

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

LUCAS PINTO DA SILVA

DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS BASEADOS EM
CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE
MASSAS PARA DETERMINAÇÃO DE MICOTOXINAS E
AGROTÓXICOS EM ALIMENTOS

BELO HORIZONTE

2021

UFMG/ ICEX/ DQ 1.429

D. 654

LUCAS PINTO DA SILVA

DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS BASEADOS EM
CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE
MASSAS PARA DETERMINAÇÃO DE MICOTOXINAS E
AGROTÓXICOS EM ALIMENTOS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito para a obtenção do grau de Doutor em Ciências – Química.

Orientador: Rodinei Augusti

Coorientador: Adriana Ferreira Faria

BELO HORIZONTE

2021

Ficha Catalográfica

S586d Silva, Lucas Pinto da
2021 Desenvolvimento de métodos baseados em
T cromatografia líquida acoplada à espectrometria de
massas para determinação de micotoxinas e agrotóxicos
em alimentos [manuscrito] / Lucas Pinto da Silva.
2021.
[vi], 137 f. : il.

Orientador: Rodinei Augusti.

Coorientadora: Adriana Ferreira Faria.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Minas
Gerais - Departamento de Química.

Inclui bibliografia.

1. Química analítica - Teses. 2. Alimentos -
Contaminação - Teses. 3. Micotoxinas - Teses. 4.
Produtos químicos agrícolas - Teses. 5. Nanotubos de
carbono - Teses. 6. Cromatografia líquida de alta
eficiência - Teses. 7. Espectrometria de massa -
Teses. 8. Alimentos para bebês - Teses. 9. Café -
Teses. I. Augusti, Rodinei, Orientador. II. Faria,
Adriana Ferreira, Coorientadora. III. Título.

CDU 043



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS



"Desenvolvimento de Métodos Baseados Em Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massas Para Determinação de Micotoxinas e Agrotóxicos Em Alimentos"

Lucas Pinto da Silva

Tese aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:

Prof. Rodinei Augusti - Orientador
UFMG

Profa. Adriana Ferreira Faria - Coorientadora
UFMG

Profa. Zenilda de Lourdes Cardeal
UFMG

Prof. Bruno Gonçalves Botelho
UFMG

Prof. Renato Zanella
UFMG

Prof. Robson José de Cassia Franco Afonso
UFOP

Belo Horizonte, 21 de janeiro de 2021.



Documento assinado eletronicamente por **Renato Zanella, Usuário Externo**, em 21/01/2021, às 18:08, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Bruno Goncalves Botelho, Professor do Magistério Superior**, em 21/01/2021, às 18:09, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Zenilda de Lourdes Cardeal, Coordenador(a)**, em 21/01/2021, às 18:10, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Rodinei Augusti, Professor do Magistério Superior**, em 21/01/2021, às 18:12, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Adriana Ferreira Faria, Professora do Magistério Superior**, em 21/01/2021, às 18:12, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Robson José de Cassia Franco Afonso, Usuário Externo**, em 26/01/2021, às 14:09, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador 0523329 e o código CRC F256C603.

AGRADECIMENTOS

É como elemento finalizador de uma etapa de grande importância em minha formação pessoal e acadêmica que apresento com orgulho esta tese, almejo apresentar uma síntese das qualidades reunidas durante a formação que recebi desta instituição, na intenção de fazer justiça aos alunos que me precederam neste departamento, assim como os que estão por vir.

Desta forma, é com satisfação que expresso meus sinceros agradecimentos aos meus professores orientadores Adriana Ferreira Faria, a quem devo todo o meu apreço e admiração, e Rodinei Augusti, profissional exemplar e professor dedicado, muito obrigado pela acolhida, muito obrigado pelos ensinamentos de ciência e de vida e por toda a confiança depositada em mim e o meu trabalho.

Ao grupo de pesquisa em espectrometria de massas, muito obrigados a todos.

Sou grato ao LFDA/MG por confiar em mim os elementos que subsidiam este trabalho e sem os quais sua realização não seria possível. Agradeço a todos os amigos do LACQSA, pelo apoio pessoal e suporte técnico na condução dos trabalhos que subiam esta validação.

Expresso meus agradecimentos aos meus pais, Maurício e Nilda, fundamentais na construção do caráter. A meus irmãos, Juliana, Miguel e Guilherme, que colaboram na construção de uma família generosa.

Sou grato a Juliana Cardoso, por sua presença inspiradora. Por me apoiar em todos os momentos.

Muito obrigado a todos, não seria possível sem vocês.

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório Federal de Defesa Agropecuária de Minas Gerais, no Laboratório de Espectrometria de Massas do Departamento de Química da Universidade Federal de Minas Gerais e no Department für Agrarbiotechnologie da Universität für Bodenkultur Wien, sob a orientação do Prof. Dr. Rodinei Augusti, coorientação da Profa. Dra. Adriana Ferreira Faria e supervisão de Eugenia Azevedo Vargas e Dr. Michael Sulyok.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	6
SUMÁRIO	8
LISTA DE TABELAS	i
LISTA DE FIGURAS	ii
LISTA DE SIGLAS	iv
Resumo	1
Abstract	3
1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
1.1. Micotoxinas	5
1.2. Espectrometria de massas	12
1.3. Cromatografia Líquida de Ultra Alta Performance	14
1.4. Dispersive Solid Phase Extraction	15
2. OBJETIVOS	16
3. DETERMINAÇÃO DE MICOTOXINAS EM BEBIDA VEGETAL	18
Resumo	19
Abstract	20
Introdução	21
3.1. Parte experimental	22
Padrões e reagentes	22
Sistema UHPLC-MS/MS	22
Amostras	24
Método analítico desenvolvido	24
Otimização do método QuEChERS	25
Validação	26
Extensão do escopo	28
3.2. Resultados e discussão	29

Otimização do método QuEChERS	29
Validação	30
Extensão do escopo	32
3.3. Conclusão	34
4. DETERMINAÇÃO DE MICOTOXINAS EM COMIDA DE BEBÊ	35
Resumo	36
Abstract	37
Introdução	38
4.1. Parte experimental	39
Padrões e reagentes	39
Instrumentação	40
Amostras	41
Método analítico desenvolvido	41
Otimização das condições UHPLC-MS/MS	41
Otimização do procedimento dSPE	43
Validação	44
4.2. Resultados e discussão	48
Otimização das condições UHPLC-MS/MS	48
Otimização do procedimento dSPE	49
Validação	51
Análise de amostras reais	53
4.3. Conclusão	53
5. DETERMINAÇÃO DE ZEARALENONA EM CAFÉ TORRADO	55
Resumo	56
Abstract	57
Introdução	58
5.1. Parte experimental	64

Padrões e reagentes _____	64
Amostras _____	64
Método analítico desenvolvido _____	64
Sistema UHPLC-MS/MS _____	65
Otimização do procedimento dSPE _____	66
Validação _____	69
5.2. Resultados e discussão _____	71
Otimização do procedimento dSPE _____	71
Validação _____	76
5.3. Conclusão _____	77
6. COMPARAÇÃO DAS ESTRATÉGIAS " BOTTON-UP" E "TOP-DOWN" PARA A ESTIMATIVA DA INCERTEZA DE MEDIÇÃO NA ANÁLISE MULTIANALITO DE RESÍDUOS E CONTAMINANTES EM ALIMENTOS POR UHPLC-MS/MS _____	79
Resumo _____	80
Abstract _____	81
Introdução _____	82
6.1. Parte experimental _____	85
Padrões e reagentes _____	85
Amostras _____	85
Método analítico empregado _____	85
Estimativa da incerteza de medição usando a abordagem de Bottom-up _____	89
Estimativa da incerteza de medição usando a abordagem de Top-down _____	90
6.2. Resultados e discussão _____	90
Estimativa da incerteza de medição usando o método Bottom-up _____	90
Estimativa da incerteza de medição usando o método <i>Top-down</i> _____	99
Valores de incerteza de medição obtidos _____	100
6.3. Conclusão _____	104
7. PUBLICAÇÕES ORIUNDAS DA TESE _____	106

LISTA DE TABELAS

<i>Tabela 1: Configuração ajustada para aquisição de dados por MRM na detecção de micotoxinas em bebidas vegetais</i>	23
<i>Tabela 2: Matriz de planejamento fatorial 2^4 e respostas para otimização do método QuEChERS</i>	25
<i>Tabela 3 Preparação das curvas de calibração matrizadas e resultados estatísticos para avaliação da linearidade</i>	31
<i>Tabela 4: Resultados para recuperação, precisão intermediária, LOD, LOQ, uc e U_{max}</i>	32
<i>Tabela 5: Resultados da ocorrência de contaminação em sete bebidas vegetais analisadas</i>	33
<i>Tabela 6: Parâmetros do espectrômetro de massas utilizados na análise de aflatoxinas em comida de bebê.</i>	42
<i>Tabela 7: Planejamento fatorial (2^3) empregado para a otimização do procedimento dSPE.</i>	43
<i>Tabela 8: Valores para figuras de mérito resultantes da validação do método de método para determinação de micotoxinas em comida de bebê.</i>	52
<i>Tabela 9: Resumo dos métodos descritos na literatura para determinação de micotoxinas em café</i>	61
<i>Tabela 10: Parâmetros do espectrômetro de massas utilizados na análise de zearalenona em café torrado</i>	66
<i>Tabela 11: Dados metrológicos dos instrumentos de medição</i>	94

LISTA DE FIGURAS

<i>Figura 1: Estrutura das principais micotoxinas</i>	11
<i>Figura 2: Resultados para otimização da extração de micotoxinas em bebida vegetal</i>	30
<i>Figura 3: Cromatogramas de íons extraídos obtidos para as aflatoxinas AFB1, AFB2, AFG1 e AFG2 após análise de amostras branco fortificadas em 2,0 ng kg⁻¹ de cada analito.</i>	49
<i>Figura 4: Recuperações obtidas após a dessorção da aflatoxina B1 (AFB1) MWCNT usando diferentes solventes.</i>	50
<i>Figura 5: Recuperações obtidas para as aflatoxinas AFB1, AFB2, AFG1 e AFG2 nos distintos experimentos de otimização realizados.</i>	51
<i>Figura 6: Eficiência de extração de micotoxinas de amostras de café torrado</i>	72
<i>Figura 7: Otimização da massa de nanoplaquetas de grafeno utilizada para desenvolvimento de método de extração dSPE para quantificação de zearalenona em café torrado</i>	73
<i>Figura 8: Otimização do tempo de exposição das nanoplaquetas de grafeno ao extrato de café torrado para desenvolvimento de método de extração dSPE para quantificação de zearalenona em café torrado</i>	74
<i>Figura 9: Avaliação da melhor solução para dessorção dos analitos da superfície das nanoplaquetas de grafeno.</i>	75
<i>Figura 10: Otimização do tempo necessário para dessorção do analito da superfície das nanoplaquetas de grafeno</i>	76
<i>Figura 11: Diagrama de Ishikawa para representar a relação de causa e efeito de fontes de incerteza na determinação multianalito</i>	93
<i>Figura 12: Distribuição dos valores de incerteza de medição relativa obtidos pelo método Bottom-up para dados de validação em arroz.</i>	101
<i>Figura 13: Distribuição dos valores de incerteza de medição relativa obtidos pelo método Top-down para dados de validação em arroz</i>	102
<i>Figura 14: Distribuição dos valores de incerteza de medição relativa obtidos pelo método Bottom-up para dados de validação em damasco.</i>	102

<i>Figura 15: Distribuição dos valores de incerteza de medição relativa obtidos pelo método Top-down para dados de validação em damasco</i>	103
<i>Figura 16: Distribuição dos valores de incerteza de medição relativa obtidos pelo método Bottom-up para dados de validação em feijão.</i>	103
<i>Figura 17: Distribuição dos valores de incerteza de medição relativa obtidos pelo método Top-down para dados de validação em feijão</i>	104

LISTA DE SIGLAS

AFB1 – Aflatoxina B1

AFB2 - Aflatoxina B2

AFG1 – Aflatoxina G1

AFG2 - Aflatoxina G2

AFM1 - Aflatoxina M1

AFM2 - Aflatoxina M2

AOAC - *Association of Official Analytical Chemists*

API – Ionização à pressão ambiente, do inglês *Ambient Pressure Ionization*

CE - *Collision Energy*

CTV - Citreoviridina

CXP - *Collision Exit Potential*

DP - *Declustering Potential*

dSPE - Extração em Fase Sólida Dispersiva, do inglês *Dispersive Solid Phase Extraction*

ELISA - Ensaio de Imunossorventes Ligado a Enzimas, do inglês *Enzyme Linked*

Immuno Sorbent Assay

EP - *Entrance Potential*

ESI - *Eletrospray Ionization*

FB1 – Fumonisina M1

FB2 – Fumonisina M2

GCB - Carbono Grafitizado

GUM - Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement

HPLC - Cromatografia Líquida de Alta Performance, do inglês *High Performance*

Liquid Chromatography

HRMS - Espectrometria de Massas de Alta Resolução, do inglês *High Resolution Mass*

Spectrometry

HT2 – Toxina HT2

IAC - Coluna de Imunoafinidade, do inglês *Immuno-Affinity Columns*

ICR - Ressonância Ciclotrônica de Íons, do inglês *Ion Cyclotron Resonance*

IDA - Ingestão Diária Aceitável

LACQSA – Laboratório de Controle de Qualidade e Segurança Alimentar

LLE-LTP - Extração líquido-líquido com partição em baixa temperatura, do inglês

Liquid-Liquid Extraction With Low Temperature Partitioning

LMT - Limite Máximo Tolerável

LOD - Limites de Detecção

LOQ - Limite de Quantificação

LTP - *Low Temperature Plasma*

MALDI - Ionização e Dessorção a Laser Assistida por Matriz, do inglês *Matrix Assisted*

Lazer Desorption Ionization

MMQP - Mínimos Múltiplos Quadrados Ponderados

MRM - Monitoramento de Reações Múltiplas, do inglês *Multiple Reaction Monitoring*

MSDP - Dispersão de matriz em fase sólida, do inglês *Matrix Solid Dispersion Phase*

MWCNT – Nanotubos de carbono de paredes múltiplas, do inglês *Multi-Walled Carbon*

Nanotubes

OTA - Ocratoxina A

PSA- Amina Primária-Secundária

PSI - *Paper Spray Ionization*

RSD – *Relative Standard Deviation*

t_r - Tempo de Retenção

SLE - Extração sólido-líquido, do inglês *Solid Liquid Extraction*

SPE - Extração em Fase Sólida, do inglês *Solid Phase Extraction*

T2 – Toxina T2

TLC - Cromatografia em Camada Delgada, do inglês *Thin Layer Chromatography*

TOF - Tempo de Vôo, do inglês *Time of Flight*

UHPLC-MS/MS - Cromatografia Líquida de Ultra Alta Performance acoplada a Espectrometria de Massas Sequencial, do inglês *Ultra Performance Liquid Chromatography - Tandem Mass Spectrometer*

WHO - *World Health Organization*

ZON – Zearalenona

Resumo

Foram desenvolvidos métodos analíticos para a determinação de micotoxinas em bebidas vegetais, comida de bebê e café torrado, pela aplicação de um procedimento fundamentado na técnica de extração QuEChERS e no desenvolvimento de técnicas de dSPE com a utilização de nanotubos de carbono de paredes múltiplas e nanoplaquetas de grafeno. A quantificação foi realizada pelo emprego da técnica de cromatografia líquida de ultra performance acoplada à espectrometria de massas sequencial, e pelo uso de fonte de ionização ESI. Foi realizado um estudo metrológico para avaliação comparativa entre os principais procedimentos para estimativa de incerteza de medição analítica, método *Bottom-up* e método *Top-down*, em método analítico desenvolvido para controle de resíduos e contaminantes em alimentos empregando extração *dilute and shoot* e análise por cromatografia líquida e espectrometria de massas sequencial.

Os métodos desenvolvidos foram validados segundo as diretrizes apontadas pelos guias da EURACHEM, do Manual da Garantia da Qualidade Analítica, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, e da normativa da União Europeia 2002/657/EC, e demonstraram desempenho compatível com aqueles demandados para controle de resíduos e contaminantes em alimentos.

Com este trabalho, entende-se que o desenvolvimento de metodologias analíticas fundamentadas em práticas mais dinâmicas e modernas, associados a um entendimento mais profundo da natureza metrológica dos ensaios, podem conferir vantagens operacionais de grande valor aos laboratórios de ensaio, o que, no ambiente de amostras de controle de qualidade de alimentos, reflete em maior qualidade dos produtos oferecidos ao consumidor e competitividade aos produtores nacionais de alimentos, resultando no fortalecimento da segurança alimentar.

Palavras-chave: Micotoxinas; nanotubo de carbono de paredes múltiplas; grafeno; café torrado; extração em fase sólida dispersiva; comida de bebê; bebida vegetal; cromatografia líquida de ultra performance; espectrometria de massa em tandem, incerteza de medição.

Abstract

Analytical methods were developed for the determination of mycotoxins in vegetable milks, baby food and roasted coffee, by applying a procedure based on the QuEChERS extraction technique and the development of dSPE techniques with the use of multi-walled carbon nanotubes and graphene nanoplatelets. Quantification was performed using the ultra-efficient liquid chromatography technique coupled with sequential mass spectrometry and using an ESI ionization source. A metrological study was carried out for comparative evaluation between the main procedures for estimating uncertainty of analytical measurement, Bottom-up method and Top-down method, in an analytical method developed to control residues and contaminants in food using dilute and shoot extraction and analysis by liquid chromatography and sequential mass spectrometry.

The developed methods were validated according to the guidelines pointed out by the EURACHEM guides, the Analytical Quality Assurance Manual, the Ministry of Agriculture, Livestock and Supply, and the European Union regulations 2002/657/EC, showing performance compatible with those demanded for control of residues and contaminants in food.

With this work, it is understood that the development of analytical methodologies based on more dynamic and modern practices, associated with a deeper understanding of the metrological nature of the tests, can confer operational advantages of great value to the test laboratories, which, in the environment of food quality control samples, reflects a higher quality of products offered to consumers and competitiveness to national food producers, resulting in the strengthening of food security.

Keywords: micotoxins; multi-walled carbon nanotubes; graphene; roasted coffee; dispersive solid phase extraction; baby food; vegetable milk; ultra-high performance liquid chromatography; tandem mass spectrometry, measurement uncertainty.

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1. Micotoxinas

Micotoxinas são compostos produzidos pelo metabolismo secundário de fungos filamentosos (Pitt, 2000) e podem ocorrer naturalmente em alimentos infestados por fungos. Estes compostos apresentam grande diversidade, sendo atualmente estimado o número de micotoxinas isoladas e caracterizadas superior a 1000, número que tem crescido com o avanço de técnicas analíticas e da variedade de fungos estudados (Brase et al., 2013).

Dentre os fungos capazes de produzir micotoxinas, as principais classes são *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium* (Brase, et al., 2013). A ação dos *Fusarium* sobre as plantações é agressiva, acometendo principalmente o plantio de cereais, podendo produzir micotoxinas antes, durante e após a colheita. Já a ocorrência de *Aspergillus*, que pode se dar de forma destrutiva, levando a perdas de produtividade na lavoura acometida ou de forma branda, com sua infestação não trazendo atraso ao desenvolvimento vegetal, ocorre antes e também após a colheita, como um fungo de estocagem, enquanto que a contaminação por *Penicillium* se dá, majoritariamente, durante a estocagem de alimentos (IARC, 2012). A produção de micotoxinas em alimentos contaminados por fungos está intimamente relacionada à condições ambientais à que estão submetidos, como temperatura e umidade, assim como de fatores de manejo, em pré e pós colheita, como condições de armazenamento, de transporte, ataque de insetos, entre outros (Milani, 2013).

Apesar de haverem centenas de micotoxinas conhecidas, nem todas representam um risco potencial para o homem, em virtude de sua toxicidade reduzida ou baixa ocorrência em alimentos. Dentre as micotoxinas conhecidas, as que apresentam maior risco a saúde pública são as aflatoxinas, fumonisinas, ocratoxina A, desoxinivalenol e zearalenona. Suas estruturas químicas podem ser vistas na Figura 1.

As aflatoxinas foram isoladas no início dos anos 1960, como metabolitos dos fungos *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*, e podem alcançar alimentos consumidos por um número estimado de 4.5 bilhões de pessoas (Castegnaro et al., 2006). As formas naturais de ocorrências das aflatoxinas são: aflatoxina B1 (AFB1), aflatoxina B2 (AFB2), aflatoxina G1 (AFG1) e aflatoxina G2 (AFG2), sendo a aflatoxina B1 a mais abundante, tóxica e carcinogênica dentre elas. Ainda pode ocorrer a hidroxilação das aflatoxinas B1 e aflatoxina B2, dando origem as aflatoxina M1 (AFM1) e aflatoxina M2 (AFM2), respectivamente, o que geralmente ocorre em meio animal, levando a contaminação de produtos como leite e derivados, após os animais serem alimentadas com ração contaminada (Turner et al., 2009). Já as fumonisinas são micotoxinas produzidas por vários fungos da classe *Fusarium*, principalmente nas formas da fumonisina B1 (FB1) e Fumonisina B2 (FB2), sua ocorrência é ubíqua no milho e, conseqüentemente, em produtos à base de milho (Shephard, 2016). A ingestão de ração contaminada por fumonisina pode causar inúmeras doenças em animais, como leucoencefalomalacia e edema pulmonar em cavalos e porcos.

No caso da ocratoxina A, que foi isolada em 1965 de uma colônia de *Aspergillus ochraceus*, atualmente é sabido que pode ser produzida por mais de doze espécies de fungos das classes *Aspergillus* e *Penicillium* (International Agency for Research on Cancer, 2002). A substancia é encontrada em vasta gama de produtos alimentícios, como milho, cevada trigo, café, feijão, centeio, uvas e vinhos, além de poder estar presente em produtos de origem animal (Alshannaq and Yu, 2017). Acredita-se que, dentre as patologias humanas que pode causar, estão nefropatia, a nefropatia intertiscial crônica e outras doenças que acometem o sistema renal.

A desoxinivalenol é uma micotoxinas do grupo dos tricotecenos, composto por mais de 180 substâncias produzidas por fungos das classes *Fusarium* e *Stachybotrys*. Foi isolado na

década de 1970 a partir de colônias de *Fusarium graminearum* e sua ocorrência se dá em culturas de inverso, majoritariamente trigo e cevada. Em virtude do quadro de vomito que causa após sua ingestão é conhecida como Vomitoxin e, segundo a Organização Mundial da Saúde, em inglês World Health Organization, (WHO), a substância é considerada um neurotoxina com características imunossupressoras e teratogênicas (Machado et al., 2017).

Já a zearalenona é uma micotoxina produzida por fungos da classe *Fusarium*, em particular *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. equiseti* e *F. crookwellense*(Berthiller et al., 2016). A presença dos fungos capazes de produzir zearalenona é ampla, atingindo quase todos os continentes, infestando as culturas de cereais, principalmente trigo, centeio, arroz, milho, entre outras, nas fases de pré e pós colheita. A capacidade de resistências destas toxinas a muitas etapas de processamento, como a moagem e cocção de alimentos, permite que sua presença seja identificada em diversos produtos alimentícios processados (Herrero-Latorre et al., 2015). Por sua característica singular é uma micotoxinas altamente estrogênica, pode acusar doenças relacionadas a disfunção hormonal, tais como câncer de próstata, de ovário ou cervical (Rogowska et al., 2019)(Zinedine et al., 2007).

A enorme dimensão do mercado mundial de *commodities* agrícolas, tais como trigo, arroz e milho, que em 2016 alcançou 1,6 trilhões de dólares, registrando um crescimento de 6% referente ao ano de 2015 (FAO, 2018), torna o controle de resíduos e contaminantes, como as micotoxinas, uma questão de grande importância. Neste cenário, os países emergentes, dentre eles o Brasil, que ocupa a terceira posição entre os maiores exportadores de alimentos no mundo, tem se tornado cada vez mais relevantes. As grandes perdas econômicas associadas às micotoxinas não residem apenas da perda de alimentos contaminados, mas também na redução de desempenho de rebanhos alimentados com ração contaminada, bem como dos custos médicos associados com o tratamento de micotoxicoses, dentre outros, e

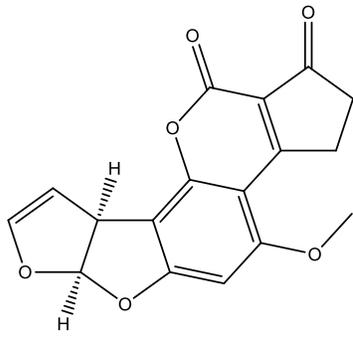
pode alcançar bilhões de dólares (Yvv et al., 2016), além de potencialmente colocar em risco a segurança alimentar pela diminuição de alimento disponível.

Frente ao desafio que as micotoxinas representam para a saúde pública, governos tem instituído normativas que determinam limites para a ocorrência de micotoxinas em alimentos. Estes limites são norteados por diferentes fatores, tais como dados de toxicidade disponíveis, dados de ocorrência, distribuição da contaminação observada na classe de alimentos, disponibilidade e capacidade de métodos analíticos para controle da contaminação, legislação de países parceiros comerciais e disponibilidade de alimento (Milićević et al., 2010). Já em 2002, 89 nações detinham legislação específica para limitar o nível máximo de micotoxinas permitido em alimentos(Lerda, 2011). O Brasil conta com a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 7, de 18 de fevereiro de 2011 (Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2011), da ANVISA, que determina o Limite Máximo Tolerável (LMT) para micotoxinas em função das classes de alimentos.

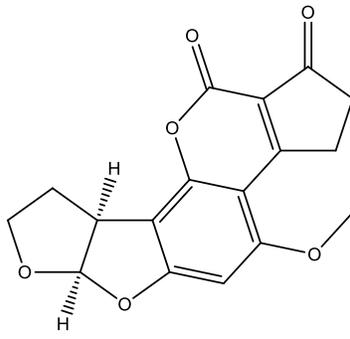
Para o controle da contaminação de alimentos por micotoxinas, são desenvolvidos uma série de métodos de ensaio. Os métodos oficiais recomendados pela Association of Official Analytical Chemists (AOAC) para análise de micotoxinas aplicam Cromatografia Líquida de Alta Performance, do inglês *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC), Cromatografia em Camada Delgada, do inglês *Thin Layer Chromatography* (TLC), Ensaio de Imunossorventes Ligado a Enzimas, do inglês *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay* (ELISA) e para a etapa de purificação a Extração em Fase Sólida, do inglês *Solid Phase Extraction* (SPE) e Coluna de Imunoafinidade, do inglês *Immuno-affinity Columns* (IAC). Porém, estes métodos apresentam limitações importantes como a restrição de escopo, elevado custo operacional e tempo de análise. Atualmente o desenvolvimento de metodologias analíticas tendem a aplicar Cromatográfica Líquida de Ultra Alta Performance

Acoplada a Espectrometria de Massas Sequencial, do inglês *Ultra Performance Liquid Chromatography - tandem Mass Spectrometer* (UHPLC-MS/MS) e aplicação de preparo de amostras fundamentada na metodologia *dilute and shoot*, QuEChERS e SPE, metodologias capazes de oferecer uma frequência analítica mais elevada e bom desempenho a um custo de análise reduzido. Porém, fatores complicadores do ensaio, como elevado efeito de matriz para determinadas matrizes, fazem necessária a aplicação de técnicas de análise e extração mais laboriosas.

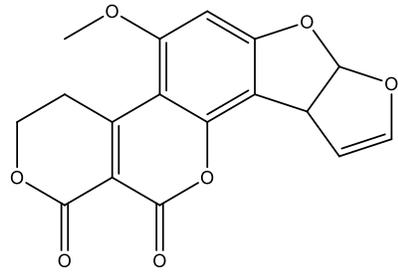
O desenvolvimento e aplicação de novos materiais em dispositivos de SPE ou em procedimento de Extração em Fase Sólida Dispersiva, do inglês *Dispersive Solid Phase Extraction* (dSPE) tem ganhado espaço com o objetivo de extração, limpeza e concentração dos analitos (Tittlemier et al., 2019). Para tal, tem sido empregados materiais nano estruturados de carbono (Dong et al., 2016)(Es'haghi et al., 2014)(Zhang et al., 2018)(Han et al., 2017)(Jiang et al., 2017); (Molinero-Fernandez et al., 2018)(Moreno et al., 2016)(Riberi et al., 2018)(Socas-Rodríguez et al., 2016)(Yu et al., 2018) ou nanopartículas de ouro (Di Nardo et al., 2017)(Di Nardo et al., 2017)(Hossain and Maragos, 2018).



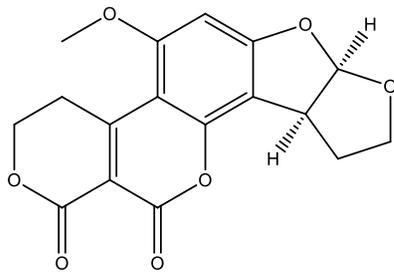
Aflatoxina B1



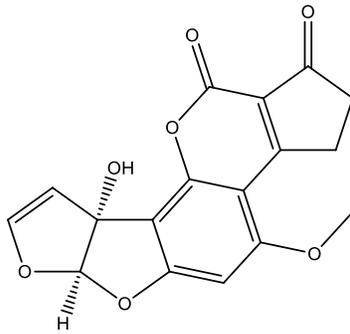
Aflatoxina B2



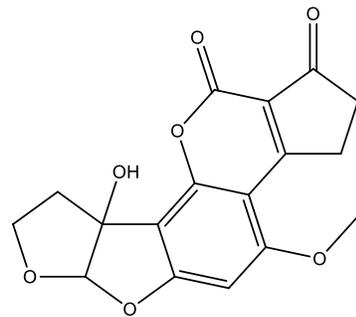
Aflatoxina G1



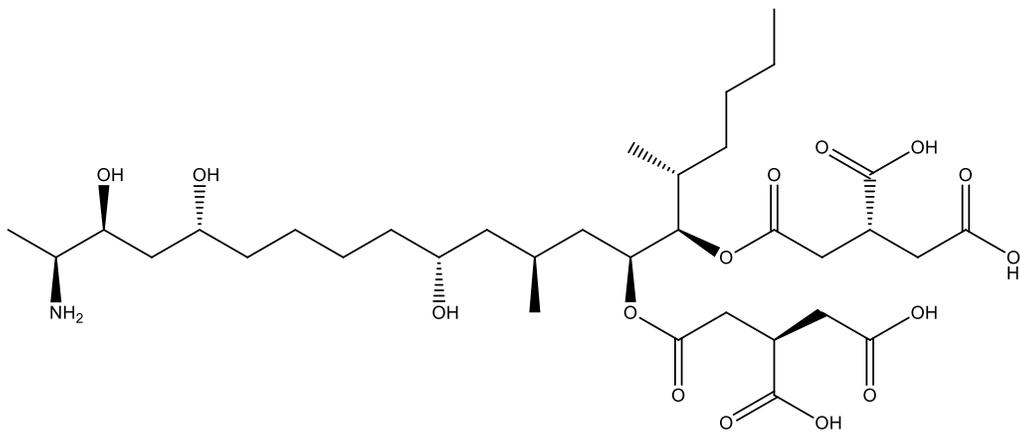
Aflatoxina G2



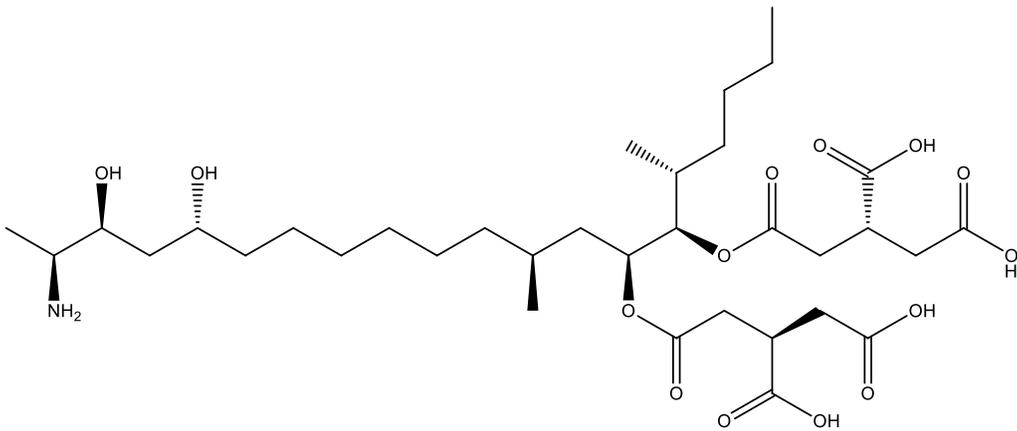
Aflatoxina M1



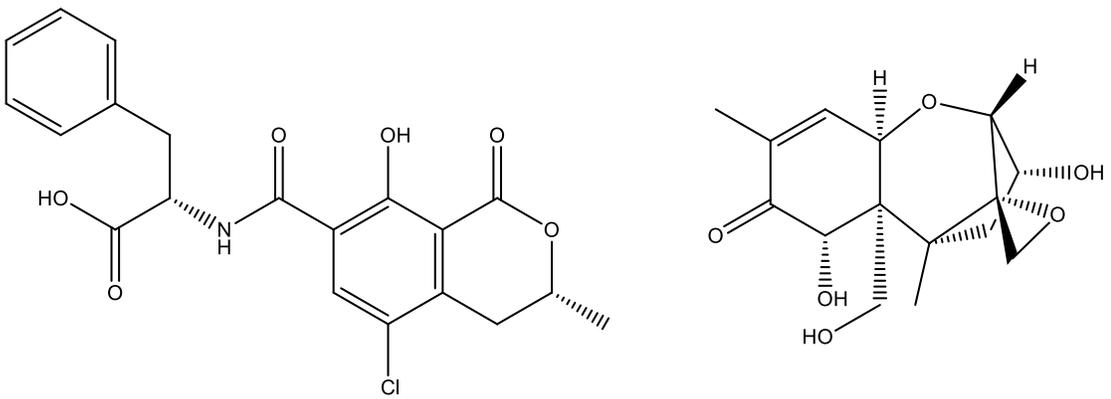
Aflatoxina M2



Fumonisina B1

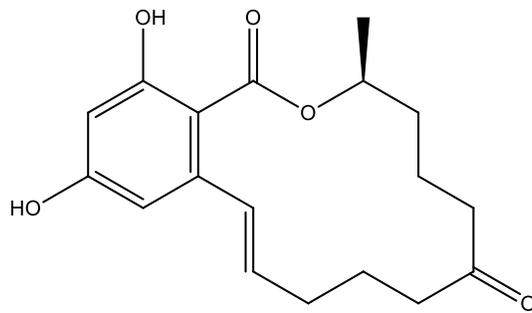


Fumonisina B2



Ocratoxina A

Desoxinivalenol



Zearalenona

Figura 1: Estrutura das principais micotoxinas

1.2. Espectrometria de massas

Nos últimos tempos, a espectrometria de massas tem despontado entre as principais técnicas analíticas. O desenvolvimento da técnica tem ajudado vários campos da ciência, trazendo soluções para áreas da química analítica, como na investigação de problemas relacionados à segurança alimentar, forense ou identificação de produtos naturais ou sintetizado; como também se mostrando uma ferramenta valiosa para investigações no campo da bioquímica e da medicina, como metabolômica, lipidômica, proteômica, dentre outros inúmeros campos que se valem da técnica (Hoffmann, 2007).

A espectrometria de massas se fundamenta na distinção de espécies química em função da diferença entre suas razões massa/carga. Para isso, convencionalmente, os componentes de interesse da amostra são convertidos em espécies química carregadas positiva ou negativamente, disponibilizadas na fase gasosa, aceleradas e submetidas a um campo eletromagnético, gerando sobre as espécies químicas carregadas uma força dependente de suas cargas, que se aceleraram diferencialmente em virtude de suas massas. Desta forma, podem ser separadas em função de sua relação massa/carga e detectadas de forma independente (Skoog, 2005). A evolução da instrumentação aplicada para tal procedimento tem avançado de forma impressionante (Hoffmann, 2007), partindo dos rústicos equipamentos aplicados por J.J. Thomson para descoberta do elétron e determinação de sua relação massa/carga, em 1897, o que lhe rendeu o Prêmio Nobel em 1906, e o aplicado por ele em 1910 para a separação dos isótopos ^{20}Ne e ^{22}Ne , até os modernos instrumentos e altíssima resolução empregados atualmente.

