na concentração aproximada de 0,1 $\mu\text{g/mL}$, aplicando a fase móvel “B” como solvente. Uma injeção direta, empregando uma seringa de infusão, foi realizada no equipamento numa vazão de 10 $\mu\text{L/min}$.

Foram utilizados dados de m/z do íon precursor da literatura para a otimização dos parâmetros de tensão (93). O ESI-MS / MS foi operado no modo de monitoramento de reação múltipla (MRM), sendo monitoradas as polaridades positiva

e negativa. Durante a varredura, foram procurados por pelo menos duas reações de fragmentação por analito. As configurações da fonte ESI já haviam sido programadas em trabalho anterior (92) e estavam projetadas para operar nas seguintes condições: temperatura da fonte 500 °C, fonte de íons gás 1 (gás de revestimento) 50 psi, íon gás fonte 2 (gás de secagem) 45 psi, tensão de pulverização de íons +4500 V e -4500 V para as polaridades positiva e negativa, respectivamente. A pressão do gás de colisão (nitrogênio) foi atribuída como Medium.

4.7.2. Otimização do procedimento de extração

Um estudo de otimização univariado do método *dilute and shoot* (69) foi feito para o procedimento de extração, onde foram analisadas a composição da solução extratora, a quantificação dos resíduos não voláteis dos extratos obtidos e a avaliação do efeito da força iônica sobre a extração das micotoxinas.

Para a análise da composição da fase extratora, 1 mL de amostra desgaseificada foi fortificada com 20 µL de um *pool* de micotoxinas em um tubo Falcon com capacidade para 15 mL. 4 mL de solução extratora, com variações entre 0% a 100% de metanol em acetonitrila, foram acrescentados ao tubo. A mistura foi agitada em vórtex por 1 minuto e centrifugada a 4000 rpm durante 10 minutos. Alíquotas de 1 mL do sobrenadante foram pipetadas, transferidas para *vials* e analisadas em UHPLC acoplado ao espectrômetro de massas no modo sequencial.

A quantificação dos resíduos não voláteis foi feita através da evaporação de 1 mL dos extratos obtidos com as soluções de extração em diferentes proporções, utilizando um concentrador de amostras com aquecimento a 44°C. Os tubos de ensaio com os extratos foram pesados antes e depois da evaporação para a determinação dos sólidos residuais.

A avaliação do efeito da força iônica sobre a extração das micotoxinas na amostra de cerveja foi feita através da análise univariada da adição de 0,5 g de acetato de sódio e 100 µL de ácido fórmico em 1 mL de cerveja desgaseificada fortificada com 20 µL do *pool* de micotoxinas. Nessa etapa da otimização foi utilizado como solvente a solução acetonitrila:metanol 80:20 (v/v). As misturas obtidas foram agitadas em vórtex por 1 minuto e centrifugadas a 4000 rpm durante 10 minutos. Alíquotas de 1 mL dos sobrenadantes foram pipetadas, transferidas para *vials* e analisadas em UHPLC acoplado ao espectrômetro de massas no modo sequencial.

Paralelamente aos experimentos do método de *dilute and shoot*, foi realizada uma otimização do método QuEChERS (73). Para isso, foi realizado um planejamento de experimento fatorial 2^4 , tendo como variáveis a porcentagem de acetonitrila e metanol como solventes de extração, porcentagem de ácido fórmico para a acidificação da amostra, e as quantidades dos sais cloreto de sódio e sulfato de magnésio a serem adicionadas ao método. A Tabela 6 apresenta as variáveis avaliadas no planejamento de experimentos.

Tabela 6: Variáveis avaliadas no planejamento de experimentos do método QuEChERS

Fatores	+1	-1
Solvente (% de ACN)	100	50
Ácido Fórmico (%)	5	0
NaCl (g)	2,5	0
MgSO ₄ (g)	3	0

Fonte: próprio autor

Para a realização da otimização do método QuEChERS, 4 mL de cerveja degaseificada do tipo Pilsen foram pipetados para um tubo Falcon de 50 mL e fortificados com 40 µL de cada *pool* de micotoxinas. Foi adicionado aos tubos Falcon 16 mL do solvente de extração, onde as proporções de acetonitrila foram variadas de 100 a 50% (100% acetonitrila ou 50:50 v/v acetonitrila:metanol). A mistura foi homogeneizada por 10 minutos a 1000 rpm no homogeneizador de amostras. A acidificação da amostra com ácido fórmico e a adição de cloreto de sódio foram efetuadas antes da adição do sulfato de magnésio. A adição do agente secante foi realizada por último já que sua reação de hidratação exotérmica poderia superaquecer o sistema, caso fosse adicionado antes da solução extratora, podendo comprometer os resultados da análise.

Os tubos foram agitados por 10 minutos no homogeneizador de amostras e centrifugados a 4000 rpm pelo mesmo tempo. Uma alíquota de 10 mL do sobrenadante foi pipetada, vertida em um tubo Falcon de 15 mL e evaporada a um volume menor do que 2 mL no concentrador de amostras. O volume do extrato foi elevado a 2 mL no próprio tubo Falcon, utilizando como solvente metanol: água 1:1

(v/v). O extrato obtido foi colocado em *vial* e analisado através da análise cromatográfica (UHPLC) acoplada ao espectrômetro de massas no modo sequencial.

4.7.3. Parâmetros de validação

Para a validação do método de análise de micotoxinas em cerveja empregando UHPLC-MS/MS, foi utilizado como referência o Manual de Garantia da Qualidade Analítica (13), do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), a Diretiva 2002/657/CE (88) o Regulamento (CE) Nº 401/2006 da Comissão de 23 de Fevereiro de 2006 (89) e os documentos SANTE 11813/2017 (90) e 12089/2016 (91). As figuras de mérito avaliadas foram seletividade, efeito matriz, linearidade, veracidade e precisão, Limites de Detecção (LD), Quantificação (LQ), decisão ($CC\alpha$), capacidade de detecção ($CC\beta$) e incerteza de medição. A robustez foi avaliada durante os experimentos de otimização do método.

Para tal estudo foram realizados ensaios com soluções padrão de micotoxinas e material de referência certificado (MRC) de deoxinivalenol. Como branco, foi utilizado o extrato de um *pool* de cervejas do tipo Pilsen.

4.7.3.1. Seletividade

A seletividade foi avaliada de acordo com o Manual de Garantia da Qualidade Analítica (13), que determina que o analista deve analisar amostras brancas e averiguar a presença de interferentes na região de interesse que se espera a eluição do analito. Caso exista algum interferente, a seletividade do método só é aceitável se o sinal do interferente não ultrapassar 30% do sinal apresentado para o analito na concentração referente ao limite de detecção.

4.7.3.2. Efeito matriz

Para avaliação do efeito matriz, foi construída uma curva de calibração, em triplicata de preparo e unicata de injeção, de analito em solvente com sete níveis de concentração, usando soluções padrão de calibração, de analito puro em solvente puro. Em paralelo, foi preparada uma curva de calibração, em duplicata de análise e duplicata de injeção, através do extrato da matriz branca fortificada com padrões de calibração.

O critério adotado para determinação do efeito matriz foi a comparação entre os interceptos e os coeficientes angulares das curvas em matriz e em solvente. As avaliações estatísticas foram feitas a partir dos testes F (Fischer-Snedecor) para avaliação de variâncias combinadas ou distintas (13). A equação 1 demonstra os cálculos utilizados para avaliar o teste F:

Equação 1

$$F = S_1^2 / S_2^2 \quad \text{ou} \quad F = S_2^2 / S_1^2$$

Onde:

S_1 e S_2 = variância dos dois grupos de amostras matrizadas e não matrizadas, com a maior variância no numerador.

Caso as variâncias fossem distintas ($F_{\text{calculado}} > F_{\text{tabelado}}$), era considerado que a matriz tinha efeito importante sobre a precisão do método, sendo, portanto, considerado efeito matriz. Caso contrário, se as variâncias fossem consideradas iguais ($F_{\text{calculado}} < F_{\text{tabelado}}$), os desvios-padrão dos interceptos eram agrupados, assim como os desvios padrões das inclinações, e a igualdade testada com a distribuição t de Student (94). As equações 2 e 3, demonstram os cálculos utilizados para avaliação do teste t:

Equação 2

$$t = \frac{|\bar{X}_1 - \bar{X}_2|}{\sqrt{S^2 \left(\frac{1}{n_1} \right) + \left(\frac{1}{n_2} \right)}}$$

Onde:

$\bar{X}_1 - \bar{X}_2$ = são as médias das respostas dos analitos para amostras com e sem matriz no mesmo nível de concentração.

Equação 3

$$S^2 = \frac{(n_1 - 1) S_1^2 + (n_2 - 1) S_2^2}{(n_1 + n_2 - 2)}$$

n_1 e n_2 = número de amostras paralelas nos dois grupos.

A um nível de significância de 5% ($\alpha=0,05$), foram assumidas duas hipóteses: H_0 - as curvas apresentam o mesmo intercepto e coeficiente angular e H_1 - as curvas possuem intercepto e coeficiente angulares distintos. Foram considerados efeitos de matriz quando os interceptos e coeficientes angulares eram distintos entre as curvas.

4.7.3.3. Linearidade

A linearidade foi avaliada de acordo com o manual de garantia da qualidade analítica, que aconselha que a curva de calibração seja constituída por pelo menos cinco níveis de concentração preparados independentemente por no mínimo três vezes sendo as leituras instrumentais realizadas aleatoriamente (13).

Para a avaliação da linearidade, foram preparadas sete curvas de calibração independentes, construídas através do extrato da matriz branca fortificada, no decorrer dos três dias de validação. Cada curva foi preparada com sete níveis de concentração distribuídos equidistantemente e injetados em duplicata no sistema de UHPLC-MS/MS. Desta forma, foram obtidos 14 resultados de análise para cada ponto da curva em condições de precisão intermediária. Foram preparados e injetados também, dezesseis extratos de matriz branca isentos de matriz e fortificação.

Para a preparação da curva de calibração, 3625 μL de extrato de matriz branca foram fortificados com 125 μL de cada um dos três *pools* de micotoxina, totalizando 4000 μL de extrato de matriz branca fortificado. O extrato fortificado foi então submetido a seis etapas de diluição com extrato de matriz branca não fortificado para obtenção dos pontos da curva de calibração. As concentrações das micotoxinas no extrato da matriz branca fortificado, bem como as diluições efetuadas para a obtenção das curvas de calibração e as concentrações dos analitos em cada ponto da curva, podem ser observados nas Tabelas 7, 8 e 9, respectivamente.

As concentrações da curva de calibração foram escolhidas com base nos limites de detecção de micotoxinas no arroz (95), já que é a matriz de trabalho do LACQSA com menos interferentes amostrais onde são alcançados baixos limites de detecção. Como a cerveja é composta por aproximadamente 90% de água, os limites de fortificação escolhidos, bem como os limites de detecção, deveriam ser baixos o suficiente para a avaliação da presença das micotoxinas nesta matriz.

Tabela 7: Concentração das micotoxinas no extrato da matriz branca fortificado para elaboração de curva de calibração em relação à quantidade de analito na cerveja e em extrato.

Analito	Concentração na matriz (μgL^{-1})	Concentração no extrato ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
Ácido Penicílico	18,250	0,023
Aflatoxina B1	4,000	0,005
Aflatoxina B2	2,500	0,003
Aflatoxina G1	2,500	0,003
Aflatoxina G2	2,500	0,003
Citrinina	13,250	0,017
Citrioviridina	25,000	0,031
Deoxinivalenol	935,000	1,169
Dihidroergocristinina	19,025	0,024
Ergocornina	19,075	0,024
Ergocristina	18,450	0,023
Ergocristinina	16,325	0,020
Ergonovina	19,000	0,024
Ergosina	19,025	0,024
Fumonisina B1	1250,000	1,563
Ocratoxina A	12,500	0,016
Toxina T-2	200,000	0,250
Zearalenona	130,000	0,163
α -ergocriptina	18,325	0,023

Fonte: próprio autor

Tabela 8: Diluições realizadas para obtenção da curva de calibração.

Ponto	Volume de extrato branco fortificado (μL)	Volume de extrato branco (μL)	Volume final (μL)
1	1000	0	1000
2	800	200	1000
3	600	400	1000
4	400	600	1000
5	200	800	1000
6	100	900	1000

Ponto	Volume de extrato branco fortificado (μL)	Volume de extrato branco (μL)	Volume final (μL)
7	80	920	1000

Fonte: próprio autor

Tabela 9: Concentração dos analitos calculada para cada nível da curva de calibração.

Analito	Nível						
	1	2	3	4	5	6	7
	Concentração (μgL^{-1})						
Ácido Penicílico	18,250	14,600	10,950	7,300	3,650	1,825	1,460
Aflatoxina B1	4,000	3,200	2,400	1,600	0,800	0,400	0,320
Aflatoxina B2	2,500	2,000	1,500	1,000	0,500	0,250	0,200
Aflatoxina G1	2,500	2,000	1,500	1,000	0,500	0,250	0,200
Aflatoxina G2	2,500	2,000	1,500	1,000	0,500	0,250	0,200
Citrinina	13,250	10,600	7,950	5,300	2,650	1,325	1,060
Citrioviridina	25,000	20,000	15,000	10,000	5,000	2,500	2,000
Deoxinivalenol	935,000	748,000	561,000	374,000	187,000	93,500	74,800
Dihidroergocristinina	19,025	15,220	11,415	7,610	3,805	1,903	1,522
Ergocornina	19,075	15,260	11,445	7,630	3,815	1,908	1,526
Ergocristina	18,450	14,760	11,070	7,380	3,690	1,845	1,476
Ergocristinina	16,325	13,060	9,795	6,530	3,265	1,633	1,306
Ergonovina	19,000	15,200	11,400	7,600	3,800	1,900	1,520
Ergosina	19,025	15,220	11,415	7,610	3,805	1,903	1,522
Fumonisina B1	1250,000	1000,000	750,000	500,000	250,000	125,000	100,000
Ocratoxina A	12,500	10,000	7,500	5,000	2,500	1,250	1,000
Toxina T-2	200,000	160,000	120,000	80,000	40,000	20,000	16,000
Zearalenona	130,000	104,000	78,000	52,000	26,000	13,000	10,400
α -ergocriptina	18,325	14,660	10,995	7,330	3,665	1,833	1,466

Fonte: próprio autor

A avaliação de outliers foi realizada pela aplicação do teste de Jackknife (94). O gráfico foi traçado pelo Método dos Mínimos Quadrados Ponderados (MMQP) para obtenção dos parâmetros de regressão linear, $\hat{y}_i = \alpha_w + \beta_w x_i$ onde α_w é o intercepto e β_w a inclinação, conforme recomendação do manual de garantia da

qualidade analítica (13), eliminando assim a necessidade de se fazer o teste de homocedasticidade da curva de calibração .

A normalidade e independência dos resíduos da regressão ponderada foram investigados através dos testes Ryan-Joiner (96) e Durbin-Watson (97), respectivamente. A avaliação da significância da regressão foi realizada através do teste t.

4.7.3.4. Veracidade e precisão

A veracidade do método foi avaliada através da recuperação analítica. Para isso, foram analisados extratos de matriz brancos (isentos de analitos) sem fortificação e amostras fortificadas com os padrões de micotoxinas em quatro níveis de concentração, sendo sete replicatas reais de análise em três dias de validação, totalizando 21 resultados de análise para cada ponto de fortificação. As concentrações de cada micotoxina nos quatro níveis de fortificação podem ser observadas na Tabela 10. Como a cerveja é composta por aproximadamente 90% de água, foram escolhidos limites de fortificação baixos, para a avaliação da presença das micotoxinas na matriz.

O fator de recuperação F_{rec} foi calculado pela Equação 4 (13) :

Equação 4

$$F_{rec} = \frac{C_f - C_{nf}}{C_{ad}} \times 100$$

Onde,

C_f = teor medido após fortificação da matriz branca;

C_{nf} = teor medido na matriz branca não fortificada,

C_{ad} = teor do analito puro adicionado à matriz branca.

Tabela 10: Concentração de fortificação de extratos de matriz branca para estudos de veracidade e precisão.

Analito	Concentração 1° nível (μgL^{-1})	Concentração 2° nível (μgL^{-1})	Concentração 3° nível (μgL^{-1})	Concentração 4° nível (μgL^{-1})
Ácido Penicílico	17,500	10,500	3,500	1,400
Aflatoxina B1	4,000	2,400	0,800	0,320
Aflatoxina B2	2,500	1,500	0,500	0,200

Analito	Concentração 1° nível (μgL^{-1})	Concentração 2° nível (μgL^{-1})	Concentração 3° nível (μgL^{-1})	Concentração 4° nível (μgL^{-1})
Aflatoxina G1	2,500	1,500	0,500	0,200
Aflatoxina G2	2,500	1,500	0,500	0,200
Citrinina	12,500	7,500	2,500	1,000
Citrioviridina	25,000	15,000	5,000	2,000
Deoxinivalenol	937,500	562,500	187,500	75,000
Dihidroergocristina	19,025	11,415	3,805	1,522
Ergocornina	19,075	11,445	3,815	1,526
Ergocristina	18,450	11,070	3,690	1,476
Ergocristinina	16,325	9,795	3,265	1,306
Ergonovina	19,000	11,400	3,800	1,520
Ergosina	19,025	11,415	3,805	1,522
Fumonisina B1	1250,000	750,000	250,000	100,000
Ocratoxina A	12,500	7,500	2,500	1,000
Toxina T-2	200,000	120,000	40,000	16,000
Zearalenona	130,000	78,000	26,000	10,400
α -ergocriptina	18,325	10,995	3,665	1,466

Fonte: próprio autor

Os valores obtidos nos três dias de ensaio foram combinados de forma a se obter a média de recuperação para cada um dos analitos sob investigação. Foram consideradas aceitáveis as recuperações que apresentaram desempenho conforme os critérios descritos na Diretiva CE 401/2006 para determinação de micotoxinas em gêneros alimentícios (89) descritos na Tabela 11, por não existirem limites máximos toleráveis para cerveja nas legislações vigentes. Para as micotoxinas sob investigação que não se encontram na Tabela 11, foram consideradas aceitáveis as recuperações que estavam na faixa de 70% e 110% para fortificações entre $1 \mu\text{gkg}^{-1}$ e $10 \mu\text{gkg}^{-1}$, e recuperações entre 80% e 110% para concentrações de fortificação acima de $10 \mu\text{gkg}^{-1}$, conforme determinação da Diretiva 2002/657/CE (88).

