

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

FACULDADE DE FARMÁCIA

FABIANO NARCISO PASCHOAL

**AFLATOXINAS B₁, B₂, G₁ E G₂, FUMONISINA B₁ E
ZEARALENONA EM FUBÁ: VALIDAÇÃO DE MÉTODO
POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ACOPLADA A
ESPECTROMETRIA DE MASSAS E OCORRÊNCIA DE
CONTAMINAÇÃO**

Belo Horizonte, MG
2015

FABIANO NARCISO PASCHOAL

**AFLATOXINAS B₁, B₂, G₁ E G₂, FUMONISINA B₁ E
ZEARALENONA EM FUBÁ: VALIDAÇÃO DE MÉTODO
POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ACOPLADA A
ESPECTROMETRIA DE MASSAS E OCORRÊNCIA DE
CONTAMINAÇÃO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção de grau de Mestre em Ciência de Alimentos.

Orientadora: Scheilla Vitorino C. de Souza

Área de concentração: Ciências de Alimentos

Belo Horizonte, MG
2015

Paschoal, Fabiano Narciso.

P279a Aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂, fumonisina B₁ e zearalenona em fubá: validação de método por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas e ocorrência de contaminação / Fabiano Narciso Paschoal. – 2015. 130 f. : il.

Orientadora: Scheilla Vitorino Carvalho de Souza

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos.

1. Alimentos – Contaminação – Teses. 2. Micotoxinas – Teses. 2. Análise cromatográfica – Teses. 3. Espectrometria de massa – Teses. 4. Milho – Teses. I. Souza, Scheilla Vitorino Carvalho de. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia. III. Título.

CDD: 664.07



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Faculdade de Farmácia
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DE ALIMENTOS - PPGCA

FABIANO NARCISO PASCHOAL

AFLATOXINAS B1, B2, G1 E G2, FUMONISINA B1 E ZEARALENONA
EM FUBÁ: VALIDAÇÃO DE MÉTODO POR CROMATOGRAFIA
LÍQUIDA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS E
OCORRÊNCIA DE CONTAMINAÇÃO

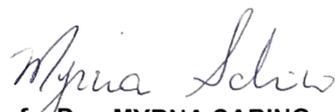
TESE APROVADA EM 27 DE FEVEREIRO DE 2015

COMISSÃO EXAMINADORA


Profa. Dra. SCHELLA VITORINO CARVALHO DE SOUZA FERREIRA
Orientadora e Presidente da Comissão


Profa. Dra. SILVANA DA MOTTA


Profa. Dra. CLÉSIA CRISTINA NASCENTES


Profa. Dra. MYRNA SABINO

AGRADECIMENTOS INSTITUCIONAIS

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos (PPGCA) da Faculdade de Farmácia (FAFAR) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

À Biblioteca da FAFAR, à Secretaria do Departamento de Alimentos da FAFAR/UFMG e à Secretaria do PPGCA pela assistência nas pesquisas bibliográficas e todo apoio e orientação na resolução de questões administrativas.

À Fundação Ezequiel Dias (FUNED), pela oportunidade de aprimoramento profissional dos seus funcionários e, em especial, ao laboratório de micotoxinas do serviço de ciências bioquímicas pelo apoio técnico e logístico no desenvolvimento do projeto.

À Waters pela disponibilização do Laboratório de Aplicações de Cromatografia e Espectrometria de Massas, em Barueri, SP, e pela oportunidade de aprendizado na condução dos experimentos usufruindo de sua infraestrutura analítica.

AGRADECIMENTOS PESSOAIS

À minha orientadora, Scheilla Vitorino Carvalho de Souza, pela oportunidade de orientação e ensinamentos transmitidos, pela excelência na condução do projeto e incentivo em momentos críticos, pela serenidade e paciência durante todo o percurso deste trabalho.

À equipe do serviço de ciências bioquímicas da FUNED e, em especial, aos colegas do laboratório de micotoxinas, Rafael von Sperling de Souza, Daniela de Azevedo Silva, Mateus Batista Gomes (agora no quadro funcional do laboratório de micotoxinas do MAPA), Raquel Eduardo Bickel e Elisete Alves, pelo apoio pessoal e pelo suporte técnico e operacional na condução dos experimentos de validação.

À Jovita Eugênia Gazzinelli Cruz Madeira, chefe do Serviço de Ciências Bioquímicas da FUNED pelo suporte e compreensão. Ao Guilherme Prado pelos ensinamentos sobre micotoxinas abordados neste trabalho.

Um agradecimento especial à Marize Silva de Oliveira, Responsável Técnica do Laboratório de Micotoxinas da FUNED, pelo grande empenho na realização deste projeto.

Ao Danilo Augusto Alves Pereira, Especialista de Aplicações em Espectrometria de Massas da Waters Technologies do Brasil, pela amizade e pela coparticipação no desenvolvimento da metodologia apresentada neste trabalho.

Aos membros da Banca Examinadora Dra. Myrna Sabino, Profa. Dra. Clésia Cristina Nascentes e Profa. Dra. Silvana da Motta pelas considerações que contribuíram para a melhoria da qualidade do presente trabalho.

Aos meus amigos e familiares por todo apoio e paciência durante este período.

Ao meu pai, não mais entre nós, pela formação de personalidade e caráter, no período em que estive ao meu lado.

À minha mãe pelo carinho incondicional e companhia do dia a dia, com constante transmissão de valores e conhecimentos.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
2. OBJETIVOS	22
2.1 OBJETIVO GERAL.....	22
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
3. REVISÃO DA LITERATURA	23
3.1 MILHO	23
3.1.1 ASPECTOS nutricionais.....	24
3.1.2 ASPECTOS econômicos.....	27
3.1.3 PRODUTOS DO MILHO E CONSUMO	28
3.2 MICOTOXINAS	32
3.2.1 HISTÓRICO	33
3.2.2 TOXICIDADE	33
3.2.3 FORMAS DE CONTAMINAÇÃO	44
3.2.4 OCORRÊNCIA EM MILHO E DERIVADOS	46
3.2.5 REGULAMENTAÇÃO EM MILHO E SEUS PRODUTOS	50
3.3 MÉTODOS DE ANÁLISE	57
3.4 VALIDAÇÃO.....	67
3.4.1 Validação intralaboratorial	67
3.4.2 Parâmetros de desempenho	68
3.4.3 Linearidade, sensibilidade e faixa	68
3.4.4 Efeitos de matriz e seletividade	70
3.4.5 Veracidade e precisão.....	71
3.4.6 Limites e incerteza.....	72

4. MATERIAL E MÉTODOS	74
4.1 AMOSTRAS	74
4.1.1 VALIDAÇÃO.....	74
4.1.2 ESTUDO DE OCORRÊNCIA	75
4.2 EQUIPAMENTOS.....	75
4.3 REAGENTES, PADRÕES E OUTROS	76
4.4 SOLUÇÕES	76
4.5 PROCEDIMENTOS ANALÍTICOS.....	78
4.5.1 Extração	79
4.5.2 Purificação.....	79
4.5.3 Determinação	80
4.6 VALIDAÇÃO DO MÉTODO.....	81
4.6.1 Linearidade, sensibilidade e faixa linear.....	81
4.6.2 Efeitos de matriz e seletividade	83
4.6.3 Recuperação, precisão, limites E INCERTEZA	85
4.7 ESTUDO DE OCORRÊNCIA	88
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	89
5.1 VALIDAÇÃO DO MÉTODO.....	89
5.2 ESTUDO DE OCORRÊNCIA	111
6. CONCLUSÕES	115
7. Referências Bibliográficas	117

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição nutricional do milho em grão cru	25
Tabela 2. Múltiplos usos do milho (planta, espiga e grão) no Brasil.....	29
Tabela 3. Categorização de substâncias pela Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (IARC) segundo seu potencial carcinogênico	34
Tabela 4. Notificações registradas pelo <i>Rapid Alert System for Food and Feed (RASFF)</i> entre 2004 e 2013 para micotoxinas em alimentos e rações.....	50
Tabela 5. Limites máximos tolerados para micotoxinas no Brasil	51
Tabela 6. Limites máximos tolerados para micotoxinas no Brasil - aplicação em janeiro de 2017	54
Tabela 7. Limites máximos tolerados para micotoxinas em milho e derivados na União Europeia	55
Tabela 8. Níveis de orientação do <i>Food and Drug Administration</i> para fumonisina em milho e produtos de milho.....	56
Tabela 9. Proposta do CODEX ALIMENTARIUS para níveis de fumonisinas e aflatoxinas em alimentos	57
Tabela 10. Revisão bibliográfica das metodologias para determinações multi-grupos de micotoxinas em milho e outros alimentos.....	60
Tabela 11. Critérios de desempenho para métodos de análise de micotoxinas.....	66
Tabela 12. Concentrações das soluções estoque de micotoxinas e respectivos diluentes	77
Tabela 13. Composição da solução estoque <i>pool</i> de micotoxinas	78
Tabela 14. Gradiente de eluição.....	80