De forma geral, o espectrômetro de massas apresenta a seguinte configuração: um sistema de injeção de amostras, como um cromatógrafo, uma seringa de injeção direta ou outro dispositivo com finalidade similar; uma fonte de ionização responsável por produzir

íons a partir dos analitos e disponibiliza-los na fase gasosa; um ou um arranjo de analisadores de massas capazes de separar os íons em função de sua relação massa/carga; e por fim, um detector para estimar a quantidade de íons que foram separados pelos analisadores.

Algo importante e presente na arquitetura de qualquer espectrômetro de massas é a operação de regiões em alto vácuo. O caminho percorrido pelos íons, desde sua entrada no espectrômetro de massas até o detector deve ser mantido em alto vácuo, uma vez que devesse evitar a colisão dos analitos ionizados com moléculas do ar para que suas trajetórias não sejam influenciadas ou que reações indesejadas entre os analitos e moléculas espúrias não ocorram, desconfigurando a relação massa/carga esperada para cada composto.

As fontes de ionização são dispositivos destinados a disponibilizar os analitos na forma ionizada e em fase gasosa, adequados para serem analisados no espectrômetro de massas. Foram desenvolvidas inúmeras fontes de ionização, operando sob diversas tecnologias, que diferem muito na quantidade de energia que transferem aos analitos e nos tipos de analitos e amostras em que são capazes de operar. A energia que é conferida ao analito é um parâmetro importante durante a ionização, uma vez que, ao se transferir muita energia ao analitos pode-se causar intensa fragmentação do composto tornando mais complexa a interpretação do espectro de massa, enquanto ao se fornecer baixa energia, tem-se quase que exclusivamente a formação do íon da espécie molecular na fonte de ionização. Quanto a condição da amostra, as fontes de ionização distintas podem operar amostras nas fases gasosa, líquida ou sólida. As fontes de ionização produzem ou disponibilizam íons na fase gasosa, principalmente pela ionização de moléculas através da ejeção de eletros, captura de elétrons, protonação, desprotonação, formação de adutos ou ainda pela transferência de carga entre espécies (Hoffmann, 2007). Dentre as fontes de ionização para espectrometria de massas, há aquelas que operam a pressão baixa pressão e as que podem trabalhar a pressão ambiente.

A utilização de fontes de ionização à pressão ambiente, do inglês *Ambient Pressure Ionization* (API) se deu em 1958 por Knewstubb e Sugden (Knewstubb and Sugden, 1958), cujos trabalhos resultaram na primeira fonte a pressão ambiente produzida comercialmente, produzida pela empresa Franklin GNO Corp. Após diversas modificações na fonte de ionização, dentre as quais a inserção do dispositivo que permitiu a realização de descargas corona, a fonte foi capaz de ser acoplada ao sistema de cromatografia líquida pela empresa Sciex, sendo muito útil à comunidade científica e iniciando sua aplicação pela indústria farmacêutica. Na década de 1980, os pesquisadores Yamashita e Fenn desenvolveram a fonte do tipo *Eletrospray Ionization* (ESI) o que rendeu ao último o Prêmio Nobel de Química em 2002, permitindo uma nova perspectiva de acoplamento entre espectrometria de massas e cromatografia líquida, tornando viável a ionização de moléculas de elevada massa molecular, como proteínas, elevando a espectrometria de massas a uma das técnicas analíticas principais.

1.3. Cromatografia Líquida de Ultra Alta Performance

A cromatografia líquida é uma técnica de separação onde a amostra é separada pela distribuição de seus constituintes entre duas fases. Os mecanismos principais pelos quais esta separação pode ser obtida são a partição e adsorção. A técnica faz uso de duas fases distintas, a fase móvel, líquida, e a fase estacionária, sólida, que é encapotada em colunas analíticas.

O desenvolvimento da tecnologia UHPLC é o avanço recente mais importante na técnica de separação por cromatografia líquida. Os sistemas que operam esta tecnologia trabalham com fase móvel a altas pressões, associado a colunas cromatográfica com partículas de tamanho reduzido, inferiores a 2 μm , e conseguem atingir uma performance de separação superior a aqueles possíveis com tecnologias anteriores (Dong, 2019).

Os avanços recentes na técnica de cromatografia líquida tem colaborado para a sua consolidação como uma das principais técnicas analíticas no controle de segurança e qualidade de alimentos. Tornando mais simples e eficiente a determinação dos mais diversos contaminantes(Quinton and Kennedy, 2001).

1.4. Dispersive Solid Phase Extraction

A Dispersive Solid Phase Extraction (dSPE) é uma técnica de separação que faz uso de um material sólido para adsorver seletivamente analitos de interesse presentes na solução da amostra. Inicialmente, o material adsorvente é adicionado à solução contendo os analitos, que são adsorvidos em sua superfície. Os interferentes não adsorvidos são removidos e, então, os analitos são desorvidos da superfície do adsorvente e disponibilizados para análise.

Geralmente, os materiais utilizados como adsorvente são similares a aqueles que são empregados como fase estacionária em cromatografia líquida em fase reversa, usualmente sílica ou polímeros (Islas et al., 2017). A modificação e otimização destes materiais favorece a obtenção de um método de melhor performance ao conferir maior seletividade, maximização da retenção do analito e a minimização da manutenção de interferentes. Portanto, a utilização de material adsorvente adequado é fundamental para se obter um procedimento de tratamento de amostras adequado.

2. OBJETIVOS

Pretende-se desenvolver e validar metodologias analíticas para determinação de micotoxinas em alimentos por meio de técnicas fundamentadas em espectrometria de massas. Será avaliada a viabilidade de utilização de instrumentação dotada de analisadores de baixa resolução, a aplicação de fontes de ionização à pressão ambiente e a utilização de técnicas de separação hifenadas, com o uso de cromatografia líquida.

Serão avaliadas a viabilidade da aplicação de técnicas de extração, preparo de amostras e clean-up diversificadas, tais como *dilute and shoot*, extração líquido-líquido com partição em baixa temperatura, do inglês *Liquid-Liquid Extraction With Low Temperature Partitioning* (LLE-LTP) ou na implementação de adsorventes nanoestruturados na extração em fase sólida dispersiva (dSPE).

Os dados analíticos de validação serão empregados na estimativa da incerteza de medição por meio de dois procedimentos antagônicos, *Bottom-up* e *Top-down*, na direção de se identificar diferenças entre os resultados obtidos por meio das duas abordagens e avaliar a pertinência de adoção de cada uma delas.

Desta forma, pretende-se:

Estudar o comportamento de diferentes condições de extração tipo *dilute and shoot* e sua capacidade de extração de analitos de grande diversidade físico-química em amostras complexas.

Avaliar o desempenho de diferentes materiais nanométricos, sobretudo nanotubos de carbono e grafeno, oxidados, funcionalizados ou quimicamente modificados, como adsorventes em procedimentos de extração.

Avaliar as diferenças observadas ao se adotar um tratamento de dados por meio da metodologia de estimação de incertezas *Bottom-up* e *Top-down*.

Desenvolver metodologias analíticas de alta performance e robustez, compatíveis com rotinas analíticas.

3. DETERMINAÇÃO DE MICOTOXINAS EM BEBIDA VEGETAL

Resumo

A extração das micotoxinas, aflatoxinas B1, B2, G1 e G2, citreoviridina, fumonisinas B1 e B2, ocratoxina A e zearalenona, foi otimizada por QuEChERS seguida por UHPLC-MS/MS. A condição ótima consistiu na extração de 2 mL de bebida vegetal com 2 mL de solução de acetonitrila acidificada com 2% v/v de ácido acético, seguida da adição de 0,5 g de sulfato de magnésio anidro e 0,4 g de cloreto de sódio. O procedimento QuEChERS foi validado pela primeira vez para a bebida vegetal de amendoim e, em seguida, estendido para bebidas à base de aveia, arroz, castanha de caju, milho, soja e coco. O método forneceu limites de quantificação entre 0,023 $\mu\text{g L}^{-1}$ para a aflatoxina B1 e 2,166 $\mu\text{g L}^{-1}$ para a fumonisina B1; recuperações entre 70,5% para fumonisina B2 e 109,5% para ocratoxina A; desvio padrão relativo entre 4,0% para a aflatoxina G2 e 19,7% para a aflatoxina B2. As aflatoxinas B1, B2, G1 e G2 e ocratoxina A foram quantificadas nas bebidas vegetais analisadas acima dos limites de quantificação.

Palavras-chave: micotoxinas; bebidas vegetais; QuEChERS; UHPLC -MS/MS.

Abstract

The extraction of the mycotoxins, aflatoxins B1, B2, G1 and G2, citreoviridin, fumonisins B1 and B2, ochratoxin A and zearalenone, was optimized by QuEChERS followed by UHPLC-MS/MS. The optimum condition consisted in the extraction of 2 mL of vegetable milk with 2 mL acetonitrile solution acidified with 2% v/v of acetic acid, followed by addition of 0.5 g of anhydrous magnesium sulfate and 0.4 g of sodium chloride. QuEChERS procedure was first validated for groundnut milk and, next, extended to oat, rice, cashew nut, corn, soy and coconut milks. The method provided quantification limits between 0.023 $\mu\text{g L}^{-1}$ for aflatoxin B1 and 2.166 $\mu\text{g L}^{-1}$ for fumonisin B1; recoveries between 70.5% for fumonisin B2 and 109.5% for ochratoxin A; relative standard deviations between 4.0% for aflatoxin G2 and 19.7% for aflatoxin B2. Aflatoxins B1, B2, G1 and G2 and ochratoxin A were quantified in the analyzed vegetable milks above the quantification limits.

Keywords: mycotoxins; vegetable milks; QuEChERS; UHPLC-MS/MS.

Introdução

A constante evolução da indústria de alimentos tem resultado no desenvolvimento de novos alimentos, com destaque para as bebidas vegetais. Essas bebidas são produzidas a partir de uma ampla variedade de vegetais, como amendoim, arroz, aveia, nozes, coco, soja, entre outros. As bebidas vegetais são isentas de lactose, proteína do leite de vaca e colesterol, apresentando alto índice de fibras e baixo índice glicêmico. Desta forma, as bebidas vegetais apresentam-se como uma excelente alternativa nutricional para pessoas intolerantes, alérgicas, veganas ou que procuram alimentos mais saudáveis. No entanto, devido à sua origem vegetal, essas bebidas podem ser contaminadas por micotoxinas (Chiralt, 2014).

As micotoxinas são metabólitos secundários de origem fúngica, que podem ser altamente tóxicos se ingeridos, inalados ou absorvidos pela pele. Os fungos micotoxigênicos, como *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus*, *Fusarium* e *Penicillium*, são capazes de produzir diferentes micotoxinas em uma variedade de alimentos. Esses fungos micotoxigênicos também podem co-ocorrer em alimentos, causando contaminação por múltiplas micotoxinas (Kovalsky et al., 2016).

Os limites máximos tolerados (LMT) de micotoxinas em diferentes matrizes já foram estabelecidos por meio de regulamentos, como o Regulamento da Comissão 1881/2006/CE (Reg. nº1881/2006, 2006) e a RDC Nº 7 de 18 de fevereiro de 2011 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2011). No entanto, o LMT ainda não foi determinado para bebidas vegetais. Esse fato pode ser explicado, em parte, pela escassez de métodos analíticos capazes de determinar micotoxinas nessas matrizes e pela falta de dados que mostrem as principais micotoxinas recorrentes e os níveis de contaminação.

3.1. Parte experimental

Padrões e reagentes

Acetonitrila, metanol e ácido acético glacial, todos de grau HPLC, foram adquiridos da Merck (Darmstadt, Alemanha), ácido fórmico da Êxodo (Sumaré, Brasil) e formiato de amônio da Riedel-de Haën (Wunstorf, Alemanha). Sulfato de magnésio anidro e clorato de sódio foram fornecidos pela Sigma Aldrich (Saint Louis, EUA) e Nuclear (Diadema, Brasil), respectivamente. Água ultrapura obtida por um sistema Milli-Q (Millipore, Bedford, EUA).

Os padrões de aflatoxinas B1 (AFB1), B2 (AFB2), G1 (AFG1) e G2 (AFG2), citreoviridina (CTV) e ocratoxina A (OTA) foram adquiridos à Biopure (Getzersdorf, Áustria), fumonisinas B1 e B2 (FB1 e FB2) e zearalenona (ZON) foram fornecidos pela Sigma-Aldrich (Saint Louis, EUA).

Soluções estoque foram preparadas em acetonitrila a 10 mg L^{-1} para aflatoxinas, 8 mg L^{-1} para CVT, 50 mg L^{-1} para OTA e 40 mg L^{-1} para ZON. Para as fumonisinas, a solução estoque foi preparada em acetonitrila/água (1: 1 v/v) a 50 mg L^{-1} para o FB1 e 25 para o FB2 mg L^{-1} . A primeira solução de trabalho foi preparada em acetonitrila a partir da diluição de soluções estoque a $0,05 \text{ mg L}^{-1}$ para AFB1 e AFB2, $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ para AFG1, AFG2 e OTA, $0,3 \text{ mg L}^{-1}$ para CTV e 5 mg L^{-1} para ZON. O segundo foi preparado em acetonitrila/água (1: 1 v/v) a partir da diluição da solução estoque em 5 e $2,5 \text{ mg L}^{-1}$ para FB1 e FB2, respectivamente. Todas as soluções foram mantidas em frascos de vidro âmbar sob refrigeração a $-20 \text{ }^\circ \text{C}$.

Sistema UHPLC-MS/MS

As análises cromatográficas foram realizadas em um sistema da série LC Agilent 1290 Infinity (Santa Clara, EUA) acoplado a um espectrômetro de massas QTRAP 6500 da Sciex

(Toronto, Canadá) com uma fonte de ionização por eletrospray (ESI) operando em modo positivo. Os softwares Analyst versão 1.6.3 e MultiQuant versão 3.0.2 (Sciex) foram utilizados para aquisição e processamento de dados. A separação cromatográfica foi realizada em uma coluna C18 Hypersil GOLD (50 x 2,1 mm, tamanho de partícula de 1,9 μm) da Thermo Scientific (Waltham, EUA) usando uma pré-coluna Acquity UHPLC BEH C18 (2,1 x 5 mm) da Waters (Milford, EUA), operando à temperatura de 30 °C e um volume de injeção de 5 μL . Utilizou-se um gradiente de eluição com solvente A (solução tampão: 0,1% v/v de ácido fórmico e 5 mmol L⁻¹ de formato de amônio) e solvente B (metanol acidificado com 0,1% v/v de ácido fórmico) como se segue: de 0 a 1 min a percentagem de solvente B foi mantida a 5%; de 1 a 5 min aumentou linearmente para 100% do solvente B e foi mantido constante até 5,75 min; de 5,75 a 6 min diminuiu linearmente para 5%, o que foi mantido até 7 min. A taxa de fluxo da fase móvel foi de 350 $\mu\text{L min}^{-1}$. Os parâmetros da fonte foram: Ion Spray Voltage em 4500 V, temperatura a 550 °C, gás nebulizador (Gás 1) a 45 PSI, gás de dessolvatação (Gás 2) a 45 PSI e gás de cortina a 40 PSI. Foram adquiridas duas transições para cada um dos analitos, usando Multiple Reaction Monitoring no modo positivo (Tabela 1).

Tabela 1: Configuração ajustada para aquisição de dados por MRM na detecção de micotoxinas em bebidas vegetais

Analito	Q1(m/z)	Q3(m/z)	Rt	DP	EP	CE	CXP
AFB1	312.8	285.1	2.8	122	10	32	15
	312.8	241.0	2.8	122	10	50	15
AFB2	315.0	258.9	2.6	30	10	40	15
	315.0	287.0	2.6	30	10	35	25
AFG1	328.8	199.9	2.5	70	10	54	15
	328.8	242.9	2.5	70	10	37	15
AFG2	331.0	189.0	2.4	115	10	55	15
	331.0	245.2	2.4	115	10	41	15

FB1	722.2	334.3	3.6	151	10	55	14
	722.2	352.2	3.6	151	10	49	16
FB2	706.2	336.2	4.2	126	10	49	14
	706.2	318.2	4.2	126	10	51	14
OTA	404.0	239.0	4.0	60	10	33	14
	404.0	102.0	4.0	60	10	101	16
CTV	403.0	138.8	4.0	131	10	29	18
	403.0	315.0	4.0	131	10	10	16
ZON	319.1	283.0	3.9	6	10	15	16
	319.1	185.1	3.9	6	10	31	14

Sublinhando as transições usadas para fins de quantificação. Q1 e Q3: quadropolos 1 e 3, respectivamente; t_r : tempo de retenção; DP: declustering potential; EP: entrance potential; CE: collision energy; CXP: collision exit potential.

Amostras

Amostras de bebidas vegetais a base de aveia, amendoim, arroz, castanha de caju, milho, soja e coco foram compradas em supermercados de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. As amostras, após abertura das embalagens originais, foram mantidas sob refrigeração (-8 ± 2 ° C) até o momento da análise.

Método analítico desenvolvido

Transfere-se de 2 mL da amostra de bebida vegetal para um tubo Falcon com capacidade para 15 mL, adiciona-se 2 mL de acetonitrila acidificada a 2% v/v de ácido acético, segue agitação manual e posterior adição 0,5 g de sulfato de magnésio, e em seguida adição de 0,4 g de cloreto de sódio. A mistura é então agitada em vortex por 1 min. Segue centrifugação a 4000 rpm por 10 min e recolhimento da fase superior do sobrenadante e injeção no sistema UHPLC-MS/MS.

Otimização do método QuEChERS

O procedimento QuEChERS foi otimizado por meio de um planejamento fatorial 2^4 avaliando os seguintes fatores: volume de acetonitrila, acidificação da acetonitrila com ácido acético, massa de sulfato de magnésio anidro e cloreto de sódio utilizado para partição de fases (Tabela 2).

Para todos os experimentos, 2 mL de bebida de amendoim foram fortificados com padrões de micotoxinas e agitados em vórtice por 1 min. Um volume de fase de extração foi adicionado às amostras e a mistura foi submetida a vórtice por 1 min. Adicionou-se uma quantidade de sulfato de magnésio anidro e cloreto de sódio à mistura, a qual foi então agitada em vortex durante 1 min e centrifugada a 4000 rpm durante 5 min (Tabela 2). Finalmente, uma alíquota da fase orgânica foi transferida para um vial e injetada no UHPLC-MS/MS. Todos os experimentos foram realizados em duplicata.

A condição otimizada consistiu na extração de 2 mL de bebida de amendoim com 2 mL de acetonitrila acidificada com 2% v/v de ácido acético, seguida da adição de 0,5 g de sulfato de magnésio anidro e 0,4 g de cloreto de sódio para partição de fases

Tabela 2: Matriz de planejamento fatorial 2^4 e respostas para otimização do método QuEChERS

Ensaio	Fator				Área Normalizada (%)									
	I	II	III	IV	AFB1	AFB2	AFG1	AFG2	CTV	FB1	FB2	OTA	ZON	Media
1	1	-1	1	1	52	53	51	52	41	0	0	7	41	33
2	1	-1	-1	-1	50	47	46	48	48	0	0	11	45	33
3	-1	1	-1	-1	80	78	74	78	86	100	100	95	97	88
4	-1	-1	1	-1	98	96	98	98	96	0	0	10	94	66
5	-1	-1	-1	-1	91	89	91	88	82	0	0	14	86	60
6	-1	-1	1	1	100	100	100	100	93	0	0	9	91	66
7	1	-1	-1	1	52	49	49	48	47	0	1	6	43	33
8	-1	1	-1	1	87	83	81	84	80	90	100	100	100	90

9	1	1	-1	1	48	44	42	46	45	62	58	52	44	49
10	-1	-1	-1	1	98	98	97	98	100	0	1	7	92	66
11	1	1	-1	-1	52	50	48	50	47	73	62	55	55	55
12	-1	1	1	1	86	82	79	82	86	73	84	45	91	79
13	1	-1	1	-1	51	50	49	49	51	0	1	8	44	34
14	1	1	1	-1	46	42	44	46	43	43	46	44	45	44
15	-1	1	1	-1	80	76	73	79	83	59	72	86	87	77
16	1	1	1	1	48	45	44	46	42	52	54	48	47	47

Fator I: Volume de acetonitrila: (-1) 2 e (+1) 4 mL;

Fator II: Acidificação: (-1) 0 e (+1) 2% v/v de ácido acético;

Fator III: Massa de sulfato de magnésio anidro: (-1) 0,5 e (+1) 1 g;

Fator IV: Massa de cloreto de sódio: (-1) 0,2 e (+1) 0,4 g;

Área normalizada é a razão percentual entre a área do analito em cada experimento e a área mais alta do analito.

Validação

Para avaliar a linearidade, amostras de bebida vegetal de amendoim com e sem adição de padrões de micotoxina foram extraídas e combinadas para preparar curvas de calibração matrizadas (Tabela 3). A regressão da curva foi realizada pelo método dos mínimos quadrados ponderados, usando o inverso de variância como um fator de ponderação. A qualidade do ajuste linear foi avaliada pelo coeficiente de correlação (R²) e pelo teste t (Abastecimento, 2011)(Magnusson and Örnemark, 2014). A recuperação e a precisão foram estimadas pela fortificação de amostras de bebida vegetal de amendoim com padrões de micotoxinas em três níveis de concentração distintos, e posteriormente extraídas. As concentrações de micotoxinas foram estimadas, as recuperações e os desvios padrões relativos (DPR) foram calculados. As concentrações teóricas nos três níveis foram: 1, 2 e 3 $\mu\text{g L}^{-1}$ para AFB1 e AFB2; 2, 4 e 6 $\mu\text{g L}^{-1}$ para AFG1 e AFG2; 200, 300 e 400 $\mu\text{g L}^{-1}$ para o

FB1; 100, 150 e 200 $\mu\text{g L}^{-1}$ para o FB2; 8, 11 e 14 $\mu\text{g L}^{-1}$ para OTA; 100, 200 e 300 $\mu\text{g L}^{-1}$ para ZON; 9, 18 e 27 $\mu\text{g L}^{-1}$ para CTV. Cada nível foi avaliado em quintuplicado por três dias.

Os limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) foram estimados a partir de procedimentos adaptados do Guia Eurachem (Magnusson and Örnemark, 2014). Para a estimativa do Limite de Detecção e Limite de Quantificação foram estimados pela divisão do desvio padrão da concentração, em um nível mais baixo da curva de calibração, pelo desvio padrão do intercepto da curva de calibração S_0 , aplicando o fator multiplicador de 3 e 10 respectivamente.

A incerteza de medição foi estimada pela abordagem *Bottom-up* de acordo com a Avaliação de dados de medição - Guia para a expressão de incerteza na medição (Joint Committee For Guides In Metrology, 2008). As principais fontes de incerteza foram definidas a partir das resultantes da curva de calibração, da medição do volume da solução de extração e da amostra, bem como dos fatores de correção para recuperação e precisão interna. A equação do mensurando foi definida como:

Equação 1

$$C = \frac{(A-a)}{b} \cdot \frac{V_0}{V_1} \cdot \frac{1}{R} + F_p$$

Onde: C é a concentração de micotoxina na amostra ($\mu\text{g L}^{-1}$); A é a área do pico cromatográfico; a é o intercepto da curva de calibração; b é a inclinação da curva de calibração; V_0 é o volume acidificado de acetonitrila (mL); V_1 é o volume da amostra (mL); R é o percentual de recuperação; F_p é o fator de correção para a precisão interna.

A incerteza padrão combinada (u_c) foi obtida pela estimativa do coeficiente de sensibilidade, onde $cov(a, b)$ é a correlação entre a e b :

Equação 2

$$u_c^2 = (u_A)^2 \left(\frac{\partial u_c}{\partial u_A} \right)^2 + (u_a)^2 \left(\frac{\partial u_c}{\partial u_a} \right)^2 + (u_b)^2 \left(\frac{\partial u_c}{\partial u_b} \right)^2 + (u_{V_0})^2 \left(\frac{\partial u_c}{\partial u_{V_0}} \right)^2 + (u_{V_1})^2 \left(\frac{\partial u_c}{\partial u_{V_1}} \right)^2 + (u_R)^2 \left(\frac{\partial u_c}{\partial u_R} \right)^2 + (u_{F_p})^2 \left(\frac{\partial u_c}{\partial u_{F_p}} \right)^2 + 2cov(a, b) \left(\frac{\partial u_c}{\partial u_a} \right) \left(\frac{\partial u_c}{\partial u_b} \right)$$

As incertezas de medição foram calculadas usando dados no nível de concentração mais baixo de cada curva de calibração.

Extensão do escopo

O escopo do método foi estendido para bebidas vegetais de aveia, arroz, castanha de caju, milho, soja e coco. Para cada amostra, curvas de calibração matrizadas foram preparadas pela mistura dos extratos obtidos de amostras com e sem adição de padrões de micotoxinas, em sete níveis de concentração distintos. As concentrações de micotoxinas nestas amostras foram determinadas pelo método de adição padrão. Para estimar a recuperação e a repetibilidade, 2 mL das bebidas vegetais foram contaminados com padrões nas seguintes concentrações: 1,5 $\mu\text{g L}^{-1}$ para AFB1 e AFB2; 3 $\mu\text{g L}^{-1}$ para AFG1 e AFG2; 250 $\mu\text{g L}^{-1}$ para FB1; 125 $\mu\text{g L}^{-1}$ para FB2; 9 $\mu\text{g L}^{-1}$ para OTA; 150 $\mu\text{g L}^{-1}$ para ZON e $\mu\text{g L}^{-1}$ para 15 CTV, extraídos e quantificados pelo método validado.

3.2. Resultados e discussão

Otimização do método QuEChERS

Um planejamento fatorial 2^4 (Tabela 2) foi utilizado para otimizar o procedimento QuEChERS para a extração de micotoxinas a partir da bebida vegetal de amendoim. A melhor condição de extração foi selecionada pela avaliação da área normalizada, ou seja, razão percentual entre a área do analito em cada experimento e a área mais alta desse analito. Como pode ser observado na Tabela 2, a acidificação foi indispensável para a extração da fumonisina, e as condições dos experimentos 3 e 8 favoreceram a extração simultânea de todas as micotoxinas. No entanto, o experimento 8 foi mais favorável para a extração de aflatoxina e esses analitos apresentaram menor LMT. As médias das áreas normalizadas de todas as micotoxinas foram tratadas estatisticamente pelo Software Design Expert. A função de desejabilidade indicou que a extração com 2 mL de acetonitrila acidificada com 2% v/v de ácido acético e partição de fases com 0,5 g de sulfato de magnésio anidro e 0,4 g de cloreto de sódio foi a melhor condição (Figura 2) e, portanto, selecionada. Comparando o presente método com o descrito por Miró-Abella et al. e Hamed et al. (Lahouar et al., 2017) (Miró-Abella et al., 2017), observou-se que menor quantidade de amostras, solventes e sais foram necessários, bem como a ausência das etapas de evaporação e filtração da extração. Quanto aos analitos não comuns, Miró-Abella et al. apresentaram toxinas desoxinivalenol, T2 e HT2, enquanto, neste trabalho, FB1, FB2 e CTV foram analisados; Hamed et al. estudaram as toxinas HT2 e T2, desoxinivalenol e fusarenon-X, enquanto, no presente método, AFB1, AFB2, AFG1, AFG2, OTA e CTV foram determinados. Quanto aos tipos de bebidas vegetais analisadas, o presente trabalho inseriu pela primeira vez produtos à base de amendoim, castanha de caju, milho e coco, entretanto, a bebida vegetal produzida a partir de semente de aveia não foi analisada.

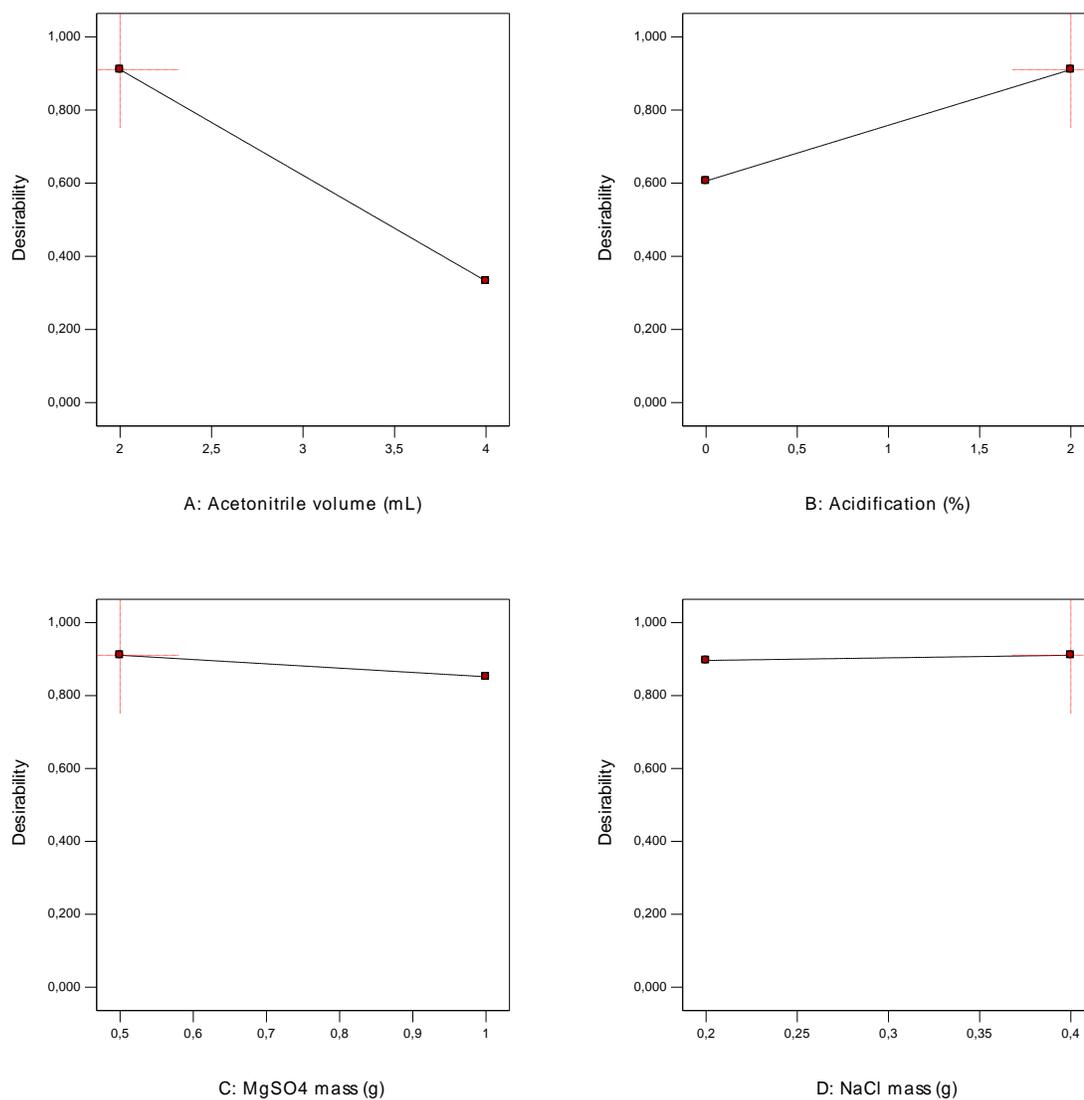


Figura 2: Resultados para otimização da extração de micotoxinas em bebida vegetal

Validação

Os resultados estatísticos para linearidade (Tabela 3) mostraram que as curvas ajustadas pelo método dos mínimos quadrados ponderados apresentaram linearidade adequada para todos os analitos apresentando $R^2 \geq 0,9997$ e t_r maior que o crítico- $t_{(19; 0,05)}$ (Abastecimento, 2011).

Tabela 3 Preparação das curvas de calibração matrizadas e resultados estatísticos para avaliação da linearidade

Nível	Volume de extração (µL)		Concentração (µg L ⁻¹)								
	Fortificado	Branco	AFB1	AFB2	AFG1	AFG2	FB1	FB2	OTA	ZON	CTV
1	20	980	0.17	0.17	0.34	0.34	25.0	12.5	1.25	16.9	1.5
2	30	970	0.34	0.34	0.67	0.67	50.0	25.0	2.50	33.3	2.9
3	50	950	0.64	0.64	1.25	1.25	100.0	50.0	5.00	62.4	5.5
4	100	900	1.28	1.28	2.50	2.50	150.0	75.0	7.50	124.8	11.0
5	200	800	3.19	3.19	6.25	6.25	250.0	125.0	12.50	311.9	27.5
6	500	500	6.38	6.38	12.50	12.50	500.0	250.0	25.00	623.8	55.0
7	1000	0	12.75	12.75	25.00	25.00	1000.0	500.0	50.00	1247.5	110.0
Parâmetro estatístico	Inclinação		163834	115011	90415	66279	554	2643	109140	4244	6132
	SInclinação		476	232	759	227	9	19	1164	67	59
	Intercepto		372	-4711	-4650	-4807	-13203	-31914	-24801	-4761	-1801
	sintercepto		256	252	573	211	258	394	2037	3195	483
	R2		0.9998	0.9997	0.9999	0.9999	0.9999	0.9999	0.9999	0.9999	0.9999
*tr		327	242	545	517	493	463	158	478	465	

* t-crítico (0.05;19)=2.09

A recuperação foi avaliada em três níveis de concentração durante três dias. As recuperações médias globais em cada nível (Tabela 4) para cada analito encontravam-se dentro do intervalo de aceitabilidade recomendado pelo Regulamento (CE) n.º 401/2006 da Comissão Europeia, que é de 70-110% a estes níveis de concentração (European Commission, 2006).

A precisão foi avaliada em três níveis de concentração intra-dia (repetibilidade) e inter-dia (precisão intermediária). Os valores de RSD (Tabela 4) foram inferiores a 20% e cumpriram os critérios de aceitabilidade do Regulamento (CE) N.º 401/2006 (European Commission, 2006).

Considerando que o LMT estabelecido pelo Regulamento (CE) n.º 1881/2006 da Comissão Europeia para o amendoim foi de 8 µg kg⁻¹ para AFB1 e 15 µg kg⁻¹ para a soma de AFB1, AFB2, AFG1 e AFG2, e que uma diluição de 5 vezes foi utilizada durante a

preparação da bebida, o LOD e LOQ do método (Tabela 4) foram capazes de identificar e quantificar essas micotoxinas na bebida vegetal de amendoim.

As incertezas padrão combinadas, para o menor nível de concentração de cada curva de calibração, foram menores que a incerteza padrão máxima. Por conseguinte, o critério de aceitabilidade do Regulamento (CE) n.º 401/2006 foi cumprido (Tabela 4) (European Commission, 2006).