Como os critérios da legislação são referendados na unidade μgkg^{-1} , foi necessário averiguar a densidade das cervejas em estudo, utilizando o densímetro automático Anton Paar. Constatou-se que todas as amostras analisadas, incluindo o *pool* de cervejas utilizado para otimização e validação do método, têm densidades

próximas à da água, equivalente a 1,00 g/cm³, sendo as unidades µgkg⁻¹ e µgL⁻¹ consideradas equivalentes para reportar os resultados.

Tabela 11: Critérios de desempenho dos procedimentos analíticos para determinação de micotoxinas em produtos de origem vegetal.

Micotoxina	Nível (µgkg ⁻¹)	Recuperação (%)	RSD _r	RSD _R
Aflatoxinas B1, B2, G1, G2*	<1	50 – 120	0,66 x RSD _R	Recomendado: valor derivado da equação de Horwitz. Máximo: 2 vezes o valor derivado da equação de Horwitz.
	1 – 10	70 – 110		
	>10	80 – 110		
Citrinina	Todos	70 – 120		
Citreoviridina	<5	60 – 130	< 40	< 50
	>5	65 – 110	< 25	< 40
Desoxinivalenol	>100 - <500	60 – 110	< 20	< 40
	>500	70 – 120	< 20	< 40
Fumonisinias B1 e B2	<500	60 – 120	< 30	< 60
	>500	70 – 110	< 20	< 30
Ocratoxina A	<1	50 – 120	< 40	< 60
	1 – 10	70 – 110	< 20	< 30
Zearalenona	<50	60 – 120	< 40	< 50
	>50	70 – 120	< 25	< 40
Toxinas T-2	50-250	60-130	< 40	< 60
	>250	60-130	< 30	< 50

Fonte: Diretiva CE 401/2006 (89). Adaptado de Manual de garantia da qualidade analítica (13).

Notas: * Estes critérios aplicam-se para B1 e para a soma de B1, B2, G1 e G2.

Legenda: RSD_r = desvio padrão relativo, calculado a partir dos resultados obtidos em condições de repetitividade. RSD_R = desvio-padrão relativo, calculado a partir dos resultados obtidos em condições de precisão intermediária.

A precisão do método foi avaliada em termos de repetitividade, ou seja, o grau de concordância entre os resultados de medições sucessivas de extratos de matriz branca fortificadas em quatro níveis distintos, efetuadas sob as mesmas condições de medição. Também foi investigada em termos de precisão intermediária,

avaliada sobre a mesma amostra, utilizando o mesmo método, mesmo laboratório, mas alterando o analista e os dias de análise.

A repetitividade foi determinada a partir dos cálculos das médias das recuperações de um mesmo dia de análise, em cada nível de fortificação e, do cálculo de dispersão dos resultados através do desvio padrão relativos (RSD_r).

A determinação da precisão intermediária foi avaliada de forma semelhante, considerando os resultados das recuperações obtidos em todos os dias de validação, calculando-se ao final o desvio padrão relativo dos resultados das amostras ensaiadas em dias diferentes (RSD_R).

Os critérios de aceitabilidade da precisão do método foram referenciados na Diretiva 2002/657/CE (88) que determina que o desvio padrão relativo da análise de precisão intermediária não deve exceder os limites calculados através da equação de Horwitz e o desvio padrão relativo da repetitividade não deve exceder a $\frac{2}{3}$ dos limites previstos pela mesma equação. A equação de Horwitz é descrita na Equação 5.

Equação 5

$$RSD_R = 2^{(1-0,5\log C)}$$

Onde:

RSD_R = é o desvio-padrão relativo, calculado a partir dos resultados obtidos em condições de reprodutibilidade

$$C = \text{Concentração } (\mu\text{gkg}^{-1}) \times 10^{-9}$$

4.7.3.5. Limites de Detecção (LD), Quantificação (LQ), capacidade de decisão ($CC\alpha$) e detecção ($CC\beta$)

Embora existam inúmeras formas de calcular os limites de detecção e quantificação (13, 86, 98), optamos por defini-los nesse trabalho como sendo equivalentes a capacidade de decisão ($CC\alpha$) e capacidade de detecção ($CC\beta$), respectivamente, conforme diretiva 2002/657/CE (88).

Os valores da capacidade de decisão ($CC\alpha$) e detecção ($CC\beta$) foram calculados a partir dos valores da incerteza padrão combinada, calculada para o menor nível de fortificação da curva de calibração conjunta dos três dias de validação em condição de precisão intermediária, conforme orientação do Manual de Garantia

da Qualidade Analítica (88). Os cálculos envolvidos na determinação de $CC\alpha$ e detecção $CC\beta$ estão descritos nas equações 6 e 7.

Equação 6

$$CC\alpha = LMR + 1,64 \cdot \mu_{reproLMR}$$

Equação 7

$$CC\beta = CC\alpha + 1,64 \cdot \mu_{reproLMR}$$

Onde:

LMR = é a concentração do limite máximo de resíduo nas mesmas unidades de concentração do resultado final, considerado aqui como o menor nível da curva de calibração fortificado.

$\mu_{reproLMT}$ = é a incerteza padrão combinada no nível de concentração do LMR da curva de calibração conjunta de três dias em condições de precisão intermediária ou reprodutibilidade intralaboratorial.

4.7.3.6. Incerteza de medição

Os cálculos da incerteza de medição foram realizados através da metodologia de *Bottom-Up*. Nesta metodologia, cada fonte de incerteza é quantificada individualmente e seus efeitos são então combinados, geralmente através da aplicação do método do GUM (99).

As equações envolvidas para os cálculos da incerteza combinada, encontram-se na equação 8:

Equação 8

Onde:

$$u_c = \sqrt{\sum u_i(y)^2} = \sqrt{\left(\sum \left(\frac{\partial y}{\partial x_i}\right) \cdot u(x_i)\right)^2}$$

u_c : é a incerteza padrão combinada, ou simplesmente incerteza combinada;

$u_i(y)$: são as contribuições de incerteza para o mensurando y ;

$u(x_i)$: são as incertezas padrão das grandezas x_i ; e

$\left(\frac{\partial y}{\partial x_i}\right)$: são os coeficientes de sensibilidade.

As principais fontes de incerteza do procedimento analítico foram a área do pico cromatográfico, curva de calibração, volumes pipetados do solvente de extração, amostra e extrato, ajuste de volume do extrato obtido após evaporação, fatores de correção para recuperação e reprodutibilidade. Desta forma, foram combinadas as principais fontes de incerteza na equação 9 em que a concentração do analito é dada em $\mu\text{g L}^{-1}$.

Equação 9

$$C = \frac{(A - a)}{b} \frac{V_{\text{extração}} V_{\text{final}}}{V_{\text{amostra}} V_{\text{inicial}} F_{\text{rec}}} + C_{\text{repro}}$$

Onde:

C = concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$);

A = área do pico cromatográfico

a = intercepto da curva analítica

b = inclinação da curva analítica

$V_{\text{extração}}$ = volume da solução extrativa (mL)

V_{amostra} = volume de amostra utilizada (mL)

V_{inicial} = volume coletado do extrato para evaporação (mL)

V_{final} = volume final de extrato obtido após evaporação (mL)

C_{repro} = correção da precisão intermediária.

F_{rec} fator de correção da recuperação

Equação 10

$$F_{\text{rec}} = \frac{\text{Recuperação}}{100}$$

Os coeficientes de sensibilidade, utilizados para os cálculos da incerteza combinada, foram calculados através das derivadas parciais, apresentadas nas equações de 11 a 17, para cada uma das fontes de incerteza de medição (60, 92).

Equação 11

$$\frac{\partial C}{\partial A} = -\frac{\partial C}{\partial a} = \frac{V_{\text{extração}} \cdot V_{\text{inicial}}}{b \cdot V_{\text{amostra}} \cdot F_{\text{rec}} \cdot V_{\text{final}}}$$

Equação 12

$$\frac{\partial C}{\partial b} = - \frac{V_{\text{extração}} \cdot V_{\text{inicial}} (A - a)}{b^2 \cdot V_{\text{amostra}} \cdot \text{Rec} \cdot V_{\text{final}}}$$

Equação 13

$$\frac{\partial C}{\partial V_{\text{extração}}} = \frac{V_{\text{inicial}} (A - a)}{b \cdot V_{\text{amostra}} \cdot \text{Rec} \cdot V_{\text{final}}}$$

Equação 14

$$\frac{\partial C}{\partial V_{\text{amostra}}} = - \frac{V_{\text{extração}} \cdot V_{\text{inicial}} (A - a)}{b \cdot (V_{\text{amostra}})^2 \cdot \text{Rec} \cdot V_{\text{final}}}$$

Equação 15

$$\frac{\partial C}{\partial V_{\text{inicial}}} = \frac{V_{\text{extração}} (A - a)}{b \cdot V_{\text{amostra}} \cdot \text{Rec} \cdot V_{\text{final}}}$$

Equação 16

$$\frac{\partial C}{\partial V_{\text{final}}} = - \frac{V_{\text{extração}} \cdot V_{\text{inicial}} (A - a)}{b \cdot V_{\text{amostra}} \cdot \text{Rec} \cdot (V_{\text{final}})^2}$$

Equação 17

$$\frac{\partial C}{\partial V_{\text{frec}}} = - \frac{V_{\text{extração}} \cdot V_{\text{inicial}} (A - a)}{b \cdot V_{\text{amostra}} \cdot (\text{Rec})^2 \cdot V_{\text{final}}}$$

A partir do valor da incerteza combinada (μgL^{-1}), foi possível calcular a incerteza expandida (U) utilizando um fator de abrangência (k) igual a 2, correspondente ao estabelecimento do nível de confiança de aproximadamente 95% (13, 92). A equação para o cálculo da incerteza combinada pode ser observada na equação 18:

Equação 18

$$U = k \cdot u_c(y)$$

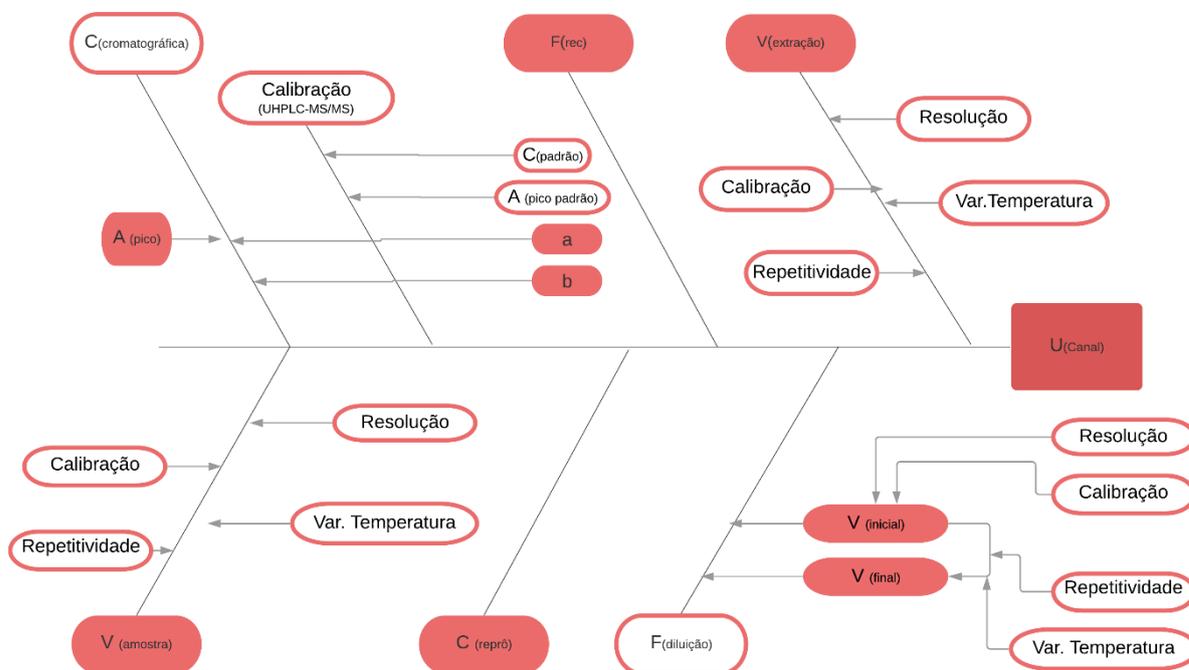
Onde:

U é a incerteza expandida;

k é o fator de abrangência para incerteza;

O diagrama de causa e efeito para o cálculo de incerteza de medição é apresentado na Fig. 14.

Figura 14: Diagrama de causa e efeito para o cálculo de incerteza do método



Fonte: próprio autor

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Otimização do espectrômetro de massas

Os parâmetros do espectrômetro de massas para cada analito, encontram-se nas Tabelas 12, para o modo positivo, e 13, para o modo negativo.

Tabela 12: Parâmetros de operação do espectrômetro de massas em polaridade positiva.

Identificação	Íon precursor	Q3 (m/z) ^(a)	t. de retenção (min)	DP (V)	EP (V)	CE (V)	CXP (V)
15-acetil Deoxinivalenol	339,1 [M+H] ⁺	137/261,1	2,67	76	10	15/15	6/14
3-acetil Deoxinivalenol	356,2 [M+NH ₄] ⁺	231,1/203	2,68	21	10	19/46	16/7
Ácido Penicílico	171,1 [M+H] ⁺	125,1/82,1	2,58	76	10	15/33	8/12
Aflatoxina B1	312,8 [M+H] ⁺	241/285,1	3,3	122	10	50/32	15/15
Aflatoxina B2	315,0	287/258,9	3,11	30	10	35/40	25/15

Identificação	Íon precursor	Q3 (m/z) ^(a)	t. de retenção (min)	DP (V)	EP (V)	CE (V)	CXP (V)
	[M+H] ⁺						
Aflatoxina G1	328,8 [M+H] ⁺	199,9/242,9	3,13	70	10	54/37	15/15
Aflatoxina G2	331,0 [M+H] ⁺	245,2/189,0	2,9	115	10	41/55	15/15
α-ergocriptina	576,2 [M+H] ⁺	268,1/223,0	3,7	116	10	33/43	26/22
Citrinina	251,2 [M+H] ⁺	232,9/205,0	2,76	51	10	21/35	14/12
Citreoviridina	403,0 [M+H] ⁺	297,3/138,8	4,43	58	10	20/29	9/18
Dihidroergocristina	612,3 [M+H] ⁺	270/350	3,7	126	10	39/46	34/7
Deoxinivalenol	297,1 [M+H] ⁺	249/231	2,4	60	10	14/16	16/16
Ergocornina	562,2 [M+H] ⁺	268,1/223,1	3,43	116	10	33/43	24/26
Ergocristina	610,3 [M+H] ⁺	268/223	3,84	51	10	35/45	34/26
Ergocristinina	610,3 [M+H] ⁺	304,9/592,2	4,98	51	10	37/21	36/54
Ergonovina	326,1 [M+H] ⁺	223/208	2,45	86	10	31/37	28/24
Ergosina	548,3 [M+H] ⁺	223/207,9	3,17	131	10	41/49	22/26
Fumonisina B1	722,2 [M+H] ⁺	334,3/352,2	3,18	151	10	55/49	14/16
Ocratoxina A	404,0 [M+H] ⁺	239/102	3,99	60	10	33/101	14/16
Toxina T-2	484,2 [M+NH ₄] ⁺	215,1/185	4,55	31	10	21/25	10/8
Zearalenona	319,1 [M+H] ⁺	283/185,1	4,9	6	10	15/31	16/16

Fonte: próprio autor

(a) valores são dados no íon quantificador / íon qualificador da ordem

Tabela 13: Parâmetros de operação do espectrômetro de massas em polaridade negativa.

Identificação	Íon precursor	Q3 (m/z) ^(a)	t. de retenção (min)	DP (V)	EP (V)	CE (V)	CXP (V)
3-acetil-Deoxinivalenol	397,0 [M+Ac] ⁻	306,9/173	2,68	-50	-10	-20/-20	-12/-12

Identificação	Íon precursor	Q3 (m/z) ^(a)	t. de retenção (min)	DP (V)	EP (V)	CE (V)	CXP (V)
Deoxinivalenol-15-glucosídeo	517,0 [M+Ac] ⁻	457,1/59	2,37	-50	-10	-18/-50	-12/-12
Deoxinivalenol-3-glucosídeo	517,0 [M+Ac] ⁻	457,1/427,1	2,37	-50	-10	-18/-18	-12/-12

Fonte: próprio autor

(a) valores são dados no íon quantificador / íon qualificador da ordem

As configurações de tensão ideais, determinadas para cada analito, foram usadas para quantificação das micotoxinas no método, exceto para 15-acetil-deoxinivalenol, 3-acetil-deoxinivalenol, deoxinivalenol-15-glucosídeo e deoxinivalenol-3-glucosídeo, pois não havia padrões ou eles não estavam disponíveis em quantidades suficientes para a inclusão destes compostos na etapa de validação. Portanto, a presença dessas micotoxinas mascaradas de deoxinivalenol foi avaliada apenas qualitativamente em amostras de cerveja, através da comparação dos cromatogramas nas duas transições monitoradas.