Tabela 15. Níveis de concentração estudados nas curvas de calibração	82
Tabela 16. Níveis de contaminação das amostras adicionadas de padrão nos estudos de veracidade e precisão.....	86
Tabela 17. Tolerância máxima permitida para intensidade relativa dos íons em diferentes técnicas de espectrometria de massas.....	89
Tabela 18. Intensidades relativas dos íons confirmatórios obtidas para soluções padrões de curva matrizada e amostras adicionadas de padrão, por mensurando, e respectivas variações	90
Tabela 19. Avaliação dos parâmetros de regressão para as curvas de calibração das seis micotoxinas do escopo, preparadas em solvente e matriz, nas três condições de extração estudadas	96
Tabela 20. Comparações das inclinações e interceptos das curvas usuais e matrizadas, para as seis micotoxinas do escopo, nas três condições de extração estudadas	99
Tabela 21. Médias de recuperação e desvios padrão relativos, sob condições de repetibilidade e precisão intermediária, para as seis micotoxinas do escopo, empregando extração com acetonitrila:água (80:20)	104
Tabela 22. Médias de recuperação e desvios padrão relativos, sob condições de repetibilidade e precisão intermediária, para as seis micotoxinas do escopo, empregando extração com acetonitrila:metanol:água (60:20:20).....	105
Tabela 23. Médias de recuperação e desvios padrão relativos, sob condições de repetibilidade e precisão intermediária, para as seis micotoxinas do escopo, empregando extração com metanol:acetonitrila:água (60:20:20).....	106
Tabela 24. Limites de detecção e de quantificação teóricos estimados para as seis micotoxinas do escopo, nas três condições de extração estudadas	109
Tabela 25. Estimativas das incertezas de medição por nível estudado e respectivas incertezas máximas aceitáveis, para as seis micotoxinas do escopo, empregando a condição de extração selecionada - metanol:acetonitrila:água (60:20:20)	110

Tabela 26. Resultados obtidos no estudo de ocorrência para fumonisina B1 e zearalenona, com respectivas estimativas de incerteza..... 112

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de processamento do milho por moagem a seco.....	31
Figura 2. Estruturas químicas e massas moleculares (MM) das aflatoxinas B e G.	36
Figura 3. Produtos de oxidação da aflatoxina B ₁ (AFB ₁).....	37
Figura 4. Biotransformação do epóxido exo-8,9 da aflatoxina B ₁ (AFB ₁).....	38
Figura 5. Estrutura química e massa molecular (MM) das fumonisinas B ₁ e B ₂	39
Figura 6. Estruturas químicas da esfinganina e da esfingosina.....	40
Figura 7. Esquema de biossíntese de esfingolipídeos (a) e da interrupção do metabolismo de esfingolipídeos pela fumonisina B ₁ (b).	41
Figura 8. Estrutura química e massa molecular (MM) da zearalenona.	42
Figura 9. Estrutura química dos metabólitos da zearalenona.....	43
Figura 10. Estrutura química do 17β-estradiol.....	44
Figura 11. Marcha analítica do método proposto, empregando três diferentes soluções extratoras.....	79
Figura 12. Representação esquemática do delineamento experimental para avaliação da linearidade.....	82
Figura 13. Representação esquemática do delineamento experimental para avaliação dos efeitos de matriz.	83
Figura 14. Representação esquemática da avaliação dos parâmetros: veracidade, precisão, limite de detecção e limite de quantificação, para cada solução extratora.....	87

Figura 15. Cromatogramas típicos obtidos para amostras adicionadas de 80 µL da solução estoque <i>pool</i> de micotoxinas, utilizando metanol:acetonitrila:água (60:20:20) como solução extratora.	91
Figura 16. Cromatogramas típicos obtidos para o <i>pool</i> de amostras brancas, utilizando metanol:acetonitrila:água (60:20:20) como solução extratora.	92
Figura 17. Cromatogramas típicos obtidos para as soluções padrão da curva matrizada, utilizando metanol:acetonitrila:água (60:20:20) como solução extratora.	93
Figura 18. Cromatogramas típicos obtidos para as soluções padrão da curva usual....	94

LISTA DE SIGLAS E ABREVIACOES

AFB1	Aflatoxina B1
AFB2	Aflatoxina B2
AFG1	Aflatoxina G1
AFG2	Aflatoxina G2
AFM1	Aflatoxina M1
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOAC	<i>Association of Official Analytical Chemists</i>
BEH	<i>Ethylene Bridged Hybrid</i>
CI	<i>Chemical Ionization</i>
DVA	Diretoria de Vigilância em Alimentos
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i>
DPR	Desvio Padrão Relativo
EI	<i>Electron Ionization</i>
ESI	<i>Electrospray Ionization</i>
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
FB1	Fumonisina B1
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FUNED	Fundação Ezequiel Dias
GC	<i>Gas Chromatography</i>
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i>
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial
ISO	<i>International Standards Organization</i>
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
LACEN-MG	Laboratório Central de Saúde Pública do Estado de Minas Gerais
LD	Limite de Detecção
LMT	Limites Máximos Tolerados
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

MM	Massa Molecular
MRC	Material de Referência Certificado
MRM	<i>Multiple Reaction Monitoring</i>
MS	<i>Mass Spectrometry</i>
PNCRC	Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes
POF	Pesquisa Orçamentária Familiar
PROMAC	Programa de Monitoramento de Aditivos e Contaminantes
RASFF	<i>The Rapid Alert system for Food and Feed</i>
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
SSE	<i>Signal Suppression / Enhancement</i>
TLC	<i>Thin Layer Chromatography</i>
UE	União Europeia
UPLC	<i>Ultra Performance Liquid Chromatography</i>
UV - vis	Ultra Violeta - visível
VIM	Vocabulário Internacional de Metrologia
ZEA	Zearalenona

RESUMO

O milho é o principal produto da agricultura mundial, sendo o Brasil o terceiro maior produtor, além de extremamente importante sob o ponto de vista nutricional. Apesar da maior parte dos grãos produzidos no Brasil ter como destino a alimentação animal, o que representa uma tendência mundial, o fubá ocupa posição de destaque entre os produtos de milho destinados ao consumo humano. A contaminação de alimentos com micotoxinas é um importante tópico em segurança alimentar, sendo o milho o produto que apresenta as maiores taxas e variedades de contaminação. Os métodos oficiais descritos para a determinação de micotoxinas em alimentos e rações contemplam um único mensurando ou um único grupo de mensurandos, empregando técnicas cromatográficas e imunoensaios, com etapas laboriosas de extração e purificação. Contudo, existe uma tendência em substituição de procedimentos clássicos por técnicas analíticas modernas. Neste contexto, a cromatografia líquida de ultra performance acoplada à espectrometria de massas sequencial permite a ampliação dos escopos analíticos, associada à redução no consumo de tempo, materiais, solventes e geração de resíduos. No presente trabalho, um método rápido, envolvendo extração em etapa única para determinação simultânea de aflatoxinas B₁ (AFB₁), B₂ (AFB₂), G₁ (AFG₁), G₂ (AFG₂), fumonisina B₁ (FB₁) e zearalenona (ZEA) em fubá, foi validado e aplicado em um estudo de ocorrência. Diferentes soluções extratoras foram testadas, com melhor desempenho para metanol:acetonitrila:água (60:20:20). Linearidade foi evidenciada nas faixas de 0,25 a 1,50 ng/mL para as aflatoxinas, de 20 a 120 ng/mL para FB₁ e de 7,00 a 42,00 ng/mL para ZEA. Efeitos de matriz significativos foram demonstrados para todos os grupos ($p < 0,05$). Recuperações médias de 87,57; 93,18; 93,35; 94,20; 78,76 e 95,98 % foram estimadas, para AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂, FB₁ e ZEA, respectivamente, em ensaios com amostras adicionadas. Material de referência certificado de milho para FB₁ foi analisado com obtenção de z-escore de 0,19. Desvios padrão relativos máximos sob condições de repetibilidade e precisão intermediária de 13,6 e 13,6 % para AFB₁, AFB₂, AFG₁ e AFG₂, de 3,7 e 6,3 % para FB₁, e de 3,5 e 4,0 % para ZEA, respectivamente, foram alcançados. Tais resultados comprovaram a acurácia do método na faixa estudada. No estudo de ocorrência, das 50 amostras analisadas, 44 % apresentaram níveis

quantificados de FB1 e ZEA foi detectada em 18 % das amostras. A metodologia validada foi considerada adequada para o propósito de determinação de multigrupos de micotoxinas em fubá como parte das ações para promoção da saúde pública.