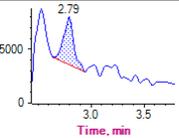
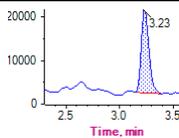
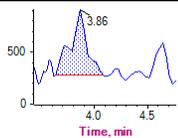
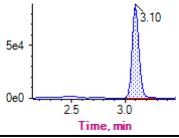
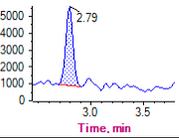
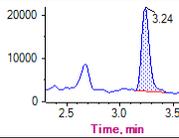
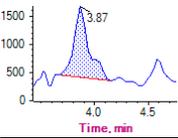
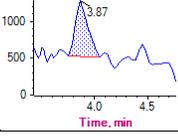
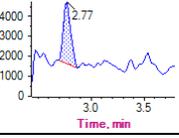
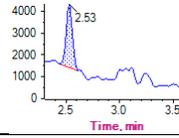
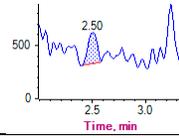
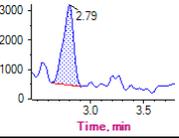
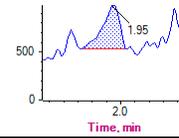
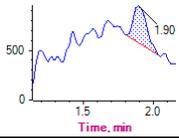
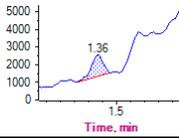
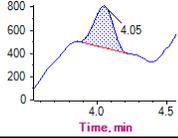
Tabela 4: Resultados para recuperação, precisão intermediária, LOD, LOQ, uc e Umax

Analito	Recuperação média (%)			RSD (%)			LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LOQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	uc ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Umax ($\mu\text{g L}^{-1}$)
	Nível 1	Nível 2	Nível 3	Nível 1	Nível 2	Nível 3				
AFB1	85.0	80.1	77.6	9.2	10.2	9.2	0.007	0.023	0.07	0.15
AFB2	93.0	86.4	86.1	4.8	6.8	19.7	0.007	0.024	0.02	0.08
AFG1	98.9	91.0	88.5	5.5	7.8	6.2	0.017	0.057	0.02	0.08
AFG2	96.6	89.2	86.4	4.1	5.5	4.0	0.009	0.031	0.02	0.08
FB1	75.5	76.5	95.5	16.8	11.8	15.2	0.650	2.166	12.61	13.53
FB2	70.5	96.2	95.5	11.9	10.8	9.4	0.332	1.105	8.91	13.52
OTA	72.0	97.9	109.5	5.1	6.7	8.5	0.031	0.104	0.19	0.75
ZON	107.1	99.6	95.4	6.4	9.2	7.7	2.428	8.093	0.48	1.93
CTV	97.2	89.5	82.0	7.3	8.1	8.2	0.392	1.305	0.02	1.51

Extensão do escopo

O método otimizado teve seu escopo ampliado para bebidas vegetais produzidas a partir de aveia, arroz, castanha de caju, milho, soja e coco. As contaminações observadas na amostra são mostradas na Tabela 5. Como pode ser observado (Tabela 5), a contaminação das amostras com aflatoxinas e OTA foi bastante frequente. Tendo em vista a toxicidade dessas micotoxinas e a frequente contaminação, o estabelecimento de LMT pelas agências reguladoras e o monitoramento dessas substâncias em bebidas vegetais são importantes.

Tabela 5: Resultados da ocorrência de contaminação em sete bebidas vegetais analisadas

Analito	AFB1	ZON	FB1	AFG2	OTA
Castanha de caju	 1.54 95% 7%	 0.650 91% 17%			 0.980 83% 3%
Coco			 0.034 80% 3%		
Milho	 1.10 81% 1%	 0.175 82% 7%			 0.128 96% 18%
Aveia					 1.19 95% 2%
Arroz	 0.619 104% 11%				
Soja		 0.320 85% 5%		 0.116 76% 8%	
Amendoim	 0.089 85% 13%	 0.055 92% 7%	 0.060 98% 7%	 0.079 95% 7%	 0.25 71% 2%

Os valores mostrados ao lado do cromatograma são concentrações em $\mu\text{g L}^{-1}$, recuperações e desvios padrão relativos.

3.3. Conclusão

Um método QuEChERS foi otimizado e validado utilizando pequenas quantidades de amostras, solventes e sais e sem etapas adicionais de limpeza e pré-concentração. O presente método foi capaz de extrair e quantificar AFB1, AFB2, AFG1, AFG2, FB1, FB2, OTA, CTV e ZON em bebidas vegetais produzidas a partir de amendoim, aveia, arroz, castanha de caju, milho, soja e coco. Amostras preparadas a partir de amendoim, castanha de caju, milho e coco foram analisados pela primeira vez neste trabalho. Aflatoxinas e OTA foram frequentemente quantificadas nas amostras de bebidas vegetais analisadas.

4. DETERMINAÇÃO DE MICOTOXINAS EM COMIDA DE BEBÊ

Resumo

Uma metodologia analítica utilizando extração em fase sólida dispersiva (dSPE) com nanotubos de carbono de paredes múltiplas, do inglês *Multi-Walled Carbon Nanotubes* (MWCNT) como adsorvente para quantificar aflatoxinas B1, B2, G1 e G2 em amostras de alimentos para bebês é descrita. Esta metodologia consistiu nos seguintes passos otimizados: (a) diluição da amostra com um solvente apropriado; (b) adição do material MWCNT seguido de agitação e centrifugação; (c) eluição com um solvente selecionado; (d) análises por UHPLC-MS/MS. O procedimento analítico foi totalmente validado de acordo com as diretivas CE/657/2002 e SANCO/12571/2013. Valores aceitáveis foram obtidos para os números de mérito, (recuperações: 75,8 a 120,6%) e limites de quantificação (LOQs: 60,0 a 560,0 ng kg⁻¹), sem efeitos de matriz perceptíveis. A metodologia foi testada em amostras reais (n = 4) com detecção de AFB1 em apenas uma delas. Finalmente, este procedimento analítico tem enorme potencial para ser aplicado na análise de aflatoxinas (e outras micotoxinas) em diferentes tipos de amostras complexas.

Palavras-chave: Aflatoxinas; nanotubo de carbono de paredes múltiplas; extração em fase sólida dispersiva; cromatografia líquida de ultra alta performance; espectrometria de massas sequencial.

Abstract

An analytical methodology using dispersive solid phase extraction (dSPE) with multi-walled carbon nanotubes (MWCNT) as adsorbent to quantify aflatoxins B1, B2, G1 and G2 in baby food samples is described. This methodology consisted of the following optimized steps: (a) sample dilution with an appropriate solvent; (b) addition of the MWCNT material followed by stirring and centrifugation; (c) elution with a selected solvent; (d) analyzes by UHPLC-MS/MS. The analytical procedure was fully validated according to the EC/657/2002 and SANTE/12571/2015 directives. Acceptable values were obtained for the figures of merit, mainly veracity (recoveries: 75.8 to 120.6 %) and quantification limits (LOQs: 60.0 to 560.0 ng kg⁻¹), with no noticeable matrix effects. The methodology was tested in real samples (n = 4) with detection of AFB1 in just one of them. Finally, this analytical procedure has enormous potential to be applied to analyze aflatoxins (and other mycotoxins) in distinct types of complex samples.

Keywords: Aflatoxins; multi-walled carbon nanotube; dispersive solid phase extraction; ultra-high performance liquid chromatography; tandem mass spectrometry

Introdução

Devido ao baixo peso corporal (Oueslati et al., 2018), taxas metabólicas muito altas e um organismo ainda em desenvolvimento (Raiola et al., 2015), as crianças são bastante vulneráveis à exposição a contaminantes alimentares (Juan et al., 2014), principalmente micotoxinas (Movassagh et al., 2017). Entre as micotoxinas, as aflatoxinas são as espécies mais tóxicas e integram o grupo 1A da lista da Agência Internacional para Pesquisa do Câncer (IARC) (IARC, 2012). As aflatoxinas apresentam reconhecida atividade imunossupressora, estando também associadas à ocorrência de carcinoma hepatocelular, bem como a neoplasia gastrointestinal e hepática. Atualmente, a aflatoxina B1 é a substância natural com maior potencial carcinogênico (Bennett and Klich, 2003).

A Comunidade Europeia estabelece limites máximos permitidos para as aflatoxinas em diferentes matrizes, sendo igual a $0,1 \mu\text{g kg}^{-1}$ de aflatoxina B1 em comida de bebê (European Commission, 2006). No entanto, a operação em um nível tão baixo representa um desafio para os métodos analíticos. Diversas publicações descreveram procedimentos que foram testados para atender aos rígidos requisitos, como: extração sólido líquido, do inglês *Solid Liquid Extraction* (SLE) com LOQs (limites de quantificação) variando de $0,5 \mu\text{g kg}^{-1}$ a $1,2 \mu\text{g kg}^{-1}$ (Andrade et al., 2017) (Spanjer et al., 2008); dispersão de matriz em fase sólida, do inglês *Matrix Solid Dispersion Phase* (MSDP) com LOQs superiores a $0,05 \mu\text{g kg}^{-1}$ (Rubert et al., 2012); extração em fase sólida (SPE) com LOQs entre $0,3$ e $1,0 \mu\text{g kg}^{-1}$; *dilute and shoot* com LOQs entre $0,6$ e $10,0 \mu\text{g kg}^{-1}$ (Malachova et al., 2014); (Martínez-Domínguez et al., 2016a) e SPE com aplicação de colunas de imunoafinidade, produzindo LOQs entre $18,0$ e $500,0 \text{ ng kg}^{-1}$ (Beltrán et al., 2011)(Juan et al., 2014).

A Extração em Fase Sólida Dispersiva (dSPE) (Buszewski and Szultka, 2012) tem sido empregada com sucesso na preparação de amostras, sendo uma alternativa à SPE. O não uso

de cartuchos torna o dSPE mais atraente do que o SPE em muitos aspectos, tais como: (a) ausência de difíceis estágios de empacotamento, (b) não dependência de cartuchos previamente fabricados; (c) menor quantidade de adsorvente e eluente utilizado. O dSPE baseia-se na exposição do material adsorvente a um extrato para a adsorção de analitos alvo ou para a retenção de espécies químicas indesejáveis (Romero-González et al., 2011). Convencionalmente, sílica, sílica funcionalizada e polímeros são utilizados como adsorventes para dSPE. Mais recentemente, nanotubos de carbono de paredes múltiplas (MWCNT) tem sido usado como material adsorvente em dSPE (La Barbera et al., 2017)(Han et al., 2017)(Uclés Moreno et al., 2015)(Socas-Rodríguez et al., 2016). O MWCNT adsorve os analitos-alvo através das seguintes interações: π - π , ligações de hidrogênio, hidrofóbicas, ácido-base de Lewis e eletrostáticas(Ma and Agarwal, 2016). O desempenho dos MWCNT depende de suas características de superfície, das propriedades físico-químicas dos analitos-alvo e das condições de extração, como pH e força iônica (Ma and Agarwal, 2016).

O presente trabalho tem como objetivo utilizar o MWCNT como adsorvente para extrair seletivamente aflatoxinas (B1, B2, G1 e G2) de amostras de alimentos para bebês em um procedimento de dSPE. A análise das aflatoxinas é realizada por UHPLC-MS/MS e o procedimento analítico é validado de acordo com as diretivas CE/657/2002 (European Commission, 2002) e SANTE/12571/2015 (SANTE/EU, 2015).

4.1. Parte experimental

Padrões e reagentes

Os padrões de aflatoxina B1 (AFB1), aflatoxina B2 (AFB2), aflatoxina G1 (AFG1) e aflatoxina G2 (AFG2) foram comprados na Biopure (Biopure, Getzersdorf, Áustria) e usados para preparar soluções de estoque via diluição com acetonitrila (Merck, Darmstadt, Alemanha). Estas soluções foram mantidas sob refrigeração a -20 °C. Para a preparação da

fase móvel de cromatografia líquida, foram utilizados ácido acético glacial de grau HPLC e metanol (Merck, Darmstadt, Alemanha) e água de grau Milli-Q (Milli-pore, Billeria, MA, EUA). Para a otimização do procedimento de dSPE, os seguintes solventes de grau HPLC foram empregados: acetonitrila, diclorometano, clorofórmio (Tedia, Fairfield, OH, EUA), n-propanol, acetona e acetato de etila (Sigma Aldrich, St. Louis, MI, EUA), tolueno, metanol (Mallinckrodt Baker, Phillipsburg, NJ, EUA) e isooctano (Panreac, Castellar del Vallès, Espanha). O MWCNT foi fornecido pelo Laboratório de Nanomateriais do Departamento de Física da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Brasil, com pureza superior a 95%, diâmetro médio de 17 μm e comprimento máximo de 30 μm . Este material foi sintetizado e caracterizado como descrito noutro local (Ortega, Trigueiro, Santos, Denadai, Oliveira, Teixeira, et al., 2017).

Instrumentação

Durante o tratamento das amostras foi utilizado um agitador de tubos (Eberbach, Alemanha) e uma centrífuga (Thermo Scientific, Waltham, EUA). Foram utilizadas micropipetas com capacidade de 20 a 10000 μL (Gilson, Middleton, EUA) e membranas hidrofóbicas de PTFE com diâmetro poroso de 0,22 μm (Thermo Scientific, Waltham, EUA). A quantificação foi realizada usando um sistema de cromatografia líquida da Agilent UHPLC, modelo 1290 (Santa Clara, EUA) acoplado a um espectrômetro de massas da Sciex, modelo QTRAP 6500 (Toronto, Canadá). Os softwares (Analyst versão 1.6.3 e MultiQuant versão 3.0.2), ambos fornecidos pela Sciex, foram utilizados para aquisição e processamento de dados.

Amostras

As amostras que serão tratadas neste trabalho como “comida para bebê” são, conforme legislação brasileira atual (ANVISA, 2002), designadas como “Alimentos para Lactentes e Crianças de Primeira Infância” e “Alimento à base de cereais para lactentes e crianças de primeira infância”. As amostras foram adquiridas em mercados locais da cidade de Belo Horizonte, Estado de Minas Gerais, Brasil. As amostras branco foram armazenadas em frascos plásticos inertes e acondicionadas em geladeira (-8 ± 2 °C) até o momento da análise.

Método analítico desenvolvido

Uma massa de amostra (5 g) foi pesada e transferida para um tubo falcon com capacidade para 15 mL, seguido da adição de 10 mL do solvente de extração (18,75% v/v acetonitrila/água). A mistura foi submetida a agitação por 90 min em mesa agitadora e posteriormente centrifugada a 4000 rpm por 5 min. Uma alíquota de 2 mL do sobrenadante foi coletada e transferida para um balão volumétrico com capacidade para 25 mL e seu volume completado com água ultrapura. Em seguida, 5 mL desta solução foi transferida para um tubo Falcon com capacidade para 15 mL contendo 20 mg de MWCNT. A suspensão formada foi agitada em vortex por 3 min e centrifugada a 4000 rpm durante 10 min a 10 °C. O sobrenadante foi então removido e ao precipitado são adicionados 10 mL de diclorometano, seguido de agitação em vortex durante 3 min e centrifugação a 4000 rpm por 10 min a 10 °C. O sobrenadante obtido foi recolhido e injetado no sistema UHPLC-MS/MS.

Otimização das condições UHPLC-MS/MS

Foram utilizadas as seguintes condições cromatográficas: coluna C18 (Zorbax RRHD, Agilent, Santa Clara, EUA) com dimensões de 50 mm x 2,1 mm x 1,8 µm, C18 pré-coluna

(Phenomenex, Torrance, Califórnia, EUA) a 30 °C e um volume de injeção de 5 µL. A fase móvel consistiu em água com 0,5% v/v de ácido acético (A) e metanol com 0,5% v/v de ácido acético (B), que foi infundido a uma vazão de 350 µL min⁻¹. O gradiente começou com 40% de B seguido por um aumento linear na concentração de B até 90% de 0,0 a 5,0 min e esta condição manteve-se até 5,5 min. Na sequência, uma diminuição linear na concentração de B de 5,5 para 6,0 min até 40% de B ocorreu e esta condição foi mantida até 7,0 min.

O espectrômetro de massas foi ajustado para operar no modo positivo e no modo de varredura de *Multiple Reaction Monitoring* (MRM). A voltagem aplicada na probe de ionização foi de 5000 V e a temperatura da fonte foi de 500 °C. Outros parâmetros da fonte foram os seguintes: Curtin gas (40 psi), collision-activated dissociation (Médium), sheath gas 1 (45 psi) e sheath gas 2 (45 psi). Parâmetros de fonte adicionais são apresentados na Tabela 6.

Tabela 6: Parâmetros do espectrômetro de massas utilizados na análise de aflatoxinas em comida de bebê.

Analito	Q1 (m/z)	Q3 (m/z)	DP	EP	CE	CXP
AFB ₁	312.8	<u>285.1</u>	122	10	32	15
	312.8	241.0	122	10	50	15
AFB ₂	315.0	<u>258.9</u>	30	10	40	15
	315.0	287.0	30	10	35	25
AFG ₁	328.8	<u>199.9</u>	70	10	54	15
	328.8	242.9	70	10	37	15
AFG ₂	331.0	245.2	115	10	41	15
	331.0	<u>189.0</u>	115	10	55	15

As transições de quantificação estão sublinhadas; Q1 e Q3: quadrupolos 1 e 3, respectivamente; DP: declustering potential (V); EP: entrance potential (V); CE: collision energy (V); CXP: collision exit potential (V).

Otimização do procedimento dSPE

Para determinar as melhores condições para a adsorção de aflatoxinas na superfície do MWCNT, diferentes composições da solução extratora foram testadas. Assim, misturas de acetonitrila/água (6,25; 12,50; 18,75; 25,00 e 50,00% v/v) foram preparadas e fortificadas em $5,0 \text{ ng mL}^{-1}$ de cada aflatoxina. As soluções (5 mL) foram expostas a 20 mg de MWCNT, e as suspensões resultantes foram submetidas a vortex durante 3 min e centrifugadas a 4000 rpm durante 10 min ($3925 \times g$). Para verificar as melhores condições para a dessorção de aflatoxinas, o sobrenadante foi descartado e o MWCNT foi isolado e tratado com 10 mL de solventes orgânicos distintos (acetato de etila, acetonitrila, diclorometano, isooctano, isopropanol, metanol ou clorofórmio). As suspensões resultantes foram submetidas a agitação por vórtice durante 3 min e posteriormente centrifugadas a 4000 rpm ($3925 \times g$) durante 10 min. O sobrenadante foi coletado e injetado no sistema UHPLC-MS/MS a ser analisado. Os ensaios foram realizados em duplicata, sendo as recuperações estimadas e expressas em porcentagem.

Os valores ótimos para as variáveis: massa de MWCNT, acidificação da solução extrativa (6,25% v/v de acetonitrila) e volume de diclorometano, foram determinados por meio de um planejamento fatorial 2^3 (Tabela 7). Os ensaios foram realizados em triplicata em ordem aleatória, e as respostas foram medidas como recuperações.

Tabela 7: Planejamento fatorial (2^3) empregado para a otimização do procedimento dSPE.

Ensaio	Massa de MWCNT (mg)	Volume de diclorometano (mL)	Acidificação (% v/v)
1	10	5	0
2	20	5	0
3	10	10	0
4	20	10	0
5	10	5	2
6	20	5	2

7	10	10	2
8	20	10	2

A acidificação indica a presença (2% v/v) ou ausência (0% v/v) de ácido acético.

As condições otimizadas para o procedimento dSPE foram as seguintes: a amostra (5 g) foi transferida para um tubo Falcon (15 mL) seguido pela adição de 10 mL da solução de extração (18,75% v/v acetonitrila/água). A mistura foi agitada durante 90 min num agitador de bancada e centrifugada a 4000 rpm durante 5 min. Assim, o sobrenadante (2 mL) foi coletado e transferido para um balão volumétrico (25 mL) e o volume completado com água ultrapura. Subsequentemente, 5 mL desta solução foram transferidos para um tubo Falcon de 15 mL contendo 20 mg de MWCNT. A suspensão foi submetida a vórtice durante 3 min e centrifugada a 4000 rpm (3925 x g) durante 10 min a 10 °C. O sobrenadante foi descartado e as micotoxinas foram dessorvidas a partir do MWCNT com 10 mL de diclorometano. Após vórtex durante 3 min e centrifugação a 4000 rpm (3925 x g) durante 5 min a 10 ° C, o sobrenadante foi recolhido e analisado por UHPLC-MS/MS.

Validação

As figuras de mérito (seletividade, linearidade, recuperação, precisão, limite de detecção, limite de quantificação, limite de decisão, capacidade de detecção e incerteza de medição) foram estimadas de acordo com o protocolo de validação especificado na SANTE/12571/2015 (SANTE/EU, 2015) e 2002/657/CE (European Commission, 2002). As incertezas foram calculadas seguindo as instruções do Guia para a Expressão da Incerteza em Medições (Joint Committee For Guides In Metrology, 2008). Os Limites Máximos Tolerados (LMT) para aflatoxinas foram estipulados com base nos regulamentos europeus atuais.

Para o estabelecimento da seletividade, seis amostras branco foram analisadas no sistema cromatográfico para verificar a presença de compostos interferentes. A seletividade aceitável foi atribuída somente se o sinal de interferência fosse inferior a 30% da resposta do analito no respectivo limite de detecção.

As curvas de calibração em solvente e matriz foram preparadas diluindo as soluções de estoque de aflatoxinas com acetonitrila e o extrato em branco, respectivamente. As curvas foram preparadas em sete níveis de concentração (0; 30; 80; 250; 420; 840 e 1670 ng kg⁻¹ para aflatoxina B1 e aflatoxina B2; 0; 70; 160; 490; 820; 1640 e 3280 ng kg⁻¹ para aflatoxina G1 e aflatoxina G2). Cada solução foi preparada em triplicata e injetada em duplicata, durante três dias distintos, resultando em 18 determinações por nível.

Para estimar o efeito da matriz, a supressão/aumento de sinal para cada aflatoxina foi calculada como a razão entre as inclinações das curvas de calibração de matriz e de solvente.

Para avaliar a linearidade, o teste de Grubbs foi aplicado primeiramente para identificar outliers nos dados (áreas de pico cromatográfico) usados para construir as curvas de calibração. A distribuição normal dos resíduos foi avaliada pelo teste Ryan-Joiner, que foi confirmado para todos os analitos. A regressão foi realizada pelo método dos mínimos quadrados ponderados, utilizando a dispersão como fator de ponderação. Este procedimento foi adotado devido ao comportamento heteroscedástico da resposta instrumental. A qualidade do ajuste linear foi avaliada pela aplicação do teste t. O teste de independência de Durbin-Watson foi aplicado para comprovar a inexistência de pontos de alavancagem ao longo da curva de calibração.

A precisão do método foi estimada pela obtenção das recuperações para as aflatoxinas. A precisão foi avaliada pelos resultados de repetibilidade e reprodutibilidade intra-laboratorial, que foram avaliados pela estimativa do desvio padrão relativo (RSD) das

amostras fortificadas. Para a avaliação da recuperação, seis amostras em branco foram fortificadas e extraídas em três níveis de concentração (100, 200 e 300 ng kg⁻¹ para AFB1 e AFB2; e 200, 400 e 600 ng kg⁻¹ para AFG1 e AFG2), em três dias distintos. Os valores médios de recuperação foram considerados aceitáveis apenas se compreendidos dentro do intervalo de 50 a 120%. Como critérios de aceitabilidade para os testes de precisão, os valores calculados pela equação de Horwitz foram utilizados como limite para cada nível de fortificação. Assim, a RSD obtida sob condições de reprodutibilidade intra-laboratorial não deve exceder a obtida pela função de Horwitz. Para reprodutibilidade, o RSD não deve ser superior a 2/3 do valor fornecido pela função Horwitz.

Equação 3

$$RSD_{Horwitz} = 2^{(1-0.5 \log C)}$$

Onde $RSD_{Horwitz}$ é o desvio padrão relativo previsto pela equação de Horwitz e C é a concentração na fração de massa.

Os limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) foram estimados de acordo com o Guia Eurachem (Magnusson and Örnemark, 2014). A precisão foi estimada usando os parâmetros de regressão das curvas de calibração matrizadas combinadas construídas com os dados obtidos em três dias distintos.

Para estimar as incertezas da medição, a função de medição foi estabelecida. Esta função descreve detalhadamente as operações realizadas para obter os valores de medição. A função de medição identifica as fontes de incerteza associadas a cada determinação e suporta a estimativa dos coeficientes de sensibilidade. Este é um passo importante para avaliar as incertezas não apenas de cada contribuição, mas também da medição expandida (Joint Committee For Guides In Metrology, 2008).

Equação 4

$$C = \frac{(A - a)}{b} \cdot \frac{V_{\text{extraction}}}{m_{\text{sample}}} \cdot \frac{V_{\text{extract}}}{V_{\text{extract}} + V_{\text{water}}} \cdot \frac{1}{R} + C_{\text{prec}}$$

Onde A é a área do pico cromatográfico; a é o intercepto da curva de calibração; b é a inclinação da curva de calibração; $V_{\text{extraction}}$ é o volume da solução extrativa (mL); m_{sample} é a massa da amostra (kg); V_{extract} é o volume de extrato utilizado durante o processo (mL); V_{water} é o volume de água utilizado durante o processo (mL); R é a recuperação obtida no processo de controle; C é a concentração do analito ($\mu\text{g kg}^{-1}$); C_{prec} é a correção devido à reprodutibilidade interna.

Os coeficientes de sensibilidade para cada um das componentes principais identificadas pela função de medição são expressos nas Equação 5 a Equação 13 . Estes coeficientes foram utilizados para estimar a incerteza total de medição dos resultados analíticos pela abordagem *Bottom-up*.

Equação 5

$$\frac{\partial}{\partial A} = \frac{V_{\text{extraction}} \cdot V_{\text{extract}}}{b \cdot m_{\text{sample}} \cdot V_{\text{extract}} \cdot R + b \cdot m_{\text{sample}} \cdot V_{\text{water}} \cdot R}$$

Equação 6

$$\frac{\partial}{\partial a} = -\frac{V_{\text{extraction}} \cdot V_{\text{extract}}}{b \cdot m_{\text{sample}} \cdot V_{\text{extract}} \cdot R + b \cdot m_{\text{sample}} \cdot V_{\text{water}} \cdot R}$$

Equação 7

$$\frac{\partial}{\partial b} = -\frac{V_{\text{extraction}} \cdot V_{\text{extract}} \cdot (A - a)}{m_{\text{sample}} \cdot R \cdot b^2 \cdot (V_{\text{extract}} + V_{\text{water}})}$$

Equação 8

$$\frac{\partial}{\partial V_{\text{extraction}}} = \frac{A \cdot V_{\text{extract}} - a \cdot V_{\text{extract}}}{b \cdot m_{\text{sample}} \cdot V_{\text{extract}} \cdot R + b \cdot m_{\text{sample}} \cdot V_{\text{water}} \cdot R}$$

Equação 9

$$\frac{\partial}{\partial m_{sample}} = -\frac{V_{extraction} \cdot V_{extract} \cdot (A - a)}{b \cdot R \cdot b^2 \cdot (V_{extract} + V_{water})}$$

Equação 10

$$\frac{\partial}{\partial V_{extract}} = \frac{V_{extraction} \cdot V_{water}(A - a)}{b \cdot m_{sample} \cdot R \cdot (V_{water} + V_{extract})^2}$$

Equação 11

$$\frac{\partial}{\partial V_{water}} = -\frac{V_{extraction} \cdot V_{extract}(A - a)}{b \cdot m_{sample} \cdot R \cdot (V_{extract} + V_{water})^2}$$

Equação 12

$$\frac{\partial}{\partial R} = -\frac{V_{extraction} \cdot V_{extract}(A - a)}{b \cdot m_{sample} \cdot R^2 \cdot (V_{extract} + V_{water})}$$

Equação 13

$$\frac{\partial}{\partial C_{preci}} = 1$$

4.2. Resultados e discussão

Otimização das condições UHPLC-MS/MS

As análises das aflatoxinas foram realizadas utilizando o MRM (*Multiple Reaction Monitoring*) no modo de ionização positivo. Duas transições de massa foram escolhidas para confirmação e quantificação de cada analito. Cromatogramas típicos obtidos pela aplicação das transições de quantificação e confirmação de cada aflatoxina são mostrados na Figura 3. Esses cromatogramas foram obtidos pela injeção de extratos branco fortificados em uma concentração de 0,02 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de cada aflatoxina.

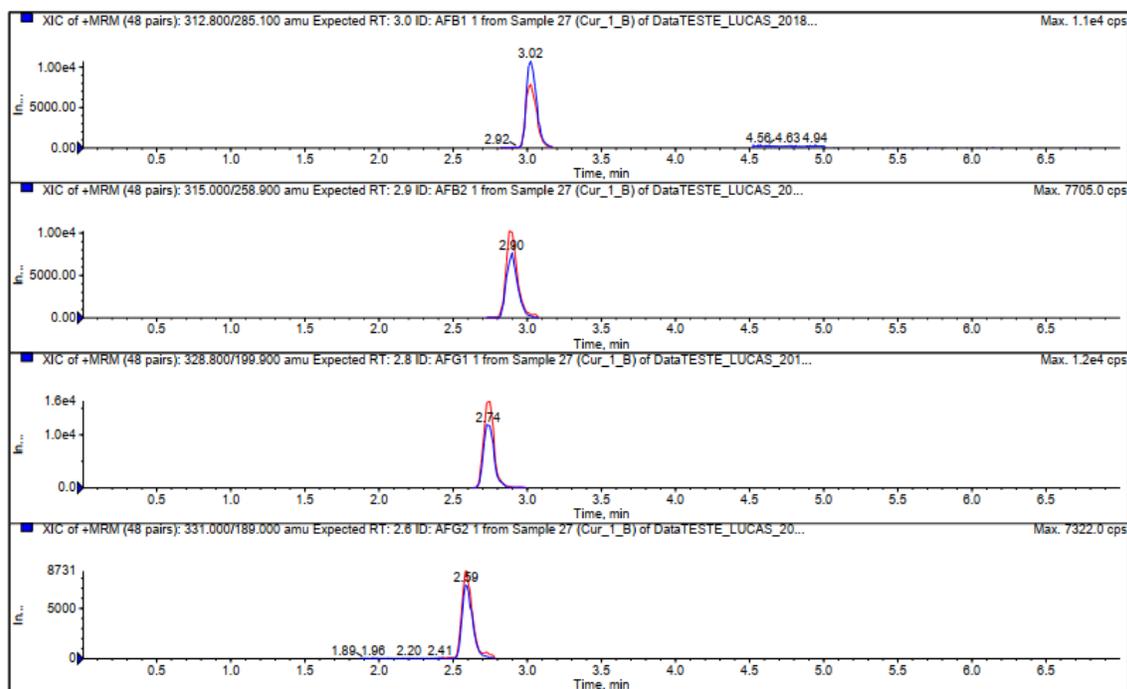


Figura 3: Cromatogramas de íons extraídos obtidos para as aflatoxinas AFB1, AFB2, AFG1 e AFG2 após análise de amostras branco fortificadas em 2,0 ng kg⁻¹ de cada analito.

Otimização do procedimento dSPE

A melhor solução extratora utilizada para a adsorção de aflatoxinas pelo MWCNT foi determinada pela avaliação de soluções de acetonitrila/água: 6,25; 12,50; 18,75; 25,00 e 50,00% v/v, o que rendeu recuperações de 79; 44; 16; 20 e 21%, respectivamente. Os resultados indicam que aumentando o teor de acetonitrila de 6,25 para 18,75% v/v resultou em uma redução de recuperação de 60%. Para soluções com maiores proporções de acetonitrila, as recuperações permaneceram praticamente constantes. Esses resultados sugerem que a adsorção de aflatoxinas é claramente prejudicada pela elevação do teor de solvente orgânico. Assim, a solução extrativa com acetonitrila 6,25% v/v foi escolhida.

Para a seleção do solvente utilizado para a dessorção das aflatoxinas do MWCNT, constatou-se que apenas o diclorometano proporcionou recuperações adequadas (Figura 4). Esse resultado pode ser explicado levando-se em conta a capacidade superior de solventes

menos polares (por exemplo, o diclorometano) de perturbar as interações hidrofóbicas entre as aflatoxinas e o material adsorvente (Ayazi and Rafighi, 2015)). Portanto, o diclorometano foi escolhido como o solvente de dessorção das aflatoxinas aderidas à superfície do MWCNT.

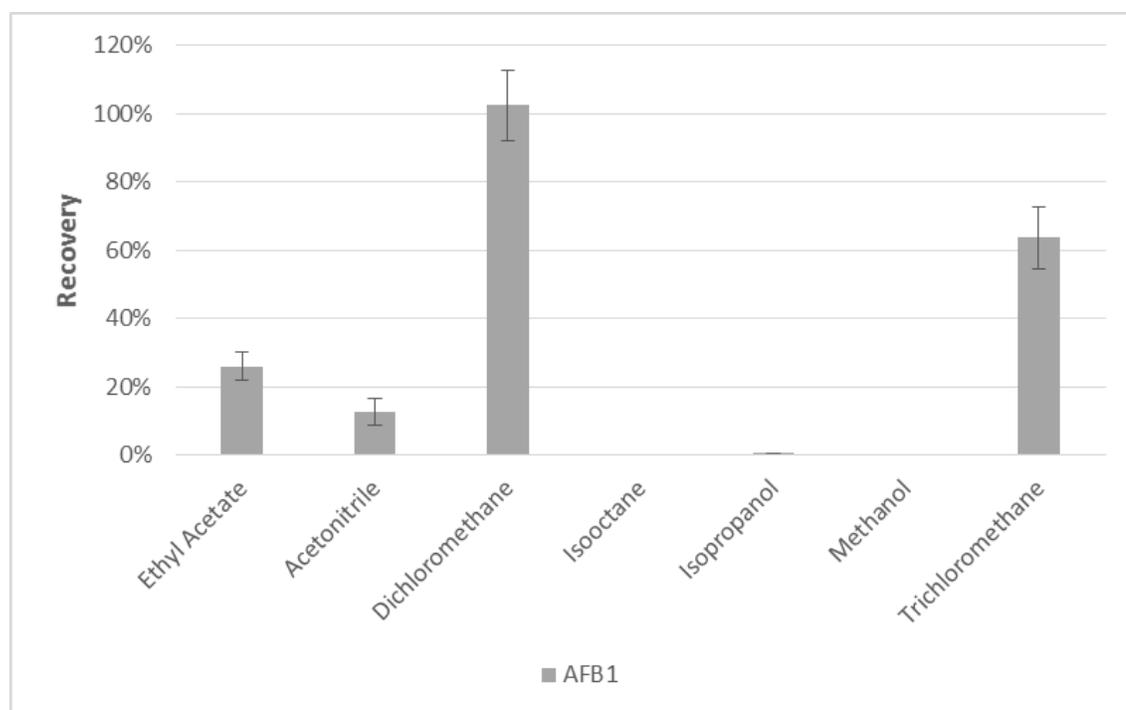


Figura 4: Recuperações obtidas após a dessorção da aflatoxina B1 (AFB1) MWCNT usando diferentes solventes.

Afim de se obter melhor condição para o processo de adsorção/dessorção, foi utilizado um planejamento fatorial 2^3 , sendo analisadas as seguintes variáveis: massa de MWCNT, acidificação da solução extrativa (acetonitrila/água 6,25% v/v) e volume de diclorometano (Tabela 7). As recuperações das 4 aflatoxinas obtidas em cada uma das 8 condições avaliadas estão apresentadas na Figura 5. Entre os 8 testes realizados, o ensaio 4 (20 mg de MWCNT, solução extrativa sem acidificação e dessorção com 10 mL de diclorometano) apresentou a

melhor desempenho. Observa-se que, sob essa condição, as recuperações para os quatro analitos estavam dentro da faixa de aceitabilidade, portanto, essa foi a condição selecionada.

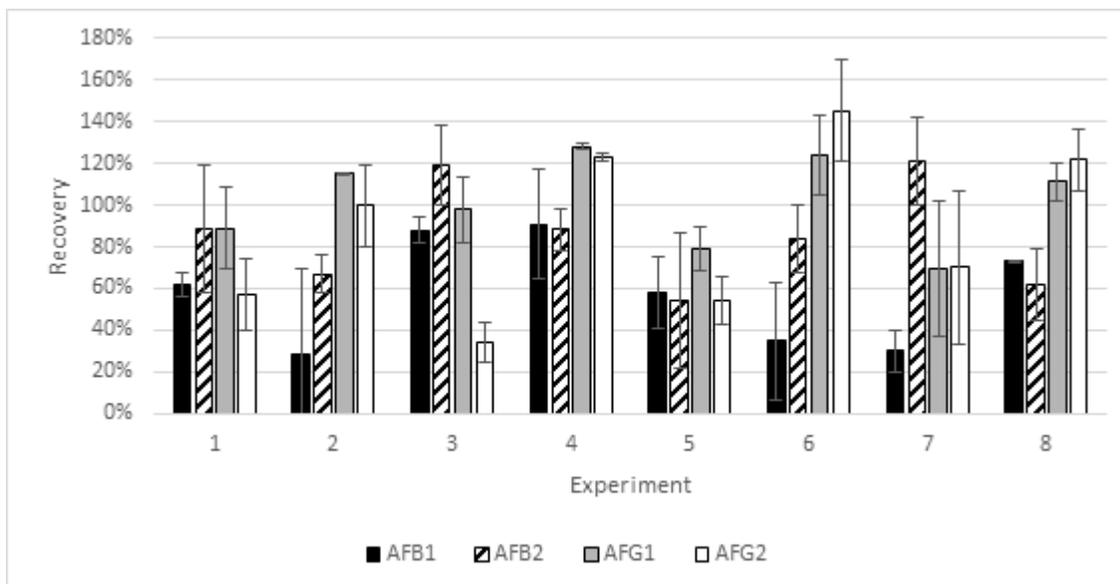


Figura 5: Recuperações obtidas para as aflatoxinas AFB1, AFB2, AFG1 e AFG2 nos distintos experimentos de otimização realizados.