5.2. Otimização do procedimento de extração *dilute and shoot*:

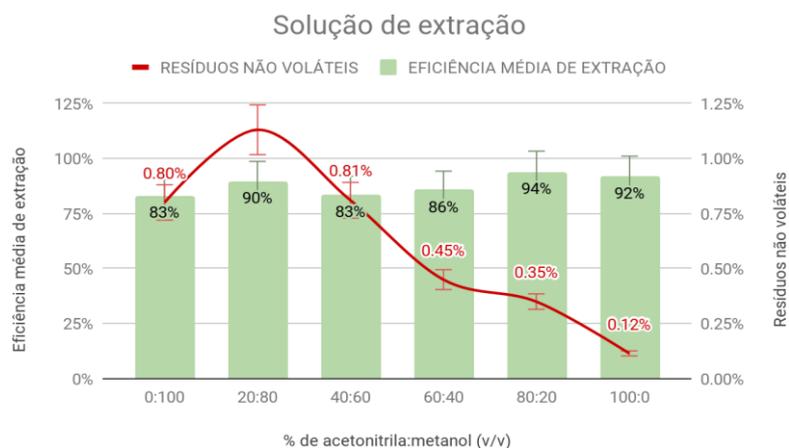
Para a avaliação da composição da solução extratora, foram utilizadas soluções de acetonitrila:metanol nas proporções 0:100 (v/v), 20:80 (v/v), 40:60 (v/v), 60:40 (v/v), 80:20 (v/v) e 100:0 (v/v). Foi observado que a variação da porcentagem de metanol nas soluções extratoras 20:80 (v/v), 80:20 (v/v) e 100:0 (v/v) não acarreta diferença estatística significativa na eficiência média de extração das micotoxinas (Fig. 15), com porcentagem de extração superiores a 90%. Entretanto, os resultados da quantificação dos resíduos não voláteis, apontam que a massa residual aumenta com o aumento da porcentagem de metanol na solução de extração (Fig. 15).

Embora a hidroxila presente no metanol tenda a melhorar a extração das micotoxinas polares como DON, FB1, OTA, T-2 e CTV foi observado que na matriz cerveja, composta por aproximadamente 90% de água, o aumento da porcentagem deste solvente na solução extratora aumenta a quantidade de interferentes não voláteis no extrato. Estes resíduos são indesejáveis na análise, pois, além de interferir nos resultados, aumentam as chances de formação de incrustações no sistema de injeção. Este arraste de interferentes ocorre possivelmente devido às interações de hidrogênio entre o solvente e a água presente na cerveja.

Dessa forma, dentre as soluções extratoras que apresentaram os melhores resultados na eficiência de extração, as soluções acetonitrila:metanol 80:20 (v/v), com baixa concentração de metanol, e acetonitrila:metanol 100:0 (v/v) se mostraram promissoras, já que a presença de resíduos não voláteis apresentou níveis inferiores a 0,5% em ambos os testes. Portanto, de modo a favorecer a extração das micotoxinas polares, especialmente DON, que tem histórico de baixa recuperação (65), optou-se pela solução extratora acetonitrila:metanol na proporção de 80:20 (v/v).

Entretanto, mesmo utilizando uma solução extratora polar, os níveis de recuperação de DON se mostraram abaixo do esperado, sendo necessário, portanto, a avaliação de outra metodologia de extração. Além disso, como a cerveja é um produto onde o extrato dos grãos é diluído com aproximadamente 90% de água para obtenção do produto acabado, a utilização da metodologia *dilute and shoot* para avaliação da presença de micotoxinas poderia relatar um resultado falso negativo durante a análise das amostras, em razão do grande fator de diluição aplicado às amostra neste método. Por este motivo, foi decidido que a metodologia *dilute and shoot* não seria validada.

Figura 15: Resultados da eficiência média de extração x resíduos não voláteis



Fonte: próprio autor

5.3. Otimização do procedimento de extração QuEChERS:

A otimização do procedimento de extração do método QuEChERS (73) foi avaliada através de um planejamento de experimento fatorial 2^4 , onde foram analisados a presença de metanol na solução de extração, ácido fórmico e os sais cloreto de sódio e sulfato de magnésio. O detalhamento dos experimentos, realizados

em duplicata real de análise e duplicata de injeção, podem ser observados na Tabela 14.

Tabela 14: Planejamento fatorial 2⁴ elaborado para a otimização de metodologia de extração tipo QuEChERS.

Ensaio	Solvente (% de ACN)	Ácido Fórmico (%)	NaCl (g)	MgSO ₄ (g)
1	50	0	0	0
2	100	0	0	0
3	50	5	0	0
4	100	5	0	0
5	50	0	2,5	0
6	100	0	2,5	0
7	50	5	2,5	0
8	100	5	2,5	0
9	50	0	0	3
10	100	0	0	3
11	50	5	0	3
12	100	5	0	3
13	50	0	2,5	3
14	100	0	2,5	3
15	50	5	2,5	3
16	100	5	2,5	3

Fonte: próprio autor

Os resultados foram avaliados através das médias das áreas das micotoxinas obtidas com os dezesseis experimentos, sendo o tratamento dos dados realizado utilizando o *software* Design Expert 10. Os *outliers* foram analisados através do gráfico de resíduos sendo removidos quatro das trinta e duas áreas obtidas com a duplicata de análise e duplicata de injeção.

A presença de ácido fórmico foi prejudicial para o procedimento de extração, conforme aponta o efeito negativo do Gráfico de Pareto (Fig. 16). Os valores de desejabilidade (*desirability*) para as respostas são mostrados na Fig. 17, onde o ponto em cada rampa indica o nível ideal de cada parâmetro. Pode-se observar que a presença de cloreto de sódio e sulfato de magnésio na maior concentração avaliada mostrou-se ideal para o procedimento. Além disso, a análise dos dados mostrou que

a solução de extração acetonitrila:metanol 100:0 (v/v) foi a mais promissora para a extração das micotoxinas, sendo este resultado parcialmente observado na otimização do procedimento de *dilute and shoot*, já que foi averiguado que quanto menor a concentração de metanol na solução de extração, melhores os resultados obtidos.

A desejabilidade é uma função que varia de zero, quando os parâmetros obtidos estão fora da idealidade, a um, quando a otimização alcança a condição ideal maximizada para todos os compostos sob investigação. Em análises multiresíduos, é muito difícil encontrar uma condição que seja 100% ideal para todas as substâncias, entretanto, pode-se encontrar um bom conjunto de condições que atendam de forma satisfatória a todos os analitos. Na otimização realizada, o valor de desejabilidade obtido foi de 0,924 para as condições mencionadas no parágrafo anterior e mostradas na Fig. 17. Esse valor foi considerado satisfatório para a otimização da metodologia, já que foram avaliadas a extração de dezenove substâncias diferentes.

Figura 16: Gráfico de Pareto obtido com o planejamento de experimentos do método QuEChERS

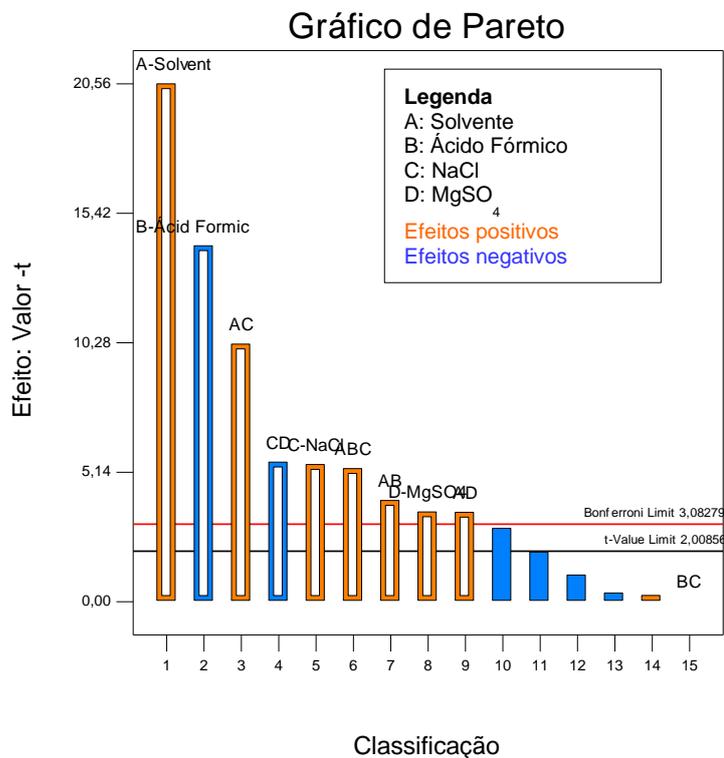
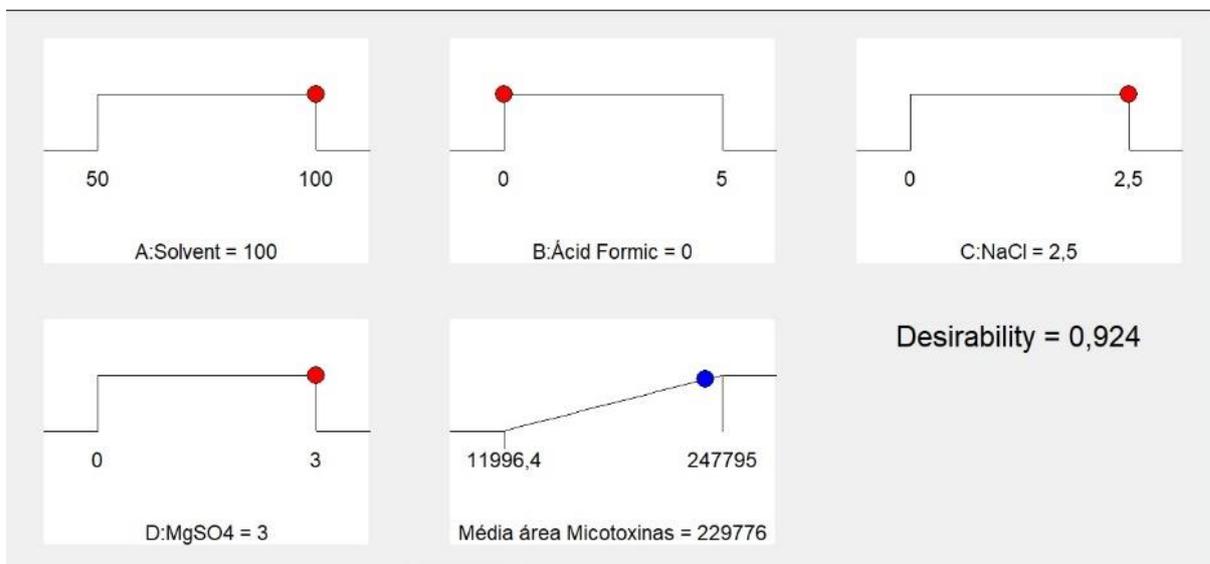


Figura 17: Estimativa das áreas médias dos picos cromatográficos das micotoxina em relação a melhor condição de extração.

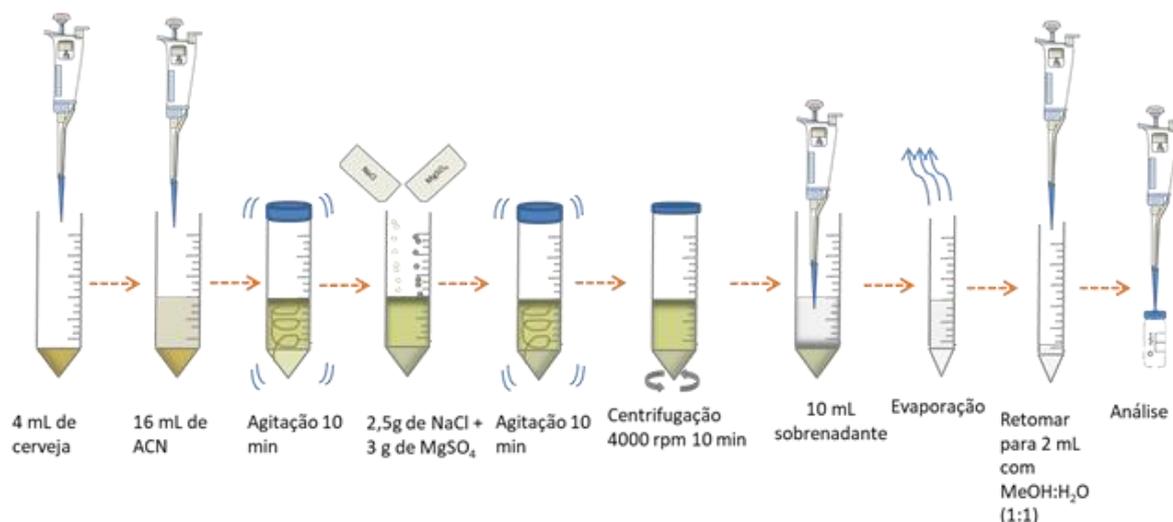


A função do cloreto de sódio no método QuEChERS é de auxiliar na partição bifásica do sistema e a adição de sulfato de magnésio anidro na absorção de água. Desta forma, quanto menos água estiver presente no extrato, melhor será a

eficiência de extração das micotoxinas no método. As proporções de 2,5 g de cloreto de sódio e 3 g de sulfato de magnésio para 4 mL de cerveja, superam as descritas originalmente no método de QuEChERS, onde se utiliza 1 g de NaCl e 4 g de MgSO₄ para cada 10 g de amostra. Esse fato pode ser explicado pela grande quantidade de água presente na cerveja, necessitando assim de uma maior quantidade de sais para a secagem da amostra. Já a presença de ácido não interferiu significativamente na extração, o que pode ser explicado pelo fato da cerveja ser levemente ácida (100) e essa acidez pode ter sido suficiente para o efeito do pH na extração dos compostos.

Desta forma, o procedimento de extração escolhido para validação, foi: 4 mL de cerveja degaseificada são pipetados para um tubo Falcon de 50 mL seguido da adição de 16 mL de acetonitrila. A mistura é agitada no homogeneizador de amostra durante 10 minutos a 1000 rpm e logo após são adicionados 2,5 g de cloreto de sódio e 3 g de sulfato de magnésio anidro. O tubo Falcon é novamente levado ao homogeneizador de amostras pelo mesmo período de tempo e mesma rotação utilizados na primeira homogeneização. O extrato é submetido a centrifugação a 4000 rpm durante 10 minutos para a precipitação de possíveis interferentes que ainda tenham ficado em suspensão. Uma alíquota de 10 mL do sobrenadante é pipetada, vertida em um tubo Falcon de 15 mL e evaporada no concentrador de amostras a 42°C até atingir um volume inferior 2 mL. O volume do extrato é aferido para 2 mL no próprio Falcon, utilizando como solvente metanol: água 1:1 (v/v). O extrato obtido é analisado através da análise cromatográfica (UHPLC) acoplada ao espectrômetro de massas no modo sequencial. Uma visão detalhada do procedimento otimizado pode ser observada a Figura 18.

Figura 18: Representação esquemática do procedimento de extração otimizado para análise de micotoxinas em amostras de cerveja.



Fonte: próprio autor

Diferentemente do método original de QuEChERS, o procedimento otimizado para extração de micotoxinas em cerveja, dispensa a etapa de *clean up* utilizando D-SPE, já que o extrato obtido apenas com a bipartição utilizando cloreto de sódio e o agente secante sulfato de magnésio apresentou um aspecto final límpido e livre de interferentes que pudessem comprometer a análise.

Essa redução das etapas de *clean up* em relação ao método original diminui o tempo necessário para o preparo de amostras, o que pode ser considerado uma vantagem do método.

5.4. Validação

5.4.1. Seletividade

Para a realização do método foi utilizado o modo de varredura MRM na polaridade positiva, sendo monitorados tanto o íon precursor, quanto duas transições para cada analito, uma de quantificação, cuja área foi utilizada para a plotagem das curvas de calibração, determinação das recuperações e limites de detecção e quantificação do método e a segunda utilizada para a confirmação da identidade do analito.

A Diretiva 2002/657/CE determina que para contaminantes do grupo B da Directiva 96/23/CE (101), como as micotoxinas, são necessários no mínimo três pontos de identificação para confirmação das substâncias em estudo. Já o documento

SANTE 12089/2016 (91) indica que diferentes tipos e modos de detecção espectrométrica de massas fornecem diferentes graus de seletividade e especificidade, relacionados à confiança na identificação de micotoxinas.

Para a contagem de pontos, a Diretiva 2002/657/CE apresenta a Tabela 15 com o número de pontos de identificação que cada uma das técnicas básicas de espectrometria de massas pode proporcionar (88).

Tabela 15: Relação entre uma série de classes de fragmentos mássicos e os pontos de identificação obtidos

Técnica de MS	Pontos de identificação obtidos por ion
Espectrometria de massas de baixa resolução (LR)	1,0
LR-MS ⁿ íon precursor	1,0
LR-MS ⁿ produtos de transição	1,5
HRM	2,0
HR- MS ⁿ íon precursor	2,0
HR-MS ⁿ produtos de transição	2,5

Fonte: Diretiva 2002/657/CE (88)

LR-MSⁿ: Low Resolution sequential Mass Spectrometry;

HRMS: High Resolution Mass Spectrometry;

HR- MSⁿ: High Resolution sequential Mass Spectrometry.