Palavras-chave: validação intralaboratorial, micotoxinas, fubá, cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas, determinação multigrupos, ocorrência

ABSTRACT

Corn is the main product of world agriculture, and Brazil is the third largest producer. This is an extremely important product in the nutritional point of view. Although most of the grain produced in Brazil have destined for animal feed, which is a global trend, the cornmeal occupies a prominent position among the maize products for human consumption. Food contamination with mycotoxins is an important topic in food security, and the corn stands out as a product having the highest rates and varieties of contamination. Official methods described for the determination of mycotoxins in foods and feeds include a single measurand or a single group of measurands, using chromatographic techniques and immunoassays, and laborious extraction and clean-up steps. However, there is a trend to replace classical procedures by modern analytical techniques. In this context, ultra performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry allows the extension of the analytical scopes associated with a reduction of the time consuming, and solvent discard. In this paper, a rapid and single extraction method for simultaneous determination of aflatoxin B1 (AFB1), B2 (AFB2), G1 (AFG1), G2 (AFG2), fumonisin B1 (FB1) and zearalenone (ZEA) in cornmeal was validated and applied in an occurrence. Different extraction solutions were tested, with better performance for methanol:acetonitrile:water (60:20:20). Linearity was observed in the range from 0.25 to 1.50 for aflatoxins, from 20 to 120 for FB1 and from 7.00 to 42.00 ng/mL for ZEA. Significant matrix effects were demonstrated for all groups ($p < 0.05$). Average recoveries of 87.57, 93.18, 93.35, 94.20, 78.76 and 95.98 % were estimated to AFB1 AFB2, AFG1, AFG2, FB1 and ZEA, respectively, employing spiked samples. Maize certified reference material for FB1 was analyzed with score-z of 0.19. Maximum relative standard deviation under repeatability conditions and intermediate precision of 13.6 and 13.6 % for AFB1, AFB2, AFG1 and AFG2, of 3.7 and 6.3 % for FB1, and of 3.5 and 4.0 % for ZEA, respectively, were achieved. These results confirmed the accuracy of the method. In the occurrence study, for the 50 samples analyzed, 44 % had measurable levels of FB1 and ZEA was detected in 18 % of the samples. The validated method was considered fitness for the purpose of considering the determination of different groups of mycotoxins in cornmeal as part of the actions for the public health promotion.

Keywords: in-house validation, mycotoxins, cornmeal, ultra performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry, multi-group determination, occurrence.

1. INTRODUÇÃO

O milho é o principal produto da agricultura mundial, sendo o Brasil o terceiro maior produtor, atrás dos Estados Unidos e China (USDA, 2015). Em 2013/2014 foi alcançada uma safra recorde no país, em torno de 80 milhões de toneladas, sendo o centro-oeste, o sul e o sudeste as principais regiões produtoras. Neste contexto, destacam-se os estados do Mato Grosso, Paraná, Minas Gerais e Goiás (CONAB, 2014).

Trata-se de um produto extremamente importante sob o ponto de vista nutricional, com destaque para sua composição em relação aos macronutrientes energéticos, carboidratos e lipídeos, e ao seu conteúdo de fibras alimentares (Paes, 2006). O milho é um produto que apresenta grande versatilidade para o aproveitamento na alimentação humana. Ele pode ser consumido diretamente ou pode ser utilizado como componente na fabricação de produtos diversos como, balas, biscoitos, pães, chocolates, cerveja, entre outros (ABIMILHO, 2011). Apesar destas características, a maior parte dos grãos produzidos no Brasil tem como destino a alimentação animal, o que representa uma tendência mundial (EMBRAPA, 2012).

Para o processamento do milho destinado ao consumo humano, no Brasil, destaca-se o processo de moagem a seco, que envolve menores escalas de produção e investimentos industriais, resultando em produtos como canjica, farinhas, fubás, *grits*, flocos, farelo e óleo (EMBRAPA, 2012; AGEITEC, 2013). Os produtos de moagem a seco são os que apresentam maior índice de consumo no Brasil, com destaque para o fubá, que é o derivado de milho mais consumido no país (Rios, et al., 2011).

A segurança alimentar é um tópico de grande expressão na promoção da saúde humana e animal. Neste contexto, destaca-se a contaminação dos alimentos por micotoxinas, metabólitos secundários de fungos, os quais são contaminantes naturais de uma série de alimentos. Estes compostos são fatores etiológicos de uma série de distúrbios respiratórios e neurológicos, bem como, nefrotoxicidade, hepatotoxicidade e carcinogênese. Um grande número de micotoxinas pode ser encontrado em cereais, que representam a principal fonte de carboidratos na dieta humana, e podem ser facilmente contaminados por fungos em diversos estágios de sua produção e

armazenamento. Dentre os cereais, o milho se sobressai como o produto que apresenta as maiores taxas e variedades de contaminação (Resanovic, et al., 2013).

No Brasil, as redes de laboratórios oficiais da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) realizam atividades de monitoramento da contaminação de milho e seus produtos por micotoxinas, por meio do Programa de Monitoramento de Aditivos e Contaminantes (PROMAC) e do Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes em Produtos de Origem Vegetal (PNCRC) respectivamente, sendo empregadas técnicas cromatográficas como cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e cromatografia em camada delgada (TLC). Nestes métodos oficiais as etapas de extração e purificação envolvem partição líquido:líquido, extração em fase sólida ou colunas de imunoafinidade (AOAC, 2012). Desta forma, nos referidos programas, os grupos de micotoxinas são analisados individualmente, o que representa um significativo gasto de tempo, recursos humanos e reagentes, além de impactos ambientais decorrentes dos resíduos dos processos analíticos.

Existe, atualmente, uma tendência em substituição de procedimentos clássicos por técnicas analíticas modernas, as quais permitem fornecer respostas às demandas globais de segurança, qualidade e rastreabilidade de alimentos. Desta forma, os laboratórios de análises de alimentos têm sido demandados pelo desenvolvimento de métodos *environmental-friendly*, por meio da implantação da química verde (*Green Analytical Chemistry*), incluindo miniaturização, uso de técnicas que consomem menos solventes ou combinações de técnicas de separação (Cifuentes, 2012). Neste contexto, a cromatografia líquida de ultra performance acoplada à espectrometria de massas sequencial (UPLC-MS/MS) permite a ampliação dos escopos analíticos e, conseqüentemente, uma redução do tempo gasto na análise de contaminantes nas matrizes alimentícias levando à uma diminuição na geração de resíduos químicos.

Independentemente da técnica utilizada, todo o trabalho para manutenção de uma estrutura de monitoramento da qualidade de alimentos, visando à segurança alimentar, tem como base o grau de confiabilidade dos métodos analíticos utilizados. Assim, os laboratórios e indústrias que realizam análises de contaminação por micotoxinas em alimentos devem dispor de métodos devidamente validados e

monitorados (Souza, et al., 2007). A validação de métodos é uma importante ferramenta compreendida nos sistemas de gestão da qualidade laboratoriais que, juntamente com procedimentos de controle de qualidade interno e externo, permite aos laboratórios produzirem dados analíticos confiáveis (Thompson, et al., 2002).

Tendo em vista a elevada produção de milho no Brasil, aliada à possibilidade de contaminação deste produto por diferentes espécies de fungos, se faz necessário validar metodologias para análise rápida e simultânea de micotoxinas de diferentes grupos em derivados de milho, visando assegurar a segurança alimentar da população.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Validar um método para determinação simultânea de aflatoxinas B₁ (AFB1), B₂ (AFB2), G₁ (AFG1), G₂ (AFG2), fumonisina B₁ (FB1) e zearalenona (ZEA) em fubá, empregando extração em etapa única e a técnica UPLC-MS/MS, visando subsidiar ações da ANVISA.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Validar um método quantitativo para determinação de AFB1, AFB2, AFG1, AFG2, FB1 e ZEA em fubá por UPLC-MS/MS, por processo intralaboratorial, incluindo o estudo dos parâmetros linearidade, sensibilidade, faixa, seletividade e efeitos de matriz, veracidade, precisão, limites e incerteza.
- Monitorar a ocorrência de contaminação por AFB1, AFB2, AFG1, AFG2, FB1 e ZEA em amostras de fubá coletadas no comércio de Minas Gerais pela Vigilância Sanitária Estadual, empregando o método validado.
- Avaliar a adequação das amostras analisadas considerando os limites máximos tolerados pela legislação nacional e internacional.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 MILHO

O grão de milho é formado por quatro principais estruturas físicas: endosperma, gérmen, pericarpo (casca) e ponta, as quais diferem na composição química e na organização dentro do grão. Os componentes majoritários dos grãos são o endosperma e o gérmen, onde estão presentes as maiores quantidades de amido e de óleo, respectivamente (Shukla & Cheryan, 2001).