Validação

A Tabela 8 exhibe os valores das figuras de mérito resultantes do protocolo de validação. Assim, os coeficientes de determinação (R^2) das curvas de calibração matrizadas foram considerados adequados, pois valores superiores a 0,994 foram obtidos. O ajuste linear de cada curva de calibração também foi adequado, pois os valores calculados de t foram maiores que os t críticos (6,4). Os testes de recuperação também mostraram taxas variando de 75,8 e 120,6%, dentro dos critérios estabelecidos pelo guia Eurachem, com exceção do resultado de recuperação de 120,6%, que supera em pequena proporção o critério apresentado de 120,0% (Magnusson and Örnemark, 2014). Os testes de precisão, expressos como RSD, forneceram resultados de reprodutibilidade interna de 10,4 a 35,8%, que estão dentro da faixa aceitável

para um método analítico de acordo com a equação de Horwitz. Os valores de LOD e LOQ estimados foram respectivamente: 15,0 e 30,0 ng kg⁻¹ para AFB1 e AFB2; e 45,0 e 70,0 ng kg⁻¹ para AFG1; e AFG2, o que torna a presente metodologia analítica adequada para ser aplicada em amostras reais. O efeito de matriz foi calculado como a razão entre as inclinações das curvas de calibração de matriz e solvente. Foram obtidos valores entre 1,02 a 1,16 para as quatro aflatoxinas, dentro do intervalo tolerado, de acordo com o guia Eurachem (Magnusson and Örnemark, 2014) . Esses resultados, portanto, desconsideram esse efeito como um fator relevante na aplicação do presente método analítico. No entanto, devido à alta diversidade de amostras de alimentos para bebês, recomenda-se o uso de curvas de calibração matrizadas. A seletividade do método foi investigada através da análise de amostras branco fortificadas. Picos cromatográficos para as quatro aflatoxinas foram claramente observados nas amostras fortificadas, mas ausentes nas amostras em branco. Além disso, o uso do modo MRM para a detecção das aflatoxinas, com quatro pontos de identificação por analito, permitiu a identificação inequívoca de cada analito. As incertezas expandidas variaram de 17% a 28% para as aflatoxinas B1 e B2, respectivamente. Mais uma vez, esses valores são consistentes com as diretivas de 1881/2006/EC (Reg. n°1881/2006, 2006) para baixos níveis de contaminação, como descrito aqui. Esses resultados indicam, portanto, que o presente método analítico é totalmente adequado para ser aplicado na determinação de aflatoxinas B1, B2, G1 e G2 em alimentos para bebês, conforme descrito na Tabela 8.

Tabela 8: Valores para figuras de mérito resultantes da validação do método de método para determinação de micotoxinas em comida de bebê.

Analito	a	b	R ²	t	n	T	R	RSD	LOD	LOQ
AFB1	201.3	8439.1	0.999	665.5	6	6.4	75.8%	35.8%	29.0	58.0
AFB2	214.1	5810.7	0.999	349.2	6	6.4	79.6%	20.7%	35.3	70.6

AFG1	84.6	2649.3	0.994	27.8	6	6.4	105.3%	9.7%	133.2	266.3
AFG2	-131.4	1556.3	0.999	112.5	6	6.4	120.6%	10.4%	282.1	564.3

a e b são a inclinação e o intercepto das curvas de calibração matrizadas, respectivamente; R² é o coeficiente de determinação para cada curva de calibração matrizada; t é o valor de t obtido para cada curva de calibração matrizada; T é o valor crítico (6.4); R é a recuperação; LOD e LOQ são expressos em ng kg⁻¹.

Análise de amostras reais

Com o objetivo de avaliar a capacidade do método analítico de quantificar aflatoxinas em comida de bebê, foram analisadas quatro amostras de diferentes composições (legumes e carne, verduras e massas, banana e maçã, mamão e laranja). As amostras são produzidas por marcas comumente disponíveis para os consumidores brasileiros no mercado local. Curvas de calibração matrizadas para cada uma das amostras foram construídas e o procedimento analítico foi conduzido. Os resultados mostraram que apenas na amostra contendo macarrão foi determinada contaminação por AFB1 em 80,0 ng kg⁻¹.

4.3. Conclusão

Os nanotubos de carbono foram aplicados com sucesso na extração de aflatoxinas a partir de amostras de comida de bebê. O procedimento de extração proposto, dSPE (extração por fase sólida dispersiva), foi eficiente e robusto, além de trazer vantagens operacionais aos métodos atuais que utilizam colunas de imunoafinidade. O uso de material de carbono nanoestruturado, como os nanotubos, tem se mostrado uma ferramenta importante no avanço das técnicas de preparo de amostras, principalmente devido a sua alta estabilidade química, permitindo sua aplicação em diversos ambientes químicos, além de sua alta área superficial,

o que o torna um excelente material adsorvente. Por fim, os limites de quantificação obtidos atendem aos rígidos critérios exigidos pelas agências reguladoras mundiais.

5. DETERMINAÇÃO DE ZEARALENONA EM CAFÉ TORRADO

Resumo

Foi desenvolvida uma metodologia para determinação de zearalenona em amostras de café torrado pela aplicação de extração em fase sólida dispersiva (dSPE) empregando nanoplaquetas de grafeno como adsorvente. Para o desenvolvimento do método analítico, inicialmente realizou-se a otimização das condições de extração de micotoxinas nas amostras, posteriormente as condições de adsorção dos analitos na superfície do adsorvente, e em seguida a otimização das condições de dessorção dos analitos e sua disponibilização em uma solução passível de ser ensaiada no sistema de UHPLC-MS/MS. A capacidade analítica do procedimento foi investigada, obtendo-se recuperações entre 89,4 % e 112,5 %, precisão intermediária estimada em função do desvio padrão relativo entre 32 % e 16 %, limites de detecção e quantificação de 0,06 e 0,09 $\mu\text{g kg}^{-1}$ respectivamente. Entende-se que o procedimento analítico descrito apresenta performance adequada para ser empregado como ferramenta analítica no controle de zearalenona em amostras de café torrado em substituição ao método principal, mais caro e laborioso.

Palavras-chave: micotoxinas; grafeno; extração em fase sólida dispersiva; cromatografia líquida de ultra alta performance; espectrometria de massas sequencial.

Abstract

A methodology for the determination of zearalenone in roasted coffee samples was developed by the application of dispersive solid phase extraction (dSPE) using graphene nanoplaquets as adsorbent. For the development of the analytical method, initially mycotoxin extraction conditions were optimized for the samples, later the adsorption conditions of the analytes on the adsorbent surface, followed by the optimization of the desorption conditions of the analytes to be analyzed in UHPLC-MS/MS system. The analytical capacity of the procedure was investigated, obtaining recoveries between 89,4 % e 112,5 %, intermediate precision, estimated by relative standard deviation, between 16 and 32%, limits of detection and quantitation between 0.06 and 0,09 $\mu\text{g kg}^{-1}$, respectively. It is understood that the described analytical procedure presents adequate performance to be used as an analytical tool in the control of mycotoxins in roasted coffee samples, in substitution of the more expensive and laborious main method.

Keywords: Mycotoxins; graphene; solid phase extraction dispersive; ultra high performance liquid chromatography; sequential mass spectrometry.

Introdução

O café é o fruto do cafeeiro. Uma planta tropical da família das *Rubiaceas* e pertencente ao gênero *Coffea*. As variedades mais exploradas economicamente são a *Coffea arábica* e *Coffea canefora*, representando, respectivamente, cerca de 70 e 30% da produção mundial. A planta é perene e de folhagem persistente, alcançando entre 2 a 5 metros na fase adulta.

Seu cultivo para produção da bebida, hoje consagrada, se iniciou no século 15, na região sudoeste da península arábica, com plantas oriundas da Etiópia. O seu consumo foi rapidamente incorporado aos hábitos do povo árabe e, após se consolidar na Europa, durante os séculos 16 e 17, se estendeu para a Ásia, Oceania e América, disseminadas pelas potências coloniais europeias, encontrando nestas regiões condições ideais de cultivo.

Atualmente o cultivo de café está disseminado por todo o mundo, porém se concentra no continente americano, onde se encontra 55% da produção mundial de café, seguido pela Ásia, cuja produção representa 32 % da produção mundial. Dentre os grandes produtores de café, o Brasil se destaca, com uma produção de café verde que, em 2017, alcançou 2,68 milhões de toneladas, significando 29,1% da produção mundial neste período (European Commission, 2011) (Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2017). A importância do produto para o Brasil é tamanha que alcança hoje a quinta posição como o produto que mais rende dividendos na pauta de exportações, tendo movimentado US\$ 5,2 bilhões em 2017, e responsável pela geração de 8 milhões de empregos (Carlos Magno Mesquita, 2016).

O cultivo do café está distribuído por várias regiões do Brasil, sendo Minas Gerais o estado com a maior produção nacional de café, representando cerca de 50 % da produção, e a principal fonte de cafés especiais. As principais regiões cafeicultoras em Minas Gerais são o Sul de Minas, Cerrado de Minas, Chapada de Minas e Matas de Minas.

Já o Espírito Santo é o segundo maior produtor de café no Brasil, e o maior produtor de café Conilon (Robusta). A região norte do estado, de temperatura média mais quente, abriga as plantações de Conilon, enquanto no sul se concentra o cultivo de Arábica.

O estado de São Paulo também é um tradicional produtor de café, majoritariamente arábica, que se distribui pelas regiões Mogiana e Centro-Oeste Paulista. A produção paulista é caracterizada por grandes cafeicultores, porém há pequenas propriedades que se especializaram em produção de cafés especiais. No estado ainda se encontra o Porto de Santos, principal rota de exportação do produto nacional, escoando cerca de 2/3 das exportações brasileiras de café. Ainda há significativa produção de café nos estados da Bahia, Paraná e Rondônia (Café, 2019).

A porção utilizada do café são as sementes presentes nas frutas do cafeeiro, chamadas de cereja, que ocorrem nas frutas normalmente aos pares. Após a colheita da fruta do cafeeiro, que pode ser executada de forma manual ou maquinizada, se dá o processamento. Para esta etapa, geralmente são aplicadas umas das três técnicas: secagem a seco ou natural, onde os grãos de café são dispostos para remoção de humidade em terreiros ao céu aberto, o processamento úmido, ou um intermediário entre os dois, chamado processamento semiúmido.

Após esta etapa, o café verde é submetido à torrefação, uma etapa fundamental que altera drasticamente as características físicas, químicas e sensoriais do produto. A torra é um processamento térmico intenso, no qual os grãos de café são submetidos a temperaturas elevadas, entre 160 e 240 °C, por intervalos de tempo entre 8 e 20 minutos (Fabbri et al., 2011). A torrefação pode ser executada de diversas maneiras, obtendo produtos mais claros ou escuros, dotadas de propriedades distintas, como terrosas ou defumadas (Grosch, 1998).

Os grãos verdes do café são compostos, majoritariamente por carboidratos, que representam cerca de 60 % do peso seco deste produto, incluindo polissacarídeos solúveis e insolúveis, oligossacarídeos, dissacarídeos e monossacarídeos. Os lipídeos representam cerca de 8 a 18 % do peso seco dos grãos e consistem de triglicerídeos e esteróis, por sua vez, proteínas, peptídeos e aminoácidos livres representam cerca de 9 a 16 % do peso seco dos grãos (Ludwig et al., 2014).

Após o processo de torra do café, há profundas modificações físico- químicas no produto e alteração dos compostos disponíveis, principalmente devido às reações de Maillard, caramelização de carboidratos e pirólise de compostos orgânicos, levando a formação de compostos orgânicos voláteis, responsáveis pelo aroma característico do café torrado e diminuição nos teores de proteínas e carboidratos, porém, mantendo grande concentração de compostos bioativos, como melanoidinas, cafeína, trigonelina e os diterpenos cafestol e kahweol. Em virtude de suas propriedades, pesquisas tem demonstrado que a ingestão de café pode ajudar na prevenção de doenças, tais como diabetes tipo 2, doença de Parkinson, e doenças do fígado (Cano-Marquina et al., 2013)(Higdon and Frei, 2006).

No café torrado, a determinação de micotoxinas é um desafio analítico, devido à complexidade da matriz(Nielsen et al., 2015). As micotoxinas frequentemente associadas aos grãos de café são a ocratoxina A e aflatoxinas, sendo a primeira a mais reportada na literatura, devido à quantidade significativa da mesma encontrada em diferentes fases da produção (Vatinno et al., 2008). A Tabela 9 mostra uma breve descrição dos métodos encontrados na literatura para determinação de micotoxinas em diferentes tipos de café.

Tabela 9: Resumo dos métodos descritos na literatura para determinação de micotoxinas em café

Analito	Matriz	Extração/Purificação	Tecnica de quantificação	Faixa de trabalho/ Recuperação	LQ	Referência
OTA	Café torrado	25 g de café torrado foram extraídos com uma mistura de metanol e solução aquosa de bicarbonato de sódio a 3% m/v (1:1, v/v). O extrato foi purificado numa coluna de imunoafinidade e eluído com metanol.	LC/ MS/MS	3-7 ng g ⁻¹ /89-108%	3,0 ng g ⁻¹	(Bandeira et al., 2012)
OTA	Café verde, torrado e solúvel	5 g de amostra foram extraídos em um liquidificador com NaHCO ₃ a 1% m/v. O extrato foi purificado numa coluna de imunoafinidade e eluído com metanol:ácido acético (98:2, v/v).	HPLC -FD	0,13-10,26 mg kg ⁻¹ / 100-104%	0,05 mg kg ⁻¹	(Mota et al., 2014)
OTA, FB2, FB4 e FB6	Café verde, torrado e instantâneo	5 g de café verde ou torrado ou 2 g de café instantâneo foram extraídos empregando o método QuEChERS: a mistura acetoneitrila:água:ácido fórmico (49:49:2, v/v/v) foi usada como solvente extrator, e a partição foi feita com MgSO ₄ e NaCl O extrato foi purificado usando um cartucho de 200 mg de Oasis Max 60 µm, e eluído com	UHPLC-MS/MS	OTA 0-10 µg kg ⁻¹ / >75% e FB 0-100 µg kg ⁻¹ / > 40%	2,0 µg kg ⁻¹ para OTA; 13 µg kg ⁻¹ para FB	(Nielsen et al., 2015)

		acetonitrila acidificada com 2% v/v de ácido fórmico.				
OTA	Café torrado	20 g de café torrado foram extraídos com a mistura metano:solução aquosa de NaHCO ₃ (1:1, v/v) . O extrato passou por uma coluna NH ₂ Sep Pak, e após eluição e diluição foi purificado numa coluna de imunoafinidade.	HPLC-FD	72-84%	-	(Lobeau et al., 2005)
OTA	Café verde	0,5 g de grãos finamente moídos foram extraídas com solução 1% m/v de NaHCO ₃ sob agitação magnética por 30 min. O extrato foi filtrado sob pressão reduzida, e em seguida, diluído em clorofórmio. Após centrifugação, a fase orgânica foi descartada e a fase aquosa foi purificada usando SPME com fibra de sílica revestida com uma película de polidimetilsiloxano/divinilbenzeno de 60 µm de espessura.	LC-FD	2-32 ng g ⁻¹	2 ng g ⁻¹	(Vatinno et al., 2008)
OTA	Café instantâneo	2 g de amostra foi extraída com uma solução aquosa contendo polietilenoglicol e hidrogenocarbonato de sódio. O extrato foi purificado numa coluna Ochrapprep e eluído com metanol.	HPLC-FD	2-256 ng mL ⁻¹ 1/83-92%	-	(De Almeida et al., 2007)

OTA	Café torrado	25 g de amostra foram extraídos com mistura de metanol e solução de NaHCO ₃ a 1% m/v. O extrato foi purificado numa coluna de imunofluorescência ochratest® e eluído com metanol.	HPLC-FD	0,15-2,15 ng mL ⁻¹ /58-115%	0,7 µg kg ⁻¹	(Mota et al., 2014)
21 micotoxinas	Café expresso, solúvel e turco	As amostras foram inicialmente clarificadas com a solução de Carrez. Em seguida, à solução clarificada foi adicionada a uma mistura de acetato de etila/ácido fórmico (95:5 v/v) e homogeneizada com Ultra-Turrax por 5 min. O sobrenadante (fase orgânica) foi separado, evaporado e reconstituído com 1 mL de metanol:água (50:50 v/v).	LC-MS/MS-IT	90-98%	0,42 µg kg ⁻¹	(García-Moraleja et al., 2015a)
21 micotoxinas	Café	5 g de amostra foram extraídos com acetonitrila:H ₂ O (80:20, v/v). O extrato foi centrifugado, e o sobrenadante foi evaporado. O resíduo foi reconstituído com metanol e purificado usando colunas C18 e carbono ativado.	LC-MS/MS	-	1,45 µg kg ⁻¹	(García-Moraleja et al., 2015b)

5.1. Parte experimental

Padrões e reagentes

O padrão de zearalenona (ZON) foi adquirido junto a Biopure (Biopure, Getzersdorf, Áustria) e usado para preparar soluções estoque por diluição com acetonitrila (Merck, Darmstadt, Alemanha). Estas soluções foram mantidas sob refrigeração a -20 °C.

Para os experimentos de adsorção foram utilizadas nanoplaquetas de grafeno adquiridas junto a Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA), ácido acético glacial P.A, metanol, acetonitrila e acetona com grau de pureza HPLC foram adquiridos da Merck (Merck, Darmstadt, Alemanha). Para a preparação de fase móvel de cromatografia, utilizou-se ácido acético glacial de grau de HPLC e metanol (Merck, Darmstadt, Alemanha) e água de qualidade Milli-Q (Milli-pore, Billerica, MA, EUA).

Amostras

As amostras de café torrado foram disponibilizadas pelo banco de amostras branco mantido pelo LACQSA. As amostras foram dispostas em frascos de plásticos inertes, impermeáveis e resistentes à luz, e foram acondicionados em câmaras térmicas (2-8°C).

Método analítico desenvolvido

O método de extração otimizado consiste, primeiramente, na extração dos analitos da matriz, para isto, foi realizada a pesagem de 2,5 g de café torrado em um tubo Falcon com capacidade para 50 mL, em seguida foram adicionados 25 mL de solução extratora, uma solução com a composição de acetonitrila/água 9:1 (v/v). A mistura foi agitada durante 90 min em mesa agitadora e, em seguida, centrifugada a 4000 rpm por 10 min. Posteriormente o sólido foi descartado e 1 mL do sobrenadante foi transferido para um eppendorf com

capacidade para 2 mL, ao qual foi adicionado 1 mL de suspensão aquosa de nanoplaquetas de grafeno com concentração de 10 mg mL⁻¹. A mistura foi submetida a agitação em vortex por 5 min para adsorção dos analitos na superfície do nanomaterial e submetida a centrifugação a 4000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante é eliminado e os analitos desorvidos da superfície das nanoplaquetas de grafeno pela adição de 1 mL de solução de desorção com a composição acetona/ácido acético (85/15 v/v), e posterior agitação em banho de ultrassom por 10 min. O sistema é centrifugado a 4000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante obtido filtrado a 0,22 µm e analisado.

Sistema UHPLC-MS/MS

As análises cromatográficas foram realizadas utilizando um sistema da Agilent, modelo 1290 Infinity (Agilent Technologies, Palo Alto, California, USA) operando em conjunto com o espectrômetro de massas da SCIEX, modelo QTRAP 6500 (Concord, Ontario, Canada). Utilizou-se uma coluna cromatográfica da Agilent, com fase estacionária em C18, modelo Zorbax RRHD e dimensões 50 mm x 2,1 mm x 1,8 µm (Concord, Ontario, Canada); pré-coluna em C18 da Phenomenex, modelo SecurityGuard (Torrance, Califórnia, EUA). Trabalhou-se com um volume de injeção de 5 µL; temperatura do forno da coluna igual a 30 °C; fases móveis: (A) água acidificada em 0,5% v/v de ácido acético e (B) metanol acidificado em 0,5% v/v de ácido acético; vazão da fase móvel de 350 µL min⁻¹. O gradiente empregado na eluição foi: 40% de B em 0 min; incremento linear de 40-90% de B até 5 min, mantendo constante até 5,5 min; redução linear de 90-40% de B até 6 min, mantendo constante até 7 min.

Os parâmetros da fonte foram: Ion Spray Voltage em 4500 V, temperatura a 500 °C, gás nebulizador (Gás 1) a 50 PSI, gás de dessolvatação (Gás 2) a 45 PSI e gás de cortina a 30 PSI. Foram adquiridas duas transições para o analito, usando experimentos do tipo Multiple Reaction Monitoring no modo positivo. As transições são descritas na Tabela 10: Parâmetros do espectrômetro de massas utilizados na análise de zearalenona em café torrado.

Tabela 10: Parâmetros do espectrômetro de massas utilizados na análise de zearalenona em café torrado

Analito	Q1 (m/z)	Q3 (m/z)	DP	EP	CE	CXP
ZON	319.1	<u>283.0</u>	6	10	15	16
	319.1	185.1	6	10	31	14

As transições de quantificação estão sublinhadas; Q1 e Q3: quadrupolos 1 e 3, respectivamente; DP: declustering potential (V); EP: entrance potential (V); CE: collision energy (V); CXP: collision exit potential (V).

Otimização do procedimento dSPE

Condição de extração

Foram pesados 2,5 g de amostra branco de café torrado em um tubo Falcon com capacidade para 50 mL. As amostras destinadas a estimativa da eficiência de foram fortificadas pela adição de solução padrão de zearalenona até uma concentração de 10 µg kg⁻¹, e seguiu-se então adição 25 mL das soluções extratoras avaliadas. Foram testadas soluções compostas por acetonitrila e água, nas proporções de 5:5, 7:3 e 9:1 (acetonitrila/água v/v). As misturas foram agitadas durante 90 min em mesa agitadora e, em seguida, centrifugadas a 4000 rpm por 10 min. Os sobrenadantes foram transferidos para tubos Falcon com capacidade para 15 mL e os sólidos descartados. Nesta etapa foi tomado cuidado especial com os extratos obtidos, uma vez que apresentam elevada presença de coextrativos e

interferentes. Estas substâncias são capazes de dificultar a identificação e a quantificação do analito, assim como podem causar elevado estresse aos equipamentos analíticos. Portanto os sobrenadantes foram diluídos 20 vezes pela adição de acetonitrila e então analisados no sistema UHPLC-MS/MS. Para fins de comparação e escolha da melhor condição de extração, as áreas cromatográficas referentes a cada ensaio foram ponderadas pela maior área obtida na condição de extração. Os ensaios foram conduzidos em triplicata.

Condição de adsorção

A fim de se obter a melhor condição para adsorção dos analitos na superfície das nanoplaquetas de grafeno, foram avaliadas a influência de duas variáveis: a massa de adsorvente a ser utilizada e o tempo de exposição do adsorvente ao extrato.

Para se avaliar qual a massa otimizada de nanoplaquetas de grafeno a se empregar no procedimento, 2,5 g de café torrado foram extraídos pela adição de 25 mL de solução de acetonitrila e água na proporção de 9:1 (v/v) e agitação em mesa agitadora por 90 min, seguida de centrifugação a 4000 rpm por 10 min. O sobrenadante foi recolhido e fortificado pela adição de solução padrão de zearalenona até uma concentração equivalente a $10 \mu\text{g kg}^{-1}$. Alíquotas de 1 mL do extrato fortificado foram transferidas para tubos eppendorf com capacidade de 2 mL, aos quais foram adicionados 1 mL de suspensão aquosa de nanoplatequas de grafeno de concentração 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 e 80 mg mL^{-1} . Os sistemas foram submetidos a agitação em vortex por 10 minutos e centrifugados a velocidade de 4000 rpm por 10 minutos. Os sobrenadantes foram filtrados a $0,22 \mu\text{m}$ e analisados para se avaliar a presença de analitos não adsorvidos. O experimento foi realizado em triplicata.

Posteriormente, foi avaliado qual o tempo de exposição das nanoplaquetas de grafeno que é necessário para favorecer uma adsorção quantitativa e reprodutível dos analitos na

superfície do adsorvente. Para isto, o extrato de café torrado foi fortificado pela adição de solução padrão de micotoxina até concentração de $10 \mu\text{g kg}^{-1}$. Alíquotas de 1 mL do extrato fortificado foram transferidas para tubos eppendorf com capacidade para 2 mL, às quais foi adicionado 1 mL de suspensão aquosa de nanoplatequas de grafeno na concentração 10 mg mL^{-1} e submetidos a agitação por vórtex, em temperatura ambiente, por intervalos de 0, 5, 10, 15, 20, 25 e 30 minutos. Após este período seguiram para centrifugação a 4000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante resultante foi filtrado a $0,22 \mu\text{m}$. Os sobrenadantes foram analisados para se investigar a permanência de analitos não adsorvidos no sobrenadante. Este experimento foi realizado em triplicata.

Condição de dessorção

Para se alcançar a melhor condição para a remoção das micotoxinas adsorvidas na superfície das nanoplaquetas de grafeno, foram avaliados dois fatores: a solução de dessorção a se empregar e o tempo necessário para uma dessorção quantitativa.

Para se otimizar a solução de dessorção, foi avaliada a utilização de três solventes orgânicos comumente empregados em experimentos de dSPE, acetonitrila, acetona e metanol, aos quais foi adicionada duas quantidades distintas de ácido acético, totalizando seis condições para a extração: acetonitrila/ácido acético (85/15 v/v), acetonitrila/ácido acético (95/5 v/v), acetona/ácido acético (85/15 v/v), acetona/ácido acético (95/5), metanol/ácido acético (85/15 v/v) e metanol/ácido acético (95/5). Utilizou-se extrato branco de café torrado, obtido pela extração de 2,5 g de amostra por 25 mL de solução de extração, de composição acetonitrila/água 9:1, que foram agitados em mesa agitadora por 90 min e posteriormente centrifugada a 4000 rpm por 10 min. Ao sobrenadante foi adicionada solução padrão de zearalenona até concentração equivalente a $10 \mu\text{g kg}^{-1}$. Uma alíquota de 1 mL do extrato

branco fortificado foi transferida para um eppendorf com capacidade para 2 mL, ao qual foi adicionado 1 mL de suspensão de nanoplaquetas de grafeno de concentração 10 mg mL^{-1} e submetido a agitação em vortex por 5 min, seguido de centrifugação a 4000 rpm por 10 min e posterior descarte do sobrenadante. Ao precipitado, as nanoplaquetas de grafeno em cuja superfície estão adsorvidos os analitos, foi adicionado 1 ml das soluções de dessorção avaliadas. O sistema foi submetido a agitação em banho de ultrassom por 10 minutos e, em seguida, centrifugado a 4000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi filtrado a $0,22 \mu\text{m}$ e analisado. O experimento foi realizado em triplicata.

Para se avaliar qual o tempo necessário para remoção completa dos analitos da superfície do adsorvente, 1 mL de extrato branco fortificado à concentração equivalente de 10 ug kg^{-1} foi transferido para um eppendorf com capacidade para 2 mL, ao qual foi adicionado 1 mL de suspensão de nanoplaquetas de grafeno com concentração de 10 mg mL^{-1} . O sistema foi agitado em vortex por 5 minuto e centrifugado a 4000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi retirado e ao precipitado foi adicionado 1 ml da solução de dessorção, de composição acetona/ácido acético (85/15 v/v). O sistema foi submetido a banho de ultrassom por intervalos de 0, 5, 10, 15 e 20 minutos, e posteriormente centrifugado a 4000 rpm. Os sobrenadantes foram filtrados a $0,22 \mu\text{m}$ e analisados. O experimento foi realizado em triplicata.

Validação

A fim de verificar a capacidade do método analítico em desenvolvimento, foram estimadas as seguintes figuras de mérito: seletividade, efeito de matriz, faixa de trabalho, recuperação, precisão, limite de detecção e limite de quantificação, em acordo com as propostas dos

documentos SANTE/12571/2015 (SANTE/EU, 2015), 2002/657/CE (European Commission, 2002) e Eurachem (Magnusson and Örnemark, 2014).

Para a apuração da seletividade do método de ensaio, amostra de café torrado branco foi previamente analisada, sendo investigada a presença de pico cromatográfico no tempo de retenção designado para os analitos. Entendeu-se como seletivo se o método analítico não apresentar sinal cromatográfico no tempo de retenção dos analitos superior a 30% do sinal cromatográfico referente à menor concentração da curva de calibração.

A fim de se estudar o efeito de matriz no método de ensaio, optou-se por avaliar as curvas de calibração. Preparou-se curvas de calibração pela adição de solução padrão de zearalenona em solvente puro, acetonitrila, e em paralelo, pela adição de solução padrão de zearalenona em extrato de amostra branco, preparado conforme o procedimento analítico desenvolvido. As inclinações das curvas foram comparadas utilizando a equação (Thompson et al., 2002). O efeito de matriz foi considerado pouco significativo em resultados entre 0,8 e 1,2.

Optou-se por trabalhar, neste método analítico com curvas de calibração obtidas pela adição de solução padrão de zearalenona em acetonitrila, nas concentrações equivalentes a 0,5; 1,0; 2,0; 2,5; 3,0; 5,0; 8,0 e 10 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Foram preparadas 3 curvas de calibração para com preparo distinto para cada um dos três dias, desta forma, se somam 9 dados para nível de concentração da curva de calibração. Em virtude da elevada variação de resposta instrumental obtida entre os dias de ensaio, os dados das curvas de calibração de dias distintos não foram combinados. Os dados das curvas de calibração preparadas no mesmo dia foram combinadas e uma curva de calibração obtida pela aplicação do método de regressão linear por Mínimos Múltiplos Quadrados Ponderados (MMQP), usando como ponderador $1/x$. A adequação da faixa calibrada foi investigada pela aplicação do teste de t.

Para se estimar a recuperação e precisão do método, amostras brancas de café torrado foram fortificadas pela adição de solução padrão de micotoxinas até concentrações equivalentes a 1,5; 2,0 e 2,5 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Foram preparadas 6 replicatas reais de fortificação para cada um dos níveis de concentração em trabalho, para cada um dos três dias, totalizando 18 replicatas para cada uma das concentrações em condição de reprodutibilidade interna. Estimou-se a recuperação do método analítico pelo cálculo da recuperação das amostras branco fortificadas e como estimados de precisão calculou-se o desvio padrão ponderado obtido em condições de repetibilidade e reprodutibilidade interna.

Para a estimativa do Limite de Detecção e Limite de Quantificação, optou-se por adotar a proposta expressa no Eurachem(Magnusson and Örnemark, 2014). Para tal, calculou-se o desvio padrão dos resultados de concentração obtidos pela interpolação dos dados de área cromatográfica do menor nível de concentração a curva de calibração. Este desvio padrão foi multiplicado por um multiplicador, 3 para a estimativa do Limite de Detecção e 5 para cálculo do Limite de Quantificação.

5.2. Resultados e discussão

Otimização do procedimento dSPE

Condição de extração

Para a otimização da condição de extração, foram avaliadas diversas proporções da solução de acetonitrila e água empregadas na técnica de *dilute and shoot* para obtenção de extrato com elevada eficiência de extração de micotoxinas em amostras de café torrado. Os resultados obtidos são expressos na Figura 6, ponderados pela resposta mais elevada para cada condição a fim de se facilitar a identificação da melhor condição, uma vez que as

respostas instrumentais entre os analitos variam em função de seus desempenhos relativos no método de análise.

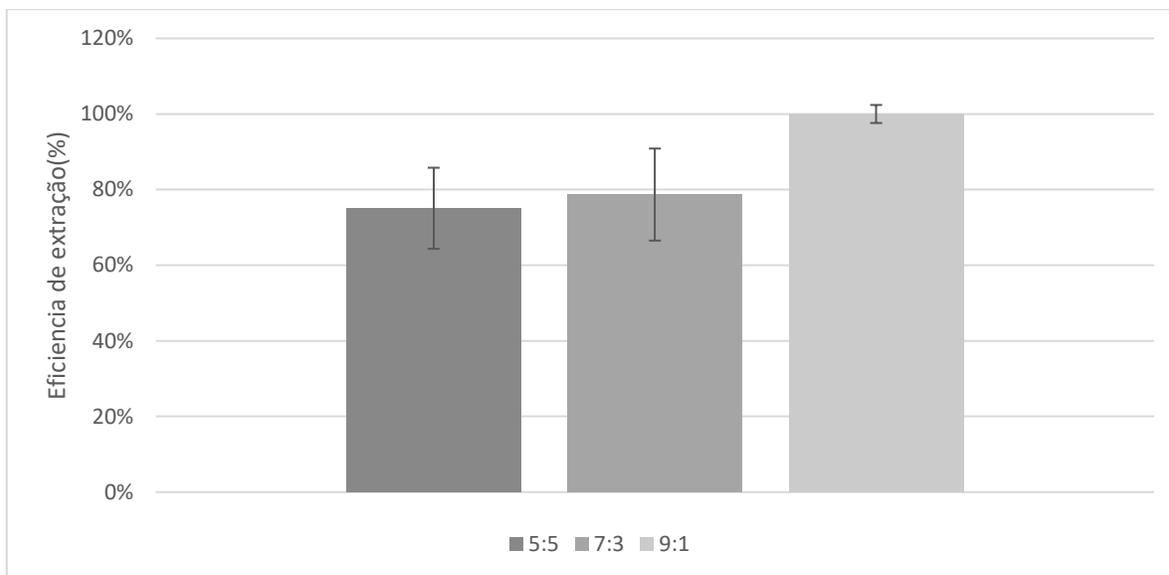


Figura 6: Eficiência de extração de micotoxinas de amostras de café torrado

Como pode ser observado na Figura 6, a condição de extração que oferece melhor eficiência de extração é a que aplica a solução composta por 9:1 (v/v), esta condição ainda apresenta dispersão reduzida de seus resultados, estimados pelo desvio padrão relativo expresso na figura. Esta condição, portanto, foi escolhida para o método analítico.

Condição de adsorção

A fim de se otimizar a massa de adsorvente a ser empregada no procedimento de dSPE, foi avaliado o uso de suspensões de nanoplaquetas de grafeno com diversas concentrações. Ao se analisar os resultados expressos na Figura 7, podemos concluir que a quantidade de micotoxinas presente na solução após a exposição ao adsorvente é reduzida a valores próximos a 0 quando utilizado 10 mg de nanoplaquetas de grafeno. Está a quantidade foi apontada como suficiente para a adsorção quantitativa dos analitos presentes no extrato e foi adotada no procedimento em desenvolvimento.