Dessa forma, somando a pontuação do íon precursor e dos dois produtos de transição, obtém-se 4 pontos de caracterização, o suficiente para atender a pontuação necessária para a caracterização dos compostos.

Já o documento SANTE orienta que em sistemas do tipo triploquadupolo no modo de varredura MRM sejam monitorados pelo menos dois íons produtos, conforme realizado neste estudo. A Tabela 16 demonstra o número mínimo de íons necessários para diferentes técnicas em espectrometria de massas.

Tabela 16: Requisitos de identificação para diferentes técnicas de MS

Detector MS/ características	Sistemas típicos (Exemplos)	Aquisição	Requisitos para identificação	
			Nº mínimo de íons	Outros
Resolução de massa unitária	Quadrupolo íon trap, TOF	full scan, alcance m/z limitado, SIM	3 íons	
MS/MS	Triploquadrupolo, ions trap, Q-trap, Q-TOF, Q-Orbitrap	seleção ou monitoramento de reação múltipla (SRM, MRM), resolução em massa para isolamento de íons precursores igual ou melhor que a resolução em massa unitária	2 íons produtos	S/N $\geq 3^d$ Os picos de analito nos cromatogramas de íons extraídos devem se sobrepor completamente.
Medição precisa de massa	Alta resolução MS (Q-) TOF (Q-) Trap FT-ICR-MS setor MS	full scan, alcance m/z limitado, SIM, fragmentação com ou sem seleção de íons precursores ou combinações dos mesmos	2 íons ^{a,b} com precisão de massa ≤ 5 ppm para $m/z \geq 200$ ≤ 1 mDa para $m/z \leq 200$	Razão de íons dentro $\pm 30\%$ (relativo) da média dos padrões de calibração da mesma sequência
		MS de estágio único combinado e MS/MS com resolução em massa para isolamento de íons precursores igual ou melhor que a resolução em massa unitária	2 íons: 1 íon molecular, molécula (des)protonada ou íon aducto com precisão de massa ≤ 5 ppm (ou ≤ 1 mDa para m/z ≤ 200) mais 1 produto MS / MS íon ^c)	

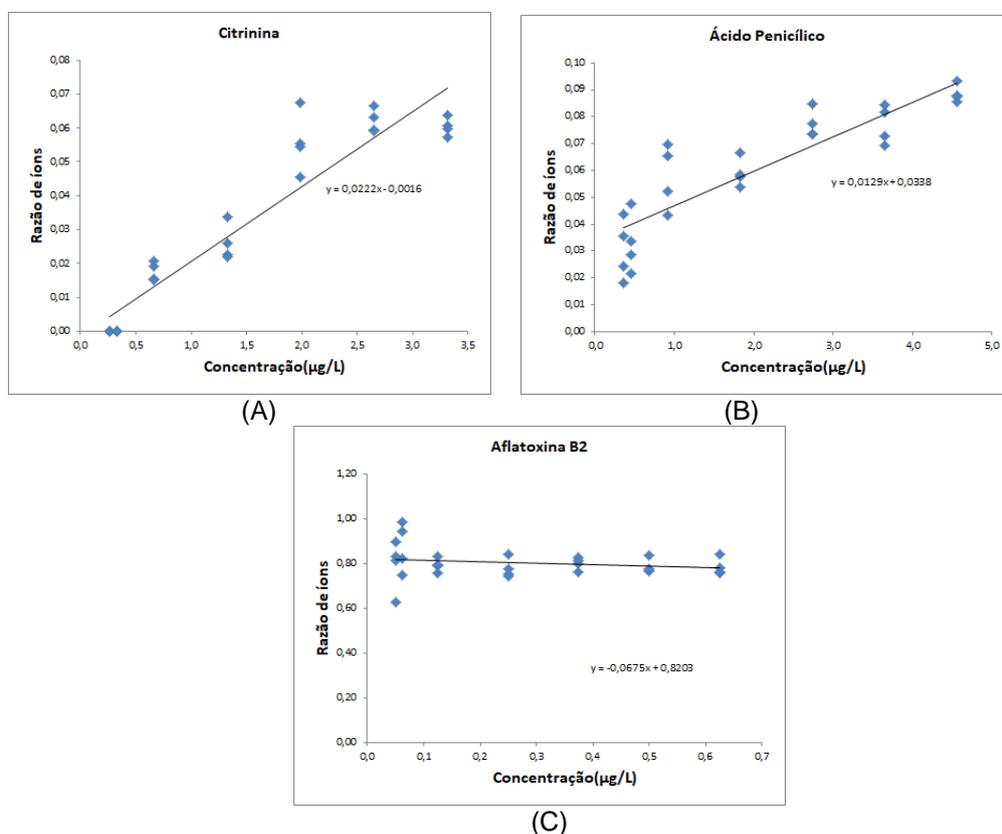
Fonte: SANTE 12089/2016 (91)

- a) de preferência incluindo o íon molecular, molécula (des) protonada ou íon aduto
b) incluir pelo menos um íon fragmento
c) nenhum requisito específico para precisão da massa
d) caso o ruído esteja ausente, um sinal deve estar presente em pelo menos 5 exames subsequentes.

Outro critério que o documento SANTE 12089/2016 (91) determina para análise de micotoxinas, de modo a assegurar que os sinais das duas transições são referentes ao analito e não a um possível interferente, é a avaliação da diferença percentual entre os sinais quantificadores e qualificadores nas amostras fortificadas com padrão e também em amostras de ensaio. Essa razão não deve ser superior a 30% da média das razões de íons obtidas para cada ponto da curva de calibração (Tabela 16).

Durante a validação foi observado que para as micotoxinas ácido penicílico e citrinina, a relação entre os sinais quantificadores e qualificadores do terceiro e quarto níveis de fortificação não atendia ao critério da razão de íons da SANTE 12089/2016 (91), já que obteve-se variação maior do que o esperado. A Figura 19 demonstra graficamente a variação de íons para a citrinina (19 A), ácido penicílico (19 B) e para aflatoxina B2 (19 C), obtidos durante o terceiro dia de validação. A razão de íons obtida para ambas as micotoxinas é muito pequena, o que pode justificar a alta variação observada para os pontos mais baixos da curva.

Figura 19: Relação de íons das micotoxinas: citrinina (A) ácido penicílico (B) e aflatoxina B2 (C)



Fonte: próprio autor

Observa-se pelas Figuras 19 A e 19 B, que a linha de tendência nos gráficos da citrinina e do ácido penicílico varia de acordo com a concentração da micotoxina, demonstrando que não há uma constância nas razões de íons dessas micotoxinas. Em contrapartida, a Figura 19 C demonstra que, para a micotoxina aflatoxina B2, a razão de íons se manteve constante, independente da concentração do analito.

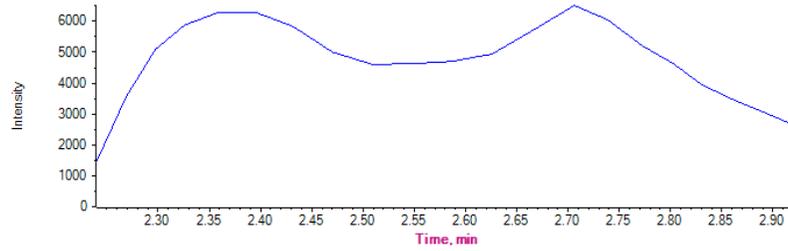
Acredita-se que a razão de íons da citrinina e do ácido penicílico ter ficado abaixo do esperado seja devido às concentrações escolhidas para o preparo da curva de calibração, as quais estavam abaixo do LD. Essa teoria é corroborada quando observamos os cromatogramas obtidos pelo terceiro dia de validação, para o extrato de matriz branca e para o último ponto da curva de calibração (Fig. 20).

Observa-se que a integração dos picos tanto para o ácido penicílico quanto para a citrinina, ficam próximos ao ruído ou da área do branco, dificultando a confirmação de suas presenças no nível escolhido.

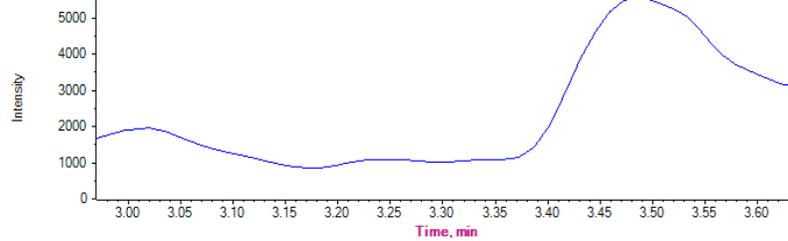
Observa-se, também, a presença das micotoxinas deoxinivalenol, dihidroergocristina e fumonisina B1 no *pool* de amostras utilizado como branco. Entretanto, as concentrações dos analitos estavam muito reduzidas frente ao último ponto da curva, não havendo interferência significativa para a validação da amostra. Para as demais micotoxinas, observa-se que a integração picos cromatográficos no extrato branco próximas ao ruído não correspondiam ao tempo de retenção dos analitos.

Desta forma, conclui-se que o método é seletivo para quase todas as micotoxinas, com exceção do ácido penicílico e da citrinina, que precisam ser avaliadas em uma concentração superior ao segundo ponto de fortificação escolhido para este estudo.

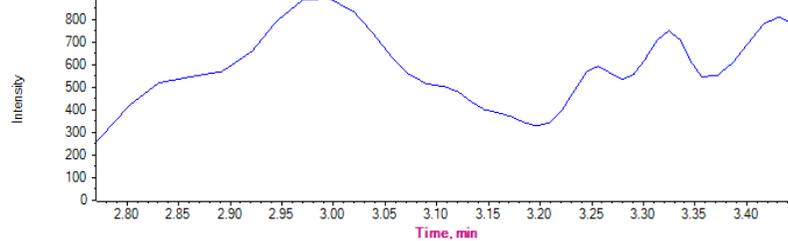
Figura 20: Cromatogramas das amostras branco e no menor ponto da curva



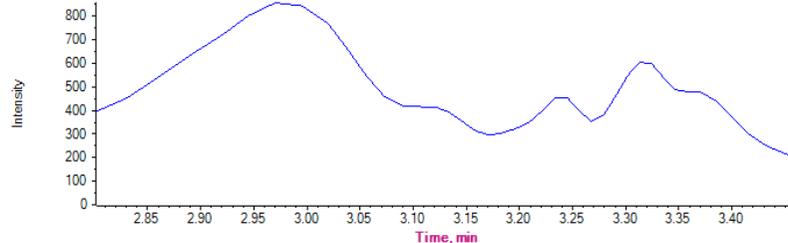
Branco - ácido penicílico



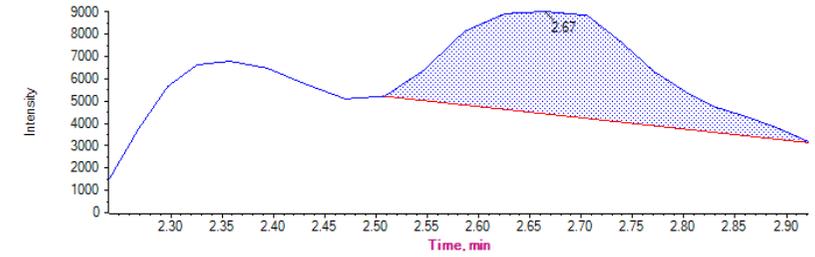
Branco - aflatoxina B1



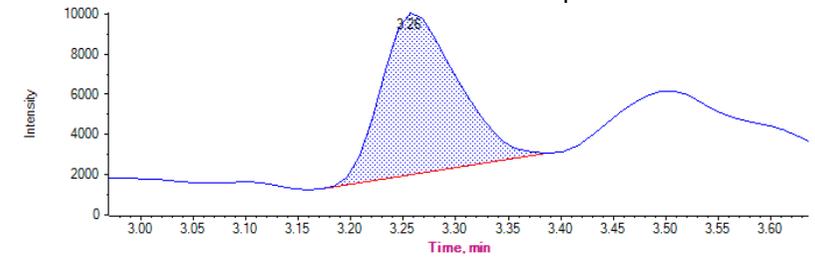
Branco - aflatoxina B2



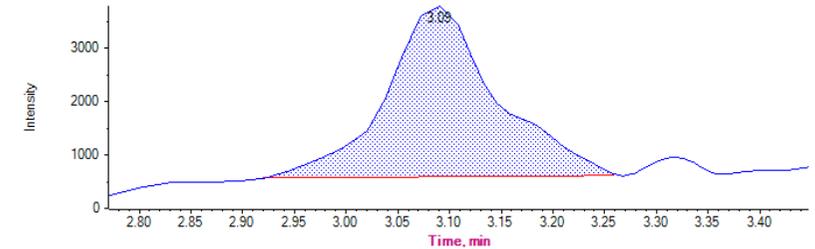
Branco - aflatoxina G1



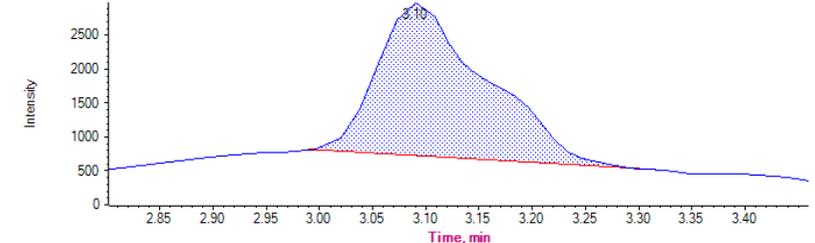
nível mais baixo da curva - ácido penicílico



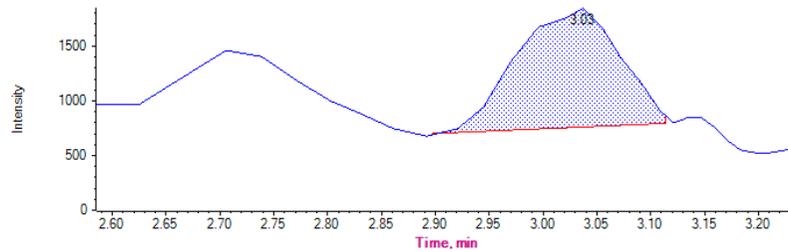
nível mais baixo da curva - aflatoxina B1



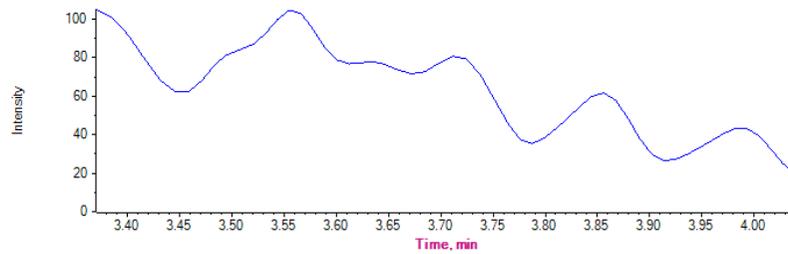
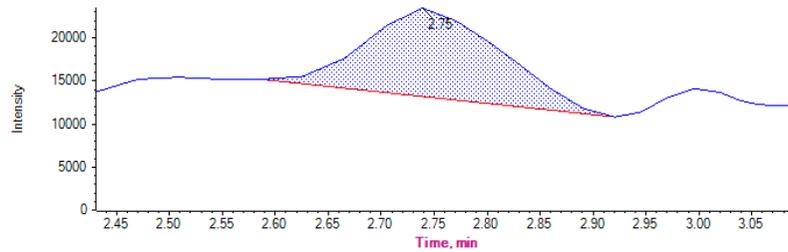
nível mais baixo da curva - aflatoxina B2



nível mais baixo da curva - aflatoxina G1

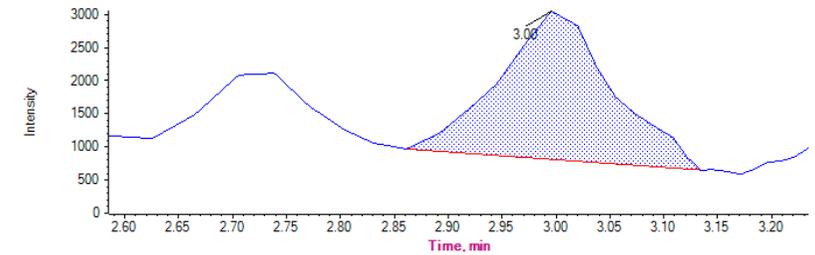


Branco - aflatoxina G2

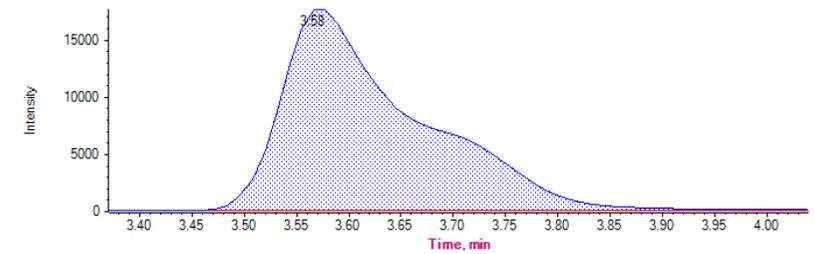
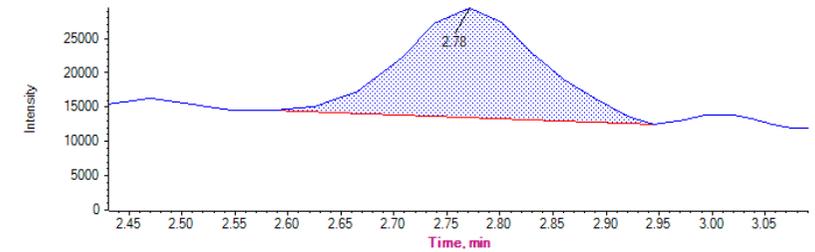
Branco - α -ergocriptina