O endosperma é o constituinte majoritário do grão e também o componente de maior valor, com importância nutricional para animais e humanos. O endosperma representa aproximadamente 83 % do peso seco do grão, constituído principalmente de amido, na forma de grânulos. No endosperma também estão presentes os carotenoides, responsáveis por conferir cor aos grãos, além das proteínas de reserva, zeínas, responsáveis pela formação dos corpos proteicos que envolvem os grânulos de amido dentro das células do endosperma. Com base na distribuição dos grânulos de amido e da matriz de proteína, o endosperma pode ser classificado como farináceo ou vítreo. No primeiro, os grânulos de amido estão dispersos e não são circundados por matriz proteica, o que resulta em espaços vagos durante a secagem do grão. No vítreo, a matriz proteica é densa e circunda os grânulos de amido, não permitindo a ocorrência de espaços entre estas estruturas. Esta denominação refere-se ao aspecto dos endospermas nos grãos quando sujeitos à incidência de luz. No farináceo, a passagem de luz é permitida o que confere opacidade ao material. No vítreo, a ausência de espaços vazios promove a reflexão da luz, resultando em um aspecto vítreo ao grão (Evers & Millart, 2002; Paes, 2006).

O gérmen representa aproximadamente 11 % do grão e concentra quase a totalidade dos lipídeos (óleo e vitamina E) e dos minerais, além de conter grandes quantidades de proteínas e açúcares. A composição de óleos no gérmen de milho é semelhante aos óleos de soja e girassol, contendo o ácido graxo linoleico e um

pequeno percentual de ácido graxo linolênico, que são considerados essenciais aos humanos por não serem naturalmente sintetizados (Paes, 2006).

Existem cinco diferentes classes gerais de milho, que são baseadas nas diferentes características dos grãos: dentado (*Zea mays* ssp *mays* var *indentata*), duro (var *indurata*), farináceo (var *amylacea*), pipoca (var *everta*) e doce (var *saccharata*). As principais diferenças entre as classes estão na forma e no tamanho dos grãos, definidos pela estrutura do endosperma e pelo tamanho do gérmen. As proporções relativas de endosperma vítreo e endosperma farináceo variam de acordo com a classe de milho. O milho duro e o milho farináceo são ambos nomeados de acordo com a textura do endosperma predominante encontrado em seus grãos. O milho duro possui um volume contínuo de endosperma vítreo apresentando grãos lisos e duros, enquanto que no farináceo o endosperma é completamente farináceo conferindo uma aparência opaca ao grão. O milho dentado é assim nomeado porque a porção central de endosperma farináceo se rompe durante a secagem dando origem a uma indentação na parte superior do grão. O milho de pipoca é uma variação do milho duro, em que a textura densa do endosperma leva a um acúmulo de pressão durante o cozimento, resultando na rápida expansão do hilo no centro dos grânulos e no “estouro” do grão. O milho doce se difere dos demais por possuir maior conteúdo de açúcar. Possui uma aparência enrugada quando seco devido a não conversão dos açúcares em amido, levando ao acúmulo de fitoglicogênio, um polissacarídeo solúvel (Evers & Millart, 2002; Singh, et al., 2009).

3.1.1 ASPECTOS NUTRICIONAIS

O milho é considerado um alimento muito energético, trazendo em sua composição vitaminas, proteínas, carboidratos, lipídeos e minerais (**Tabela 1**), contribuindo com aproximadamente 360 kcal de energia por 100 gramas do produto (ABIMILHO, 2011).

A casca do grão é rica em fibras, o que incorpora valor funcional ao milho. Os alimentos fibrosos têm sido recomendados na dieta humana para controle de colesterol, melhora da constipação intestinal, prevenção de câncer no intestino e

diverticulite. Além disso, o conteúdo de ácidos graxos, presente no óleo de milho, é um fator de prevenção de doenças cardiovasculares e de combate ao colesterol sérico elevado. Outro aspecto importante, relativo ao conteúdo de lipídeos, é a presença de tocoferóis e carotenoides. Os tocoferóis fazem parte da estrutura de hormônios, enquanto os carotenoides possuem ação anticâncer, devido à sua propriedade antioxidante. Os carotenos (alfa e beta) presentes podem ser convertidos em retinol, uma substância pró-vitamina A, sendo importantes nutricionalmente para humanos, além de colaborarem com a cadeia comercial produtiva de aves, melhorando a coloração da carne e da gema dos ovos. Outro nutriente que se destaca como constituinte dos grãos é a proteína, com teores de aproximadamente 9 %. Porém, a proteína presente no milho comum é deficiente dos aminoácidos essenciais lisina e triptofano, não sendo adequada para promover funções, como crescimento corporal, quando constitui a única fonte deste nutriente na dieta (Paes, 2006).

Tabela 1. Composição nutricional do milho em grão cru

Componente	Teor por 100 g
Umidade (g)	10,37
Energia (Kcal)	365
Proteína (g)	9,42
Lipídeos totais (g)	4,74
Carboidratos por diferença (g)	74,26
Açúcares totais (g)	0,64
Fibra alimentar (g)	7,3
Minerais	
Cálcio (mg)	7
Magnésio (mg)	127
Fósforo (mg)	210
Ferro (mg)	2,71
Sódio (mg)	35

Potássio (mg)	287
Zinco (mg)	2,21
Vitaminas	
Vitamina A (IU)	214
Vitamina A, RAE (µg)	11
Tiamina (B1) (mg)	0,385
Riboflavina (B2) (mg)	0,201
Piridoxina (B6) (mg)	0,622
Niacina (B3) (mg)	3,627
Vitamina C (mg)	0,0
Vitamina D (IU)	0
Vitamina (D2+D3) (µg)	0,0
Vitamina E (alfa tocoferol) (mg)	0,49
Vitamina K (µg)	0,3
Cianocobalamina (B12) (µg)	0,00
Folato DFE (µg)	19
Lipídeos	
Ácidos graxos saturados (g)	0,67
Ácidos graxos monoinsaturados (g)	1,25
Ácidos graxos poliinsaturados (g)	2,16
Colesterol (mg)	0
Cafeína (mg)	0

Fonte: USDA, 2013

3.1.2 ASPECTOS ECONÔMICOS

O milho é a cultura de maior destaque da agricultura mundial. A safra 2014/2015 de milho no mundo está estimada em 991,6 milhões de toneladas, com uma área plantada de 177,2 milhões de hectares. O Brasil é o terceiro maior produtor mundial, responsável pela produção de aproximadamente 80 milhões de toneladas, em uma área de 15,4 milhões de hectares, estando atrás apenas de Estados Unidos e China, responsáveis pela produção de 366 e 215,5 milhões de toneladas do produto, em áreas de 33,6 e 37 milhões de hectares, respectivamente (USDA, 2015; CONAB, 2014).

A produção mundial de milho está concentrada nos Estados Unidos, China, Brasil, União Europeia, Ucrânia, México, Argentina e Índia, os quais atualmente respondem por 66,8 % e 83 % da área plantada e da produção mundial, respectivamente (USDA, 2015).

Cerca de 70 % da produção mundial de milho é destinada à alimentação animal, podendo este percentual chegar a 85 %, em países desenvolvidos. Em termos gerais, apenas 15 % de toda a produção mundial destina-se ao consumo humano, de forma direta ou indireta (EMBRAPA, 2012).

A produção de milho no Brasil é dividida em duas épocas de plantio. No período chuvoso, ocorrem os plantios de verão, ou primeira safra, variando a época do ano dependendo da região do país. No período seco, ocorre o plantio do milho de sequeiro, ou safrinha que, com os aprimoramentos das tecnologias de cultivo e devido à logística de produção rural, vem apresentando crescimento na produção mesmo sendo cultivado em condições climáticas desfavoráveis (EMBRAPA, 2012).

A produção nacional de milho teve seu recorde na safra de 2013/2014, atingindo uma produção de 79,9 milhões de toneladas (aproximadamente 10 % maior que a safra anterior), correspondendo a uma área plantada de 15,8 milhões de hectares. A estimativa apresentada para a safra de 2014/2015 prevê um pequeno decréscimo de aproximadamente 1,5 % na produção de milho que deverá atingir níveis de produção de 78,7 milhões de toneladas em uma área plantada de 15,4 milhões de hectares. As regiões maiores produtoras são centro-oeste, sul e sudeste, sendo os estados de Mato Grosso, Paraná, Mato Grosso do Sul, Goiás, Minas Gerais e Rio Grande do Sul

responsáveis pela produção de 18,6; 14,5; 8,4; 7,7; 7,3 e 5,1 milhões de toneladas de milho, respectivamente, o que representa cerca de 80 % da safra nacional (CONAB, 2014).