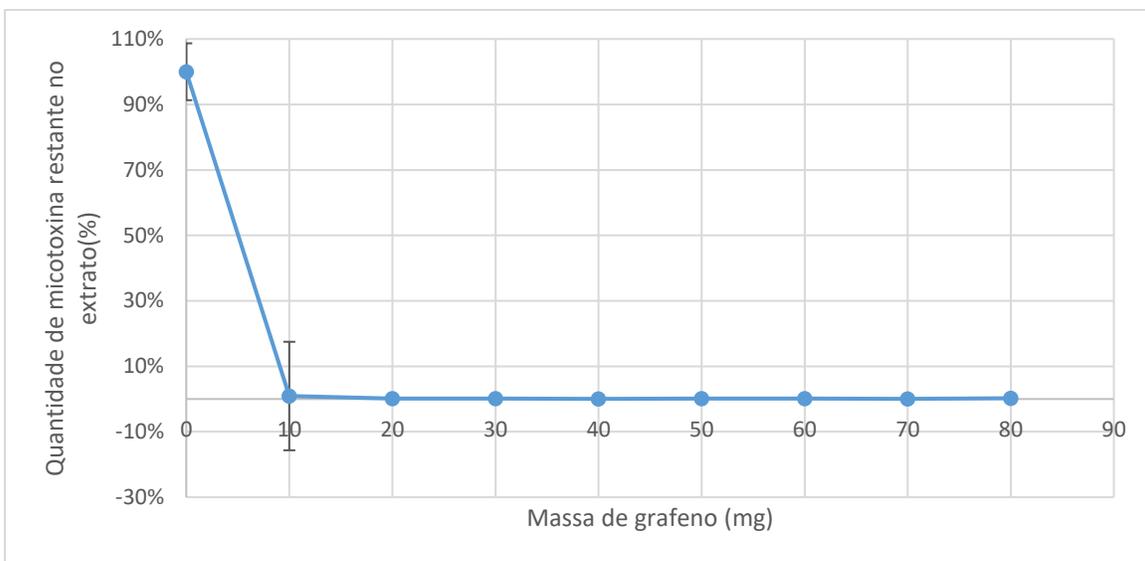


Figura 7: Otimização da massa de nanoplaquetas de grafeno utilizada para desenvolvimento de método de extração dSPE para quantificação de zearalenona em café torrado

A fim de obter a o tempo de exposição necessário para que as nanoplaquetas de grafeno sejam capazes de adsorver quantitativamente os analitos presentes no extrato, o nanomaterial foi exposto ao extrato por períodos de tempo variados. Como pode ser observado na Figura 8, após 5 minutos de exposição, não foi possível quantificar zearalenona no sobrenadante, evidenciando a sua completa adsorção após este período. Portanto, este foi o tempo de exposição escolhido para o método de ensaio em desenvolvimento.

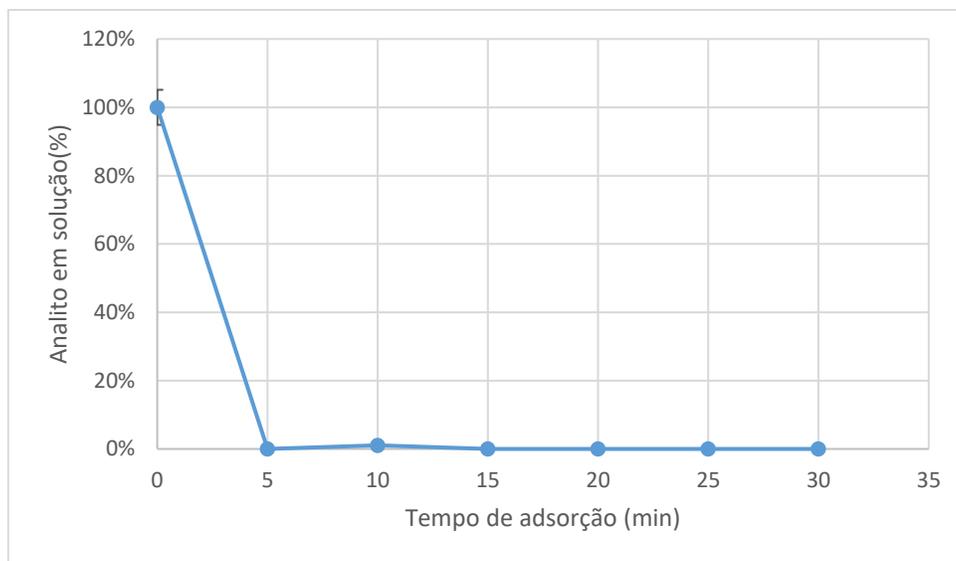


Figura 8: Otimização do tempo de exposição das nanoplaquetas de grafeno ao extrato de café torrado para desenvolvimento de método de extração dSPE para quantificação de zearalenona em café torrado

Condição de dessorção

Para a avaliação do melhor solvente para dessorção de micotoxinas da superfície das nanoplaquetas de grafeno, foi avaliada a aplicação de metanol, acetonitrila e acetona acidificados. Pela análise da Figura 9, pode-se observar claramente que a aplicação da solução com a composição acetona/ácido acético (85/15 v/v) oferece a melhor condição para

remoção de micotoxinas da superfície do adsorvente utilizado. Este solvente então foi escolhido para o método de ensaio.

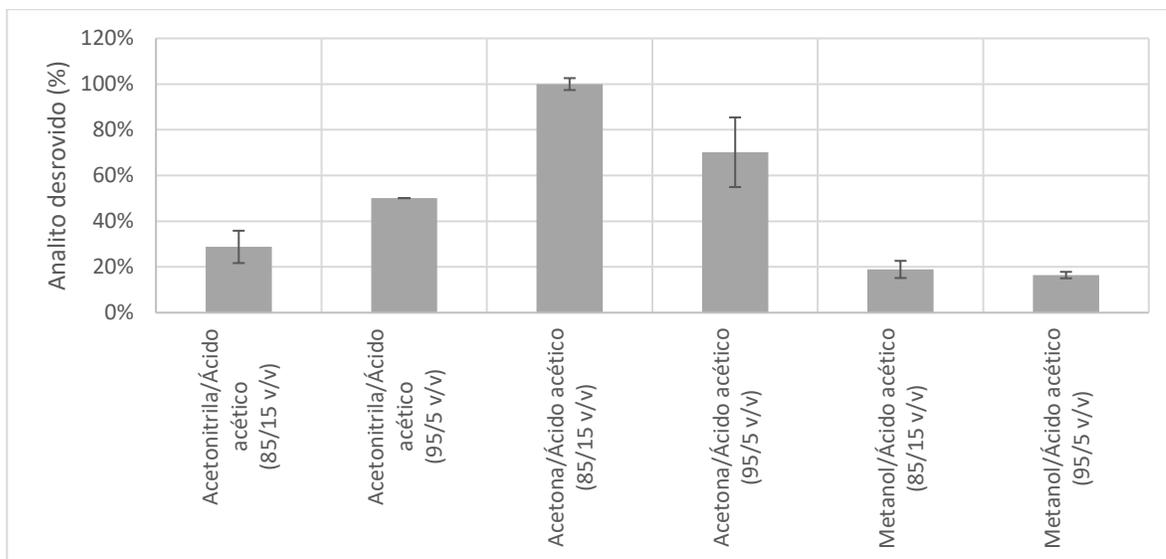


Figura 9: Avaliação da melhor solução para dessorção dos analitos da superfície das nanoplaquetas de grafeno.

A fim de se otimizar o tempo necessário para que a solução de dessorção otimizada desorva quantitativamente os analitos, nanoplaquetas de grafeno previamente expostas a extrato de café torrado fortificado com zearalenona foram submetidas à adição da solução de dessorção e agitação em banho de ultrassom por intervalos de tempo distintos, e a mistura, após centrifugada e filtrada teve seu sobrenadante analisado. Como pode ser observado na Figura 10, ao se aplicar um tempo de dessorção igual a 10 minutos obtém-se maior eficiência. Após este período, observa-se uma redução na quantidade de micotoxinas presentes em solução, que poderia indicar uma possível reabsorção dos analitos na superfície do material adsorvente. Esta condição foi a escolhida para o método em desenvolvimento.

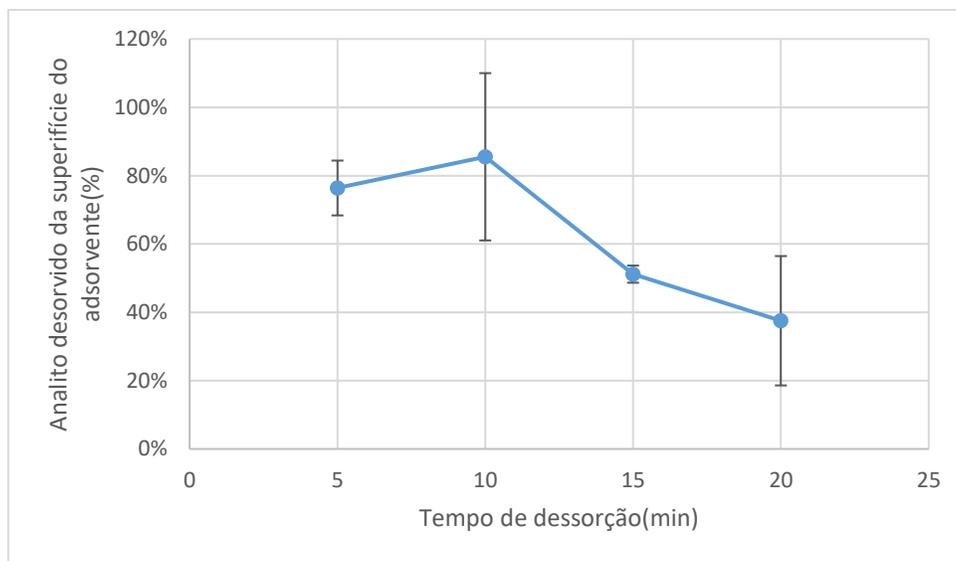


Figura 10: Otimização do tempo necessário para dessorção do analito da superfície das nanoplaquetas de grafeno

Validação

A investigação dos cromatogramas obtidos pela análise de amostras branco revelou a ausência de picos cromatográficos nos tempos de retenção referentes ao analito, demonstrando a capacidade do método de aquisição de dados baseado em MRM, com o monitoramento de duas reações de fragmentação por analito, na identificação inequívoca do alvo.

O efeito de matriz foi avaliado ao se preparar curvas de calibração em solvente puro e em extrato de matriz branco. Os resultados foram avaliados pela comparação de suas inclinações.

A curva de calibração, que foi construída pelo método de regressão linear por Mínimos Múltiplos Quadrados Ponderados (MMQP) utilizando como ponderador $1/x$, apresentou valor de coeficientes de determinação (R^2) igual a 0,997, a curva ainda apresenta ajuste linear adequado, com valor calculado (203,46) para t superior ao valor crítico (2,53). Os resultados de recuperação apresentam valores médios de 98,9%, 89,4 % e 112,5 % para as fortificações nas concentrações de 1, 2 e 3 $\mu\text{g kg}^{-1}$, respectivamente. A precisão, avaliada em função dos

valores de desvio padrão relativo dos resultados das análises de amostras branco fortificadas, em condição de repetibilidade apresentam valores entre 32%, 31% e 16%, respectivamente para as fortificações nas concentrações de 1, 2 e 3 $\mu\text{g kg}^{-1}$, enquanto em condição de precisão intermediária apresentou valor de 31% para a concentração de 1 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Os valores de LOD e LOQ estimados foram, respectivamente, 0,06 e 0,09 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Desta forma, o método avaliado tem capacidade para investigação da contaminação de café torrado por zearalenona em concentrações baixas o suficiente para emprego como ferramenta de fiscalização e prospecção de dados.

5.3. Conclusão

O trabalho demonstra a viabilidade da aplicação de nanoplaquetas de grafeno na extração de zearalenona presente em amostras de café torrado. O procedimento desenvolvido, fundamentado na técnica dSPE (extração em fase sólida dispersiva), se mostrou eficiente e capaz de analisar com segurança os contaminantes em matriz de elevada complexidade, como o café torrado, cujo extrato é carregado de coextrativos, sem a necessidade de recorrer a utilização de colunas de imunoafinidade. A validação foi conduzida empregando curvas de calibração preparadas pela adição de solução padrão em solvente puro, demonstrando a capacidade do procedimento em remover coextrativos a ponto de tornar o efeito de matriz não significativo.

Por fim, acredita-se que o desenvolvimento de metodologias analíticas modernas, capazes de oferecer elevado desempenho analítico a um custo operacional reduzido, como o método proposto por este trabalho, é uma ferramenta valiosa na ampliação da capacidade de fiscalização de produtos por parte de organismos governamentais, além de facilitar aos

produtores de alimentos o monitoramento da qualidade de seu produto, com o intuito de oferecer ao consumidor alimentos de elevada qualidade.

**6. COMPARAÇÃO DAS ESTRATÉGIAS "BOTTON-UP" E "TOP-DOWN" PARA
A ESTIMATIVA DA INCERTEZA DE MEDIÇÃO NA ANÁLISE
MULTIANALITO DE RESÍDUOS E CONTAMINANTES EM ALIMENTOS
POR UHPLC-MS/MS**

Resumo

Foi validado um procedimento analítico para a quantificação de micotoxinas, pesticidas e medicamentos veterinários em três matrizes distintas: arroz, damasco e feijão, empregando um método de extração fundamentado em *dilute and shoot* e quantificação por UHPLC-MS/MS. Os dados de validação subsidiaram a estimativa de incerteza de medição, que foi realizada por duas metodologias distintas, *Bottom-up* e *Top-down*. Os valores de incerteza expandida obtidos pelas duas metodologias foram comparados e discutidos, sendo demonstrada similaridade entre os valores obtidos pelas duas estratégias de cálculo.

Palavras-chave: micotoxinas; pesticidas; medicamentos veterinários; incerteza de medição; cromatografia líquida de ultra alta performance; espectrometria de massas sequencial.

.....

Abstract

An analytical procedure for the quantification of mycotoxins, pesticides and veterinary drugs in three different matrices was validated: rice, apricot and beans, using an extraction method based on dilute and shoot and quantification by UHPLC-MS / MS. The validation data supported the measurement uncertainty estimate, which was performed by two different methodologies, Bottom-up and Top-down. The values of expanded uncertainty obtained by the two methodologies were compared and discussed, showing similarity between the values obtained by the two calculation strategies.

Keywords: mycotoxins; pesticides; veterinary drugs; measurement uncertainty; ultra-high performance liquid chromatography; sequential mass spectrometry.

Introdução

O controle da presença de contaminantes nos alimentos é uma questão que está a aumentar em atenção da comunidade científica e política (Kleter and Marvin, 2009). A presença de substâncias nocivas, como agrotóxicos, micotoxinas e resíduos de medicamentos veterinários nos alimentos é um fator importante para o adoecimento das populações e leva a importantes perdas econômicas (Mesnage and Séralini, 2018) (Richard, 2007) (Baynes et al., 2016) (Beyene, 2016). Diante desse risco, muito esforço é dedicado pela comunidade científica no desenvolvimento de métodos analíticos mais completos e abrangentes para aumentar a capacidade de programas de prospecção e controle da contaminação de alimentos.

Muitos destes esforços se concentram no desenvolvimento de métodos multianalitos, capazes de condensar a determinação de um número crescente de contaminantes em uma única análise (Frenich et al., 2014), e este fenômeno é observado especialmente na detecção de micotoxinas, pesticidas e resíduos de medicamentos veterinários (Varga et al., 2013) (da Silva et al., 2019) (Abreu et al., 2020) (Vaclavikova et al., 2013) (Malachová et al., 2018) (Romero-González et al., 2011) (Martínez-Domínguez et al., 2016b) (Kuang et al., 2013) (Kuang et al., 2013) (Yu et al., 2013) (Burns and Borts, 2019) (Kang et al., 2017). No entanto, o aumento no escopo dos métodos também traz como consequência a elevação da complexidade do processamento de dados, entre eles, a estimativa da incerteza de medição (Hampel et al., 2018) (Hall, 2016).

Para estimar a incerteza de medição, o Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement (GUM) é entendido como o principal documento de orientação sobre cálculos de incerteza de medição (Joint Committee For Guides In Metrology, 2008). No entanto, este documento apresenta uma metodologia que às vezes é vista como inconveniente para aplicação em métodos analíticos complexos, como os que são frequentes na prática da análise

química moderna (Marcó et al., 2007)(Carvalho et al., 2012). O prodimento de cálculo que apresenta, entendido como *Bottom-up*, exige a combinação extensiva das fontes de incerteza individuais que influenciam de forma significativa a medição. Existem propostas de outras metodologias de cálculo com enfoque na avaliação holística do desempenho analítico, os procedimentos *Top-down* (European Commission, 2011)(European Commission DG-SANTE, 2019).

Ambas as metodologias fazem uso da lei de propagação da incerteza, que consiste na combinação das fontes de incertezas identificadas e classificadas como relevantes para a medição. No entanto, eles diferem em larga escala no detalhamento e especificação das fontes de incerteza contempladas, bem como nas etapas de cálculo envolvidas em suas estimativas (Abastecimento, 2011).

A adoção de cada uma das diferentes metodologias apresenta vantagens. Ao trabalhar com uma abordagem *Bottom-up* existe a possibilidade de mapear de forma individual as fontes de incerteza que mais impactam as análises, proporcionando uma melhor condição de controle e aprimoramento da metodologia de ensaio. No caso da adoção da estratégia *Top-down*, existe a possibilidade de utilizar os dados gerados em ensaios colaborativos e dados históricos, no sentido de se obter uma estimativa de incerteza de medição mais robusta(Marcó et al., 2007).

Neste capítulo, dados de validação de uma metodologia analítica foram obtidos para a determinação simultânea de micotoxinas, pesticidas e resíduos de medicamentos veterinários em várias classes de alimentos, pela aplicação de Cromatografia Líquida de Ultra Alta Performance acoplada a Espectrometria Massas Sequencial (UHPLC-MS/MS). Esses dados foram usados para estimar a incerteza de medição usando duas metodologias distintas recomendadas por normativas amplamente adotadas no tratamento de dados de química

analítica, uma usando a estratégia *Botton-up* e a outra usando a estratégia de *Top-down*. Os resultados obtidos pelas duas metodologias de cálculo foram comparados e discutidos.

6.1. Parte experimental

Padrões e reagentes

Padrões de micotoxinas, pesticidas e medicamentos veterinários foram adquiridos a partir de Biopure (Biopure, Getzersdorf, Áustria) e foram preparados em acetonitrila (Merck, Darmstadt, Alemanha) ou uma solução de acetonitrila/água (1/1 v/v) para preparo das soluções estoque. As soluções foram armazenadas sob refrigeração a -20°C . Na preparação da fase móvel para uso no cromatógrafo líquido foram utilizados ácido acético glacial grau HPLC, metanol, acetonitrila (Merck, Darmstadt, Alemanha) grau HPLC e água de qualidade Milli-Q (Milli-pore, Billerica, MA, EUA).

Amostras

Amostras branco de arroz, damasco e feijão foram recebidas do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento do Brasil. As amostras foram primeiramente moídas sucessivas vezes até um tamanho de partícula médio igual ou inferior a $100\ \mu\text{m}$ e subsequentemente homogeneizada. Em seguida, uma fração desta amostra, 100 g, foi posteriormente moída até se obter partículas de tamanho igual ou inferior a de $8\ \mu\text{m}$. As amostras foram armazenadas em frascos de plástico inerte sob refrigeração ($-8 \pm 2^{\circ}\text{C}$) até serem utilizadas nas análises.

Método analítico empregado

Procedimento de extração

Foi aplicado um método de extração adaptado a partir da literatura (Malachova et al., 2014) que demonstrou um bom desempenho para um grande número de analitos. Este

procedimento foi miniaturizado visando uma redução no consumo da solução padrão. Os detalhes podem ser encontrados na literatura mencionada.

Para a etapa de extração, 1 g de amostra previamente moída e homogeneizada foi pesada em frascos de polímero inerte, ao qual foram adicionados 4 mL de uma solução de extração (acetonitrila/água/ácido acético 79: 20: 1, v / v / v). A mistura foi agitada durante 90 minutos usando um agitador rotativo (GFL, Burgwedel, Alemanha) e deixada em repouso durante 30 min para precipitação do sólido em suspensão. Em seguida, uma alíquota de 500 µL da amostra foi retirada e transferida para um vial, ao qual foram adicionados 500 µL de acetonitrila para fins de diluição, seguido de análise em um sistema LC-MS/MS.

Método LC-MS/MS

Foi aplicado um procedimento de análise que faz uso de um sistema de cromatografia líquida acoplada a um espectrômetro de massas sequencial desenvolvido previamente, reportado em detalhes na literatura (Malachova et al., 2014). Utilizou-se um espectrômetro de massas com analisador tipo triplo quadrupolo da marca SCIEX, modelo QTRP 6500 (SCIEX, Foster City, CA, EUA) e um sistema UHPLC da Agilent, modelo 1290 (Agilent Technologies, Waldbronn, Alemanha)

Para a etapa de separação de cromatografia, foi aplicando uma coluna Gemini C18, 150 x 4,6mm, com um tamanho de partícula de 5 µm, que foi operada com uma coluna em C18, 4 x 3mm (Phenomenex, Torrance, CA, EUA). A eluição foi realizada utilizando um gradiente binário com fluxo de 1000 mL min⁻¹, as fases móveis foram: metanol/água/ácido acético 10:89:1 (v/v/v) como um eluente A e metanol/água/ácido acético 97:2:1 (v/v/v) como eluente B, ambos contendo 5 mM de acetato de amônio. Para realizar a eluição, um fluxo composto por 100% A é inicialmente ajustado e mantido por 2 min, então a proporção de B é aumentada

para 50% entre o minuto 2 e o minuto 5, seguido por um novo incremento de B para 100% entre o minuto 5 e o minuto 14, proporção mantida até o minuto 18. Depois disso, a coluna é reequilibrada a 100% de A por 2,5 min.

O espectrômetro de massa foi operado em um regime programado de MRM, no modo positivo. Para assegurar a seletividade do sistema e evitar o risco de falsa detecção e quantificação dos analitos, foram monitoradas duas transições de massa para cada analito. Uma transição foi utilizada como quantificador, a transição com a qual se calcula a curva de calibração e realiza os cálculos de concentração. E a segunda transição é utilizada como qualificadora, cuja resposta instrumental alimenta um sistema de identificação da resposta instrumental.

Quantificação

Para a quantificação, optou-se por trabalhar com curvas de calibração preparadas em solvente, construídas pela diluição de soluções padrão dos analitos numa solução de solventes, cuja composição de acetonitrila/água/ácido acético (49,5/49,5/1, v/v/v), a fim de se obter cinco níveis de concentração nas concentrações de 1:3:10:30:100:300 $\mu\text{g kg}^{-1}$. As curvas de calibração foram obtidas pelo método dos Mínimos Quadrados Ponderados utilizando como ponderador a fator $1/x$. As curvas de calibração foram preparadas em triplicata diariamente em triplicata real, e a linearidade foi garantida pela aplicação do teste t.

Amostras controle

Para a estimativa das figuras de mérito associadas à validação analítica, com finalidade de evidenciar o desempenho do procedimento adotado, foi empregado um conjunto de

amostras branco fortificadas. As amostras foram previamente analisadas pelo método analítico apresentado anteriormente para a investigação da presença dos analitos em concentração capaz de afetar os ensaios. Uma vez que tenha sido verificada a ausência de sinais analíticos capazes de sobrepor os dos analitos, ou a sua presença em quantidades capazes de causar uma resposta instrumental não superior a 30% do sinal presentes nas amostras fortificadas na concentração mais baixa, as matrizes foram consideradas branco. Tendo em vista a quantidade de analitos a serem avaliados e a ocorrência natural de muitos deles nas matrizes estudadas, entendeu-se muito improvável a obtenção de amostras totalmente isentas da presença de todos analitos. Ao todo, foram utilizados 680 substancias para a validação, dentre elas micotoxinas, pesticidas e medicamentos veterinários.

Em seguida, foram retiradas alíquotas dessas amostras branco, que posteriormente foram fortificadas com a adição de uma determinada quantidade de solução padrão dos analitos para obter uma amostra de concentração equivalente a 2 ug kg^{-1} de cada um dos analitos. Esta fortificação foi realizada em quintuplicata, durante três dias diferentes, totalizando 15 repetições reais.

Estimativa de incerteza de medição

Os dados gerados na validação do método foram usados para estimar a incerteza de medição por duas diferentes metodologias, que são normalmente utilizadas no tratamento de dados de análises químicas para segurança alimentar. Os dados podem ser encontrados no Anexo I deste texto. Primeiramente, foi utilizada a metodologia *Bottom-up*, identificando individualmente as principais fontes de incerteza e suas realizando combinações subsequentes(Bich et al., 2006), para tal foi utilizada como base a metodologia apresentada pelo Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement (Joint Committee For Guides

In Metrology, 2008). Posteriormente, foi aplicado um método *Top-down*, no qual a incerteza de medição foi estimada com base nos resultados de amostras de controle preparadas a partir de amostras branco fortificadas, o método de cálculo aplicado foi o apresentado pelas Guidelines on Estimation of Uncertainty of Results (European Commission, 2011). As duas estratégias aplicam a lei de propagação de incerteza (Vuolo, 1996) para a combinação de fontes de incerteza que foram identificadas em cada caso, mas diferem substancialmente no detalhando das fontes a serem consideradas. Os valores de incerteza de medição obtidos pelas duas metodologias foram então comparados para verificar suas equivalências. O cálculo da estimativa da incerteza foi realizado por meio do software Microsoft Excel 2016 (Microsoft, NY, EUA).

Estimativa da incerteza de medição usando a abordagem de Bottom-up

Ao estimar incertezas usando o método *Bottom-up*, uma combinação exaustiva de fontes de incerteza associadas à medição é buscada. Para isso, primeiramente foi especificada a equação do mensurando, a função matemática que relaciona as grandezas de entrada, que são obtidas nas medições, com a grandeza de saída, que neste caso se trata da concentração do analito na amostra. Em uma segunda etapa seguida, na qual são identificadas as fontes de incertezas relacionadas à análise. Foi utilizado um diagrama de causa e efeito para apoiar a identificação das fontes de incerteza que foram consideradas relevantes. Seguido por uma próxima etapa onde foram estimadas as incertezas padrão para cada uma das fontes de incerteza identificadas. Foram empregadas estimativas do Tipo A, relativas às medidas repetitivas realizadas durante as análises, e estimativas do Tipo B, quando foram utilizadas informações obtidas por outros meios, como certificados de calibração, dados providos por fabricantes de instrumentos de medição, entre outros (Taylor, Barry N and Kuyatt, 1994). Na

última etapa, as incertezas padrão relacionadas às fontes de incerteza serão combinadas pela aplicação da lei de propagação da incerteza e os coeficientes de sensibilidade serão aplicados. Os coeficientes de sensibilidade foram calculados como as derivadas parciais da grandeza de saída em função de cada uma das grandezas de entrada especificadas na equação do mensurando. Finalmente, a incerteza expandida foi estimada multiplicando a incerteza combinada pelo fator de abrangência, o multiplicador escolhido para definir um nível de confiança de 95% sobre o intervalo representado pela incerteza expandida (Taylor, Barry N and Kuyatt, 1994).

Estimativa da incerteza de medição usando a abordagem de Top-down

Para a estimativa da incerteza pela metodologia *Top-down*, devido à incapacidade de utilização de material de referência certificado ou testes colaborativos, indisponíveis para ensaios com tantos analitos, foram utilizadas amostras branco fortificadas. Para isso, foram entendidas como relevantes as fontes associadas à precisão intermediária e fonte de incerteza associada à recuperação, uma vez que os resultados emitidos pelo método analítico em estudo são corrigidos por um fator de recuperação.

6.2. Resultados e discussão

Estimativa da incerteza de medição usando o método Bottom-up

Neste método de tratamento de dados em que a relação de causa e efeito na propagação de incertezas é determinada extensivamente, inicialmente foi feita a definição da função de medição, seguida da identificação das fontes de incerteza e sua posterior quantificação, pela combinação destas diferentes fontes e, finalmente, a estimativa da incerteza expandida (Joint Committee For Guides In Metrology, 2008).

Modelando a medição

Nesta etapa, foi estabelecida uma equação matemática que relaciona as grandezas de entrada ao mensurando. Foram incluídos os fatores de correção para expressar todas as grandezas que podem trazer uma contribuição relevante para a incerteza de medição do resultado analítico. A função de medição obtido é apresentado pela Equação 14

Equação 14

$$x = \frac{(A - a)}{b} \cdot \frac{V_{\text{extraction}}}{m_{\text{sample}}} \cdot \frac{V_{\text{extract}} + V_{\text{dilution}}}{V_{\text{extract}}} \cdot \frac{1}{\text{Rec}} + C_{\text{repro}}$$

Sendo que x representa a concentração do analito (ug kg^{-1}), A representa a área cromatográfica obtida no ensaio da amostra, a representa a intercepto da curva de calibração, b representa a inclinação da curva de calibração (L ug^{-1}), $V_{\text{extraction}}$ representa o volume usado na extração (L), m_{sample} representa a massa da amostra (kg), V_{extract} representa o volume do extrato usado na diluição (L), V_{dilution} representa o volume da solução usada na diluição (L), Rec representa a recuperação estimada para o ensaio e C_{repro} representa a correção nula para a precisão intermediária (ug kg^{-1}) que estima a variabilidade dos resultados oferecidos pelo método analítico em termos de erros aleatórios, apesar desta última correção ter valor nulo, mas não uma fonte de incerteza nula.

Identificação das fontes de incerteza

Para apoiar a identificação das fontes de incerteza de medição pertinentes, um diagrama de causa e efeito, ou diagrama de Ishikawa, foi elaborado (Figura 11). As fontes de incerteza identificadas e suas representações no diagrama de Ishikawa são, no caso daquelas associadas a elaboração da curva de calibração, **a** representando a incerteza na estimação do intercepto da curva de calibração; **b** representando a incerteza na estimação da inclinação da

curva de calibração; **cov (a, b)**, representando a covariância entre o intercepto a e a inclinação b da curva de calibração; **Área**, representando a incerteza na obtenção da resposta analítica na forma da área cromatográfica referente ao analito. Foram identificadas as fontes associadas às medições de volume realizadas para adicionar a solução de extração e para coletar alíquotas para diluir o extrato, como a **Resolução**, referente à resolução do instrumento de medição; **Calibração**, referente à calibração do instrumento de medição; **Repetibilidade**, referente à variação observada no uso de instrumentos de medição em condição de repetibilidade. Foram identificadas aquelas associadas a operação da balança, como a **Excentricidade**, referente à variação observada dos valores de massa obtidos em pesagens sob condição de repetibilidade decorrente da excentricidade do instrumento de medida, e as já citadas **Resolução, Calibração e Repetibilidade**, representando dispersão da mesma natureza daquelas na operação de equipamentos de medição volumétrica. Foi apontada a fonte **Recuperação**, referente à dispersão observada nos valores de recuperação e utilizados para operar correções nas determinações. E por fim, a fonte representada por **Precisão**, referente à reprodutibilidade intermediária.

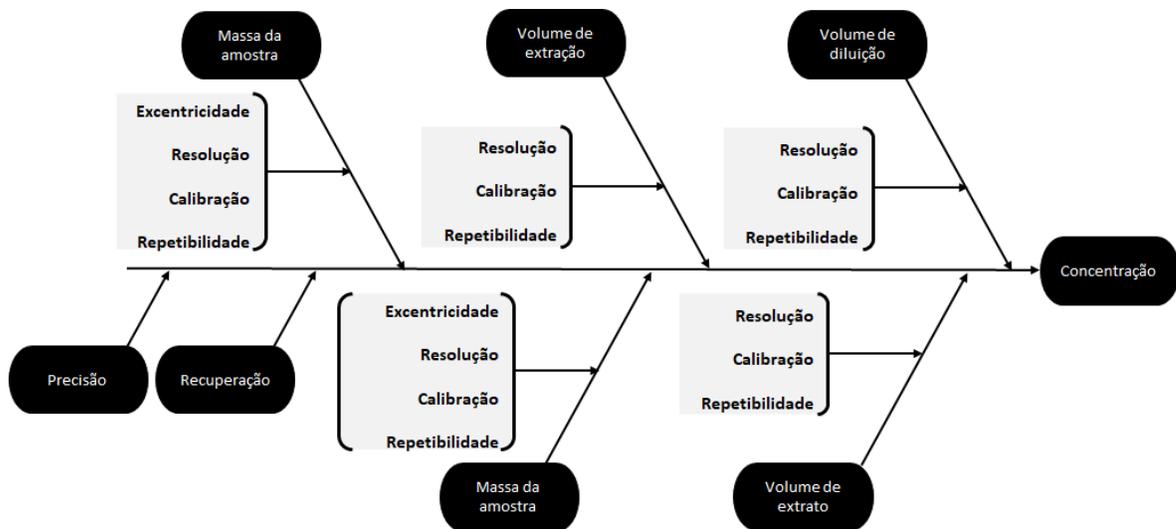


Figura 11: Diagrama de Ishikawa para representar a relação de causa e efeito de fontes de incerteza na determinação multianalito

Quantificação de incertezas padrão

A quantificação das incertezas padrão será realizada para cada uma das fontes de incerteza.

Incerteza padrão de volume

Para as fontes de incerteza associadas à medição de volume, $V_{\text{extraction}}$, V_{extract} e V_{dilution} foram identificados, para cada uma delas, três outras fontes secundárias de incerteza, das quais uma é do Tipo A, referente a repetibilidade (L), e duas do Tipo B, resolução (L) e calibração (L). As incertezas padrão associadas à resolução foram aquelas relatadas pelo fabricante dos instrumentos usados, as incertezas padrão em relação à calibração utilizada foram aquelas obtidas em certificados de calibração das micropipetas utilizadas, as incertezas padrão em relação à repetibilidade foram estimadas em uma verificação realizada no próprio laboratório, sob a condição de repetibilidade e em volume igual àquele em que o instrumento foi utilizado para a análise.

As incertezas de cada uma das fontes foram combinadas, aplicando a lei de propagação de incerteza. As informações metrológicas das micropipetas utilizadas em procedimentos analíticos relativos a estas medidas de volume são apresentadas na Tabela 11 e as funções utilizadas para combinar as incertezas padrão de fontes secundárias para a estimativa da incerteza padrão das fontes relacionadas com as medições de volume são expressas nas equações Equação 15 a Equação 17.

Tabela 11: Dados metrológicos dos instrumentos de medição

Categoria	Fonte	Incerteza / unidade	Tipo	f.d.p.*
Volume de diluição	Resolução	0,00005 (L)	B	Retangular
	Calibração	0,00015 (L)	B	Normal
	Repetibilidade	0,0003 (L)	A	Normal
Volume de extração	Resolução	0,00005 (L)	B	Retangular
	Calibração	0,00015 (L)	B	Normal
	Repetibilidade	0,0003 (L)	A	Normal
Volume de extrato	Resolução	0,00005 (L)	B	Retangular
	Calibração	0,00015 (L)	B	Normal
	Repetibilidade	0,0003 (L)	A	Normal
Massa da amostra	Resolução	0,00000005 (kg)	B	Retangular
	Calibração	0,000075(kg)	B	Normal
	Excentricidade	0,000075(kg)	B	Normal
	Repetitividade	0,00015(kg)	A	Normal

*Função de distribuição de probabilidade

Equação 15

$$uV_{\text{extraction}} = \sqrt{(V_{\text{extraction}})u_{\text{repeatability}}^2 + (V_{\text{extraction}})u_{\text{calibration}}^2 + (V_{\text{extraction}})u_{\text{resolution}}^2 + (V_{\text{extraction}})u_{\text{var.temperature}}^2}$$

Equação 16

$$uV_{\text{extract}} = \sqrt{(V_{\text{extract}})u_{\text{repeatability}}^2 + (V_{\text{extract}})u_{\text{calibration}}^2 + (V_{\text{extract}})u_{\text{resolution}}^2 + (V_{\text{extract}})u_{\text{var.temperature}}^2}$$

Equação 17

$$uV_{\text{dilution}} = \sqrt{(V_{\text{dilution}})u_{\text{repeatability}}^2 + (V_{\text{dilution}})u_{\text{calibration}}^2 + (V_{\text{dilution}})u_{\text{resolution}}^2 + (V_{\text{dilution}})u_{\text{var.temperature}}^2}$$

Sendo $uV_{\text{extraction}}$ a incerteza padrão em relação a etapa de adição do volume de solução de extração e $V_{\text{extração}}$ é o volume da solução de extração usado; uV_{extract} a incerteza padrão quanto à etapa de adição do extrato para diluição e V_{extract} o volume de extrato utilizado; uV_{dilution} a incerteza padrão quanto à adição da solução de diluição ao extrato e V_{dilution} o volume da solução de diluição utilizada; $u_{\text{repeatability}}$ referindo-se à incerteza do padrão de repetibilidade; $u_{\text{calibration}}$ referente à incerteza do padrão de calibração; $u_{\text{resolution}}$ referindo-se à incerteza do padrão de resolução e $u_{\text{var.temperature}}$ referindo-se à incerteza do padrão associada à variação de temperatura.