Branco - citrinina

Branco - citreoviridina A

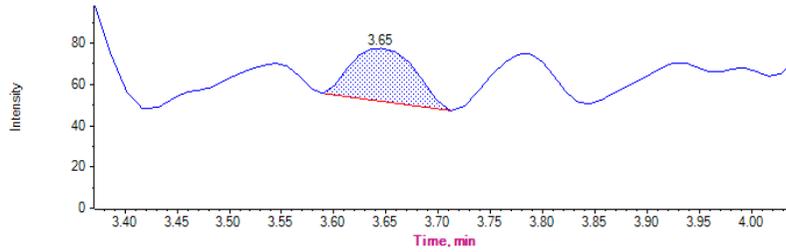


nível mais baixo da curva - aflatoxina G2

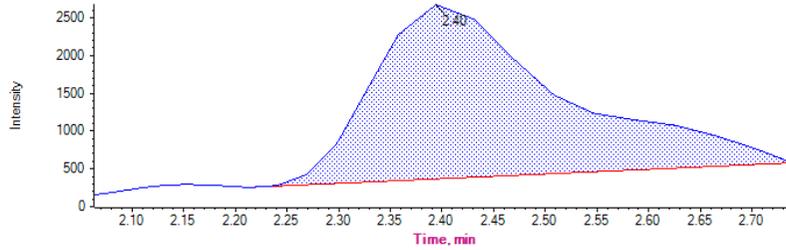
nível mais baixo da curva - α -ergocriptina

nível mais baixo da curva - citrinina

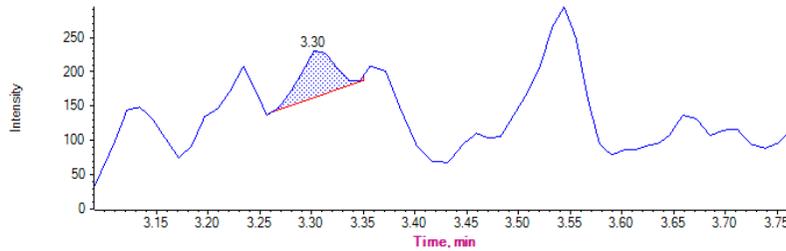
nível mais baixo da curva - citreoviridina A



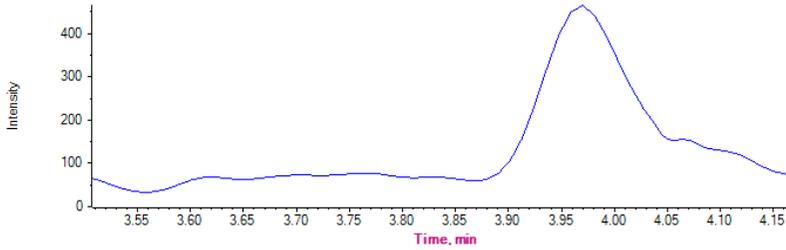
Branco - dihidroergocristina



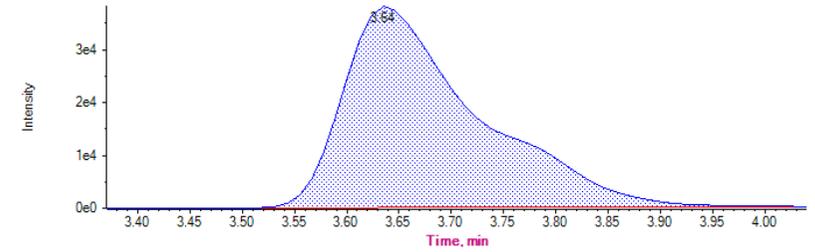
Branco - deoxinivalenol



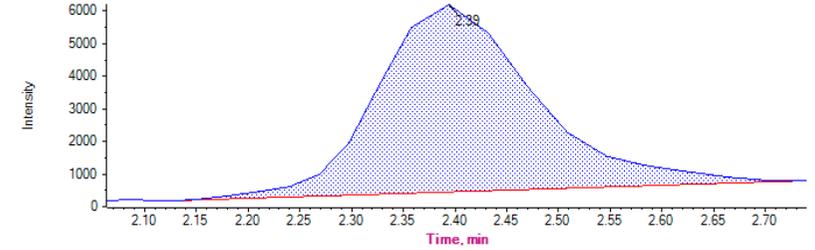
Branco - ergocornina



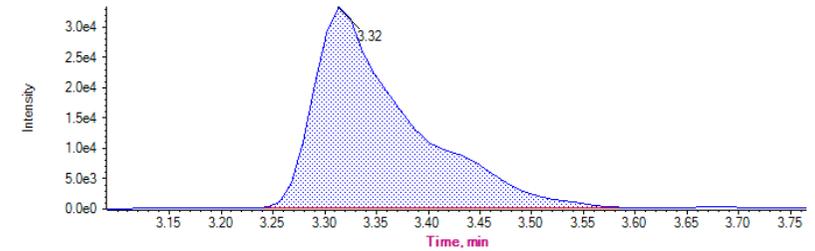
Branco - ergocristina



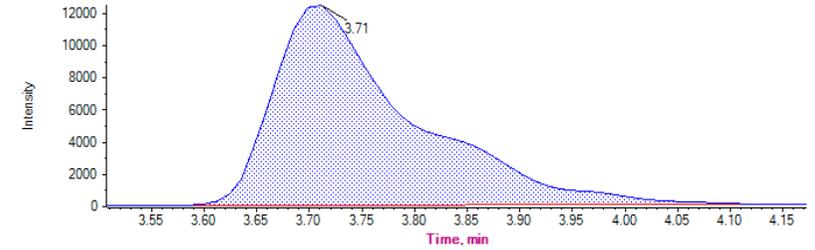
nível mais baixo da curva - dihidroergocristina



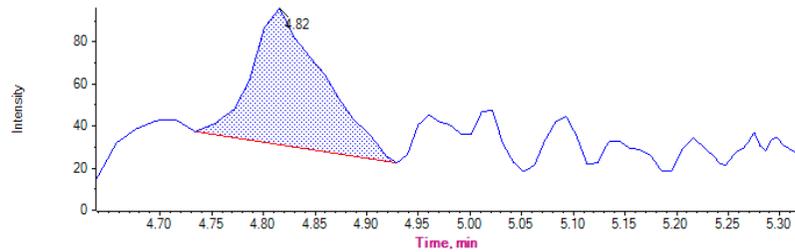
nível mais baixo da curva - deoxinivalenol



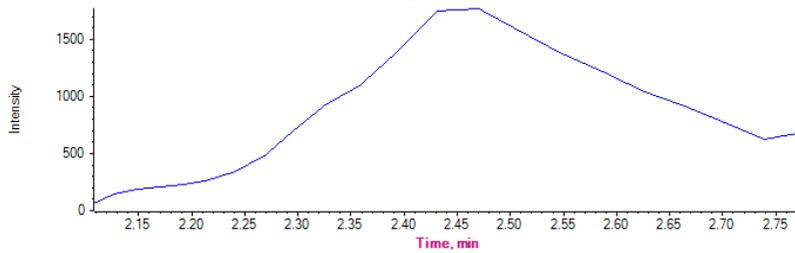
nível mais baixo da curva - ergocornina



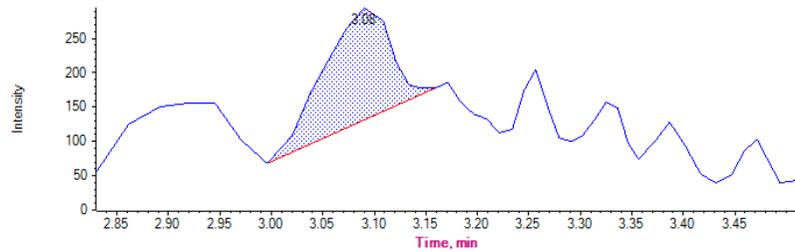
nível mais baixo da curva - ergocristina



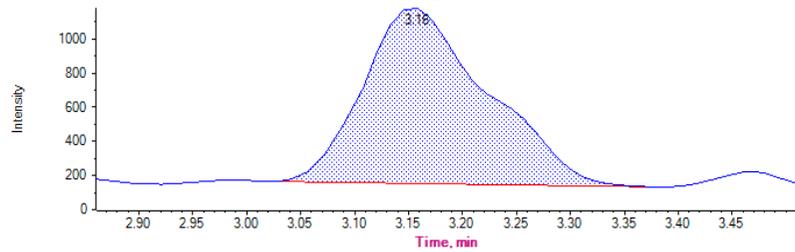
Branco - ergocristinina



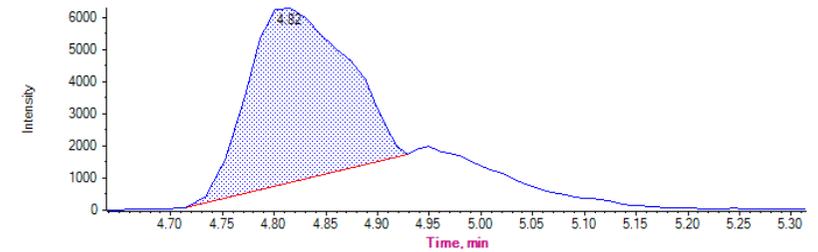
Branco - ergonovina



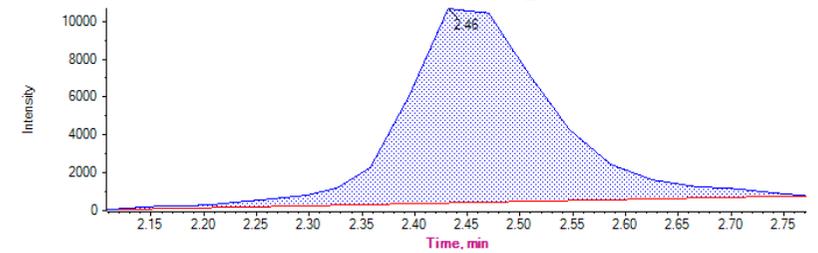
Branco - ergosina



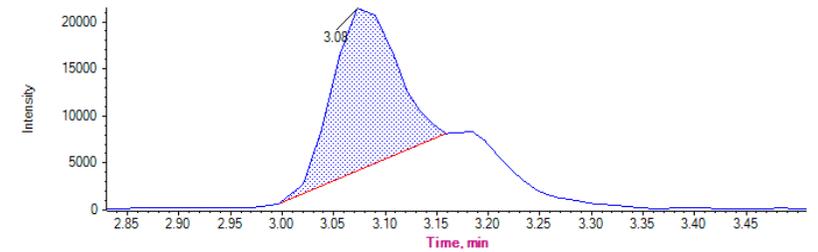
Branco - fumonisina B1



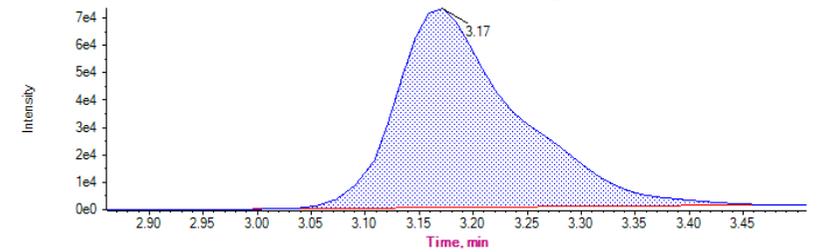
nível mais baixo da curva - ergocristinina



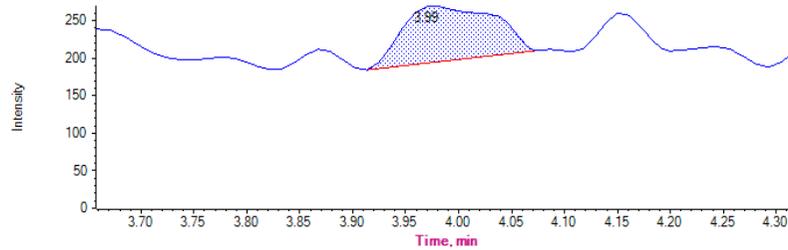
nível mais baixo da curva - ergonovina



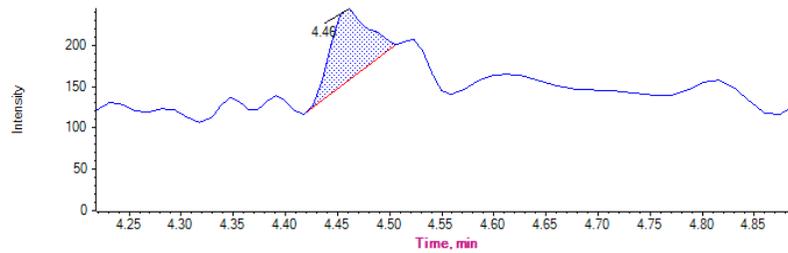
nível mais baixo da curva - ergosina



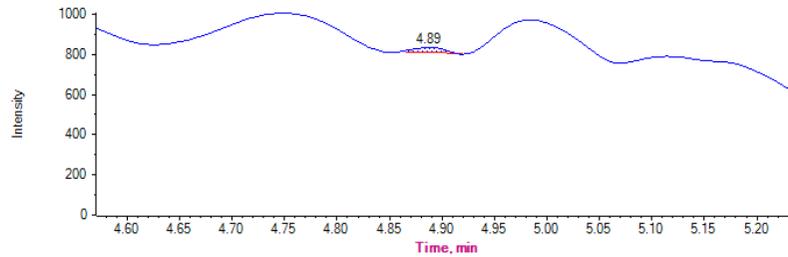
nível mais baixo da curva - fumonisina B1



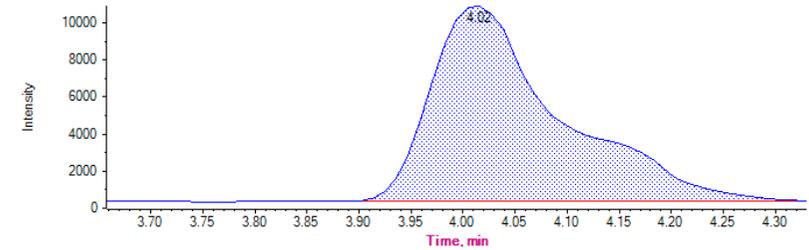
Branco – ocratoxina A



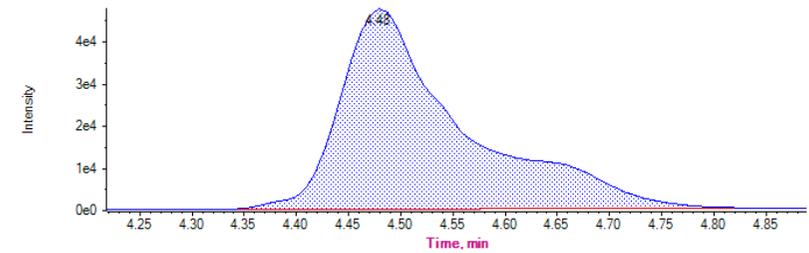
Branco – toxina T-2



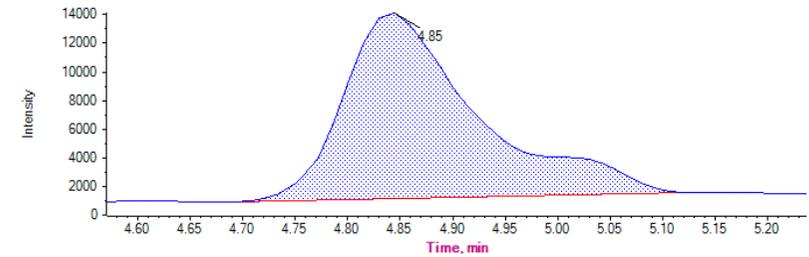
Branco – zearalenona



nível mais baixo da curva – ocratoxina A



nível mais baixo da curva – toxina T-2



nível mais baixo da curva – zearalenona

Fonte: próprio autor

5.4.2. Efeito matriz

As micotoxinas AFB1, AFB2, AFG2, OTA, CTV, DON, α -ergocriptina, ergocristina, ergocristinina, ergocornina, ergonovina, FB1 e Toxina T-2 apresentaram variâncias distintas na avaliação do teste F. Já para a micotoxina ZEA, embora o teste F tenha revelado que as variâncias são estatisticamente iguais, o teste t de Student apontou que as curvas em solvente e em matriz possuem inclinações diferentes. Desta forma, para todas as micotoxinas citadas acima, a matriz tem efeito importante sobre a precisão do método sendo, portanto, considerado a presença do efeito matriz sobre elas.

Já as micotoxinas, AFG1, dihidroergocristina e ergosina apresentaram variâncias iguais e, pela avaliação do teste t, as curvas em solvente e em matriz mostraram a mesma inclinação e intercepto, sendo estas micotoxinas isentas do efeito matriz.

5.4.3. Linearidade

Para evitar a diminuição ou ampliação da resposta instrumental, as curvas de calibração foram preparadas pela diluição de *pools* de padrões de micotoxinas em extrato de matriz branca, já que a presença de efeito matriz foi confirmada para algumas micotoxinas do método.