No Brasil, a produção é voltada, majoritariamente, para o mercado interno, no qual o milho tem dois destinos: i) o próprio estabelecimento rural onde é produzido; destinado em sua maior parte à nutrição animal, mas também para consumo humano; e ii) o mercado consumidor, sendo direcionado para fábricas de rações, indústrias químicas, indústrias de alimentos e para o mercado de consumo *in natura* (EMBRAPA, 2012).

Cerca de 20 % do total de milho produzido no Brasil destina-se à exportação, a qual tem como principais mercados países como Japão, Irã, Coreia do Sul, Marrocos, Arábia e Estados Unidos. Eventualmente, o Brasil importa milho, em pequenas quantidades, de países como Paraguai e Argentina (CONAB, 2013).

3.1.3 PRODUTOS DO MILHO E CONSUMO

O milho não possui apenas aplicação alimentícia. O emprego de seus derivados estende-se às indústrias química, farmacêutica, de papéis, têxtil, entre outras aplicações (**Tabela 2**), de forma que tem sido discutido o tratamento do milho como uma *commoditie*. Existem diferentes variedades do produto, cujas qualidades físicas e químicas, são determinadas de acordo com o seu destino. Por exemplo: milhos com alto teor de óleo (6 a 7,5 %) e alto teor de proteína (> 12 %), destinados à alimentação animal; alto teor de amilose, com propriedades importantes para a indústria alimentícia e de papel; alto teor de amilopectina, para a indústria alimentícia e também de produção de adesivos; alto teor de ácido graxo oleico, para a produção de margarinas e também óleos de fritura especiais; alto teor de aminoácidos (lisina e triptofano), com melhor qualidade proteica; milhos com amido de fácil extração, destinados à indústria de produção de álcool a partir de milho (Paes, 2006).

Tabela 2. Múltiplos usos do milho (planta, espiga e grão) no Brasil

Destinação	Forma / Produto Final
Uso Animal Direto	Silagem, rolão, grãos (inteiro/desintegrado) para aves, suínos e bovinos.
Uso Humano Direto de Preparo Caseiro	Espiga assada ou cozida, pamonha, curau, pipoca, pães, bolos, broas, cuscuz, polenta, angus, sopas, farofa.
Indústria de Rações	Rações para aves (corte e postura), outras aves, suínos, bovinos (corte e leite), outros mamíferos.
Indústria de Alimentos - Produtos Finais	Amidos, fubás, farinhas comuns, farinha pré-cozidas, flocadas, canjicas, óleo, creme, pipocas, glicose, dextrose.
Intermediários	Canjicas, sêmola, semolina, moído, granulado, farelo de germe.
Xarope de Glucose	Balas duras, balas mastigáveis, goma de mascar, doces em pasta, salsichas, salames, mortadelas, hambúrgueres, outras carnes processadas, frutas cristalizadas, compotas, biscoitos, xaropes, sorvetes, para polimento de arroz.
Xarope de Glucose com alto teor de maltose	Cervejas.
Corantes Caramelo	Refrigerantes, cervejas, bebidas alcoólicas, molhos.
Maltodextrinas	Aromas e essências, sopas desidratadas, pós para sorvetes, complexos vitamínicos, produtos achocolatados.
Amidos Alimentícios	Biscoitos, melhoradores de farinhas, pães, pós para pudins, fermento em pó, macarrão, produtos farmacêuticos, balas de goma.
Amidos Industriais	Para papel, papelão ondulado, adesivos fitas gomadas, briquetes de carvão, engomagens de tecidos, beneficiamento de minérios.

Dextrinas	Adesivos, tubos e tubetes, barricas de fibra, lixas, abrasivos, sacos de papel, multifolhados, estampagem de tecidos, cartonagem, beneficiamento de minérios.
Pré-Gelatinizados	Fundição de peças de metal.
Adesivos	Rotulagem de garrafas e de latas, sacos, tubos e tubetes, fechamento de caixas de papelão, colagem de papel, madeira e tecidos.
Ingredientes Proteicos	Rações para bovinos, suínos, aves e cães.

Fonte: Jornal Agroceres apud CiMilho (2013).

A indústria moageira de milho se divide em dois grandes grupos. O grupo de moagem a úmido, que produz subprodutos com alto valor agregado geralmente, destinados a reprocessamentos por parte de outra indústria, e o grupo de moagem a seco, que gera produtos de menor valor, geralmente destinados ao consumo humano. No Brasil, o processo mais utilizado é o de moagem a seco (**Figura 1**), o que resulta em produtos como canjica, farinhas, fubás, *grits*, flocos, farelos e óleos (EMBRAPA, 2012; AGEITEC, 2013).

A moagem seca é o processo mais utilizado devido ao fato de envolver menores escalas de produção e menor investimento industrial. As indústrias processadoras de milho por esse processo são geralmente de pequeno porte e quase que totalmente dedicadas ao processamento para consumo local, embora se observe uma tendência recente de concentração destes produtos em indústrias de maior porte. Além dos produtos derivados da moagem seca, produtos industriais derivados da moagem úmida foram acrescentados, dentre os destinados ao consumo humano. Os de maior importância são o amido derivado da moagem úmida, cujo nome do produto foi praticamente substituído pela designação comercial de Maizena, e o óleo de milho, que rende em média 5 % do peso do grão. Devido à complexidade do processamento e à necessidade de capital envolvido, esses produtos são oriundos de empresas de grande porte (AGEITEC, 2013).

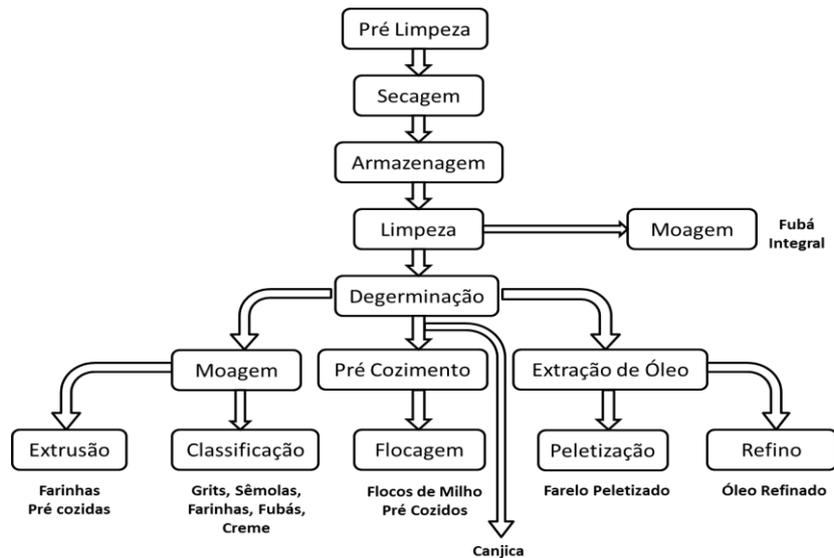


Figura 1. Esquema de processamento do milho por moagem a seco.

Fonte: Rios et al. (2011).

No processo de moagem por via seca, o grão é separado em endosperma, pericarpo e gérmen. O milho degerminado pode ser designado de canjica (*flaking grits*), sendo caracterizado pelo endosperma em pedaços desprovidos da película e do gérmen. A canjica pode ser destinada diretamente ao consumo, ou pode ser submetida ao processo de moagem originando outros *grits*, fubás e farinhas. No Brasil, em relação aos tipos de fubá e de farinha de milho produzidos, têm-se algumas peculiaridades, pois há diferentes tipos destes produtos que podem variar tanto na granulometria quanto na forma de produção. Com relação ao modo de produção existem dois tipos de fubá, o fubá comum (integral) obtido pela moagem do grão inteiro, tendo alto valor nutricional, e o fubá mimoso (fubá canjica) obtido da moagem do milho degerminado (canjica) sendo mais fino e apresentando maior tempo de conservação em razão do baixo conteúdo lipídico. Com relação à farinha, a Resolução RDC N° 263 (ANVISA, 2005) define a farinha de milho como: produto obtido de partes comestíveis de uma ou mais espécies de cereais, leguminosas, frutos, sementes, tubérculos e rizomas por moagem e ou outros processos tecnológicos considerados seguros para produção de alimentos. Industrialmente a farinha de milho (creme de milho), é composta basicamente pela fração amilácea do grão. A presença de proteína favorece a integridade do grânulo de amido, dificultando sua liberação durante a moagem. Desta forma, por motivos econômicos, a indústria, na moagem dos grãos para produção de

fubá, obtém a farinha de milho como um produto residual, separado em peneiras muito finas (Rios, et al., 2011).