Incerteza padrão de massa

Foram identificadas quatro fontes de incerteza associadas a medição de massa da amostra, elas são a resolução, do Tipo A (kg), e as fontes da calibração Tipo B (kg), excentricidade (kg) e repetibilidade (kg). As informações fornecidas pelo fabricante da balança operada foram usadas para estabelecer a incerteza padrão associada à resolução, a

incerteza padrão associada à calibração e excentricidade foram obtidas a partir do certificado de calibração do instrumento, e a incerteza associada à repetibilidade foi calculada a partir de medições de massa realizada na balança, em condições de repetibilidade com peso padrão em massa próxima à utilizada na coleta da amostra para análise.

Foi então utilizada a lei de propagação da incerteza, para combinar as incertezas-padrão de cada uma das fontes acima mencionadas que compõem a incerteza padrão da massa e estão presentes na Equação 18:

Equação 18

um_{sample}

$$= \sqrt{(m_{sample})u_{repeatability}^2 + (m_{sample})u_{calibration}^2 + (m_{sample})u_{resolution}^2 + (m_{sample})u_{eccentricity}^2}$$

Onde um_{sample} representa a incerteza padrão da medição da massa da amostra, $urepeatability$ representando a incerteza padrão da repetibilidade, $ucalibration$ representando a incerteza padrão da calibração; $uresolution$ representa a incerteza padrão da resolução e a $ueccentricity$ representa a incerteza da excentricidade padrão.

Curva de calibração

No procedimento adotado para determinar a concentração de resíduos e contaminantes em alimentos, optou-se por utilizar uma curva de calibração que relaciona a resposta instrumental a uma determinada concentração utilizando uma função matemática obtida pelo método de Mínimos Quadrados Lineares, que é descrita aqui como uma curva de calibração analítica. Foram identificadas quatro fontes de incerteza que contribuem para a incerteza da estimativa da concentração usando a curva de calibração, uma associada a obtenção da área

do pico cromatográfico relacionado com o analito, cuja incerteza padrão foi obtida por cálculo do desvio padrão da área cromatografia, deste modo do Tipo A. As outras fontes de incerteza associadas a curva de calibração identificadas são: a incerteza do cálculo do intercepto **a** e a incerteza associada ao cálculo da inclinação **b** ($L\text{ ug}^{-1}$) e a incerteza associada à covariância entre a e b $\text{cov}(a,b)$, fontes de incerteza do Tipo A. Para a estimativa da incerteza padrão de cada uma dessas fontes uma curva de calibração foi preparada em triplicata em uma condição de precisão intermediária.

Recuperação

O método analítico em estudo corrige os resultados pelo fator de recuperação, igual ao inverso da recuperação aparente estimada na análise de amostras controle, amostras em branco enriquecidas em concentrações conhecidas. A incerteza associada a esta fonte foi estimada usando o desvio padrão calculado entre os fatores de correção de recuperação obtidos da análise de amostras de controle em condições de precisão intermediária.

Precisão intermediária

Embora sejam as fontes de incerteza associadas à repetibilidade dos instrumentos de medição de massa e volume contempladas individualmente, bem como aquelas associadas a obtenção de picos cromatográficos e sua integração, incluiu-se uma fonte de incerteza denominada de precisão intermediária μ_{Prec} , do Tipo A, que visa abordar as incertezas associado à variação entre os lotes de amostras, preparação de amostras, a variação inerente ao ensaio realizado por vários analistas, entre outros. A incerteza padrão para esta fonte foi calculada estimando o desvio padrão das amostras de controle preparadas e testadas durante três dias diferentes, por dois analistas.

Calculando a incerteza combinada e expandida do mensurando

Para estimar a incerteza de medição combinada em relação às determinações feitas sob este método analítico, as incertezas padrão de cada fonte foram combinadas pela aplicação da lei de propagação da incerteza e os coeficientes de sensibilidade para cada uma dessas fontes foram calculados como a derivada parcial para as grandezas de entrada representadas na função de medição, expressa na Equação 19 a Equação 26

Equação 19

$$\frac{\partial x}{\partial a} = - \frac{V_{\text{extraction}} \cdot V_{\text{extract}} + V_{\text{extraction}} \cdot V_{\text{dilution}}}{b \cdot V_{\text{extract}} \cdot \text{Rec} \cdot m_{\text{sample}}}$$

Equação 20

$$\frac{\partial x}{\partial b} = - \frac{(A \cdot V_{\text{extraction}} - a \cdot V_{\text{extraction}}) \cdot (V_{\text{extract}} + V_{\text{dilution}})}{m_{\text{sample}} \cdot V_{\text{extract}} \cdot \text{Rec} \cdot b^2}$$

Equação 21

$$\frac{\partial x}{\partial V_{\text{extraction}}} = \frac{A \cdot V_{\text{extract}} - a \cdot V_{\text{extract}} + A \cdot V_{\text{dilution}} - a \cdot V_{\text{dilution}}}{b \cdot V_{\text{extract}} \cdot \text{Rec} \cdot m_{\text{sample}}}$$

Equação 22

$$\frac{\partial x}{\partial m_{\text{sample}}} = - \frac{(A \cdot V_{\text{extraction}} - a \cdot V_{\text{extraction}}) \cdot (V_{\text{extract}} + V_{\text{dilution}})}{b \cdot V_{\text{extract}} \cdot \text{Rec} \cdot m_{\text{sample}}^2}$$

Equação 23

$$\frac{\partial x}{\partial V_{\text{extract}}} = \frac{(A \cdot V_{\text{extraction}} - a \cdot V_{\text{extraction}}) \cdot V_{\text{dilution}}}{b \cdot m_{\text{sample}} \cdot \text{Rec} \cdot V_{\text{extract}}^2}$$

Equação 24

$$\frac{\partial x}{\partial V_{\text{dilution}}} = \frac{A \cdot V_{\text{extraction}} - a \cdot V_{\text{extraction}}}{b \cdot V_{\text{extract}} \cdot \text{Rec} \cdot m_{\text{sample}}}$$

Equação 25

$$\frac{\partial x}{\partial Rec} = - \frac{(A \cdot V_{extraction} - a \cdot V_{extraction}) \cdot (V_{extract} + V_{dilution})}{b \cdot m_{sample} \cdot V_{extract} \cdot Rec^2}$$

Equação 26

$$\frac{\partial x}{\partial C_{repro}} = 1$$

Em seguida, a incerteza expandida foi calculada usando uma probabilidade de 95% e um fator de abrangência igual a 2,00 foi aplicado.

Estimativa da incerteza de medição usando o método *Top-down*

Em contraponto ao método *Bottom-up* apresentado acima, a incerteza de medição também foi estimada pela estratégia *Top-down* e, para tanto, foi usada a publicação CAC/GL 59-2006 (European Commission, 2011). Dentre as várias metodologias de estimativa da incerteza de medição apresentadas por este guia, foi escolhida aquela que utiliza dados de amostras de controle. A utilização de resultados obtidos em ensaios de proficiência seria a opção mais recomendada, mas devido à disponibilidade limitada de estudos colaborativos para ensaios multianalitos na diversidade de matrizes e analitos necessários, seu uso não foi uma opção viável para este estudo.

Para a estimativa da incerteza com base na metodologia selecionada, foram utilizados dados de validação, onde amostras em branco foram fortificadas em concentração controlada e submetidas a testes de repetibilidade e precisão intermediária.

A incerteza de medição relativa será o resultado da combinação das incertezas padrão relativas associadas à recuperação urec, estimada pelo desvio padrão relativo dos valores de recuperação obtidos nos testes de validação; e a incerteza relativa padrão associada à precisão intermediária uprec, estimada pelo desvio padrão relativo dos valores de concentração,

obtidos nos testes de validação em condições de precisão intermediária, ao longo de três dias de testes e realizados por diferentes analistas. A combinação dessas duas fontes é apresentada pela Equação 27

Equação 27

$$u' = \sqrt{u_{rec}^2 + u_{prec}^2}$$

Sendo que u' representa a incerteza combinada, u_{rec} representa a incerteza de recuperação e u_{prec} representa a incerteza de precisão intermediária.

Após esta etapa, a incerteza expandida relativa (U) é calculada multiplicando-se a incerteza combinada relativa pelo fator de abrangência (k), que, neste caso, para uma probabilidade de 95%, será adotado valor igual a 2. A Equação 28 representa esta operação.

Equação 28

$$U = u' \cdot k$$

Valores de incerteza de medição obtidos

Após aplicar o método de estimativa de incerteza de medição *Bottom-up* (Figura 12, Figura 14 e Figura 16), e *Top-down* (Figura 13, Figura 15 e Figura 17), descritos anteriormente, sobre os dados de validação para os 680 compostos, nas matrizes de alimentos arroz, damasco e feijão.

As figuras (da Figura 12 a Figura 17) apresentam a distribuição dos valores de incerteza de medição relativa estimados para a determinação dos 680 analitos em estudo, para cada uma das matrizes. Ao se analisar os histogramas, podemos observar que há pouca diferença entre aqueles que descrevem os resultados obtidos por metodologias de cálculo distintas, em

todas as matrizes. Isso se dá em virtude da relevância que a fonte de incerteza referente a estimativa da precisão intermediária possui sobre as duas metodologias de cálculo. Como as duas abordagens tem nesta fonte a maior contribuição para a incerteza combinada total, a sua variação modula o resultado em ambas.

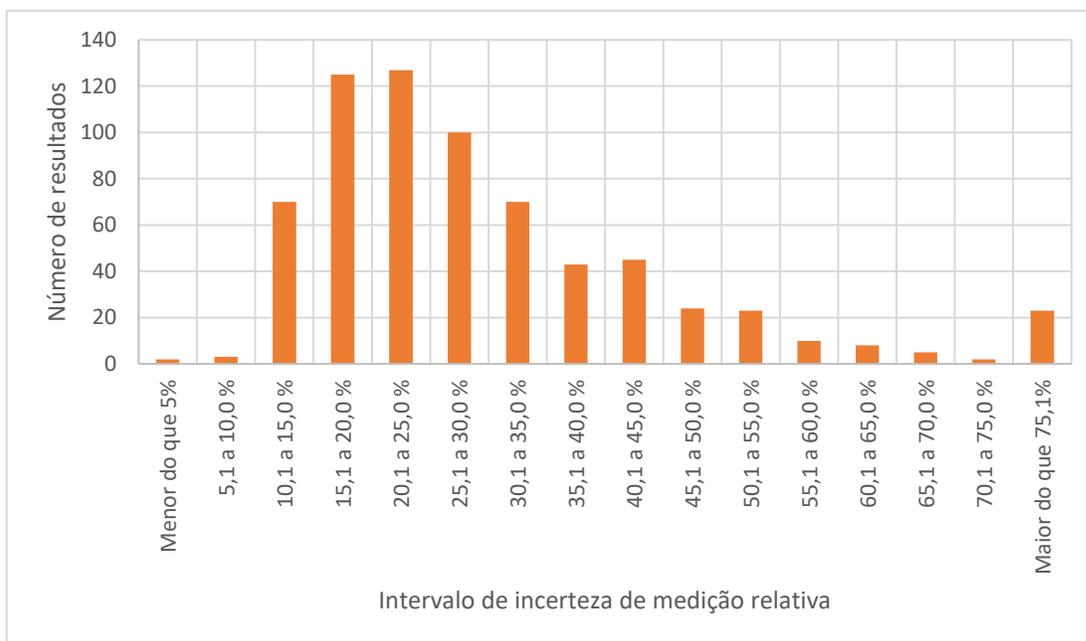


Figura 12: Distribuição dos valores de incerteza de medição relativa obtidos pelo método Bottom-up para dados de validação em arroz.

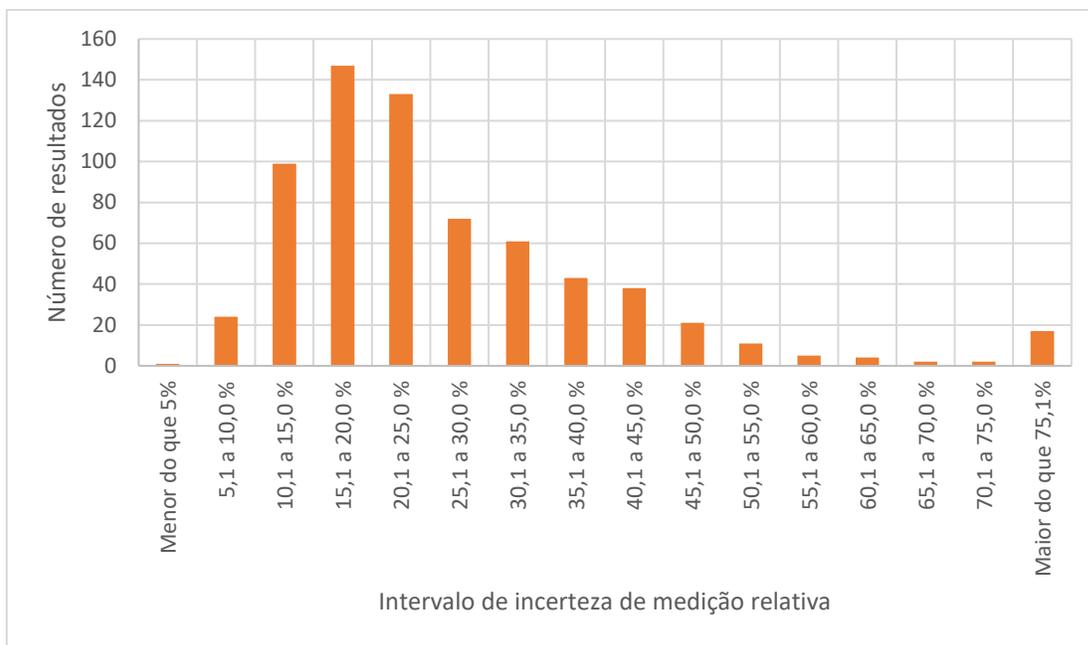


Figura 13: Distribuição dos valores de incerteza de medição relativa obtidos pelo método *Top-down* para dados de validação em arroz

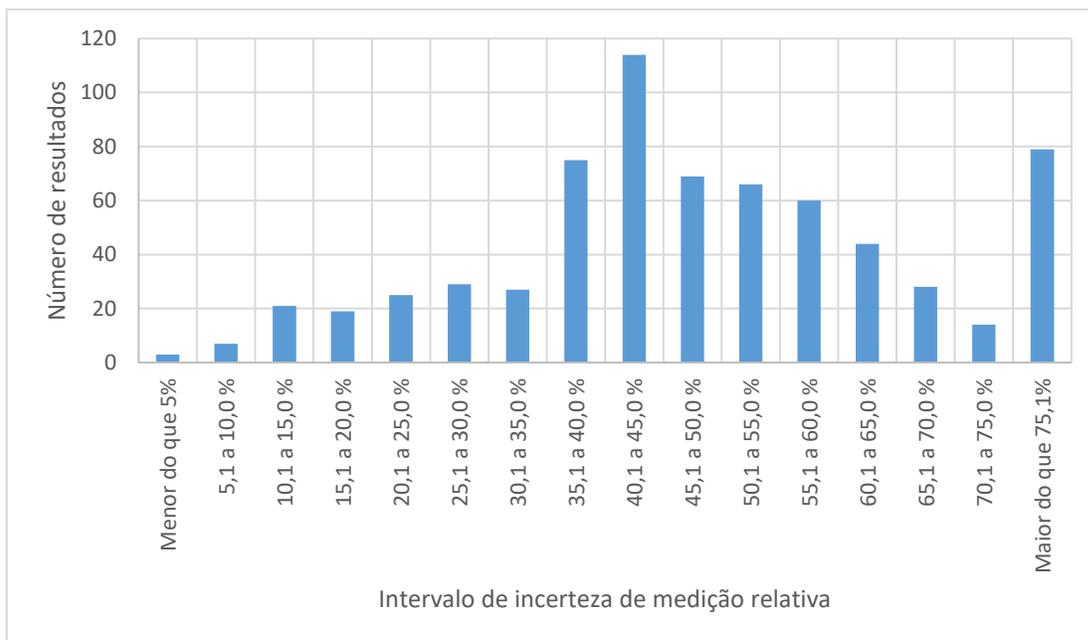


Figura 14: Distribuição dos valores de incerteza de medição relativa obtidos pelo método *Bottom-up* para dados de validação em damasco.

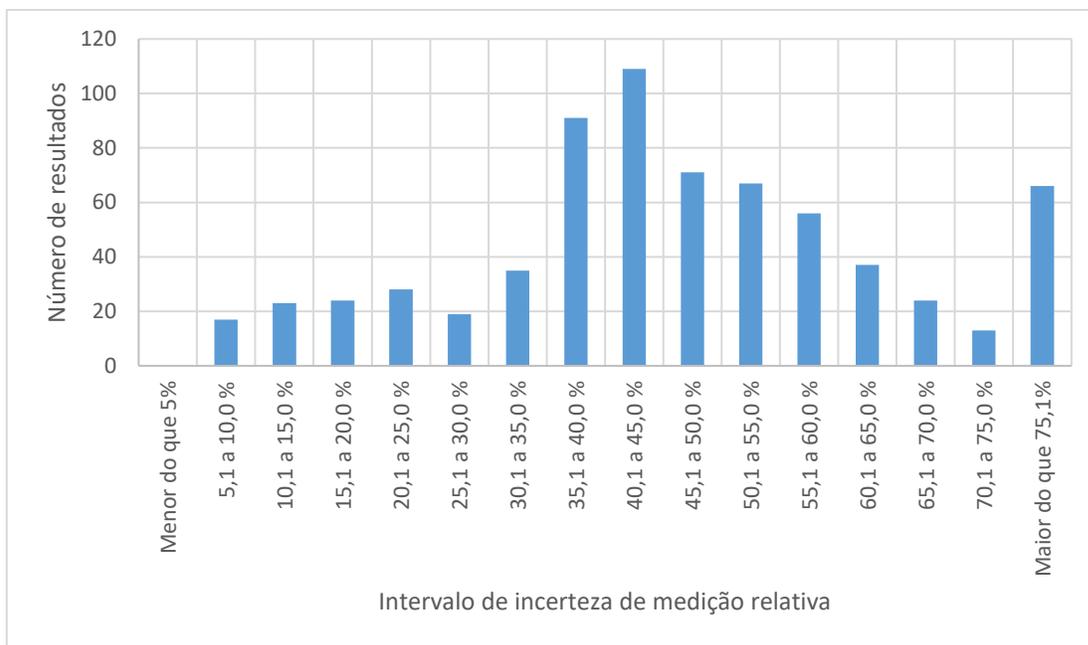


Figura 15: Distribuição dos valores de incerteza de medição relativa obtidos pelo método *Top-down* para dados de validação em damasco

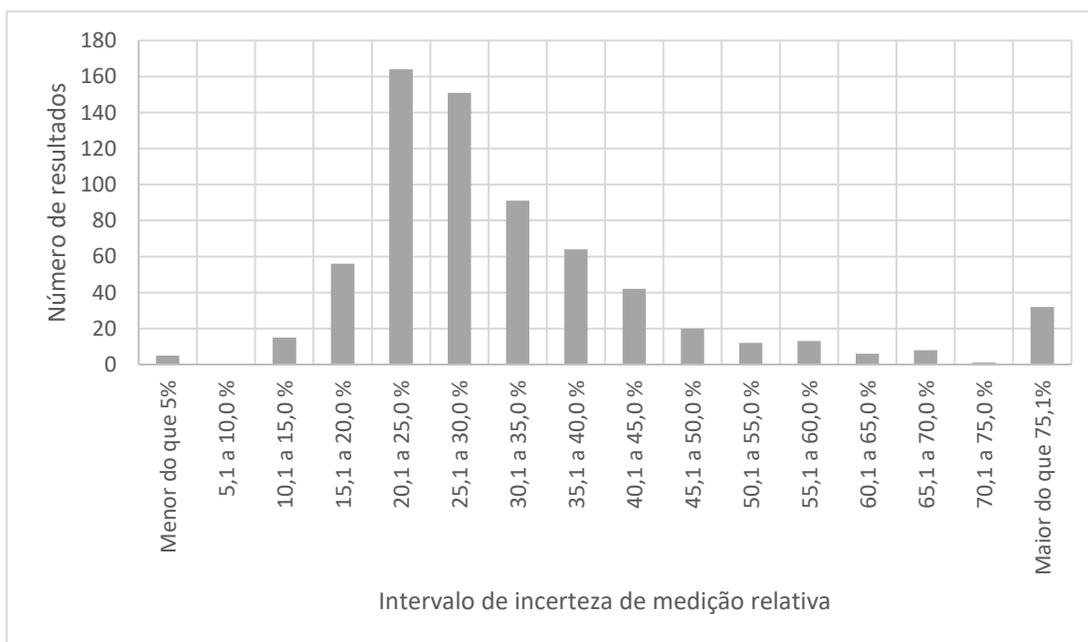


Figura 16: Distribuição dos valores de incerteza de medição relativa obtidos pelo método *Bottom-up* para dados de validação em feijão.

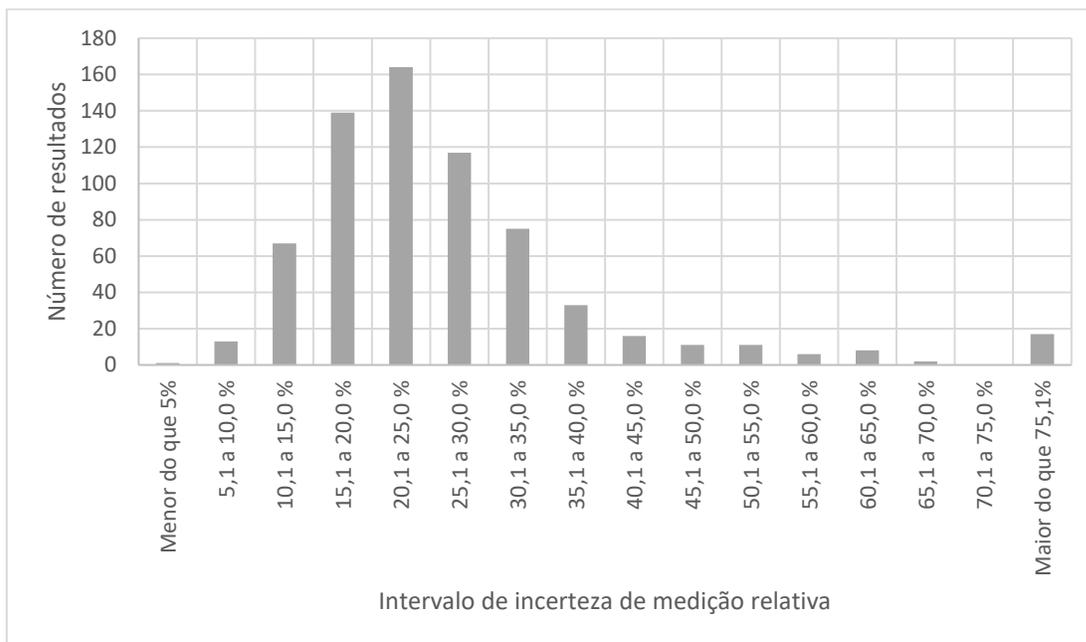


Figura 17: Distribuição dos valores de incerteza de medição relativa obtidos pelo método *Top-down* para dados de validação em feijão

Porém, ao analisarmos as medias dos valores de incerteza de medição relativa obtidos para cada um para os métodos de cálculo *Bottom-up* e *Top-down*, respectivamente 33 e 30 % para a validação em arroz, 52 e 53 % para os dados obtidos em damasco e 32 e 28 % para os dados obtidos em feijão; podemos observar valores de incerteza de medição levemente mais baixos ao se adotar a abordagem *Top-down*.

6.3. Conclusão

Diversas metodologias para a estimativa da incerteza de medição foram propostas ao longo do tempo, e guardam metodologias de cálculo distintas, se tornando de grande importância a seleção dos procedimentos mais adequados à finalidade das medições.

Neste trabalho foram utilizados dados de validação de um método analítico desenvolvido para a determinação multianalito de micotoxinas pesticidas e medicamentos

veterinários alimentos pelo emprego de método de dextração *dilute and shoot* e cromatografia líquida de ultra performance acoplada a espectrometria de massas sequencial. Estes dados subsidiaram a estimativa da incerteza de medição por duas metodologias distintas que se destacam na literatura, o método *Bottom-up* proposto pelo GUM, mais laborioso, e o método *Top-down* proposto pelo CODEX, mais simples.

A análise dos resultados apontou pequena diferença entre os resultados obtidos pelas duas metodologias e grande similaridade na distribuição dos valores de incerteza de medição relativa obtidos para os diversos analitos em estudo.

Portanto, é possível concluir que a opção por qualquer um dos dois métodos de estimativa de incerteza de medição avaliados levaria a resultados semelhantes, não havendo riscos de subestimação da incerteza de medição pela adoção do método *Top-down*, tendo em vista o sistema analítico em estudo.

É ainda importante apontar que a estimativa de incerteza pode constituir uma ferramenta importante para o controle da qualidade de ensaios e a conformidade do sistema de análise, em especial se as fontes de incerteza são estudadas de forma independente e exaustiva, uma particularidade da abordagem *Bottom-up*. Cabendo ao analista o julgamento de quais estratégias são mais convenientes ambiente analítico em que são realizadas as determinações.

7. PUBLICAÇÕES ORIUNDAS DA TESE

Artigo publicado pela revista FOOD ANALYTICAL METHODS em 2020, de autoria de Lucas Pinto da Silva, Eugenia Azevedo Vargas, Fernando Diniz Madureira, Adriana Ferreira Faria, Rodinei Augusti, intitulado: **“Development and validation of a novel analytical method to quantify aflatoxins in baby food samples by employing dispersive solid phase extraction with multi-walled carbon nanotubes”**
<https://doi.org/10.1007/s12161-020-01778-4>

Artigo submetido à revista WORLD MYCOTOXIN JOURNAL em 2020, de autoria de Lucas Pinto da Silva; Ariane Sara Santos; Eugenia Azevedo Vargas; Fernando Diniz Madureira; Rodinei Augusti; Adriana Ferreira Faria, intitulado: **“Validation of an analytical method based on QuEChERS and LC-MS/MS to quantify nine mycotoxins in vegetable milk”**.

8. REFERÊNCIAS

- Abastecimento, B.M. da A.P. e, 2011. Manual de garantia da qualidade analítica, 1st ed. Brasília.
- Abreu, D.C.P., da Silva Oliveira, F.A., Vargas, E.A., Madureira, F.D., Magalhães, E.J., da Silva, L.P., Saczk, A.A., 2020. Methodology development based on “dilute and shoot” and QuEChERS for determination of multiple mycotoxins in cocoa by LC-MS/MS. *Anal. Bioanal. Chem.* 412, 1757–1767. <https://doi.org/10.1007/s00216-020-02390-5>
- Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2011. Resolução - rdc nº - 7, de 18 de fevereiro de 2011 Dispõe sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos. *Diário Of. da União* 9 mar., 66–67.
- Alshannaq, A., Yu, J.H., 2017. Occurrence, toxicity, and analysis of major mycotoxins in food. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 14. <https://doi.org/10.3390/ijerph14060632>
- Andrade, P.D., Dantas, R.R., Moura-Alves, T.L. da S. de, Caldas, E.D., 2017. Determination of multi-mycotoxins in cereals and of total fumonisins in maize products using isotope labeled internal standard and liquid chromatography/tandem mass spectrometry with positive ionization. *J. Chromatogr. A* 1490, 138–147. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.02.027>
- ANVISA, 2002. RESOLUÇÃO-RDC Nº 222, DE 5 DE AGOSTO DE 2002.
- Ayazi, Z., Rafighi, P., 2015. Preparation and application of a carbon nanotube reinforced polyamide-based stir bar for sorptive extraction of naproxen from biological samples prior to its spectrofluorometric determination. *Anal. Methods* 7, 3200–3210. <https://doi.org/10.1039/c4ay02734e>
- Bandeira, R.D. da C.C., Uekane, T.M., Cunha, C.P. da, Cunha, V.S. da, Rodrigues, J.M., Godoy, R.L. de O., la Cruz, M.H.C. de, 2012. Development and validation of a method for detection and quantification of ochratoxin A in green coffee using liquid chromatography coupled to mass spectrometry. *Food Sci. Technol.* 32, 775–782. <https://doi.org/10.1590/s0101-20612012005000120>
- Baynes, R.E., Dedonder, K., Kissell, L., Mzyk, D., Marmulak, T., Smith, G., Tell, L., Gehring, R., Davis, J., Riviere, J.E., 2016. Health concerns and management of select veterinary drug residues. *Food Chem. Toxicol.* 88, 112–122. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2015.12.020>

- Beltrán, E., Ibáñez, M., Sancho, J.V., Cortés, M.Á., Yus, V., Hernández, F., 2011. UHPLC-MS/MS highly sensitive determination of aflatoxins, the aflatoxin metabolite M1 and ochratoxin A in baby food and milk. *Food Chem.* 126, 737–744.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.11.056>
- Bennett, J.W., Klich, M., 2003. J. W. Bennett 1 * and M. Klich 2. *Society* 16, 497–516.
<https://doi.org/10.1128/CMR.16.3.497>
- Berthiller, F., Maragos, C.M., Dall’Asta, C., 2016. Chapter 1: Introduction to masked mycotoxins. *Issues Toxicol.* 2016-Janua, 1–13.
<https://doi.org/10.1039/9781782622574-00001>
- Beyene, T., 2016. *Veterinary Science & Technology Veterinary Drug Residues in Food-animal Products : Its Risk Factors and Potential Effects on Public Health* 7, 1–7.
<https://doi.org/10.4172/2157-7579.1000285>
- Bich, W., Cox, M.G., Harris, P.M., 2006. Evolution of the “guide to the expression of uncertainty in measurement.” *Metrologia* 43. <https://doi.org/10.1088/0026-1394/43/4/S01>
- Brase, S., Glaser, F., Kramer, C.S., Lindner., S., Linsenmeier, A.M., Masters, K.-S., Meister, A.C., Ruff, B.M., Zhong, S., 2013. *The Chemistry of Mycotoxins*. Springer-Verlag. <https://doi.org/10.1007/978-3-7091-1312-7>
- Burns, L.E., Borts, D.J., 2019. *Analytica Chimica Acta Rapid untargeted screening for drug residues in animal tissues with liquid microjunction surface sampling probe mass spectrometry.* *Anal. Chim. Acta* 1063, 75–81.
<https://doi.org/10.1016/j.aca.2019.01.029>
- Buszewski, B., Szultka, M., 2012. Past, Present, and Future of Solid Phase Extraction: A Review. *Crit. Rev. Anal. Chem.* 42, 198–213.
<https://doi.org/10.1080/07373937.2011.645413>
- Café, ssociação B. da I. de, 2019. O café brasileiro na atualidade [WWW Document]. URL <https://www.abic.com.br/o-cafe/historia/o-cafe-brasileiro-na-atualidade-2/> (accessed 11.21.20).
- Cano-Marquina, A., Tarín, J.J., Cano, A., 2013. The impact of coffee on health. *Maturitas* 75, 7–21. <https://doi.org/10.1016/j.maturitas.2013.02.002>
- Carlos Magno Mesquita, 2016. *Manual do café*. EMATER-MG, Belo Horizonte.