A avaliação de outliers foi realizada pela aplicação do teste de Jacknife e os valores discrepantes foram retirados observando um valor máximo de exclusão de 22% (94). A normalidade da distribuição estatística dos resíduos foi verificada através do teste de Ryan-Joiner, sendo confirmada em todos os casos. Para eliminar a necessidade do teste de homocedasticidade necessário para a regressão utilizando o método dos mínimos quadrados ordinários (MMQO), optou-se pela regressão utilizando o método dos mínimos quadrados ponderados (MMQP) para obtenção dos parâmetros de regressão linear. A ponderação utilizando MMQP é recomendada pelo manual da garantia da qualidade analítica, já que o MMQO é um caso particular do MMQP (13).

Os dados obtidos durante os três dias de validação foram agrupados para a elaboração de uma curva combinada para cada analito sob investigação. Todos os analitos tiveram ajuste linear na faixa de trabalho investigada, sendo estes verificados

através do teste de t de Student (13). A independência dos resíduos da regressão ponderada foi confirmada através do teste Durbin-Watson.

Os parâmetros obtidos na elaboração das curvas de calibração combinadas estão apresentados na Tabela 17.

Tabela 17: Dados obtidos para os parâmetros das curvas de calibração

Analito	Teste de equivalência estatística	R ²	Inclinação (β_w)	Intercepto (α_w)	t calculado	t crítico
Aflatoxina B1	Faixa Linear	0,9889	7,94E+07	-1,13E+03	92,5517	1,9850
Aflatoxina B2	Faixa Linear	0,9802	6,47E+07	-2,03E+03	68,9347	1,9850
Aflatoxina G1	Faixa Linear	0,9876	5,88E+07	-3,99E+03	87,4486	1,9850
Aflatoxina G2	Faixa Linear	0,9634	2,52E+07	-1,01E+03	50,2547	1,9850
Citreoviridina A	Faixa Linear	0,9857	7,77E+06	-4,46E+02	81,2664	1,9850
Deoxinivalenol	Faixa Linear	0,9841	2,85E+05	8,94E+02	77,1854	1,9850
Dihidroergocristina	Faixa Linear	0,9739	1,21E+08	-7,97E+03	59,8137	1,9850
Ergocornina	Faixa Linear	0,9653	6,38E+07	-1,61E+03	51,6790	1,9850
Ergocristina	Faixa Linear	0,9672	3,83E+07	-2,11E+03	53,1703	1,9850
Ergocristinina	Faixa Linear	0,9833	1,66E+07	9,94E-01	75,2437	1,9850
Ergonovina (ergometrina)	Faixa Linear	0,9493	2,22E+07	-3,35E+02	42,3826	1,9850
Ergosina	Faixa Linear	0,9601	4,23E+07	-5,11E+02	48,0416	1,9850
Fumonisina B1	Faixa Linear	0,9904	3,49E+06	-5,39E+04	99,2768	1,9850
Ocratoxina A	Faixa Linear	0,9580	4,18E+07	5,23E+03	46,8000	1,9850
Toxina T-2	Faixa Linear	0,9809	1,04E+07	3,05E+04	70,1245	1,9850
Zearalenona	Faixa Linear	0,9759	6,74E+06	1,74E+03	62,3403	1,9850
α -Ergocriptina	Faixa Linear	0,9668	5,38E+07	-8,44E+02	52,8696	1,9850

Fonte: próprio autor

5.4.4. Veracidade e precisão

A veracidade do método foi avaliada através da recuperação analítica. Os valores obtidos nos três dias de ensaio, em condições de precisão intermediária, foram combinados e as médias calculadas para cada um dos quatro níveis de

fortificação. Na Tabela 18 conseguimos observar os resultados obtidos juntamente com as concentrações para cada nível de fortificação das micotoxinas.

Tabela 18: Média das recuperações por nível de fortificação em condições de precisão intermediária.

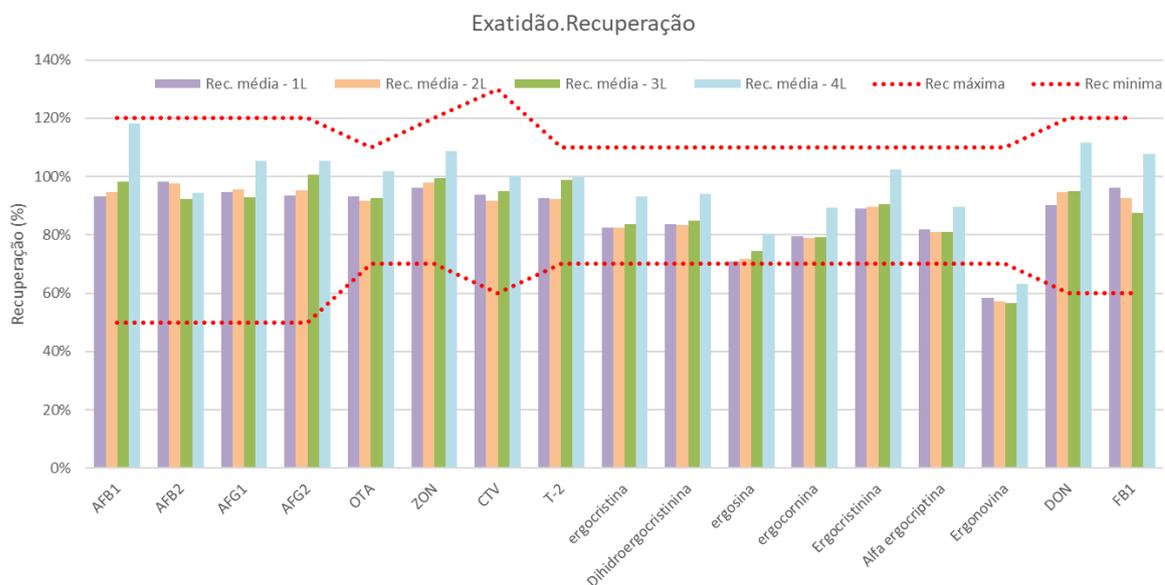
Analito	Concentração (μgL^{-1})				Recuperação média (%)			
	1º nível	2º nível	3º nível	4º nível	1º nível	2º nível	3º nível	4º nível
Aflatoxina B1	4,00	2,40	0,80	0,32	93,12	94,57	98,16	118,28
Aflatoxina B2	2,50	1,50	0,50	0,20	98,15	97,61	92,22	94,45
Aflatoxina G1	2,50	1,50	0,50	0,20	94,65	95,69	92,81	105,34
Aflatoxina G2	2,50	1,50	0,50	0,20	93,50	95,24	100,57	105,29
Citreoviridina A	12,50	7,50	2,50	1,00	93,91	91,59	95,02	99,99
Deoxinivalenol	937,50	562,50	187,50	75,00	90,34	94,60	94,97	111,61
Dihidroergocristina	19,03	11,42	3,81	1,52	83,77	83,42	84,99	93,95
Ergocornina	19,08	11,45	3,82	1,53	79,42	78,92	79,09	89,44
Ergocristina	18,45	11,07	3,69	1,48	82,49	82,44	83,55	93,25
Ergocristinina	16,33	9,80	3,27	1,31	89,00	89,67	90,49	102,46
Ergonovina (ergometrina)	19,00	11,40	3,80	1,52	58,36	57,16	56,56	63,06
Ergosina	19,03	11,42	3,81	1,52	70,81	71,92	74,52	80,49
Fumonisina B1	1250,00	750,00	250,00	100,00	96,26	92,51	87,45	107,85
Ocratoxina A	12,50	7,50	2,50	1,00	93,09	91,72	92,56	101,92
Toxina T-2	200,00	120,00	40,00	16,00	92,63	92,33	98,82	99,83
Zearalenona	130,00	78,00	26,00	10,40	96,28	97,88	99,39	108,56
α -Ergocriptina	18,33	11,00	3,67	1,47	81,83	80,85	81,08	89,76

Fonte: próprio autor

Os critérios de aceitabilidade dos desempenhos da recuperação foram baseados na Diretiva CE 401/2006 para determinação de micotoxinas em gêneros alimentícios (89), conforme descrito na Tabela 11 no item parâmetros de validação. Para as micotoxinas não abordadas na legislação, como os alcalóides de Ergot, foram consideradas aceitáveis as recuperações que estavam na faixa entre 70% e 110% para fortificações entre $1 \mu\text{gkg}^{-1}$ (ou μgL^{-1}) e $10 \mu\text{gkg}^{-1}$, e recuperações entre 80% e 110% para concentrações de fortificação acima de $10 \mu\text{gkg}^{-1}$, conforme determinação

da Diretiva 2002/657/CE (88). Na Figura 21 observa-se as recuperações obtidas para os quatro níveis de fortificação das micotoxinas, bem como suas recuperações máximas e mínimas.

Figura 21: Recuperações obtidas para os quatro níveis de fortificação das micotoxinas em condição de precisão intermediária, bem como suas recuperações máximas e mínimas.



Fonte: próprio autor

Observa-se pela Fig. 21 que as recuperações da ergonovina nos níveis de concentração avaliados ficaram abaixo dos valores determinados pela Diretiva 2002/657/CE (88), mantendo-se entre 50 - 60% em todos os níveis de fortificação. Segundo o documento SANTE/11813/2017 (90), que orienta sobre o controle analítico de qualidade e procedimentos de validação de métodos para resíduos de pesticidas e análises em alimentos para animais, recuperações fora da faixa de 70-120% podem ser aceitas se forem consistentes ($RSD \leq 20\%$), desde que devidamente justificadas, sendo as recuperações médias não inferiores a 30% ou acima de 140%.

Para a baixa recuperação da ergonovina, acredita-se que, devido à etapa de particionamento do método, o analito tenha se distribuído entre as fases orgânica e aquosa, ocasionando, dessa forma, a baixa recuperação dessa micotoxina no método. Para esses tipos de situação, mesmo sendo devidamente justificado, o SANTE (90) recomenda que haja uma correção da recuperação ou que o analito seja analisado por outro método.

Acredita-se que a ergonovina tenha sofrido particionamento devido a sua maior polaridade em relação as demais micotoxinas. Seu grupo OH terminal e livre de impedimento estérico, faz ligação de hidrogênio com a água da cerveja, dificultando assim a extração do analito pelo solvente da fase extratora. As demais micotoxinas tiveram recuperações dentro dos limites estabelecidos pelas legislações, variando de 70,8% (ergosina) a 118% (aflatoxina B1).

A precisão do método foi avaliada em termos de repetitividade e precisão intermediária. Para isso, foram calculadas as médias das recuperações em duas situações: por dia de análise e para todos os dias de validação, em cada um dos quatro níveis de fortificação. Com o cálculo dos desvios padrões relativos, foi possível avaliar a dispersão dos resultados para a repetitividade (RSD_r) e precisão intermediária (RSD_R), respectivamente.

Para que a precisão do método fosse considerada aceitável, os valores de RSD_R não deveriam ser superiores aos valores calculados utilizando a equação de Horwitz (equação 19).

Equação 19

$$RSD_R = 2^{(1-0,5\log C)}$$

Além disso, os desvios padrões relativos de repetitividade não deveria superar $\frac{2}{3}$ os limites previsto pela mesma equação (88).

A Tabela 19 mostra os resultados de desvio padrão relativo para o último nível de fortificação.

Tabela 19: Desvio padrão relativo para o último nível de fortificação.

Analito	RSD _r 4º nível (%)			RSD _r Horwitz	RSD _R (%)	
	1º dia	2º dia	3º dia		4º nível	Horwitz
Aflatoxina B1	10,71	9,57	5,15	35,18	10,49	52,77
Aflatoxina B2	10,01	15,57	13,94	39,36	16,98	59,04
Aflatoxina G1	7,06	16,64	13,16	38,14	13,15	57,21
Aflatoxina G2	28,24	15,13	12,32	40,54	19,92	60,81
Citreoviridina A	9,20	4,29	5,41	27,38	14,22	41,07

Analito	RSD _r , 4º nível (%)			RSD _R (%)		
	1º dia	2º dia	3º dia	RSD _r Horwitz	4º nível	Horwitz
Deoxinivalenol	12,75	8,41	10,67	16,14	34,42	24,21
Dihidroergocristina	10,02	11,37	8,02	28,80	13,88	43,20
Ergocornina	7,91	5,38	5,97	29,23	18,32	43,84
Ergocristina	7,96	4,91	9,83	29,19	15,64	43,79
Ergocristinina	9,30	9,28	10,54	29,31	11,99	43,97
Ergonovina (ergometrina)	13,05	18,42	9,01	31,94	28,74	47,91
Ergosina	13,92	3,65	7,54	29,48	16,76	44,22
Fumonisina B1	7,59	2,58	5,55	15,02	9,67	22,54
Ocratoxina A	10,45	5,29	10,60	30,54	27,14	45,81
Toxina T-2	6,78	10,68	8,23	20,03	22,91	30,04
Zearalenona	10,08	3,36	5,79	21,27	10,76	31,90
α-Ergocriptina	7,77	11,61	9,08	29,16	16,25	43,74

Fonte: próprio autor

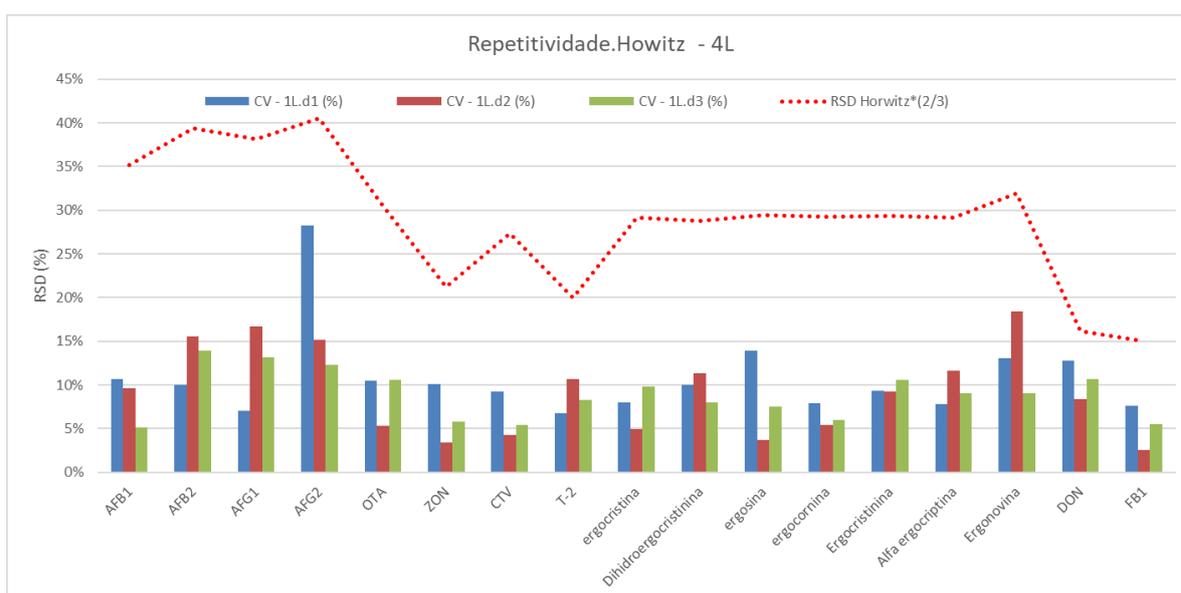
Através dos dados do menor nível de fortificação, considerado o mais crítico para os cálculos do desvio padrão relativo, pois podem apresentar os maiores desvios, pode-se observar (Fig. 22) que a precisão em termos de repetitividade foi satisfatória para as dezessete micotoxinas em que o método foi considerado seletivo.

Consegue-se observar também através dos dados de precisão intermediária obtidos em ensaios de recuperação (Fig. 23), que a micotoxina deoxinivalenol apresentou um desvio acima do esperado pela equação de Horwitz no segundo e quarto níveis de fortificação. Estes resultados podem ser justificados, pois no terceiro dia de validação, as micropipetas utilizadas no preparo da curva foram levadas para calibração, sendo a fortificação feita com micropipetas distintas. Desta forma, a recuperação de DON para o terceiro dia de validação ficou abaixo do esperado, acarretando um desvio acima do permitido na equação de Horwitz.

A variação da pipeta no terceiro dia de validação, aumentou o desvio de reprodutibilidade para todas as micotoxinas em estudo. Contudo, como a integração do pico cromatográfico de DON é mais trabalhosa, há um erro inerente ocasionado

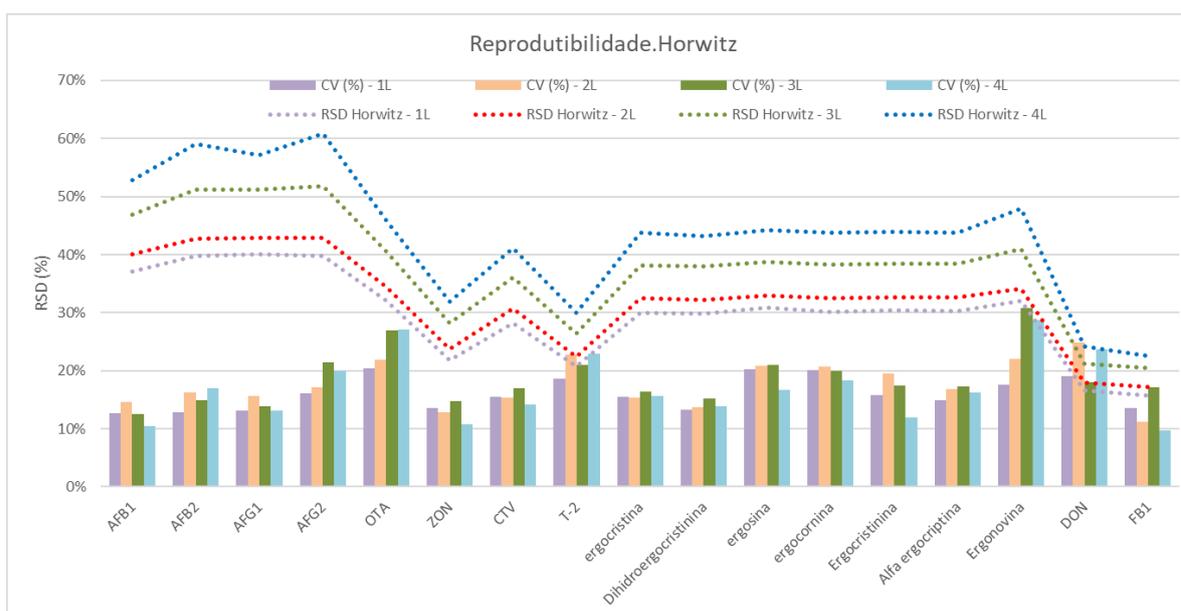
por essa integração, o que aumenta o coeficiente de variação em relação as demais micotoxinas. Além disso, para concentrações maiores como a avaliada para o quarto nível de fortificação de DON, a equação de Horwitz prevê coeficientes de variação menores ($RSD_R \text{ (Horwitz)} < 25$) e, estes dois fatores aliados fizeram com que o RSD_R de DON ficasse acima do esperado pela equação de Horwitz.