Entre os derivados de milho oriundos do processo de moagem a seco, o fubá é o produto mais consumido pela população no Brasil. Dados da Pesquisa Orçamentária Familiar (POF), realizada pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) no período de 2008 – 2009, apontam este produto como o derivado de milho com maior índice de aquisição domiciliar *per capita* anual. O milho em grão também se destaca neste levantamento pelo seu alto consumo na área rural, destinado principalmente para o consumo animal (IBGE, 2009).

Apesar do grande consumo de produtos oriundos do processo de moagem a seco, o Brasil, seguindo a tendência mundial, destina a maior parte da sua produção de milho para o consumo animal, sendo este segmento o grande mercado deste cereal, seguido do reprocessamento industrial e, por último, o consumo humano (EMBRAPA, 2012).

3.2 MICOTOXINAS

As micotoxinas são compostos de baixo peso molecular, produtos do metabolismo secundários de fungos, cuja presença em alimentos e rações não pode ser completamente evitada. São consideradas contaminantes naturais e sua presença está associada a doenças em humanos e animais (Kuiper-Goodman, 1995).

A ocorrência de micotoxinas é mais provável em países onde as técnicas de manuseio e as condições de estocagem de alimentos são inadequadas, em países com histórico de problemas de má nutrição da população e onde as regulamentações não são suficientes para evitar a exposição dos consumidores aos alimentos contaminados (Bennett & Klich, 2003).

3.2.1 HISTÓRICO

Doenças devido à produção de alcaloides por fungos parasitas do centeio (ergotismo), já eram relatadas desde a idade média, sem a identificação da substância tóxica (Desjardins, et al., 2003). No entanto, o início da micotoxicologia moderna se deu com a descoberta das aflatoxinas na década de 60, quando um grande número de filhotes de perus começou a morrer em granjas inglesas, alimentados com rações preparadas a base de amendoim proveniente do Brasil e África. Animais em boas condições com aproximadamente quatro semanas de vida, adquiriram uma doença desconhecida que era responsável por altas taxas de mortalidade, em um curto período de tempo, além de provocar o aparecimento de lesões *post-mortem* envolvendo rins e fígado. Na tentativa de identificar a causa do problema, análises microscópicas e de culturas falharam em revelar alguma infecção específica que fosse conhecida. A doença foi inicialmente atribuída a algum tipo de vírus, mas já havia a desconfiança de que a dieta fornecida aos animais poderia ter alguma contribuição, já que a troca da ração fornecida tinha impacto imediato na mortalidade (Stevens, et al., 1960; Barnes, 1970).

Atualmente, são conhecidos milhares de metabólitos tóxicos de fungos, estando entre eles as micotoxinas, agentes expressivos causadores de doenças em animais e humanos. Os fungos produtores de micotoxinas causam preocupação com relação à segurança alimentar, bem como os impactos decorrentes no comércio de grãos, alimentos e rações (Desjardins, et al., 2003).

3.2.2 TOXICIDADE

Entende-se por micotoxicose o processo patológico resultante da ingestão ou contato com micotoxinas. As micotoxicoses podem ser categorizadas em aguda primária ou crônica primária. A micotoxicose aguda primária manifesta-se quando, considerando-se a sensibilidade, os indivíduos consomem doses de moderadas a altas de micotoxinas. Nestes casos, um quadro clínico agudo e específico pode incluir sinais e sintomas como hemorragias, hepatite, nefrite, necrose de mucosas digestivas e morte, dependendo da susceptibilidade da espécie, das condições individuais e da

interação ou não com outras micotoxinas. A micotoxicose crônica primária ocorre quando os níveis consumidos de micotoxinas são de moderados a baixos e manifesta-se em quadros representados por *déficit* de eficiência reprodutiva, redução do ganho de peso e da taxa de crescimento. Em geral, estes efeitos ocorrem sem a caracterização clínica da micotoxicose aguda primária e, em muitos casos, estes efeitos somente serão detectados quando cuidadosamente observados, ou pela presença de outras doenças superpostas e deficiências nutricionais. Além das categorias descritas, existem também as doenças secundárias causadas pela ingestão de baixos níveis de micotoxinas, que são incapazes de causar uma micotoxicose evidente, porém são capazes de predispor o hospedeiro a doenças infecciosas devido à quebra de mecanismos de resistência orgânica (Carvalho, 1995).

Existe uma grande preocupação com relação aos efeitos crônicos gerados mesmo em baixos níveis de exposição às micotoxinas que são consideradas carcinogênicas ou potencialmente carcinogênicas aos humanos segundo a Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (IARC) (Kuiper-Goodman, 1995). As micotoxinas estão separadas em grupos de acordo com o seu potencial carcinogênico (**Tabela 3**), segundo a classificação formulada pela IARC para agentes, misturas e circunstâncias de exposição.

Tabela 3. Categorização de substâncias pela Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (IARC) segundo seu potencial carcinogênico

Grupo	Critério para Inclusão na Categoria
1	Evidência suficiente de carcinogenicidade em humanos e animais experimentais.
2A	Evidência limitada de carcinogenicidade em humanos e evidência suficiente em animais experimentais.
2B	Evidência limitada de carcinogenicidade em humanos e animais experimentais.
3	Evidência inadequada para carcinogenicidade em humanos e evidência limitada em animais experimentais.
4	Evidências sugerem a não carcinogenicidade em humanos e animais experimentais.

Fonte: IARC (2002).

A biotransformação e os mecanismos de defesa são importantes para a compreensão da toxicidade das micotoxinas em diferentes espécies. Os animais ruminantes, por exemplo, apresentam maior resistência à ação das micotoxinas quando comparados aos não-ruminantes (Hussein & Jeffrey, 2001). Porém, a produção (leite e carne), reprodução e crescimento podem ser alterados quando os ruminantes consomem alimentos contaminados por longos períodos de tempo (Helferich, et al., 1986).

Vários tipos de metabólitos tóxicos têm sido obtidos de culturas de fungos em laboratório. A maioria deles é conhecida por causarem doenças em humanos e animais (Desjardins, et al., 2003). Dentre as micotoxinas mais importantes, conhecidas por contaminarem grãos de milho, podemos destacar as aflatoxinas, a FB1 e a ZEA, pertencentes ao grupo principal destes compostos (Covarelli, et al., 2011).

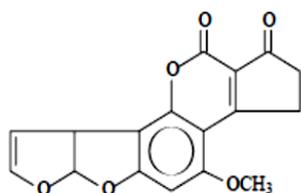
Aflatoxinas

As aflatoxinas são potentes carcinógenos naturais produzidas por fungos do gênero *Aspergillus*: *A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. nomius* e *A. pseudotamarii* (Ito, et al., 2001; Samson, et al., 1995). Dentre os citados o *A. flavus* e o *A. parasiticus* são os mais importantes, economicamente, pois estes dois fungos podem produzir aflatoxinas nas sementes em desenvolvimento de milho, amendoim, algodão, amêndoa, pistache, nozes e castanha do Brasil, além de serem capazes de contaminar praticamente todos os substratos que estejam armazenados de forma inadequada (Desjardins, et al., 2003).

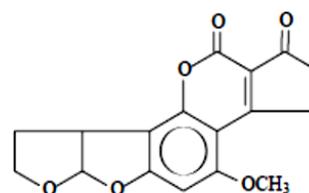
O *A. flavus* tem grande afinidade com as sementes em desenvolvimento de milho o que resulta na contaminação antes da colheita (ou imediatamente após), resultando em um grande potencial para a produção de altos níveis de aflatoxinas neste produto, sendo muito difícil a eliminação da contaminação neste caso. Estudos dos efeitos das aflatoxinas em humanos indicam que a exposição acentuada a esses compostos está associada com carcinomas hepatocelulares, hepatite tóxica, síndrome de *Reye*, *Kwashiorkor* e deficiência de linfócitos. As aflatoxinas estão entre as micotoxinas que oferecem o maior potencial de risco para a saúde de humanos e animais agindo como

contaminantes diretos em alimentos e rações, apresentando evidências suficientes de carcinogenicidade em humanos (Resanovic, et al., 2013; IARC, 2002).