- Carvalho, K.L., Gonçalves, G.A.A., Lopes, A.L., Santos, E.A., Vargas, E.A., Magalhães, W.F., 2012. Modelling uncertainty estimation for the determination of aflatoxin M1 in milk by visual and densitometric thin-layer chromatography with immunoaffinity column clean-up. *Food Addit. Contam. - Part A Chem. Anal. Control. Expo. Risk Assess.* 29, 679–693. <https://doi.org/10.1080/19440049.2011.648959>
- Castegnaro, M., Tozlovanu, M., Wild, C., Molinié, A., Sylla, A., Pfohl-Leszkowicz, A., 2006. Advantages and drawbacks of immunoaffinity columns in analysis of mycotoxins in food. *Mol. Nutr. Food Res.* 50, 480–487. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200500264>
- Chiralt, A., 2014. Vegetable milks and their fermented derivative products 3, 93–124.
- da Silva, L.P., Madureira, F., de Azevedo Vargas, E., Faria, A.F., Augusti, R., 2019. 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. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.07.126>
- De Almeida, A.P., Alaburda, J., Shundo, L., Ruvieri, V., Navas, S.A., Lamardo, L.C.A., Sabino, M., 2007. Ochratoxin A in Brazilian instant coffee. *Brazilian J. Microbiol.* 38, 300–303. <https://doi.org/10.1590/s1517-83822007000200022>
- Di Nardo, F., Baggiani, C., Giovannoli, C., Spano, G., Anfossi, L., 2017. Multicolor immunochromatographic strip test based on gold nanoparticles for the determination of aflatoxin B1 and fumonisins. *Microchim. Acta* 184, 1295–1304. <https://doi.org/10.1007/s00604-017-2121-7>
- Dong, M., Si, W., Wang, W., Bai, B., Nie, D., Song, W., Zhao, Z., Guo, Y., Han, Z., 2016. Determination of type A trichothecenes in coix seed by magnetic solid-phase extraction based on magnetic multi-walled carbon nanotubes coupled with ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* 408, 6823–6831. <https://doi.org/10.1007/s00216-016-9809-0>
- Dong, M.W., 2019. HPLC and UHPLC for practicing scientists, Second Edi. ed. Wiley.
- Es'haghi, Z., Beheshti, H.R., Feizy, J., 2014. Extraction of aflatoxins from food samples using graphene-based magnetic nanosorbents followed by high-performance liquid chromatography: A simple solution to overcome the problems of immunoaffinity columns. *J. Sep. Sci.* 37, 2566–2573. <https://doi.org/10.1002/jssc.201400260>

- European Commission, 2011. Guidelines on Estimation of Uncertainty of Results (Cac/GI 59-2006). Codex Aliment. 1–16.
- European Commission, 2006. Regulamento (CE) nº 401/2006 da Comissão, de 23 de Fevereiro de 2006 , que estabelece os métodos de amostragem e de análise para o controlo oficial dos teores de micotoxinas nos géneros alimentícios. J. Of. da União Eur. L70, 12–34.
- European Commission, 2002. Decisão da comissão de 12 de agosto de 2002 que dá execução ao disposto na Diretiva 96/23/CE do Conselho relativamente ao desempenho de métodos analíticos e à interpretação de resultados. J. Of. das Comunidades Eur. 1–29.
- European Commission DG-SANTE, 2019. Method Validation Procedures for Pesticide Residues Analysis.
- Fabbri, A., Cevoli, C., Alessandrini, L., Romani, S., 2011. Numerical modeling of heat and mass transfer during coffee roasting process. J. Food Eng. 105, 264–269.
<https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2011.02.030>
- Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2017. FAOSTAT [WWW Document]. URL <http://www.fao.org/faostat/en/>
- Frenich, A.G., Romero-González, R., del Mar Aguilera-Luiz, M., 2014. Comprehensive analysis of toxics (pesticides, veterinary drugs and mycotoxins) in food by UHPLC-MS. TrAC - Trends Anal. Chem. 63, 158–169.
<https://doi.org/10.1016/j.trac.2014.06.020>
- García-Moraleja, A., Font, G., Mañes, J., Ferrer, E., 2015a. Development of a new method for the simultaneous determination of 21 mycotoxins in coffee beverages by liquid chromatography tandem mass spectrometry. Food Res. Int. 72, 247–255.
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.02.030>
- García-Moraleja, A., Font, G., Mañes, J., Ferrer, E., 2015b. Simultaneous determination of mycotoxin in commercial coffee. Food Control 57, 282–292.
<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.04.031>
- Grosch, W., 1998. Flavour of coffee. A review. Nahrung - Food 42, 344–350.
[https://doi.org/10.1002/\(sici\)1521-3803\(199812\)42:06<344::aid-food344>3.0.co;2-v](https://doi.org/10.1002/(sici)1521-3803(199812)42:06<344::aid-food344>3.0.co;2-v)
- Hall, B.D., 2016. Evaluating the measurement uncertainty of complex quantities : a

- selective review. *Metrologia* 25, S25. <https://doi.org/10.1088/0026-1394/53/1/S25>
- Hampel, B., Liu, B., Nording, F., Ostermann, J., Struszewski, P., Langfahl-Klabes, J., Bieler, M., Bosse, H., Güttler, B., Lemmens, P., Schilling, M., Tutsch, R., 2018. Approach to determine measurement uncertainty in complex nanosystems with multiparametric dependencies and multivariate output quantities. *Meas. Sci. Technol.* 29. <https://doi.org/10.1088/1361-6501/aa9d70>
- Han, Z., Jiang, K., Fan, Z., Diana Di Mavungu, J., Dong, M., Guo, W., Fan, K., Campbell, K., Zhao, Z., Wu, Y., 2017. Multi-walled carbon nanotubes-based magnetic solid-phase extraction for the determination of zearalenone and its derivatives in maize by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Food Control* 79, 177–184. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.03.044>
- Herrero-Latorre, C., Barciela-García, J., García-Martín, S., Peña-Crecente, R.M., Otárola-Jiménez, J., 2015. Magnetic solid-phase extraction using carbon nanotubes as sorbents: A review. *Anal. Chim. Acta* 892, 10–26. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.07.046>
- Higdon, J. V., Frei, B., 2006. Coffee and health: A review of recent human research. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 46, 101–123. <https://doi.org/10.1080/10408390500400009>
- Hoffmann, E., 2007. *Mass spectrometry : principles and applications*, John Wiley & Sons.
- Hossain, M.Z., Maragos, C.M., 2018. Gold nanoparticle-enhanced multiplexed imaging surface plasmon resonance (iSPR) detection of Fusarium mycotoxins in wheat. *Biosens. Bioelectron.* 101, 245–252. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2017.10.033>
- IARC, 2012. *Improving public health through mycotoxin control*. IARC Scientific Publications.
- International Agency for Research on Cancer, 2002. *International Agency for Research on Cancer Iarc Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks To Humans. Iarc Monogr. Eval. Carcinog. Risks To Humans* 96, i-ix+1-390. <https://doi.org/10.1002/food.19940380335>
- Islas, G., Ibarra, I.S., Hernandez, P., Miranda, J.M., Cepeda, A., 2017. *Dispersive Solid Phase Extraction for the Analysis of Veterinary Drugs Applied to Food Samples : A Review 2017*.
- Jiang, K., Huang, P., Luan, L., Fan, K., Guo, W., Zhao, Z., Wu, Y., Han, Z., 2017. Iron (II,

- III) oxide/multi-walled carbon nanotube composite as solid-phase extraction sorbent followed by ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry for simultaneous determination of zearalenone and type A trichothecenes in Salv. J. Chromatogr. A 1482, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2016.12.058>
- Joint Committee For Guides In Metrology, 2008. Evaluation of measurement data — Guide to the expression of uncertainty in measurement. Int. Organ. Stand. Geneva ISBN 50, 134. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2003.030528>
- Juan, C., Raiola, A., Mañes, J., Ritieni, A., 2014. Presence of mycotoxin in commercial infant formulas and baby foods from Italian market. Food Control 39, 227–236. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.10.036>
- Kang, J., Park, S., Park, H., Hossain, A., Kim, M., Son, S., Lim, C., Kim, T., Cho, B., 2017. Multiresidue Screening of Veterinary Drugs in Meat , Milk , Egg , and Fish Using Liquid Chromatography Coupled with Ion Trap Time-of-Flight Mass Spectrometry 635–652. <https://doi.org/10.1007/s12010-016-2350-y>
- Kleter, G.A., Marvin, H.J.P., 2009. Indicators of emerging hazards and risks to food safety. Food Chem. Toxicol. 47, 1022–1039. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2008.07.028>
- Knestubb, P.F., Sugden, T.M., 1958. Mass-Spectrometric Observations of Ions in Hydrocarbon Flames. Nature 181, 1261–1261. <https://doi.org/10.1038/1811261a0>
- Kovalsky, P., Kos, G., Nährer, K., Schwab, C., Jenkins, T., Schatzmayr, G., Sulyok, M., Krska, R., 2016. Co-occurrence of regulated, masked and emerging mycotoxins and secondary metabolites in finished feed and maize—An extensive survey. Toxins (Basel). 8, 1–29. <https://doi.org/10.3390/toxins8120363>
- Kuang, Y., Qiu, F., Kong, W., Luo, J., Cheng, H., Yang, M., 2013. Simultaneous quantification of mycotoxins and pesticide residues in ginseng with one-step extraction using ultra-high performance liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci. 939, 98–107. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2013.09.013>
- La Barbera, G., Capriotti, A.L., Cavaliere, C., Foglia, P., Montone, C.M., Chiozzi, R.Z., Laganà, A., 2017. A rapid magnetic solid phase extraction method followed by liquid Chromatography-Tandem mass spectrometry analysis for the determination of mycotoxins in cereals. Toxins (Basel). 9. <https://doi.org/10.3390/toxins9040147>

- Lahouar, A., Marin, S., Crespo-sempere, A., Saïd, S., Sanchis, V., 2017. International Journal of Food Microbiology Influence of temperature, water activity and incubation time on fungal growth and production of ochratoxin A and zearalenone by toxigenic *Aspergillus tubingensis* and *Fusarium incarnatum* isolates in sorghum seed. *Int. J. Food Microbiol.* 242, 53–60. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.11.015>
- Lerda, D., 2011. Mycotoxins Factsheet. *Jt. Res. Cent.* 36 pp.
- Lobeau, M., De Saeger, S., Sibanda, L., Barna-Vetró, I., Van Peteghem, C., 2005. Development of a new clean-up tandem assay column for the detection of ochratoxin A in roasted coffee. *Anal. Chim. Acta* 538, 57–61. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2005.02.010>
- Ludwig, I.A., Clifford, M.N., Lean, M.E.J., Ashihara, H., Crozier, A., 2014. Coffee: biochemistry and potential impact on health. *Food Funct.* 5, 1695–1717. <https://doi.org/10.1039/C4FO00042K>
- Ma, X., Agarwal, S., 2016. Adsorption of emerging ionizable contaminants on carbon nanotubes: Advancements and challenges. *Molecules* 21. <https://doi.org/10.3390/molecules21050628>
- Machado, L.V., Mallmann, C.A., Mallmann, A.O., Coelho, R.D., Copetti, M.V., 2017. Deoxynivalenol in wheat and wheat products from a harvest affected by fusarium head blight 37, 8–12.
- Magnusson, B., Örnemark, U., 2014. *The Fitness for Purpose of Analytical Methods – A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics (2nd ed)*, Eurachem Guide.
- Malachová, A., Stránská, M., Václavíková, M., Elliott, C.T., Black, C., Meneely, J., Hajšlová, J., Ezekiel, C.N., Schuhmacher, R., Krska, R., 2018. Advanced LC–MS-based methods to study the co-occurrence and metabolization of multiple mycotoxins in cereals and cereal-based food. *Anal. Bioanal. Chem.* 410, 801–825. <https://doi.org/10.1007/s00216-017-0750-7>
- Malachova, A., Sulyok, M., Beltrán, E., Berthiller, F., Krska, R., 2014. Optimization and validation of a quantitative liquid chromatography-tandem mass spectrometric method covering 295 bacterial and fungal metabolites including all regulated mycotoxins in four model food matrices. *J. Chromatogr. A* 1362, 145–156.

<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.08.037>

Marcó, A., Companyó, R., Rubio, R., Pueyo, M., Vilalta, E., 2007. Comparison of “bottom-up” and “top-down” strategies for the estimation of the uncertainty in organic elemental analysis. *Microchim. Acta* 159, 387–393. <https://doi.org/10.1007/s00604-007-0760-9>

Martínez-Domínguez, G., Romero-González, R., Arrebola, F.J., Garrido Frenich, A., 2016a. Multi-class determination of pesticides and mycotoxins in isoflavones supplements obtained from soy by liquid chromatography coupled to Orbitrap high resolution mass spectrometry. *Food Control* 59, 218–224. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.05.033>

Martínez-Domínguez, G., Romero-González, R., Garrido Frenich, A., 2016b. Multi-class methodology to determine pesticides and mycotoxins in green tea and royal jelly supplements by liquid chromatography coupled to Orbitrap high resolution mass spectrometry. *Food Chem.* 197, 907–915. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.11.070>

Mesnage, R., Séralini, G.-E., 2018. Editorial: Toxicity of Pesticides on Health and Environment. *Front. Public Heal.* 6, 1–2. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2018.00268>

Milani, J.M., 2013. Ecological conditions affecting mycotoxin production in cereals: A review. *Vet. Med. (Praha)*. 58, 405–411. <https://doi.org/10.17221/6979-VETMED>

Miličević, D.R., Škrinjar, M., Baltić, T., 2010. Real and Perceived Risks for Mycotoxin Contamination in Foods and Feeds: Challenges for Food Safety Control. *Toxins (Basel)*. 572–592. <https://doi.org/10.3390/toxins2040572>

Miró-Abella, E., Herrero, P., Canela, N., Arola, L., Borrull, F., Ras, R., Fontanals, N., 2017. Determination of mycotoxins in plant-based beverages using QuEChERS and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Food Chem.* 229, 366–372. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.02.078>

Molinero-Fernandez, A., Jodra, A., Moreno-Guzman, M., López, M.A., Escarpa, A., 2018. Magnetic Reduced Graphene Oxide / Nickel / Platinum Nanoparticles Micromotors for Mycotoxin Analysis. *Anal. Methods* 1, 7172–7176. <https://doi.org/10.1002/chem.201706095>

Moreno, V., Zougagh, M., Ríos, Á., 2016. Hybrid nanoparticles based on magnetic

- multiwalled carbon nanotube-nanoC₁₈SiO₂ composites for solid phase extraction of mycotoxins prior to their determination by LC-MS. *Microchim. Acta* 183, 871–880. <https://doi.org/10.1007/s00604-015-1722-2>
- Mota, M.A., Valle, V.E. de F., Moraes, M.H.P., Lima, E.S., 2014. Ochratoxin A in roasted coffee commercially sold in the city of Rio de Janeiro. *Vigilância Sanitária em Debate* 0. <https://doi.org/10.3395/2317-269x.00183>
- Movassagh, E.Z., Baxter-Jones, A.D.G., Kontulainen, S., Whiting, S.J., Vatanparast, H., 2017. Tracking dietary patterns over 20 years from childhood through adolescence into young adulthood: The saskatchewan pediatric bone mineral accrual study. *Nutrients* 9, 1–14. <https://doi.org/10.3390/nu9090990>
- Nielsen, K.F., Ngemela, A.F., Jensen, L.B., De Medeiros, L.S., Rasmussen, P.H., 2015. UHPLC-MS/MS determination of ochratoxin a and fumonisins in coffee using QuEChERS extraction combined with mixed-mode SPE purification. *J. Agric. Food Chem.* 63, 1029–1034. <https://doi.org/10.1021/jf504254q>
- Oueslati, S., Berrada, H., Mañes, J., Juan, C., 2018. Presence of mycotoxins in Tunisian infant foods samples and subsequent risk assessment. *Food Control* 84, 362–369. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.08.021>
- Pitt, J.I., 2000. Toxigenic fungi and mycotoxins. *Br. Med. Bull.* 56, 184–192. <https://doi.org/10.1258/0007142001902888>
- Quinton, L.A., Kennedy, J.F., 2001. Food Analysis by HPLC 2nd ed. *Carbohydr. Polym.* 46, 197. [https://doi.org/10.1016/S0144-8617\(01\)00201-6](https://doi.org/10.1016/S0144-8617(01)00201-6)
- Raiola, A., Tenore, G.C., Manyes, L., Meca, G., Ritieni, A., 2015. Risk analysis of main mycotoxins occurring in food for children: An overview. *Food Chem. Toxicol.* 84, 169–180. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2015.08.023>
- Reg. n°1881/2006, 2006. Regulamento (CE) n° 1881/2006 da Comissão de 19 de Dezembro de 2006. *J. Of. da União Eur.* 2006, L 364/5-L 364/24.
- Riberi, W.I., Tarditto, L.V., Zon, M.A., Arévalo, F.J., Fernández, H., 2018. Development of an electrochemical immunosensor to determine zearalenone in maize using carbon screen printed electrodes modified with multi-walled carbon nanotubes/polyethyleneimine dispersions. *Sensors Actuators, B Chem.* 254, 1271–1277. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2017.07.113>

- Richard, J.L., 2007. Some major mycotoxins and their mycotoxicoses-An overview. *Int. J. Food Microbiol.* 119, 3–10. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.07.019>
- Rogowska, A., Pomastowski, P., Sagandykova, G., Buszewski, B., 2019. Zearalenone and its metabolites : Effect on human health , metabolism and neutralisation methods 162, 46–56. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2019.03.004>
- Romero-González, R., Garrido Frenich, A., Martínez Vidal, J.L., Prestes, O.D., Grió, S.L., 2011. Simultaneous determination of pesticides, biopesticides and mycotoxins in organic products applying a quick, easy, cheap, effective, rugged and safe extraction procedure and ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1218, 1477–1485. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.01.034>
- Rubert, J., Soler, C., Mañes, J., 2012. Application of an HPLC-MS/MS method for mycotoxin analysis in commercial baby foods. *Food Chem.* 133, 176–183. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.12.035>
- SANTE/EU, 2015. Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticides residues analysis in food and feed. SANTE/11945/2015. Eur. Commisison 11945, 1–42.
- Shephard, G.S., 2016. Current status of mycotoxin analysis: A critical review. *J. AOAC Int.* 99, 842–848. <https://doi.org/10.5740/jaoacint.16-0111>
- Skoog, D.A., 2005. *Fundamentos de química analítica*, 8th ed.
- Socas-Rodríguez, B., González-Sálamo, J., Hernández-Borges, J., Rodríguez Delgado, M.Á., 2016. Application of multiwalled carbon nanotubes as sorbents for the extraction of mycotoxins in water samples and infant milk formula prior to high performance liquid chromatography mass spectrometry analysis. *Electrophoresis* 37, 1359–1366. <https://doi.org/10.1002/elps.201500581>
- Spanjer, M.C., Rensen, P.M., Scholten, J.M., 2008. LC–MS/MS multi-method for mycotoxins after single extraction, with validation data for peanut, pistachio, wheat, maize, cornflakes, raisins and figs. *Food Addit. Contam. - Part A Chem. Anal. Control. Expo. Risk Assess.* 25, 472–489. <https://doi.org/10.1080/02652030701552964>
- Taylor, Barry N, Kuyatt, C.E., 1994. NIST Technical Note 1297 Guidelines for Evaluating

- and Expressing the Uncertainty of NIST Measurement Results. Technology.
- Thompson, M., Ellison, S.L.R., Wood, R., 2002. Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis (IUPAC Technical Report). *Pure Appl. Chem.* 74, 835–855. <https://doi.org/10.1351/pac200274050835>
- Tittlemier, S.A., Cramer, B., Dall’Asta, C., Iha, M.H., Lattanzio, V.M.T., Malone, R.J., Maragos, C., Solfrizzo, M., Stranska-Zachariasova, M., Stroka, J., 2019. Developments in mycotoxin analysis: an update for 2017-2018. *World Mycotoxin J.* 12, 3–29. <https://doi.org/10.3920/WMJ2018.2398>
- Turner, N.W., Subrahmanyam, S., Piletsky, S.A., 2009. Analytical methods for determination of mycotoxins: A review. *Anal. Chim. Acta* 632, 168–180. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2008.11.010>
- Uclés Moreno, A., Herrera López, S., Reichert, B., Lozano Fernández, A., Hernando Guil, M.D., Fernández-Alba, A.R., 2015. Microflow liquid chromatography coupled to mass spectrometry-an approach to significantly increase sensitivity, decrease matrix effects, and reduce organic solvent usage in pesticide residue analysis. *Anal. Chem.* 87, 1018–1025. <https://doi.org/10.1021/ac5035852>
- Vaclavikova, M., Malachova, A., Veprikova, Z., Dzuman, Z., Zachariasova, M., Hajslova, J., 2013. “Emerging” mycotoxins in cereals processing chains: Changes of enniatins during beer and bread making. *Food Chem.* 136, 750–757. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.08.031>
- Varga, E., Glauner, T., Berthiller, F., Krska, R., Schuhmacher, R., Sulyok, M., 2013. Development and validation of a (semi-)quantitative UHPLC-MS/MS method for the determination of 191 mycotoxins and other fungal metabolites in almonds, hazelnuts, peanuts and pistachios. *Anal. Bioanal. Chem.* 405, 5087–5104. <https://doi.org/10.1007/s00216-013-6831-3>
- Vatinno, R., Aresta, A., Zambonin, C.G., Palmisano, F., 2008. Determination of Ochratoxin A in green coffee beans by solid-phase microextraction and liquid chromatography with fluorescence detection. *J. Chromatogr. A* 1187, 145–150. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.02.020>
- Vuolo, J.H., 1996. *Fundamentos da teoria de erros*, 2^a. ed.
- Yu, L., Li, P., Zhang, Q., Zhang, W., Ding, X., Wang, X., 2013. *Graphene oxide: An*

- adsorbent for the extraction and quantification of aflatoxins in peanuts by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* 1318, 27–34.
<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.10.006>
- Yu, L., Ma, F., Ding, X., Wang, H., Li, P., 2018. Silica/graphene oxide nanocomposites: Potential adsorbents for solid phase extraction of trace aflatoxins in cereal crops coupled with high performance liquid chromatography. *Food Chem.* 245, 1018–1024.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.11.070>
- Yvv, A.K., Rm, R., Bodaiah, B., Mangamu, U.K., M, V.L., Poda, S., 2016. Mycotoxin Strategies : Impact on Global Health and Wealth *Pharmaceutica Analytica Acta* 7, 1–11. <https://doi.org/10.4172/2153-2435.1000498>
- Zhang, Y., Xue, X., Su, S., Guo, Z., Wang, J., Ding, L., Liu, Y., Zhu, J., 2018. A Multi-Class, Multi-Residue Method for Detection of Veterinary Drugs in Multiple Meat Using a Pass-Through Cleanup SPE Technique and UHPLC-MS/MS Analysis. *Food Anal. Methods* 11, 2865–2884. <https://doi.org/10.1007/s12161-018-1244-8>
- Zinedine, A., Soriano, J.M., Man, J., Molto, J.C., 2007. Review on the toxicity , occurrence , metabolism , detoxification , regulations and intake of zearalenone : An oestrogenic mycotoxin 45, 1–18. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2006.07.030>

ANEXO I

Neste anexo encontra-se apresentada a tabela contendo os valores de incerteza estimados para na seção “COMPARAÇÃO DAS ESTRATÉGIAS " BOTTON-UP" E "TOP-DOWN" PARA A ESTIMATIVA DA INCERTEZA DE MEDIÇÃO NA ANÁLISE MULTIANALITO DE RESÍDUOS E CONTAMINANTES EM ALIMENTOS POR UHPLC-MS/MS”

Tabela S1: Incerteza de medição expandida estimada para cada um dos analitos por duas metodologias distintas.

Analito	Incerteza expandida estimada pelo método <i>Bottom-up</i>			Incerteza expandida estimada pelo método <i>Top-down</i>		
	Arroz	Damasco	Feijão	Arroz	Damasco	Feijão
15-Acetyldeoxynivalenol	38 %	91 %	113 %	37 %	70 %	54 %
15-Desoxyoxalicine B	35 %	88 %	43 %	33 %	60 %	26 %
15-Hydroxyculmorin	36 %	64 %	65 %	27 %	57 %	45 %
15-Hydroxyculmoron	85 %	98 %	80 %	61 %	96 %	61 %
16-Ketoaspergillimide	16 %	29 %	30 %	13 %	28 %	24 %
2,4-Dimethylanilin	64 %	61 %	36 %	61 %	59 %	31 %
3-Hydroxycarbofuran	25 %	15 %	22 %	20 %	15 %	17 %
4-Methoxycyclopeptin	32 %	56 %	36 %	27 %	54 %	31 %
5-Methylmellein	87 %	89 %	59 %	58 %	79 %	47 %
7-Hydroxykaurenolide	39 %	41 %	53 %	30 %	40 %	44 %
7-Hydroxypestalotin	27 %	20 %	28 %	21 %	20 %	28 %
Acephate	13 %	55 %	19 %	12 %	55 %	16 %
Acetamiprid	14 %	12 %	20 %	11 %	9 %	17 %
Aflatoxicol	22 %	37 %	38 %	20 %	35 %	33 %
Aflatoxin B1	24 %	42 %	30 %	23 %	40 %	28 %
Aflatoxin B2	15 %	35 %	27 %	14 %	30 %	23 %
Aflatoxin G1	34 %	26 %	37 %	34 %	24 %	31 %
Aflatoxin G2	26 %	22 %	41 %	25 %	22 %	28 %
Aflatoxin M1	20 %	47 %	24 %	19 %	46 %	22 %
Aflatoxin P1	24 %	23 %	28 %	21 %	16 %	20 %

Aflatoxin Q1	41 %	27 %	44 %	33 %	26 %	30 %
Agistatin D	23 %	29 %	29 %	20 %	24 %	16 %
Agroclavine	27 %	27 %	36 %	26 %	26 %	30 %
Albendazole sulfone	14 %	12 %	12 %	11 %	11 %	10 %
Albendazole-2-aminosulfone	26 %	8 %	21 %	24 %	6 %	13 %
Aldicarb	37 %	55 %	46 %	31 %	44 %	36 %
Aldicarb sulfone	14 %	37 %	17 %	12 %	35 %	12 %
Aldicarb-Sulfoxide	64 %	68 %	60 %	62 %	68 %	58 %
Allethrin	23 %	43 %	39 %	19 %	43 %	26 %
Amauromine	26 %	42 %	18 %	18 %	39 %	15 %
Ametoctradin	29 %	38 %	28 %	26 %	38 %	25 %
Ametryn	18 %	37 %	21 %	16 %	35 %	17 %
Amidosulfuron	18 %	65 %	33 %	15 %	65 %	28 %
Aminodimethyloctadecanol	15 %	62 %	24 %	11 %	60 %	16 %
Amygdalin	25 %	193 %	34 %	23 %	193 %	22 %
Ancymidol	28 %	39 %	24 %	24 %	38 %	22 %
Anilofos	20 %	31 %	25 %	16 %	30 %	21 %
Anisodamine	15 %	23 %	25 %	14 %	23 %	24 %
Anisomycin	18 %	15 %	26 %	16 %	14 %	25 %
Antibiotic F 1849 A	35 %	48 %	23 %	26 %	43 %	18 %
Antibiotic Y	140 %	235 %	128 %	130 %	265 %	135 %
Aristolochic acid A	68 %	65 %	49 %	46 %	60 %	40 %
Aspergillimide	15 %	21 %	23 %	13 %	16 %	20 %
Asperloxine A	21 %	56 %	33 %	19 %	56 %	31 %
Aspinolid B	44 %	67 %	40 %	36 %	66 %	38 %
Aspinonene	20 %	7 %	18 %	16 %	6 %	13 %
Aspochalasin D	37 %	48 %	30 %	34 %	38 %	22 %
Aspochalasin I	20 %	43 %	34 %	17 %	42 %	26 %
Aspochalasin J	26 %	50 %	29 %	22 %	48 %	22 %
Aspochracin	22 %	55 %	35 %	21 %	51 %	28 %
Aspon	15 %	41 %	31 %	15 %	40 %	29 %
Asteltoxin	42 %	63 %	65 %	35 %	61 %	49 %
Asterriquinonedimethylether	60 %	97 %	49 %	55 %	94 %	31 %
Asulam	20 %	58 %	13 %	19 %	56 %	10 %
Atrazin	43 %	60 %	31 %	41 %	57 %	27 %
Atrazin-Desisopropyl	25 %	24 %	15 %	19 %	23 %	8 %
Atrazine-desethyl	35 %	18 %	31 %	33 %	17 %	21 %

Austalide A	13 %	51 %	42 %	11 %	50 %	12 %
Austalide B	12 %	50 %	18 %	11 %	49 %	10 %
Austalide Derivative	21 %	61 %	25 %	19 %	59 %	14 %
Austalide F	24 %	38 %	44 %	22 %	36 %	32 %
Austamide	21 %	78 %	48 %	19 %	76 %	37 %
Austocystin A	32 %	55 %	26 %	31 %	55 %	23 %
Austocystin B	14 %	52 %	21 %	9 %	46 %	15 %
Austocystin I	66 %	90 %	16 %	45 %	73 %	13 %
Australide D	33 %	58 %	34 %	29 %	57 %	28 %
Australide F	42 %	36 %	49 %	40 %	34 %	37 %
Averufin Derivat	10 %	55 %	20 %	9 %	55 %	15 %
Azaconazol	44 %	70 %	34 %	43 %	66 %	30 %
Azamephos	24 %	43 %	27 %	23 %	43 %	26 %
Azinphos-ethyl	70 %	57 %	65 %	46 %	54 %	46 %
Azinphos-methyl	30 %	51 %	33 %	28 %	49 %	24 %
Azoxystrobin	20 %	43 %	20 %	18 %	42 %	18 %
Bassianolide	22 %	47 %	40 %	21 %	46 %	34 %
Beauvericin	17 %	36 %	44 %	15 %	29 %	41 %
Beflubutamid	55 %	53 %	41 %	44 %	47 %	33 %
Benalaxyl	26 %	38 %	29 %	24 %	38 %	28 %
Bendiocarb	29 %	43 %	28 %	27 %	42 %	25 %
Benodanil	25 %	43 %	25 %	22 %	43 %	22 %
Benoxacor	32 %	51 %	35 %	26 %	48 %	27 %
Benthiavalicarb-isopropyl	23 %	45 %	24 %	21 %	44 %	19 %
Benzomalvin A	38 %	50 %	58 %	35 %	48 %	44 %
Benzomalvin B	12 %	42 %	20 %	11 %	42 %	18 %
Benzomalvin C	20 %	54 %	33 %	17 %	52 %	26 %
Bis(methylthio)gliotoxin	39 %	53 %	50 %	35 %	49 %	41 %
Bitertanol	25 %	49 %	29 %	24 %	48 %	20 %
Bixafen	29 %	43 %	18 %	26 %	42 %	14 %
Boscalid	31 %	62 %	36 %	28 %	62 %	20 %
Brasiliamide A	15 %	50 %	34 %	14 %	47 %	23 %
Brefeldin A	317 %	56 %	63 %	331 %	49 %	51 %
Brevianamid F	48 %	44 %	24 %	41 %	36 %	13 %
Brevicompanine B	51 %	67 %	18 %	45 %	64 %	15 %
Bromobutid	22 %	31 %	30 %	18 %	30 %	24 %
Bromuconazol	46 %	47 %	24 %	41 %	45 %	22 %

BTS 40348	24 %	22 %	26 %	20 %	19 %	21 %
BTS 44595	18 %	45 %	14 %	18 %	44 %	7 %
BTS 44596	21 %	46 %	19 %	19 %	45 %	8 %
Bupirimat	26 %	40 %	29 %	25 %	39 %	26 %
Buprofezin	25 %	47 %	28 %	24 %	47 %	24 %
Butafenacil	27 %	48 %	24 %	24 %	47 %	22 %
Butamifos	18 %	40 %	18 %	16 %	40 %	17 %
Butocarboxim	31 %	39 %	25 %	27 %	38 %	24 %
Butocarboxim-sulfoxid	12 %	17 %	22 %	11 %	16 %	17 %
Butoxycarboxim	32 %	44 %	20 %	28 %	42 %	16 %
Butralin	11 %	14 %	24 %	7 %	10 %	15 %
Buturon	19 %	41 %	30 %	18 %	41 %	25 %
Cadusafos	22 %	44 %	29 %	20 %	44 %	25 %
Cambendazole	16 %	8 %	15 %	15 %	8 %	11 %
Carbaryl	33 %	47 %	27 %	30 %	46 %	25 %
Carbendazim	20 %	292 %	21 %	16 %	292 %	21 %
Carbetamide	20 %	42 %	27 %	19 %	42 %	24 %
Carbofuran	28 %	24 %	33 %	27 %	23 %	31 %
Carbofuran 3-oh	29 %	21 %	29 %	22 %	18 %	21 %
Carbophenothion	27 %	75 %	39 %	21 %	64 %	30 %
Carboxin	20 %	37 %	26 %	19 %	37 %	24 %
Carfentrazon-ethyl	20 %	43 %	19 %	17 %	43 %	16 %
Carnequinazolin A	43 %	41 %	40 %	37 %	40 %	35 %
Carnidazole	20 %	25 %	17 %	16 %	19 %	10 %
Cereulide	20 %	59 %	70 %	15 %	58 %	22 %
Chaconin	28 %	30 %	38 %	24 %	29 %	29 %
Chanoclavin	19 %	36 %	20 %	18 %	35 %	17 %
Chevalone B	28 %	49 %	29 %	22 %	49 %	15 %
Chevalone C	35 %	55 %	27 %	33 %	51 %	20 %
Chlamydosporidiol	17 %	16 %	20 %	13 %	13 %	18 %
Chlorantraniliprole	22 %	49 %	18 %	16 %	46 %	13 %
Chlorbromuron	40 %	38 %	24 %	35 %	37 %	21 %
Chlorfenvinphos	29 %	41 %	32 %	24 %	40 %	27 %
Chloridazon	35 %	27 %	37 %	30 %	18 %	23 %
Chlorotoluron	40 %	60 %	34 %	38 %	58 %	30 %
Chloroxuron	33 %	35 %	28 %	31 %	34 %	21 %
Chlorpyrifos	26 %	60 %	33 %	24 %	52 %	30 %

Chlorthiophos	29 %	45 %	55 %	24 %	40 %	35 %
Chrysogin	11 %	17 %	33 %	9 %	13 %	33 %
Cinerin_I	50 %	69 %	83 %	33 %	59 %	62 %
Cinidon-ethyl	38 %	49 %	42 %	31 %	42 %	23 %
Cinosulfuron	17 %	83 %	24 %	14 %	83 %	23 %
Citreoviridinol	47 %	85 %	57 %	37 %	71 %	43 %
Cladosporone Derivat	19 %	45 %	60 %	18 %	43 %	39 %
Clodinafop-propargyl	15 %	37 %	22 %	14 %	37 %	20 %
Clofentezine	31 %	51 %	28 %	28 %	49 %	21 %
Clomazon	24 %	42 %	25 %	22 %	41 %	22 %
Clonostachydiol	20 %	49 %	42 %	18 %	49 %	41 %
Clopidol	15 %	20 %	21 %	14 %	16 %	13 %
Cloquintocet-Mexyl	18 %	43 %	20 %	18 %	43 %	19 %
Clothianidin	21 %	26 %	25 %	16 %	16 %	14 %
CNM 115443	17 %	45 %	22 %	15 %	42 %	20 %
Colchicin	19 %	40 %	26 %	16 %	39 %	22 %
Communesin B	32 %	59 %	25 %	23 %	56 %	23 %
Coumaphos	14 %	36 %	20 %	13 %	36 %	11 %
Crufomate	22 %	39 %	21 %	21 %	38 %	18 %
Cucurbitacin E	20 %	69 %	54 %	18 %	66 %	32 %
Culmorin	35 %	53 %	27 %	32 %	52 %	22 %
Cyanazin	39 %	53 %	35 %	35 %	51 %	31 %
Cyanofenphos	56 %	96 %	77 %	41 %	79 %	37 %
Cyazofamid	33 %	56 %	24 %	31 %	55 %	21 %
cyclo(L-Pro-L-Tyr)	11 %	42 %	35 %	9 %	38 %	37 %
cyclo(L-Pro-L-Val)	33 %	438 %	53 %	30 %	440 %	57 %
Cycloaspeptide A	48 %	101 %	28 %	40 %	99 %	19 %
Cyclophenin	25 %	35 %	28 %	22 %	34 %	27 %
Cyclophenol	44 %	52 %	30 %	36 %	46 %	21 %
Cyclopeptine	20 %	46 %	21 %	18 %	44 %	19 %
Cyclosporin H	55 %	82 %	50 %	49 %	80 %	57 %
Cycloxydim	43 %	63 %	30 %	38 %	62 %	19 %
Cycluron	38 %	57 %	31 %	36 %	54 %	26 %
Cyflufenamid	33 %	48 %	19 %	27 %	47 %	8 %
Cyhalofop-butyl	59 %	82 %	61 %	42 %	75 %	43 %
Cymiazole	28 %	52 %	26 %	20 %	50 %	20 %
Cymoxanil	27 %	48 %	31 %	27 %	44 %	23 %

Cyproconazol	34 %	51 %	23 %	33 %	49 %	18 %
Cyprodinil	39 %	53 %	22 %	32 %	50 %	11 %
Cytochalasin B	25 %	59 %	89 %	21 %	56 %	89 %
Cytochalasin C	24 %	63 %	26 %	20 %	53 %	22 %
Cytochalasin D	32 %	61 %	37 %	21 %	57 %	34 %
Cytochalasin E	27 %	65 %	28 %	22 %	58 %	27 %
Cytochalasin J	25 %	29 %	19 %	20 %	28 %	15 %
Dechlorgriseofulvin	17 %	47 %	37 %	17 %	46 %	31 %
Dechloroisochromophilon IV	27 %	79 %	22 %	25 %	78 %	21 %
DEET (Diethyltoluamid)	35 %	60 %	36 %	32 %	57 %	31 %
Dehydrocyclopeptine	42 %	59 %	39 %	37 %	57 %	32 %
Dehydrogriseofulvin	13 %	39 %	23 %	12 %	39 %	22 %
Demeton-S-Methylsulfon	23 %	28 %	25 %	18 %	26 %	23 %
Deoxynortryptoquivalin	43 %	70 %	31 %	34 %	68 %	26 %
Deoxytryptoquivaline A	27 %	62 %	44 %	24 %	59 %	37 %
Desmedipham	18 %	45 %	22 %	16 %	45 %	18 %
Desmethyl-pirimicarb	32 %	26 %	22 %	28 %	25 %	18 %
Destruxin A	30 %	56 %	30 %	23 %	55 %	23 %
Destruxin B	29 %	49 %	30 %	26 %	48 %	26 %
Destruxin D	41 %	84 %	52 %	32 %	81 %	46 %
Diacetoxyscirpenol	22 %	45 %	25 %	19 %	44 %	24 %
Dialifos	17 %	41 %	23 %	14 %	39 %	18 %
Diazinon	59 %	51 %	43 %	53 %	50 %	39 %
Diclobutrazol	40 %	48 %	25 %	35 %	44 %	22 %
Dicrotophos	17 %	36 %	30 %	15 %	33 %	27 %
Didecyldimethylammonium chlorid (DDAC)	18 %	56 %	57 %	16 %	55 %	27 %
Diethofencarb	45 %	72 %	28 %	42 %	69 %	25 %
Difenoconazole	17 %	43 %	27 %	16 %	43 %	19 %
Diflufenican	24 %	53 %	31 %	22 %	50 %	21 %
Dihydrocompactin	34 %	42 %	47 %	27 %	40 %	31 %
Dihydrogriseofulvin	21 %	41 %	24 %	19 %	39 %	22 %
Dihydrolysergol	31 %	27 %	25 %	26 %	19 %	22 %
Dimefuron	21 %	56 %	24 %	20 %	55 %	24 %
Dimepiperate	32 %	39 %	37 %	25 %	35 %	27 %
Dimethachlor	17 %	41 %	29 %	16 %	40 %	26 %
Dimethenamid	43 %	63 %	38 %	41 %	62 %	32 %