Figura 22: Estimativa de repetibilidade para nível baixo de fortificação obtido em ensaios de recuperação.



Fonte: próprio autor

Figura 23: Estimativa de precisão intermediária obtido em ensaios de recuperação.



Fonte: próprio autor

5.4.5. Limites de detecção (LD) e Limites de Quantificação (LQ)

Os limites de detecção e quantificação foram determinados a partir dos valores de $CC\alpha$ e $CC\beta$, respectivamente. Essa decisão foi tomada de modo a evitar que estes limites ficassem abaixo dos compreendidos pela curva de calibração.

Para os cálculos de $CC\alpha$ e $CC\beta$ foram utilizados como limite máximo tolerado (LMT) os menores pontos fortificados das curvas de calibração, já que não existe nas legislações brasileira ou européia, LMT para micotoxinas em cerveja. Também foram utilizados para a obtenção de $CC\alpha$ e $CC\beta$, os valores da incerteza padrão combinada, calculados para o menor nível de fortificação da curva de calibração conjunta dos três dias de validação em condição de precisão intermediária.

Na Tabela 20, encontram-se os valores de LD e LQ para cada micotoxina.

Tabela 20: Limite máximo tolerado (LMT), limites de detecção (LD- $CC\alpha$) e de quantificação (LQ- $CC\beta$), incerteza combinada do LMT (μ).

Analito	LMR ($\mu\text{g/L}$)	LD ($\mu\text{g/L}$) ($CC\alpha$)	LQ ($\mu\text{g/L}$) ($CC\beta$)	μ_c ($\mu\text{g/L}$)	$\frac{\mu_c(C_{\text{Canal}})}{C_{\text{Canal}}}$	Limite $\frac{\mu_c(C_{\text{Canal}})}{C_{\text{Canal}}}$ ¹
Aflatoxina B1	0,32	0,38	0,45	0,04	0,12	0,47
Aflatoxina B2	0,20	0,26	0,33	0,04	0,20	0,47
Aflatoxina G1	0,20	0,25	0,30	0,03	0,15	0,47
Aflatoxina G2	0,20	0,30	0,40	0,06	0,30	0,47
Citreoviridina A	2,00	2,49	2,99	0,30	0,15	0,40
Deoxinivalenol	75,00	102,50	129,99	16,77	0,22	0,27
Dihidroergocristina	1,52	1,85	2,17	0,20	0,13	0,40
Ergocornina	1,53	1,92	2,31	0,24	0,16	0,40
Ergocristina	1,48	1,83	2,18	0,21	0,14	0,40
Ergocristinina	1,31	1,56	1,82	0,16	0,12	0,40
Ergonovina (ergometrina)	1,52	1,95	2,37	0,26	0,17	0,40
Ergosina	1,52	1,86	2,21	0,21	0,14	0,40
Fumonisina B1	100,00	117,29	134,58	10,54	0,11	0,27
Ocratoxina A	1,00	1,44	1,88	0,27	0,27	0,40
Toxina T-2	16,00	21,44	26,87	3,32	0,21	0,27
Zearalenona	10,40	12,46	14,53	1,26	0,12	0,40
α -Ergocriptina	1,47	1,81	2,16	0,21	0,14	0,40

Fonte: próprio autor e ¹ Manual de Garantia da Qualidade (MAPA) (13).

LMR = é a concentração do limite máximo de resíduo, considerado aqui como o menor nível da curva de calibração fortificado.

LD = Limite de detecção

LQ = Limite de quantificação

μ_c = Incerteza combinada no menor nível de fortificação da curva de calibração.

$\mu_c(C \text{ anal.})/C \text{ anal.}$ = incerteza combinada da concentração do analito dividido pela própria concentração do analito.

5.4.6. Incerteza de medição

Os critérios de aceitabilidade da incerteza de medição foram baseados no Manual de Garantia da Qualidade (13), que determina que incertezas padrão combinadas calculadas a partir de dados de precisão intermediária (incerteza ou desvio-padrão de reprodutibilidade intralaboratorial), não devem exceder em mais de um terço os valores da Tabela de aceitação da reprodutibilidade apresentada abaixo (Tabela 21):

Tabela 21: Critérios de Aceitação da Reprodutibilidade

Concentração (c)	Coeficiente de Variação (CV) (%)
$c < 1 \text{ mg/kg}$	35
$1 \text{ mg/kg} \leq c < 10 \text{ mg/kg}$	30
$10 \text{ mg/kg} \leq c < 100 \text{ mg/kg}$	20
$100 \text{ mg/kg} \leq c < 1 \text{ g/kg}$	15
$1 \text{ mg/kg} \leq c < 10 \text{ mg/kg}$	10
$10 \text{ mg/kg} \leq c < 100 \text{ mg/kg}$	7,3
$100 \text{ mg/kg} \leq c < 1 \text{ g/kg}$	5,3
$1 \text{ g/kg} \leq c < 10 \text{ g/kg}$	3,7
$10 \text{ g/kg} \leq c < 100 \text{ g/kg}$	2,7
$100 \text{ g/kg} \leq c < 1 \text{ kg/kg}$	2

Fonte: Manual de Garantia da Qualidade (13)

Desta forma, o limite de confiabilidade para a incerteza combinada foi calculado a partir da equação 20:

Equação 20

$$\frac{\mu_c(C \text{ anal.})}{C \text{ anal.}} \leq \left(1 + \frac{1}{3}\right) * CV$$

Onde:

$\mu_c(C \text{ anal.})/C \text{ anal.} =$ incerteza combinada da concentração do analito dividido pela própria concentração do analito;

CV = coeficiente de variação apresentado na Tabela 21.

Na Tabela 20, representada na seção anterior, estão apresentados os resultados de incerteza expandida, para o LD de cada micotoxina, obtidos através dos cálculos da metodologia *Bottom-up*. Observa-se que todas as micotoxinas, apresentam resultados em conformidade com o Manual da Garantia da Qualidade Analítica (13).

A Tabela 22 apresenta, em resumo, os dados obtidos com a realização deste estudo.

Tabela 22: Resumo dos dados obtidos para micotoxinas validadas.

Analito	Faixa Linear ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Efeito de Matriz		R^2	LD (CC α) ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	LQ (CC β) ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Incerteza	
		Inclinações diferentes	Interceptos diferentes				Calculada ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Limite ($\mu\text{g.L}^{-1}$)
Aflatoxina B1	0,32 - 4,00	Sim	-	0,9889	0,38	0,45	0,12	0,47
Aflatoxina B2	0,20 - 2,50	Sim	-	0,9802	0,26	0,33	0,20	0,47
Aflatoxina G1	0,20 - 2,50	Não	Não	0,9876	0,25	0,30	0,15	0,47
Aflatoxina G2	0,20 - 2,50	Sim	-	0,9634	0,30	0,40	0,30	0,47
Citreoviridina A	1,00 - 12,50	Sim	-	0,9857	2,49	2,99	0,15	0,40
Deoxinivalenol	75,00 - 937,50	Sim	-	0,9841	102,50	129,99	0,22	0,27
Dihidroergocristina	1,52 - 19,03	Não	Não	0,9739	1,85	2,17	0,13	0,40
Ergocornina	1,53 - 19,08	Sim	-	0,9653	1,92	2,31	0,16	0,40
Ergocristina	1,48 - 18,45	Sim	-	0,9672	1,83	2,18	0,14	0,40
Ergocristinina	1,31 - 16,33	Sim	-	0,9833	1,56	1,82	0,12	0,40
Ergonovina	1,52 - 19,00	Sim	-	0,9493	1,95	2,37	0,17	0,40
Ergosina	1,52 - 19,03	Não	Não	0,9601	1,86	2,21	0,14	0,40
Fumonisina B1	100,00 - 1250,00	Sim	-	0,9904	117,29	134,58	0,11	0,27
Ocratoxina A	1,00 - 12,50	Sim	-	0,9580	1,44	1,88	0,27	0,40
Toxina T-2	16,00 - 200,00	Sim	-	0,9809	21,44	26,87	0,21	0,27
Zearalenona	10,40 - 130,00	Não	Sim	0,9759	12,46	14,53	0,12	0,40
α -ergocriptina	1,47 - 18,33	Sim	-	0,9668	1,81	2,16	0,14	0,40

Fonte: próprio autor

5.4.7. Estudo de ocorrência

A presença das micotoxinas mascaradas de DON não foi observada em nenhuma das amostras de cerveja, uma vez que não foram encontrados, nas janelas dos tempos de retenção, picos cromatográficos em ambas as transições para as micotoxinas avaliadas qualitativamente.

Para as demais micotoxinas, não foi obtido ocorrência de contaminação nas amostras, conforme pode ser observado na Tabela 23.

Tabela 23: Resultados obtidos no estudo de ocorrência para micotoxinas e agrotóxicos

Amostra	Aflatoxina B1	Aflatoxina B2	Aflatoxina G1	Aflatoxina G2	Citreoviridina A	Deoxinivalenol	Dihidroergocristina	Ergocorrina	Ergocristina	Ergocristinina	Ergonovina (ergometrina)	Ergosina	Fumonisina B1	Ocratoxina A	Toxina T-2	Zearalenona	α -Ergocriptina
	Concentração (μgL^{-1})																
TM 20:52 B	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ
TM A 14:10	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ
JA13:282 A	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ
L9090076CC 21:44	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ
PI00:552 A	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ
L9119076F09 31	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ
JC15:534	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ
MG02:231	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ
L82	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ
1763	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ

Fonte: próprio autor

NQ = não quantificado

6. CONCLUSÃO

Uma metodologia empregando QuEChERS foi otimizada, desenvolvida e validada, utilizando espectrômetro de massas triploquadropolo acoplado ao sistema cromatográfico UHPLC para quantificação de micotoxinas em cerveja. O emprego de UHPLC-MS/MS utilizando o modo de varredura MRM possibilita a determinação de multianalitos presentes em baixas concentrações em matrizes complexas, uma vez

que nesse sistema, a detectabilidade é aumentada com consecutiva diminuição da interferência espectral de compostos presentes na matriz.

O emprego do método QuEChERS para a extração de multianalitos utilizando acetonitrila como solvente extrator tem a vantagem de dispensar a utilização de co-solvente não polar para induzir uma separação de fase com a água e o emprego do cloreto de sódio no método promove o efeito *salting out* o que melhora os resultados de recuperação de analitos polares, como as fumonisinas, por exemplo. O sulfato de magnésio anidro é outro sal que potencializa a extração do método QuEChERS, pois absorve a água presente no meio, tornando os extratos finais de acetonitrila menos polares.

O procedimento validado dispensa a etapa de *clean up* utilizando D-SPE, e essa redução de etapa em relação ao método QuEChERS original diminui o tempo necessário para o preparo de amostras, o que pode ser considerado uma vantagem do método.

A seletividade da metodologia foi analisada através do ensaio de amostras branco, mostrando-se seletiva para quase todas as micotoxinas sob investigação, com exceção da citrinina e do ácido penicílico. Acredita-se que a concentração empregada para essas micotoxinas durante a validação tenha comprometido os resultados da análise, já que as fortificações foram feitas abaixo do LD. Desta forma, não foi possível validar tais substâncias no método, deixando nesse estudo uma indicação de concentração de fortificação para ampliação do escopo do procedimento analítico.

O efeito matriz foi avaliado através da comparação das inclinações e dos interceptos das curvas de calibração, sendo comprovado para as micotoxinas aflatoxina B1, B2, G2, ocratoxina A, citreoviridina, deoxinivalenol, α -ergocriptina, ergocristina, ergocristinina, ergocornina, ergonovina, fumonisina B1, toxina T-2 e zearalenona.

As curvas de calibração foram feitas utilizando extrato de matriz branca, evitando os efeitos causados pelo efeito matriz. A metodologia se mostrou linear nas faixas de 4,0 a 0,3 μgL^{-1} para aflatoxina B1; 2,5 a 0,2 μgL^{-1} para aflatoxina B2, G1 e G2; 12,5 a 1,0 μgL^{-1} para citreoviridina e ocratoxina; 19,0 a 1,5 μgL^{-1} para dihidroergocristina, ergocornina, ergonovina e ergosina; 16,3 a 1,3 μgL^{-1} para

ergocristina e α -ergocriptina; 130,0 a 10,40 μgL^{-1} para zearalenona; 200,0 a 16,0 μgL^{-1} para toxina T-2; 937,5 a 75,0 μgL^{-1} para deoxinivalenol e 1250,0 a 87,5 μgL^{-1} para fumonisina B1.

As recuperações médias das micotoxinas no método variaram de 56,6% (ergonovina) a 118,3% (aflatoxina B1), sendo estes resultados alcançados para as fortificações realizadas em quatro níveis distintos, em três dias de validação realizados em condições de precisão intermediária. A recuperação da ergonovina ficou abaixo dos valores determinados pela Diretiva 2002/657/CE (88). Entretanto, como o seu desvio padrão relativo (RSDr) foi menor do que 20%, o documento SANTE/11813/2017 (90) justifica que recuperações desta natureza podem ser aceitas, já que os dados são consistentes, embora métodos mais sensíveis para o analito devam ser testados.

Os desvios padrões obtidos para os níveis mais baixos de fortificação em condições de repetibilidade foram condizentes com a diretiva 2002/657/CE (88), para todas as micotoxinas consideradas seletivas no método, obtendo-se RSDr que variaram de 2,6% (fumonisina B1) a 28,2% (aflatoxina G2).

Para os desvios obtidos em condições de precisão intermediária, apenas o deoxinivalenol apresentou desvio acima do esperado pela equação de Horwitz, o que foi justificado pelo uso de micropipetas diferentes para o preparo da curva e fortificação das amostras no terceiro dia de validação. Embora essa variação da pipeta no terceiro dia de validação, tenha aumentado o desvio de reprodutibilidade para todas as micotoxinas em estudo, somente DON teve um efeito expressivo sobre a reprodutibilidade. Como a integração do pico cromatográfico de DON é mais trabalhosa, há um aumento no coeficiente de variação maior para esta micotoxina. Além disso, para concentrações mais elevadas, como acontece com o deoxinivalenol, a equação de Horwitz prevê coeficientes de variação menores. Estes dois fatores aliados fizeram com que o RSD_R de DON ficasse acima do esperado pela equação de Horwitz.

A razão entre a incerteza combinada na menor concentração de fortificação dividida pela própria concentração do analito mostrou que todos os resultados estão dentro do aceitável pelo Manual de Garantia de Qualidade Analítica (13).

Nenhuma das dez amostras reais analisadas no estudo de ocorrências apresentou contaminação. Desta forma, para a discussão sobre a inclusão da matriz cerveja nas legislações que tratam sobre os limites máximos de micotoxinas em alimentos, seria necessária a realização de análises de um número maior de amostras.

Embora não tenham sido encontradas amostras contaminadas, avalia-se que a metodologia proposta para análise de micotoxinas em cerveja apresentou-se adequada para determinação de dezessete das dezenove micotoxinas em estudo, sendo as duas micotoxinas não validadas (citrinina e ácido penicílico), estudadas fora de seus respectivos limites de detecção.

Desta forma, a metodologia se mostra promissora para ser utilizada em análises fiscais para o controle de qualidade e segurança alimentar, seguindo as principais normativas nacionais e internacionais de qualidade analítica.

7. REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO:

1. P. Golob, *On-farm Mycotoxin Control in Food and Feed Grain* (Food & Agriculture Org, Rome, Italy, 2007).
2. T. Becker, J. Tippmann, 500 Jahre Reinheitsgebot - Verfahrenstechnik rund ums Bier. *Chemie Ingenieur Technik*. **88**, 1847–1847 (2016).
3. T. Frank, B. Scholz, S. Peter, K.-H. Engel, Metabolite profiling of barley: Influence of the malting process. *Food Chem*. **124**, 948–957 (2011).
4. L. M. Santos, F. A. Oliveira, E. H. Ferreira, A. Rosenthal, Application and possible benefits of high hydrostatic pressure or high-pressure homogenization on beer processing: A review: <https://doi.org/10.1177/1082013217714670>.
5. D. De Keukeleire, Fundamentals of beer and hop chemistry. *Química Nova*. **23**, 108–112 (2000).
6. R. D'Avila, M. Luvielmo, C. R. Mendonça, M. Jantzen, Adjuntos utilizados para produção de cerveja: características e aplicações. *ete*. **8**, 60–68 (2012).