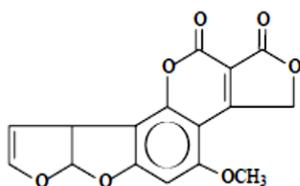
As principais aflatoxinas produzidas são AFB1, AFB2, AFG1 e AFG2 (**Figura 2**), nomeadas de acordo com sua fluorescência sob luz UV (B = *blue* e G = *green*) e mobilidade durante a separação cromatográfica, além de seus produtos metabólicos, as aflatoxinas M₁ e M₂ (AFM1 e AFM2), que foram isolados pela primeira vez do leite (M = *milk*) de animais lactantes alimentados com ração contaminada (Desjardins, et al., 2003). Dentre as aflatoxinas citadas, a AFB1 se destaca com um potente agente genotóxico e carcinogênico. Estudos feitos em ratos revelaram a indução de câncer no fígado em todos os animais submetidos à dieta rica em AFB1 (Wogan, et al., 1974).



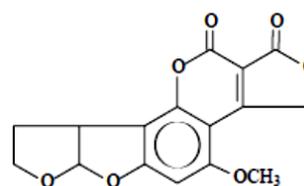
B₁: C₁₇H₁₂O MM: 312,3 g/mol



B₂: C₁₇H₁₄O₆ MM: 314,3 g/mol



G₁: C₁₇H₁₂O₇ MM: 328,3 g/mol



G₂: C₁₇H₁₄O₇ MM: 330,3 g/mol

Figura 2. Estruturas químicas e massas moleculares (MM) das aflatoxinas B e G.

Fonte: IARC (2002).

A carcinogenicidade da AFB₁ em humanos e animais está relacionada com a sua biotransformação no isômero *exo* do epóxido-8,9 por enzimas do citocromo P450 presentes no fígado (Essigman, et al., 1982). Este composto reage com moléculas de DNA formando adutos com a guanina na posição N₇ com rendimento superior a 98 %, sendo responsável direto pelo mecanismo de carcinogênese da referida micotoxina (Guengerich, et al., 1998).

Outros metabólitos menos tóxicos podem ser formados no processo de biotransformação da AFB₁ (**Figura 3**). Além disso, o isômero *exo* do epóxido-8,9 pode seguir rotas alternativas à formação de adutos com moléculas de DNA (**Figura 4**), resultando em conjugados não tóxicos reduzindo os efeitos nocivos da toxina. O epóxido pode se ligar com a enzima glutathione S-transferase (GST) para formação do conjugado do epóxido *exo* da AFB₁ com a glutathione (GSH). Além disso, o epóxido pode ser rapidamente hidrolisado, por mecanismo direto ou enzimático, formando um composto 8,9-dihidrodiol que, por sua vez, sofre uma quebra de anel por mecanismo enzimático dando origem a íons fenolato que formam bases de *schiff* com aminas primárias como as da lisina, originando adutos com proteínas como a albumina (Sabbioni, et al., 1987; Johnson, et al., 1996; Guengerich, et al., 1998; IARC, 2002).

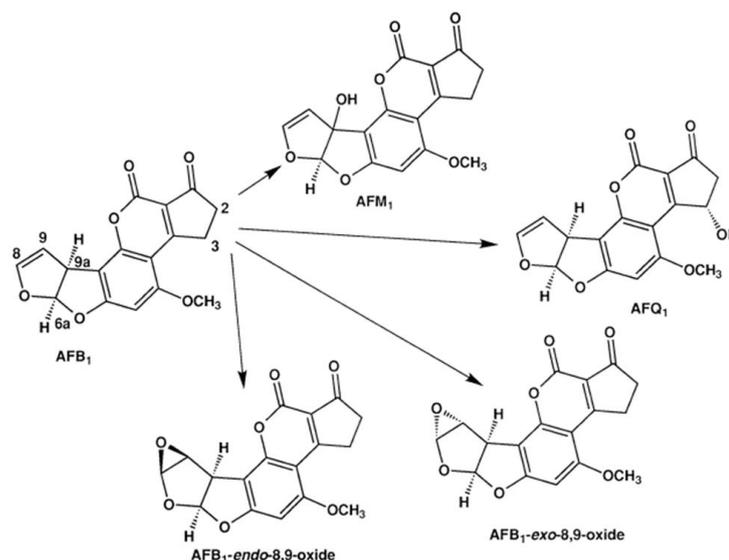


Figura 3. Produtos de oxidação da aflatoxina B₁ (AFB₁).

AFM₁: aflatoxina M₁; AFQ₁: aflatoxina Q₁.

Fonte: IARC (2002).

A toxicidade da AFB1 apresenta variações entre indivíduos, devidas às diferenças nos mecanismos de biotransformação hepática, responsáveis pela conversão da toxina no seu metabólito genotóxico e na probabilidade deste composto seguir alguma das rotas de desintoxicação. São apresentadas variações entre adultos e crianças, indivíduos de diferentes etnias, indivíduos com diferentes condições nutricionais além da diferença de resposta entre humanos e animais e entre diferentes espécies de animais (Ramjee, et al., 1992; Lye, et al., 1995; Hustert, et al., 2001; IARC, 2002).

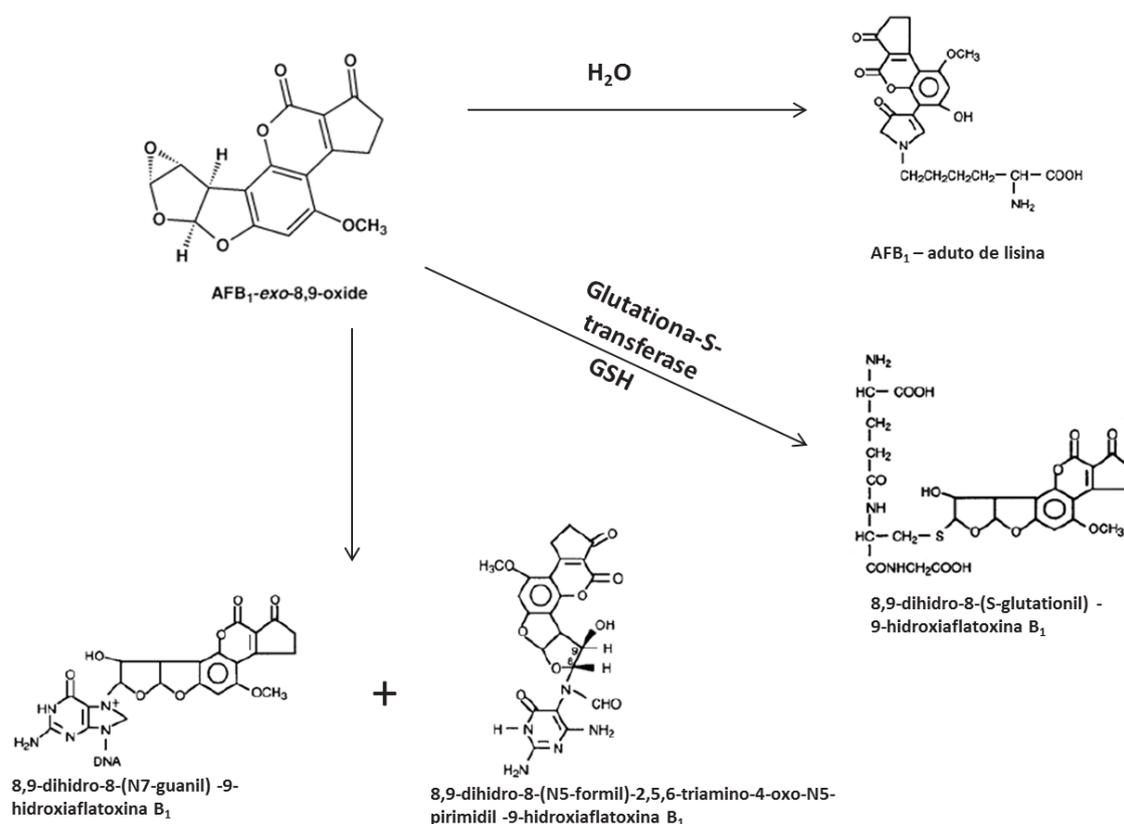


Figura 4. Biotransformação do epóxido exo-8,9 da aflatoxina B₁ (AFB1).

Fonte: IARC (2002).

Quando se tornou evidente que a exposição às aflatoxinas seria causa de câncer, vários países criaram legislações para regulamentar os níveis tolerados de

exposição, tanto de AFB1 quanto o de aflatoxina total. Inicialmente, estas regulamentações não eram baseadas na ingestão diária tolerável, mas sim no desejo de se manter os níveis de contaminação tão baixos quanto o que fosse tecnologicamente possível ou, em alguns países, que os níveis não ultrapassassem os limites de detecção das técnicas analíticas utilizadas (Kuiper-Goodman, 1995).

Segundo a avaliação da IARC (2002), a mistura de aflatoxinas de ocorrência natural possui evidência suficiente de carcinogenicidade em humanos e animais (Grupo I). No caso de estudos com tecidos tumorosos de fígado de animais experimentais, concluiu-se que há evidência suficiente para carcinogenicidade das AFB1, AFG1 e AFM1, evidência limitada para AFB2 e evidência inadequada para AFG2.