Dimethoat	31 %	22 %	23 %	29 %	18 %	21 %
Dimethomorph	25 %	48 %	25 %	23 %	47 %	19 %
Dimoxystrobin	19 %	43 %	27 %	17 %	42 %	25 %
Diniconazole	41 %	55 %	24 %	36 %	54 %	17 %
Dinotefuran	23 %	43 %	24 %	22 %	39 %	17 %
Diplodiatoxin	34 %	45 %	30 %	26 %	43 %	25 %
Disulfoton-Sulfon	21 %	42 %	33 %	19 %	42 %	31 %
Disulfuton-Sulfoxid	21 %	44 %	32 %	19 %	43 %	28 %
Ditalimfos	48 %	57 %	42 %	44 %	56 %	36 %
Dithiopyr	55 %	83 %	55 %	49 %	81 %	47 %
DMSA	57 %	40 %	55 %	56 %	38 %	54 %
DMST	34 %	44 %	35 %	33 %	42 %	35 %
Dodemorph	27 %	46 %	27 %	24 %	44 %	24 %
Dodine	46 %	108 %	27 %	39 %	107 %	17 %
Edifenphos	39 %	55 %	110 %	34 %	52 %	136 %
Elymoclavine	110 %	107 %	50 %	108 %	106 %	50 %
Elymoclavine-Fructoside	25 %	95 %	59 %	23 %	95 %	57 %
Emindole SA	26 %	68 %	38 %	23 %	64 %	18 %
Enniatin A1	16 %	39 %	39 %	14 %	36 %	33 %
Enniatin B	27 %	41 %	45 %	20 %	38 %	34 %
Enniatin B1	22 %	47 %	36 %	16 %	42 %	26 %
Enniatin B3	18 %	43 %	34 %	15 %	42 %	32 %
Enrofloxacin	34 %	31 %	38 %	27 %	21 %	30 %
Epoxyagroclavin	16 %	22 %	28 %	15 %	20 %	27 %
Epoxycytochalsin C	28 %	63 %	42 %	22 %	59 %	35 %
Eremofortin A	50 %	60 %	39 %	42 %	52 %	32 %
Ergine	27 %	32 %	28 %	21 %	29 %	27 %
Ergocorninin	42 %	46 %	61 %	35 %	38 %	33 %
Ergometrine	22 %	45 %	24 %	20 %	40 %	20 %
Ergometrinine	23 %	29 %	28 %	21 %	27 %	25 %
Erucifolin	45 %	74 %	71 %	45 %	14 %	50 %
Erucifolin-N-Oxid	14 %	87 %	21 %	12 %	87 %	19 %
Ethametsulfuron-methyl	13 %	56 %	20 %	11 %	56 %	17 %
Ethidimuron	20 %	14 %	26 %	17 %	12 %	22 %
Ethiofencarb	45 %	55 %	36 %	41 %	54 %	32 %
Ethiofencarb-sulfon	21 %	27 %	30 %	19 %	27 %	28 %
Ethiofencarb-Sulfoxid	14 %	33 %	23 %	11 %	32 %	20 %

Ethion	19 %	42 %	22 %	15 %	40 %	16 %
Ethiprole	52 %	62 %	29 %	45 %	60 %	27 %
Ethirimol	18 %	15 %	15 %	15 %	12 %	11 %
Ethofumesat	37 %	64 %	46 %	33 %	62 %	35 %
Ethopabate	23 %	37 %	32 %	22 %	37 %	31 %
Ethoprophos	29 %	49 %	27 %	26 %	49 %	25 %
Etofenprox	23 %	83 %	29 %	20 %	77 %	14 %
Europin-N-Oxid	27 %	27 %	89 %	30 %	34 %	95 %
F01 1358-A	13 %	39 %	26 %	11 %	36 %	21 %
Famoxadon	43 %	49 %	57 %	35 %	46 %	23 %
Fenamidon	28 %	53 %	26 %	26 %	53 %	22 %
Fenamiphos	44 %	60 %	33 %	41 %	59 %	29 %
Fenamiphos-sulfon	17 %	45 %	32 %	16 %	43 %	30 %
Fenamiphos-sulfoxid	23 %	49 %	34 %	22 %	48 %	31 %
Fenarimol	36 %	40 %	24 %	34 %	37 %	21 %
Fenazaquin	94 %	142 %	68 %	92 %	136 %	62 %
Fenbendazole sulfone	23 %	20 %	19 %	22 %	18 %	14 %
Fenchlorphos-oxon	24 %	31 %	38 %	23 %	31 %	32 %
Fenhexamid	39 %	47 %	29 %	37 %	43 %	18 %
Fenobucarb	41 %	54 %	37 %	38 %	53 %	30 %
Fenothiocarb	40 %	52 %	32 %	36 %	49 %	27 %
Fenoxaprop-ethyl	47 %	68 %	35 %	47 %	67 %	33 %
Fenoxycarb	22 %	45 %	32 %	19 %	45 %	24 %
Fenpiclonil	50 %	81 %	42 %	49 %	76 %	24 %
Fenpropathrin	32 %	62 %	86 %	27 %	52 %	56 %
Fenpropidin	19 %	42 %	26 %	17 %	42 %	24 %
Fenpropimorph	26 %	40 %	36 %	22 %	38 %	29 %
Fenpyroximat	28 %	45 %	26 %	25 %	44 %	19 %
Fensulfothion	22 %	45 %	31 %	21 %	44 %	26 %
Fenthion	60 %	63 %	28 %	51 %	61 %	27 %
Fenthion Oxon	18 %	48 %	23 %	16 %	47 %	19 %
Fenthion-Oxonsulfoxid	12 %	31 %	22 %	12 %	30 %	20 %
Fenthion-sulfon	33 %	49 %	31 %	31 %	47 %	28 %
Fenthion-sulfoxid	17 %	50 %	36 %	16 %	49 %	32 %
Fentinacetat	34 %	50 %	97 %	33 %	41 %	63 %
Fenuron	26 %	22 %	23 %	23 %	20 %	18 %
Festuclavine	28 %	27 %	17 %	24 %	25 %	11 %

Firocoxib	20 %	51 %	28 %	15 %	38 %	18 %
Flamprop-methyl	35 %	43 %	20 %	30 %	43 %	16 %
Flazasulfuron	19 %	75 %	26 %	16 %	75 %	24 %
Flonicamid	35 %	31 %	37 %	28 %	25 %	26 %
Florasulam	22 %	25 %	25 %	20 %	25 %	22 %
Fluacrypyrim	29 %	33 %	20 %	22 %	32 %	17 %
Fluazifop-P-butyl	25 %	47 %	15 %	22 %	47 %	11 %
Fluazuron	19 %	65 %	34 %	18 %	59 %	24 %
Flubendazole	32 %	20 %	41 %	22 %	14 %	22 %
Flufenoxuron	20 %	66 %	34 %	13 %	61 %	25 %
Flumetsulam	15 %	23 %	21 %	14 %	23 %	20 %
Fluometuron	43 %	61 %	33 %	40 %	60 %	29 %
Fluopicolid	23 %	41 %	14 %	22 %	41 %	10 %
Fluopyram	27 %	32 %	23 %	24 %	31 %	19 %
Fluotrimazole	-57 %	-104 %	-145 %	52 %	35 %	42 %
Fluoxastrobin	34 %	41 %	22 %	33 %	41 %	18 %
Flupyradifurone	10 %	10 %	25 %	9 %	8 %	20 %
Fluquinconazol	32 %	44 %	42 %	29 %	41 %	28 %
Fluroxypyr	57 %	67 %	78 %	43 %	58 %	54 %
Flurtamone	20 %	44 %	22 %	19 %	44 %	20 %
Flusilazol	51 %	70 %	28 %	47 %	68 %	17 %
Flutolanil	19 %	40 %	20 %	18 %	39 %	19 %
Flutriafol	27 %	47 %	34 %	24 %	45 %	28 %
Fomesafen	24 %	79 %	49 %	23 %	71 %	27 %
Foramsulfuron	122 %	-160 %	-186 %	22 %	16 %	11 %
Formetanate HCl	36 %	56 %	32 %	35 %	55 %	28 %
Fosthiazat	13 %	35 %	21 %	11 %	35 %	20 %
Fuberidazol	15 %	15 %	17 %	13 %	13 %	14 %
Fumigaclavine	25 %	27 %	16 %	24 %	26 %	12 %
Fumigaclavine C	21 %	43 %	30 %	17 %	42 %	26 %
Fumiquinazolin D	14 %	47 %	41 %	12 %	43 %	31 %
Fungerin	45 %	56 %	43 %	37 %	52 %	34 %
Furalaxyl	50 %	68 %	34 %	47 %	67 %	30 %
Furathiocarb	16 %	42 %	29 %	13 %	41 %	25 %
Fusapyron	35 %	54 %	32 %	25 %	51 %	28 %
Geodin hydrate	45 %	73 %	68 %	37 %	68 %	35 %
Gibberellin A14	14 %	60 %	25 %	14 %	61 %	25 %

Griseofulvin	16 %	39 %	26 %	15 %	38 %	24 %
Halofuginone	20 %	62 %	29 %	19 %	60 %	20 %
Halosulfuron-methyl	23 %	101 %	20 %	18 %	100 %	16 %
Haloxypop-2-ethoxyethyl	16 %	44 %	23 %	14 %	43 %	17 %
Haloxypop-P-methyl	16 %	38 %	24 %	15 %	38 %	21 %
Harzianopyridine	25 %	37 %	25 %	24 %	37 %	21 %
Heliotrin	16 %	37 %	19 %	14 %	36 %	15 %
Heliotrin-N-Oxid	12 %	114 %	22 %	11 %	114 %	21 %
Heptenophos	58 %	66 %	39 %	47 %	63 %	35 %
Herquline A	19 %	26 %	18 %	16 %	18 %	14 %
Hexaconazol	28 %	50 %	51 %	26 %	50 %	52 %
hydrolysed Fumonisin B1	15 %	43 %	21 %	13 %	43 %	19 %
Hydroxyandrastin A	22 %	49 %	98 %	21 %	49 %	24 %
Hydroxyandrastin C	29 %	58 %	40 %	23 %	55 %	31 %
Imazalil	23 %	42 %	24 %	22 %	41 %	21 %
Imazamox	35 %	30 %	31 %	28 %	32 %	31 %
Imazapyr	34 %	38 %	22 %	34 %	39 %	16 %
Imazaquin	21 %	44 %	13 %	19 %	44 %	12 %
Imazethapyr	12 %	39 %	14 %	11 %	39 %	12 %
Imazosulfuron	44 %	76 %	28 %	34 %	74 %	27 %
Imibenconazol	47 %	92 %	20 %	43 %	91 %	17 %
Imidacloprid	24 %	26 %	27 %	21 %	20 %	16 %
Indoxacarb	20 %	54 %	23 %	17 %	54 %	21 %
Iodosulfuron-methyl-sodium	15 %	61 %	30 %	14 %	60 %	24 %
Iproconazole	22 %	51 %	25 %	21 %	50 %	18 %
Iprobenfos	62 %	66 %	67 %	45 %	56 %	51 %
Ipronidazole	53 %	52 %	36 %	46 %	50 %	34 %
Iprovalicarb	36 %	49 %	27 %	33 %	48 %	24 %
Isazofos	26 %	42 %	29 %	23 %	40 %	27 %
Isochromophilon IV	54 %	51 %	44 %	50 %	47 %	34 %
Isofenphos-oxon	28 %	41 %	25 %	26 %	40 %	22 %
Isoprothiolan	54 %	71 %	32 %	52 %	67 %	26 %
Isoproturon	41 %	83 %	40 %	39 %	82 %	33 %
Isoxaben	23 %	54 %	23 %	21 %	53 %	21 %
Isoxadifen-ethyl	46 %	49 %	32 %	37 %	45 %	30 %
Jacobin-N-Oxid	23 %	93 %	18 %	18 %	93 %	17 %
Jasmolin_I	107 %	94 %	96 %	44 %	78 %	54 %

K252a	40 %	72 %	33 %	32 %	60 %	20 %
K-76 Derivative 4	35 %	45 %	29 %	24 %	42 %	18 %
Kojic acid	23 %	44 %	20 %	23 %	42 %	15 %
Koninginin E	22 %	56 %	26 %	19 %	55 %	18 %
Kotanin A	11 %	46 %	21 %	10 %	45 %	18 %
Kresoxim-methyl	50 %	36 %	30 %	40 %	35 %	26 %
Lactofen	10 %	43 %	23 %	9 %	42 %	21 %
Lasiocarpin	19 %	113 %	17 %	16 %	113 %	14 %
Lasiocarpin-N-Oxid	21 %	13 %	23 %	16 %	11 %	18 %
Lenacil	36 %	51 %	20 %	32 %	50 %	16 %
Levamisole	17 %	19 %	25 %	12 %	13 %	18 %
Lincomycin	18 %	8 %	12 %	16 %	7 %	11 %
Linuron	34 %	50 %	35 %	30 %	48 %	25 %
Luteusin A	33 %	55 %	25 %	26 %	55 %	22 %
Lysergol	21 %	16 %	29 %	19 %	14 %	26 %
Macrosphelide A	34 %	60 %	41 %	30 %	59 %	36 %
Malaoxon	24 %	54 %	30 %	23 %	53 %	29 %
Malathion	25 %	41 %	27 %	22 %	40 %	23 %
Mandipropamid	15 %	58 %	28 %	14 %	56 %	22 %
Marbofloxacin	27 %	34 %	27 %	24 %	22 %	16 %
Marcfortine A	33 %	45 %	26 %	22 %	43 %	22 %
Mebendazole	10 %	14 %	19 %	9 %	12 %	13 %
Mecarbam	22 %	39 %	26 %	19 %	38 %	25 %
Mefenpyr-diethyl	30 %	44 %	64 %	24 %	38 %	39 %
Meleagrinn Derivative	55 %	60 %	38 %	48 %	59 %	28 %
Mepanipyrim	27 %	37 %	23 %	24 %	35 %	16 %
Mepronil	41 %	43 %	23 %	38 %	42 %	19 %
Mesotrione	33 %	35 %	52 %	33 %	36 %	40 %
Metalaxyl	17 %	44 %	26 %	16 %	44 %	24 %
Metamitron	28 %	28 %	25 %	22 %	20 %	14 %
Metazachlor	19 %	40 %	28 %	17 %	40 %	25 %
Metconazole	23 %	46 %	16 %	21 %	45 %	14 %
Methabenzthiazuron	21 %	38 %	24 %	19 %	37 %	20 %
Methamidophos	17 %	11 %	15 %	15 %	8 %	9 %
Methidathion	15 %	40 %	26 %	13 %	39 %	20 %
Methiocarb	27 %	36 %	25 %	23 %	36 %	21 %
Methiocarb-Sulfon	43 %	23 %	23 %	39 %	21 %	19 %

Methiocarb-Sulfoxid	17 %	22 %	25 %	14 %	21 %	22 %
Methomyl	35 %	30 %	33 %	34 %	29 %	27 %
Methoprotryne	21 %	36 %	21 %	18 %	36 %	19 %
Methoxysterigmatocystin	21 %	57 %	28 %	18 %	56 %	18 %
Methylfunicone	16 %	46 %	25 %	14 %	44 %	23 %
Metobromuron	20 %	41 %	31 %	17 %	39 %	24 %
Metolachlor	23 %	42 %	28 %	22 %	40 %	27 %
Metolcarb	35 %	46 %	41 %	30 %	45 %	34 %
Metosulam	15 %	54 %	22 %	13 %	53 %	19 %
Metoxuron	42 %	55 %	40 %	38 %	54 %	34 %
Metrafenon	18 %	41 %	25 %	15 %	39 %	18 %
Metribuzin	24 %	37 %	22 %	22 %	37 %	21 %
Metsulfuron-methyl	31 %	75 %	37 %	24 %	75 %	36 %
Mevastatin	46 %	68 %	32 %	40 %	66 %	31 %
Mevinolin	33 %	51 %	26 %	30 %	50 %	25 %
Monensin	65 %	81 %	80 %	61 %	79 %	76 %
Monoacetoxyscirpenol	22 %	39 %	52 %	18 %	38 %	38 %
Monocerin	23 %	46 %	30 %	22 %	46 %	27 %
Monocrotalin	12 %	42 %	43 %	10 %	41 %	42 %
Monocrotophos	19 %	34 %	23 %	17 %	33 %	20 %
Monolinuron	45 %	62 %	42 %	40 %	60 %	34 %
Monomethylcurvulin	12 %	45 %	21 %	11 %	46 %	10 %
Monuron	44 %	57 %	35 %	40 %	55 %	29 %
Morantel	12 %	16 %	19 %	8 %	11 %	14 %
Myclobutanil	53 %	64 %	35 %	50 %	64 %	34 %
Mycophenolic acid	16 %	53 %	20 %	14 %	51 %	15 %
Mycophenolic acid IV	21 %	50 %	40 %	16 %	50 %	30 %
N-0352A	26 %	57 %	35 %	25 %	56 %	30 %
N-0532B	33 %	43 %	25 %	27 %	40 %	20 %
Nalidixic acid	20 %	29 %	25 %	20 %	29 %	25 %
Napropamid	22 %	36 %	23 %	21 %	35 %	21 %
N-Benzoyl-Phenylalanine	30 %	67 %	42 %	27 %	66 %	43 %
Neburon	46 %	58 %	30 %	44 %	56 %	23 %
Neosolaniol	16 %	42 %	25 %	15 %	41 %	22 %
Nequinat	25 %	38 %	23 %	23 %	37 %	18 %
Nicosulfuron	41 %	84 %	36 %	36 %	81 %	33 %
Nigericin	12 %	44 %	44 %	10 %	40 %	29 %

Nonactin	26 %	46 %	39 %	24 %	42 %	39 %
Notoamide Derivative	24 %	60 %	33 %	21 %	59 %	27 %
Notoamide E Derivat	54 %	89 %	36 %	52 %	89 %	32 %
NP 12318	11 %	41 %	22 %	10 %	41 %	18 %
NP16312	74 %	87 %	47 %	72 %	85 %	38 %
NP19435	15 %	37 %	22 %	13 %	35 %	19 %
NP2153	15 %	34 %	26 %	12 %	33 %	16 %
NP2155	34 %	62 %	29 %	33 %	62 %	19 %
NP2231	42 %	54 %	91 %	38 %	53 %	63 %
NP629	54 %	69 %	38 %	45 %	68 %	36 %
NP9244	48 %	65 %	56 %	36 %	63 %	47 %
Nuarimol	36 %	58 %	29 %	36 %	57 %	20 %
Ochratoxin A	32 %	47 %	22 %	23 %	46 %	16 %
Ochratoxin B	27 %	52 %	23 %	21 %	48 %	22 %
Ochratoxin C	13 %	40 %	19 %	11 %	39 %	17 %
Ochrephilone	17 %	43 %	24 %	14 %	43 %	22 %
Ofurace	24 %	49 %	32 %	23 %	48 %	29 %
Omethoat	30 %	31 %	22 %	27 %	29 %	18 %
O-Methylsterigmatocystin	16 %	51 %	21 %	16 %	50 %	16 %
O-Methylviridicatin	24 %	44 %	28 %	22 %	43 %	24 %
Orbencarb	21 %	41 %	26 %	17 %	40 %	23 %
Oxadiazon	17 %	39 %	21 %	13 %	36 %	14 %
Oxadixyl	23 %	35 %	30 %	22 %	35 %	27 %
Oxalicine B	34 %	76 %	76 %	32 %	63 %	57 %
Oxaline	17 %	26 %	14 %	14 %	25 %	13 %
Oxamyl	17 %	52 %	23 %	15 %	52 %	20 %
Oxibendazole	25 %	27 %	26 %	17 %	19 %	19 %
Oxidized Elymoclavine	51 %	75 %	54 %	52 %	75 %	54 %
Oxidized Luol	23 %	22 %	23 %	21 %	20 %	21 %
Oxisterigmatocystin E	55 %	104 %	38 %	52 %	101 %	32 %
Oxycarboxin	22 %	23 %	25 %	21 %	23 %	21 %
Oxydemeton-methyl	17 %	32 %	26 %	15 %	32 %	23 %
Paclobutrazol	48 %	75 %	30 %	47 %	74 %	22 %
Paraherquamide A	15 %	58 %	22 %	11 %	59 %	21 %
Paraoxon-ethyl	42 %	66 %	41 %	40 %	65 %	37 %
Paraoxon-methyl	39 %	42 %	40 %	32 %	35 %	31 %
Parathion	26 %	42 %	22 %	23 %	42 %	21 %

Paxillin	55 %	57 %	29 %	42 %	56 %	16 %
Penconazol	40 %	40 %	33 %	39 %	39 %	26 %
Pencycuron	23 %	44 %	21 %	22 %	44 %	18 %
Pendimethalin	22 %	56 %	47 %	17 %	54 %	33 %
Penflufen	44 %	68 %	30 %	41 %	66 %	27 %
Penicillic acid	31 %	23 %	28 %	30 %	23 %	25 %
Penicolinate	10 %	35 %	22 %	8 %	34 %	18 %
Pentanochlor	34 %	52 %	24 %	31 %	50 %	20 %
Penthiopyrad	22 %	32 %	22 %	21 %	32 %	20 %
Pentoxifylline	25 %	38 %	25 %	20 %	37 %	17 %
Pestalotin	27 %	47 %	27 %	25 %	46 %	26 %
Phenmedipham	70 %	108 %	66 %	70 %	107 %	61 %
Phenopyrrozin	61 %	71 %	57 %	50 %	67 %	48 %
Phorat-sulfon	22 %	45 %	30 %	20 %	45 %	28 %
Phorat-sulfoxid	15 %	39 %	24 %	13 %	38 %	21 %
Phosalon	37 %	57 %	27 %	32 %	56 %	19 %
Phosmet	22 %	51 %	33 %	21 %	49 %	24 %
Phosmet-oxon	48 %	66 %	41 %	46 %	63 %	37 %
Phosphamidon	29 %	48 %	31 %	26 %	47 %	29 %
Phoxim	46 %	68 %	36 %	37 %	67 %	34 %
Picaridin	14 %	40 %	19 %	13 %	39 %	18 %
Picolinafen	8 %	66 %	20 %	5 %	62 %	7 %
Picoxystrobin	19 %	37 %	18 %	15 %	36 %	16 %
Pinoxaden	13 %	40 %	26 %	10 %	38 %	21 %
Piperonylbutoxid	16 %	40 %	79 %	15 %	39 %	79 %
Piperophos	15 %	33 %	27 %	14 %	33 %	23 %
Pirimicarb	17 %	37 %	24 %	14 %	36 %	21 %
Pirimiphos-ethyl	17 %	40 %	27 %	16 %	40 %	24 %
Pirimiphos-methyl	45 %	58 %	39 %	38 %	58 %	33 %
Piscarinin A	51 %	100 %	46 %	45 %	96 %	36 %
Porritoxinol	63 %	85 %	56 %	45 %	82 %	46 %
Praziquantel	11 %	9 %	14 %	9 %	7 %	9 %
Pretilachlor	24 %	40 %	32 %	22 %	40 %	30 %
Primisulfuron-methyl	29 %	76 %	44 %	25 %	73 %	36 %
Prochloraz	39 %	64 %	23 %	37 %	63 %	12 %
Profenofos	14 %	41 %	24 %	12 %	40 %	20 %
Promecarb	25 %	39 %	21 %	22 %	38 %	18 %

Prometon	26 %	43 %	30 %	22 %	42 %	28 %
Prometryn	48 %	56 %	25 %	44 %	54 %	21 %
Propachlor	22 %	44 %	30 %	19 %	42 %	27 %
Propamocarb	16 %	22 %	16 %	13 %	20 %	14 %
Propanil	89 %	77 %	86 %	72 %	77 %	53 %
Propaquizafop	15 %	49 %	23 %	13 %	48 %	15 %
Propargit	24 %	50 %	42 %	21 %	46 %	28 %
Propazin	45 %	72 %	23 %	41 %	68 %	18 %
Propiconazol	23 %	36 %	19 %	21 %	36 %	15 %
Propoxycarbazone-Natrium	25 %	56 %	34 %	19 %	55 %	30 %
Propyzamid	36 %	40 %	33 %	34 %	40 %	27 %
Proquinazid	26 %	61 %	36 %	23 %	53 %	17 %
Prosulfocarb	18 %	49 %	26 %	17 %	48 %	23 %
Prothioconazole Desthio	54 %	70 %	31 %	52 %	68 %	19 %
Puomycin	33 %	185 %	68 %	31 %	188 %	68 %
Purpactin A	27 %	51 %	27 %	23 %	46 %	25 %
Purpuride	26 %	55 %	29 %	25 %	53 %	24 %
Pymetrozin	33 %	12 %	26 %	32 %	11 %	24 %
Pyraclostrobin	17 %	43 %	27 %	15 %	42 %	22 %
Pyranonigrin	22 %	21 %	21 %	18 %	19 %	18 %
Pyrazophos	17 %	39 %	28 %	15 %	39 %	26 %
Pyrenophorol	40 %	38 %	41 %	33 %	35 %	31 %
Pyrethrin_I	19 %	56 %	26 %	13 %	49 %	22 %
Pyrethrin_II	26 %	41 %	35 %	20 %	40 %	24 %
Pyributicarb	23 %	52 %	32 %	23 %	52 %	27 %
Pyridaben	29 %	58 %	30 %	25 %	54 %	21 %
Pyridalyl	27 %	92 %	43 %	17 %	87 %	13 %
Pyridaphenthion	29 %	41 %	27 %	28 %	41 %	24 %
Pyridat	34 %	69 %	38 %	21 %	68 %	25 %
Pyrimethanil	38 %	37 %	23 %	28 %	36 %	19 %
Pyriofenone	18 %	40 %	23 %	15 %	40 %	20 %
Pyriproxyfen	32 %	50 %	30 %	30 %	49 %	24 %
Pyripropylene D	21 %	42 %	26 %	17 %	42 %	21 %
Pyrophen	43 %	62 %	49 %	38 %	58 %	42 %
Pyroxulam	15 %	49 %	30 %	12 %	49 %	26 %
Quadrone	39 %	63 %	30 %	36 %	62 %	28 %
Quinalphos	35 %	41 %	25 %	27 %	40 %	22 %

Quinclorac	49 %	57 %	49 %	31 %	52 %	31 %
Quinmerac	26 %	16 %	40 %	23 %	16 %	36 %
Quinolactacin A	42 %	41 %	23 %	41 %	39 %	16 %
Quinolactacin B	11 %	16 %	17 %	9 %	15 %	12 %
Quinoxifen	31 %	58 %	25 %	28 %	54 %	17 %
Quizalofop	19 %	66 %	28 %	16 %	65 %	17 %
Quizalofop-ethyl	26 %	59 %	23 %	24 %	58 %	14 %
Retrorsin	19 %	41 %	29 %	16 %	40 %	29 %
Rimsulfuron	27 %	101 %	28 %	19 %	100 %	25 %
Robenidin	100 %	253 %	45 %	59 %	195 %	24 %
Rofexocib	52 %	62 %	44 %	46 %	55 %	42 %
Roquefortine C	14 %	41 %	17 %	12 %	41 %	15 %
Roquefortine D	13 %	42 %	37 %	11 %	41 %	23 %
Roquefortine E	34 %	47 %	31 %	24 %	41 %	25 %
Roridin A	16 %	61 %	21 %	14 %	58 %	18 %
Rotenon	21 %	49 %	24 %	19 %	48 %	18 %
Rugulovasine A	17 %	78 %	21 %	13 %	79 %	17 %
Rugulusovin	24 %	219 %	43 %	21 %	219 %	39 %
Saflufenacil	20 %	56 %	28 %	14 %	54 %	24 %
Scalusamid A	18 %	53 %	23 %	17 %	50 %	21 %
Sclerotigenin	21 %	37 %	32 %	21 %	36 %	29 %
Sebuthylazin	44 %	66 %	22 %	39 %	64 %	15 %
Sebumeton	150 %	201 %	150 %	149 %	201 %	150 %
semi Xanthomegnin	16 %	55 %	32 %	16 %	54 %	29 %
Senecionin_Senecivernin	16 %	165 %	19 %	14 %	166 %	13 %
Senecionin_Senecivernin_N-Oxid	19 %	92 %	22 %	16 %	92 %	20 %
Seneciphylline	17 %	13 %	27 %	15 %	12 %	20 %
Seneciphylline-N-Oxide	51 %	30 %	48 %	50 %	65 %	115 %
Senkirkin	12 %	15 %	17 %	10 %	13 %	12 %
Setusosin	46 %	86 %	51 %	43 %	71 %	40 %
Siccanin	29 %	58 %	38 %	26 %	54 %	24 %
Simazin	38 %	38 %	24 %	34 %	38 %	23 %
Solanidin	13 %	35 %	16 %	10 %	35 %	13 %
Spinetoram	23 %	37 %	27 %	19 %	36 %	23 %
Spinosyn A (Spinosad)	23 %	51 %	26 %	21 %	50 %	23 %
Spinosyn B (Spinosad)	17 %	36 %	23 %	16 %	35 %	21 %

Spirodihydrobenzofuranlactam	25 %	45 %	29 %	23 %	45 %	27 %
IV						
Spiromesifen	60 %	98 %	93 %	53 %	87 %	69 %
Spirotetramat	22 %	35 %	21 %	19 %	34 %	20 %
Spirotetramat enol-glucosid	19 %	29 %	21 %	16 %	25 %	8 %
Spirotetramat-enol	13 %	54 %	26 %	12 %	54 %	23 %
Spirotetramat-keto-hydroxy	19 %	51 %	32 %	17 %	51 %	26 %
Spirotetramat-mono-hydroxy	26 %	54 %	38 %	25 %	54 %	35 %
Spiroxamin	21 %	42 %	27 %	20 %	42 %	25 %
Sporogen AO I	32 %	53 %	35 %	27 %	48 %	30 %
Stachybotrylactam	25 %	35 %	28 %	22 %	35 %	23 %
Sterigmatocystin	27 %	48 %	30 %	25 %	47 %	17 %
Sulfacetamide	13 %	17 %	16 %	11 %	13 %	10 %
Sulfachlorpyridazine	37 %	42 %	21 %	28 %	48 %	18 %
Sulfadiazine	11 %	13 %	21 %	9 %	10 %	18 %
Sulfadimethoxine	10 %	16 %	17 %	8 %	14 %	12 %
Sulfadimidine	44 %	63 %	30 %	28 %	52 %	21 %
Sulfadoxine	11 %	15 %	16 %	8 %	15 %	14 %
Sulfaguanidine	17 %	29 %	38 %	16 %	26 %	37 %
Sulfamerazine	16 %	11 %	24 %	13 %	10 %	19 %
Sulfamethazine	12 %	11 %	14 %	9 %	9 %	11 %
Sulfamethizole	15 %	12 %	28 %	13 %	10 %	23 %
Sulfamethoxazole	23 %	38 %	16 %	17 %	43 %	14 %
Sulfamoxole	19 %	22 %	20 %	17 %	23 %	16 %
Sulfaphenazole	16 %	26 %	4 %	14 %	21 %	2 %
Sulfapyridine	369 %	451 %	21 %	369 %	455 %	16 %
Sulfaquinoxaline	16 %	16 %	11 %	13 %	14 %	8 %
Sulfisoxazole	6 %	27 %	18 %	6 %	29 %	14 %
Sulfotep	65 %	71 %	53 %	45 %	67 %	40 %
Sulochrin	26 %	19 %	36 %	25 %	17 %	31 %
Sulprofos	19 %	54 %	47 %	18 %	51 %	30 %
Sydowinin A	29 %	120 %	45 %	25 %	123 %	37 %
T-2 toxin	16 %	54 %	37 %	13 %	53 %	25 %
Tebuconazol	28 %	45 %	28 %	28 %	44 %	24 %
Tebufenpyrad	29 %	50 %	24 %	27 %	48 %	15 %
Tebutam	36 %	54 %	32 %	34 %	52 %	29 %
TEPP	28 %	41 %	33 %	27 %	41 %	33 %

Tepraloxydim	38 %	53 %	29 %	31 %	53 %	21 %
Terbucarb	22 %	36 %	31 %	20 %	35 %	28 %
Terbufos-Sulfon	33 %	54 %	35 %	29 %	53 %	31 %
Terbufos-Sulfoxid	45 %	62 %	34 %	42 %	61 %	31 %
Terbuthylazin	46 %	64 %	15 %	44 %	62 %	12 %
Terbuthylazin-desethyl	32 %	37 %	31 %	31 %	35 %	22 %
Terbutryn	21 %	35 %	22 %	18 %	34 %	18 %
Territrem B	16 %	44 %	35 %	14 %	44 %	32 %
Tetraconazol	33 %	37 %	17 %	28 %	36 %	15 %
Tetramethrin	67 %	82 %	25 %	59 %	65 %	22 %
TFNG	16 %	33 %	57 %	15 %	31 %	30 %
Thailandolide B	27 %	70 %	25 %	22 %	65 %	12 %
Thiabendazol	18 %	12 %	15 %	13 %	10 %	10 %
Thiacloprid	24 %	24 %	23 %	20 %	22 %	21 %
Thiamethoxam	31 %	32 %	27 %	29 %	29 %	18 %
Thifensulfuron-methyl	18 %	64 %	29 %	15 %	64 %	26 %
Thiofanox-Sulfon	10 %	19 %	28 %	9 %	16 %	21 %
Thiophanate-methyl	23 %	33 %	27 %	22 %	32 %	26 %
Tiamulin	21 %	22 %	15 %	15 %	16 %	11 %
Tilmicosin	43 %	41 %	43 %	31 %	35 %	31 %
Tolfenpyrad	13 %	58 %	24 %	11 %	57 %	12 %
Toxoflavin	16 %	40 %	16 %	15 %	38 %	6 %
Tralkoxydim	33 %	57 %	34 %	31 %	57 %	32 %
Triadimefon	30 %	42 %	24 %	26 %	42 %	20 %
Triasulfuron	25 %	56 %	26 %	20 %	56 %	26 %
Triazophos	34 %	42 %	30 %	32 %	41 %	25 %
Tribenuron-methyl	39 %	114 %	46 %	31 %	110 %	35 %
Trichalasin B	21 %	52 %	30 %	17 %	50 %	23 %
Trichlorfon	21 %	42 %	44 %	18 %	36 %	30 %
Trichoderamide C	25 %	46 %	33 %	21 %	45 %	27 %
Trichodermin	44 %	76 %	36 %	41 %	74 %	35 %
Trichodesmin	17 %	12 %	18 %	16 %	10 %	15 %
Tricyclazol	32 %	24 %	24 %	30 %	21 %	20 %
Trifloxystrobin	16 %	40 %	21 %	13 %	40 %	19 %
Triflumizol	27 %	50 %	39 %	26 %	49 %	36 %
Triflusaluron-methyl	12 %	58 %	24 %	10 %	58 %	23 %
Trimethoprim	8 %	8 %	11 %	7 %	7 %	8 %

Triticonazol	51 %	57 %	28 %	44 %	54 %	23 %
Tryprostatin B	25 %	62 %	38 %	23 %	56 %	29 %
Tryptophol	32 %	62 %	47 %	28 %	58 %	51 %
Tryptoquivaline A	49 %	63 %	42 %	37 %	60 %	39 %
Tryptoquivaline F	43 %	52 %	40 %	34 %	49 %	34 %
Uniconazol	56 %	67 %	32 %	49 %	66 %	19 %
Valifenalat	17 %	43 %	20 %	15 %	43 %	17 %
Valnemulin	14 %	11 %	23 %	11 %	9 %	19 %
Vamidothion	20 %	36 %	28 %	18 %	36 %	27 %
Vamidothion-Sulfon	20 %	36 %	28 %	18 %	34 %	24 %
Vermistatin	25 %	42 %	30 %	23 %	42 %	28 %
Verrucarin A	21 %	58 %	23 %	16 %	57 %	15 %
Verrucofortine	28 %	51 %	20 %	26 %	50 %	18 %
Verruculotoxin	15 %	11 %	20 %	11 %	8 %	16 %
Viridicatin	41 %	57 %	20 %	37 %	57 %	18 %
Xanthotoxin	30 %	54 %	33 %	27 %	54 %	28 %
Zinndiol	18 %	34 %	36 %	16 %	34 %	33 %
Zinniamide	67 %	77 %	40 %	55 %	72 %	17 %
Zoxamide	20 %	44 %	21 %	20 %	43 %	11 %