7. F. Silva, I. M. P. L. V. O. Ferreira, N. Teixeira, Polipeptídeos e proteínas com influência na qualidade da espuma da cerveja e métodos analíticos utilizados no seu estudo. *Química Nova*. **29**, 1326 – 1331 (2006).
8. S. N. da I. C. (SINDCERV), O setor em números. *Dados e Fatos* (2017) (available at <https://www.sindicerv.com.br/consumo-responsavel/>).
9. R. Krska, Mycotoxins. *Anal. Bioanal. Chem.* **395**, 1203–1204 (2009).
10. M. T. Maziero, L. dos S. Bersot, Micotoxinas em alimentos produzidos no Brasil. *Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais*. **12**, 10 (2010).
11. BRASIL, Resolução de diretoria colegiada - RDC No 07, de 18 de Fevereiro de 2011, 8 (2011).
12. M. Rufatto, Micotoxinas e acometimentos à saúde humana - ênfase no potencial carcinogênico. *Revista Brasileira de Nutrição Clínica Funcional*. **60**, 9 (2014).
13. Brasil, Ed., *Manual de garantia da qualidade analítica: resíduos e contaminantes em alimentos* (Brasília, ed. 1, 2011).
14. Publications Office, *Commission Regulation (EC) No 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs*. (2018; <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX:02006R1881-20180319>).
15. C. European, Diretiva 2012/154/UE. *Official Journal of the European Communities* (2012).
16. Mycotoxins.info, Common Mycotoxins (2019), (available at <http://www.mycotoxins.info/mycotoxins/common-mycotoxins/>).
17. BRASIL, *Decreto nº 6871, de 4 Junho de 2009* (2009; http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2007-2010/2009/Decreto/D6871.htm).
18. M. S. dos Santos, F. de M. Ribeiro, *Cervejas e refrigerantes* (São Paulo, 2005; <http://www.cetesb.sp.gov.br>).
19. A. R. Piccini, C. Moresco, L. Munhos, *Cerveja* (2002), (available at <http://www.ufrgs.br/alimentus1/feira/prcerea/cerveja/>).

20. B. SMITH, Esters in Home Brewed Beer | Home Brewing Beer Blog by BeerSmith™ (2012), (available at <http://beersmith.com/blog/2012/03/07/esters-in-beer-brewing/>).
21. P. B. SIQUEIRA, H. M. A. BOLINI, G. A. MACEDO, O processo de fabricação da cerveja e seus efeitos na presença de polifenóis. *Alim. Nutr. Araraquara*. **19**, 491–498 (2008).
22. R. A. CURI, thesis, UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO (2006).
23. C. A. T. Coutinho, Cervesia - A cerveja no Brasil de 1500 a 1799 (Século XVII a XIX), (available at <https://www.cervesia.com.br/artigos-tecnicos/cerveja/historia-da-cerveja/3-a-cerveja-no-brasil-de-1500-a-1799-seculo-xvii-a-xix.html>).
24. C. A. T. Coutinho, Cervesia - A cerveja no Brasil de 1800 a 1850 (Século XVII a XIX), (available at <https://www.cervesia.com.br/artigos-tecnicos/cerveja/historia-da-cerveja/6-a-cerveja-no-brasil-de-1800-a-1850-seculo-xvii-a-xix.html>).
25. C. V. Müller, E. F. Marcusso, *Anuário da Cerveja no Brasil* (2017).
26. J. W. Bennett, M. Klich, Mycotoxins. *Clin. Microbiol. Rev.* **16**, 497–516 (2003).
27. Mycotoxin Management, Mycotoxin Information - Alltech (2019), (available at <https://www.knowmycotoxins.com/mycotoxin-information/>).
28. B. T. Iamanaka, I. S. Oliveira, M. H. Taniwaki, Micotoxinas em alimentos. *Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica*. **7**, 138–161 (2010).
29. World Health Organization, Aflatoxins pose a serious health risk to humans and livestock. *Food Safety Digest*, 5 (2018).
30. S. Marin, A. J. Ramos, G. Cano-Sancho, V. Sanchis, Mycotoxins: Occurrence, toxicology, and exposure assessment. *Food Chem. Toxicol.* **60**, 218–237 (2013).
31. Fermentek: Making Fine Biochemicals, (available at <https://www.fermentek.com/>).

32. ChemSpider: Search and share chemistry, (available at <http://www.chemspider.com/Search.aspx>).
33. T. V. Milanez, L. M. Valente-Soares, G. G. Baptista, Occurrence of trichothecene mycotoxins in Brazilian corn-based food products. *Food Control*. **17**, 293–298 (2006).
34. B. Puschner, Mycotoxins. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*. **32**, 409–419 (2002).
35. R. Krska, J. L. Richard, R. Schuhmacher, A. B. Slate, T. B. Whitaker, *Guide to Mycotoxins* (ed. 4, 2012).
36. M. Zachariasova, M. Vaclavikova, O. Lacina, L. Vaclavik, J. Hajslova, Deoxynivalenol oligoglycosides: new “masked” fusarium toxins occurring in malt, beer, and breadstuff. *J. Agric. Food Chem*. **60**, 9280–9291 (2012).
37. Q. Wu, K. Kuča, H.-U. Humpf, B. Klímová, B. Cramer, Fate of deoxynivalenol and deoxynivalenol-3-glucoside during cereal-based thermal food processing: a review study. *Mycotoxin Res*. **33**, 79–91 (2017).
38. D. G. Schmale, G. P. Munkvold, Mycotoxins in Crops. *The American Phytopathological Society (APS)* (2009), (available at <https://www.apsnet.org/edcenter/disimpactmngmnt/topc/Micotoxinas/Pages/TrichothecenesPort.aspx>).
39. C. R. Pozzi, J. R. P. Arcaro, I. Arcaro Júnior, H. Fagundes, B. Corrêa, Aspectos relacionados à ocorrência e mecanismo de ação de fumonisin. *Cienc. Rural*. **32**, 901–907 (2002).
40. É. Bando, L. N. Gonçalves, N. K. Tamura, M. Machinski Junior, Biomarcadores para avaliação da exposição humana às micotoxinas. *J Bras Patol Med Lab*. **43**, 175–180 (2007).
41. L. Minami, P. G. Meirelles, E. Y. Hirooka, E. Y. S. Ono, Fumonisin: efeitos toxicológicos, mecanismo de ação e biomarcadores para avaliação da exposição. *Sem. Ci. Agr*. **25**, 207 (2004).

42. S. Yang *et al.*, Deglucosylation of zearalenone-14-glucoside in animals and human liver leads to underestimation of exposure to zearalenone in humans. *Arch. Toxicol.* **92**, 2779–2791 (2018).
43. R. Wang *et al.*, Screening and Molecular Evolution of a Single Chain Variable Fragment Antibody (scFv) against Citreoviridin Toxin. *J. Agric. Food Chem.* **64**, 7640–7648 (2016).
44. M. W. DA ROCHA, thesis, Faculdade de Ciências da Saúde (UnB) (2013).
45. EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM), Scientific Opinion on Ergot alkaloids in food and feed. *EFSA Journal.* **10** (2012), doi:10.2903/j.efsa.2012.2798.
46. D. Jakubczyk, J. Z. Cheng, S. E. O'Connor, Biosynthesis of the ergot alkaloids. *Nat Prod Rep.* **31**, 1328–1338 (2014).
47. C. Wallwey, S.-M. Li, Ergot alkaloids: structure diversity, biosynthetic gene clusters and functional proof of biosynthetic genes. *Nat Prod Rep.* **28**, 496–510 (2011).
48. J. Diana Di Mavungu *et al.*, Development and validation of a new LC–MS/MS method for the simultaneous determination of six major ergot alkaloids and their corresponding epimers. Application to some food and feed commodities. *Food Chem.* **135**, 292–303 (2012).
49. R. Krska, G. Stubbings, R. Macarthur, C. Crews, Simultaneous determination of six major ergot alkaloids and their epimers in cereals and foodstuffs by LC-MS-MS. *Anal. Bioanal. Chem.* **391**, 563–576 (2008).
50. F. I. Brasil, Micotoxinas. *revista-fi* (2009).
51. P. K. Chan, C. S. Reddy, A. W. Hayes, Acute toxicity of penicillic acid and its interaction with pentobarbital and other compounds. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **52**, 1–9 (1980).
52. A. Ciegler, R. W. Detroy, E. B. Lillehoj, Patulin, penicillic acid, and other carcinogenic lactones. **v. 1971, 6** (1971).

53. Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Governo do Estado de São Paulo, Alimentos Processados | Os ingredientes nos alimentos processados, (available at <http://www.alimentosprocessados.com.br/ingredientes-macroingredientes-graos.php>).
54. K. C. Piacentini, G. D. Savi, G. Olivo, V. M. Scussel, Quality and occurrence of deoxynivalenol and fumonisins in craft beer. *Food Control*. **50**, 925–929 (2015).
55. X. Pascari, A. J. Ramos, S. Marín, V. Sanchís, Mycotoxins and beer. Impact of beer production process on mycotoxin contamination. A review. *Food Res. Int.* **103**, 121–129 (2018).
56. M. A. H. Nawaz *et al.*, in *Analysis of food toxins and toxicants*, Y. Wong, R. J. Lewis, Eds. (John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK, 2017), pp. 137–168.
57. N. W. Turner, S. Subrahmanyam, S. A. Piletsky, Analytical methods for determination of mycotoxins: a review. *Anal. Chim. Acta.* **632**, 168–180 (2009).
58. M. Á. González-Curbelo *et al.*, Evolution and applications of the QuEChERS method. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. **71**, 169–185 (2015).
59. I. Rozentale, E. Bogdanova, V. Bartkevics, A rapid and sensitive method for the control of selected regulated and emerging mycotoxins in beer. *World Mycotoxin Journal*. **11**, 503–517 (2018).
60. L. P. da Silva, F. Madureira, E. de Azevedo Vargas, A. F. Faria, R. Augusti, Development and validation of a multianalyte method for quantification of mycotoxins and pesticides in rice using a simple dilute and shoot procedure and UHPLC-MS/MS. *Food Chem.* **270**, 420–427 (2019).
61. K. C. Piacentini *et al.*, Mycotoxin analysis of industrial beers from Brazil: The influence of fumonisin B1 and deoxynivalenol in beer quality. *Food Chem.* **218**, 64–69 (2017).
62. L. M. Kawashima, A. P. Vieira, L. M. V. Soares, Fumonisin B1 and ochratoxin A in beers made in Brazil. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* **27**, 317–323 (2007).
63. A. Desmarchelier *et al.*, Combining the quick, easy, cheap, effective, rugged and safe approach and clean-up by immunoaffinity column for the analysis of 15

- mycotoxins by isotope dilution liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A.* **1337**, 75–84 (2014).
64. J. I. Bauer, M. Gross, C. Gottschalk, E. Usleber, Investigations on the occurrence of mycotoxins in beer. *Food Control.* **63**, 135–139 (2016).
 65. F. Al-Taher *et al.*, Rapid method for the determination of multiple mycotoxins in wines and beers by LC-MS/MS using a stable isotope dilution assay. *J. Agric. Food Chem.* **61**, 2378–2384 (2013).
 66. C. A. Chilaka, M. De Boevre, O. O. Atanda, S. De Saeger, Quantification of Fusarium mycotoxins in Nigerian traditional beers and spices using a multi-mycotoxin LC-MS/MS method. *Food Control.* **87**, 203–210 (2018).
 67. M. Kostelanska *et al.*, The study of deoxynivalenol and its masked metabolites fate during the brewing process realised by UPLC-TOFMS method. *Food Chem.* **126**, 1870–1876 (2011).
 68. J. Rubert, J. Mañes, K. J. James, C. Soler, Application of hybrid linear ion trap-high resolution mass spectrometry to the analysis of mycotoxins in beer. *Food Addit. Contam. Part A. Chem. Anal. Control. Expo. Risk Assess.* **28**, 1438–1446 (2011).
 69. M. Zachariasova *et al.*, Analysis of multiple mycotoxins in beer employing (ultra)-high-resolution mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **24**, 3357–3367 (2010).
 70. K. Habler, M. Gotthardt, J. Schüler, M. Rychlik, Multi-mycotoxin stable isotope dilution LC-MS/MS method for Fusarium toxins in beer. *Food Chem.* **218**, 447–454 (2017).
 71. J. I. Bauer, M. Gross, G. Hamscher, E. Usleber, A Rapid Screening Method for the Tremorgenic Indole-Diterpene Alkaloid Mycotoxin Paxilline in Beer. *Food Anal. Methods.* **11**, 1051–1055 (2018).
 72. J. M. González-Jartín *et al.*, A QuEChERS based extraction procedure coupled to UPLC-MS/MS detection for mycotoxins analysis in beer. *Food Chem.* **275**, 703–710 (2019).

73. M. Anastassiades, S. J. Lehotay, D. Stajnbaher, F. J. Schenck, Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid-phase extraction” for the determination of pesticide residues in produce. *J AOAC Int.* **86**, 412–431 (2003).
74. O. D. Prestes, C. A. Friggi, M. B. Adaime, R. Zanella, QuEChERS: um método moderno de preparo de amostra para determinação multirresíduo de pesticidas em alimentos por métodos cromatográficos acoplados à espectrometria de massas. *Quím. Nova.* **32**, 1620–1634 (2009).
75. T. Rejczak, T. Tuzimski, A review of recent developments and trends in the QuEChERS sample preparation approach. *Open Chem.* **13** (2015), doi:10.1515/chem-2015-0109.
76. Á. Santana-Mayor, B. Socas-Rodríguez, A. V. Herrera-Herrera, M. Á. Rodríguez-Delgado, Current trends in QuEChERS method. A versatile procedure for food, environmental and biological analysis. *TrAC Trends in Analytical Chemistry.* **116**, 214–235 (2019).
77. C. Sack, J. Vonderbrink, M. Smoker, R. E. Smith, Determination of Acid Herbicides Using Modified QuEChERS with Fast Switching ESI(+)/ESI(-) LC-MS/MS. *J. Agric. Food Chem.* **63**, 9657–9665 (2015).
78. A. R. Fontana, R. Bottini, Filter-vial dispersive solid-phase extraction as a simplified clean-up for determination of ethylphenols in red wines. *Food Chem.* **230**, 405–410 (2017).
79. CEN, European, *Foods of plant origin - Multimethod for the determination of pesticide residues using GC- and LC-based analysis following acetonitrile extraction/partitioning and clean-up by dispersive SPE - Modular QuEChERS-method* (2018), vol. 15662.
80. Thermo Electron Corporation, Chromatography. *Filtration & Separation.* **43**, 32–34 (2006).
81. H. Poppe, Some reflections on speed and efficiency of modern chromatographic methods. *Journal of Chromatography A.* **778**, 3–21 (1997).

82. Z. Xiong, Y. Deng, F. Li, in *Ultra-High Performance Liquid Chromatography and its Applications*, Q. A. Xu, Ed. (John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA, 2013), pp. 271–290.
83. L. Nováková, D. Solichová, P. Solich, Advantages of ultra performance liquid chromatography over high-performance liquid chromatography: comparison of different analytical approaches during analysis of diclofenac gel. *J Sep Sci.* **29**, 2433–2443 (2006).
84. F. M. Lanças, A Cromatografia Líquida Moderna e a Espectrometria de Massas: finalmente “compatíveis”? *Scientia Chromatographica.* **1**, 35–61 (2009).
85. M. C. Chiaradia, C. H. Collins, I. C. S. F. Jardim, O estado da arte da cromatografia associada à espectrometria de massas acoplada à espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos em alimentos. *Quím. Nova.* **31**, 623–636 (2008).
86. IPQ, INMETRO, Eds., *Vocabulário Internacional de Metrologia (VIM)* (Caparica, Portugal, ed. 1, 2012).
87. M. Feinberg, Validation of analytical methods based on accuracy profiles. *J. Chromatogr. A.* **1158**, 174–183 (2007).
88. European Commission, Diretiva 2002/657/CE . *Official Journal of the European Communities*, 8–36 (2002).
89. European Commission, Regulamento (CE) N° 401/2006. *Jornal Oficial da União Europeia*, 12–34 (2006).
90. European Commission, *Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticide residues and analysis in food and feed* (2017).
91. European Commission, *Guidance document on identification of mycotoxins in food and feed* (2017).
92. D. C. P. Abreu, thesis, Universidade Federal de Lavras (2019).

93. V. Vishwanath, M. Sulyok, R. Labuda, W. Bicker, R. Krska, Simultaneous determination of 186 fungal and bacterial metabolites in indoor matrices by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* **395**, 1355–1372 (2009).
94. S. V. C. de S. Ferreira, thesis, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte (2007).
95. L. P. da Silva, thesis, Universidade Federal de Minas Gerais - Departamento de Química (2017).
96. T. A. Ryan, B. L. Joiner, *The State College: Pennsylvania State University*, in press.
97. J. Durbin, G. S. Watson, Testing for serial correlation in least squares regression. II. *Biometrika.* **38**, 159–178 (1951).
98. B. Magnusson, U. Örnemark, Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods – A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics. *The Fitness for Purpose of Analytical Methods* (2014).
99. D. H. da Jornada, C. ten Caten, Uma revisão sobre abordagens e métodos de cálculos de incerteza. *Metrosul*, 6 (2007).
100. H. R. Harrison, Submitted on behalf of the Institute of Brewing Analysis Committee (Chairman F. R. Sharpe), Collaborative determination of the pH of beer and wort. *J. Inst. Brew.* **104**, 123–126 (1998).
101. European Commission, Diretiva 96/23/CE . *Official Journal of the European Communities*, 32 (1996).