Fumonisinás

As fumonisinás são produzidas por espécies de *Fusarium*, principalmente pelo *Fusarium verticillioides* (*moniliforme*), que é um contaminante universal de milho. Ele está frequentemente associado à ocorrência de podridão nas espigas, embora também possa ser recuperado do produto aparentemente saudável. As fumonisinás são responsáveis por doenças em equinos e suínos, e têm demonstrado potencial carcinogênico em camundongos (Desjardins, et al., 2003). Elas foram isoladas pela primeira vez em 1988 a partir de culturas de *Fusarium moniliforme* em milho (Gelderblom, et al., 1988). Dentre os tipos mais conhecidos estão as fumonisinás B₁ e B₂ (**Figura 5**), sendo a FB1 a mais tóxica e abundante (Sánchez & Carrillo, 2010).

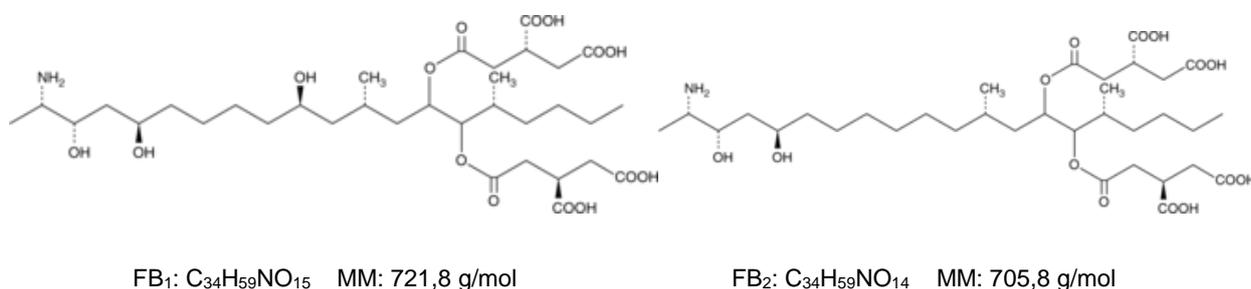


Figura 5. Estrutura química e massa molecular (MM) das fumonisinás B₁ e B₂.

Fonte: Cayman (2015)

A contaminação de alimentos por FB1 tem sido verificada em vários países do mundo. A exposição humana ocorre em níveis de microgramas a miligramas de toxina por dia, sendo maior em países onde o milho é consumido em maiores quantidades (IARC, 2002).

O mecanismo de toxicidade da FB1 se baseia na semelhança estrutural da toxina com as bases esfingóides livres, esfinganina e esfingosina (**Figura 6**). Esta semelhança promove o bloqueio do sítio catalítico da ceramida sintase, que é uma enzima chave na via de biossíntese e reciclagem de esfingolipídios (Riley, et al., 2001). Os esfingolipídios possuem diversas funções biológicas como, componentes estruturais responsáveis pela manutenção da integridade da membrana celular, receptores para vitaminas e toxinas, sítios para reconhecimento célula-célula e adesão célula-célula e célula-substrato e como mensageiros secundários nas vias de sinalização responsáveis pelo crescimento, diferenciação e morte celular (Merril, et al., 1997).

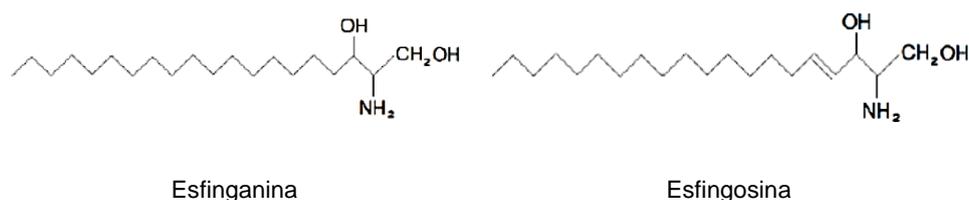


Figura 6. Estruturas químicas da esfinganina e da esfingosina.

Fonte: IARC (2002).

Quantidades anormais de esfingolipídios nos tecidos estão relacionadas com a ocorrência de distúrbios associados ao sistema nervoso. A interrupção do metabolismo dos esfingolipídios (**Figura 7**) pode resultar na alteração da biossíntese de ceramidas e no acúmulo de bases esfingóides livres. A concentração de esfinganina aumenta rapidamente com a inibição da ceramida sintase, tendo como consequência a expressão da toxicidade da fumonisina pela formação de lesões nos tecidos de órgãos como rins e fígado de animais experimentais. O acúmulo de esfinganina contribui para a ocorrência de doenças do tubo neural e promove a supressão da síntese de bases

esfingóides. Alterações no ciclo de biossíntese de esfingolípídeos acarretam em maior chance de sobrevivência de células com danos no DNA pela interrupção do mecanismo de apoptose celular. A FB1 apresenta efeito clastogênico em células humanas, o que sustenta a hipótese de que este composto pode agir como carcinógeno genotóxico em humanos pela formação de micronúcleos (Ehrlich, et al., 2002; Riley, et al., 2001; Wang, et al., 1991).

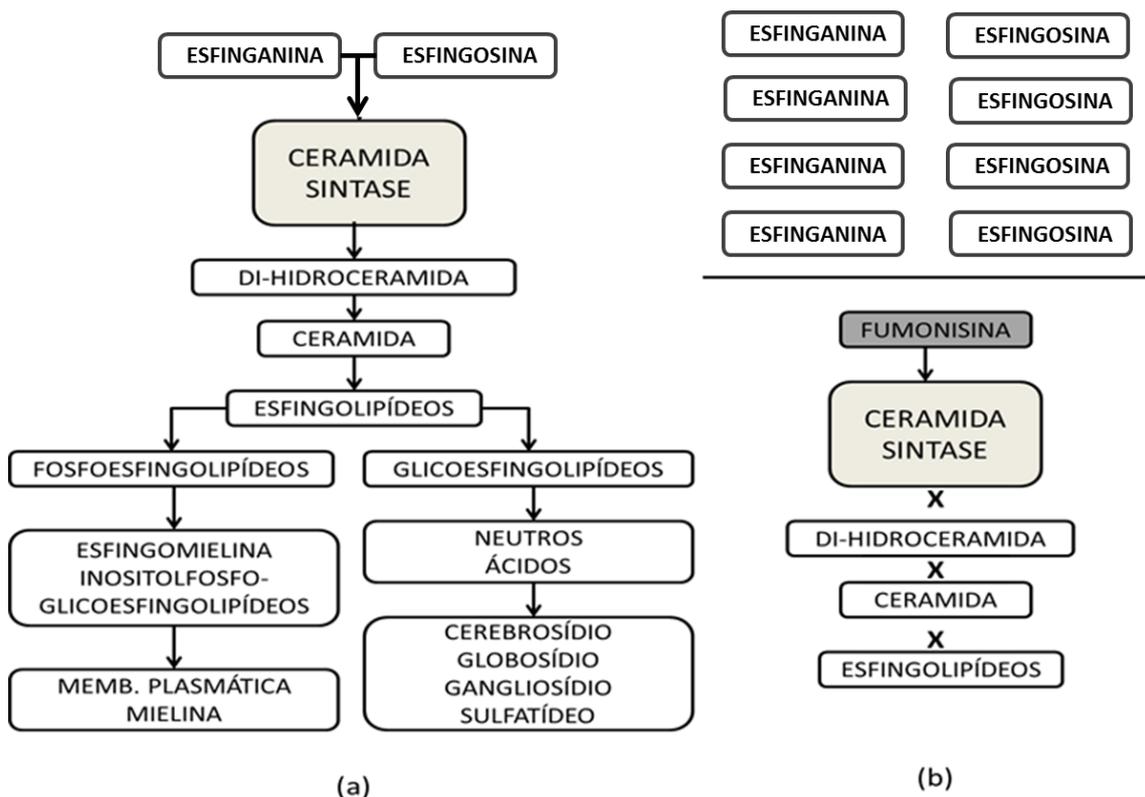


Figura 7. Esquema de biossíntese de esfingolípídeos (a) e da interrupção do metabolismo de esfingolípídeos pela fumonisina B₁ (b).

Fonte: Silva, et al. (2012).

A presença de *Fusarium verticillioides* na alimentação dos animais está associada às doenças com alta taxa de letalidade. Dentre estas doenças estão a leucoencefalomalacia equina, que afeta fígado e cérebro de cavalos, e o edema pulmonar em suínos, que afeta o pulmão, fígado e rins destes animais (Kuiper-Goodman, 1995). As informações sobre os efeitos do consumo de fumonisinas na

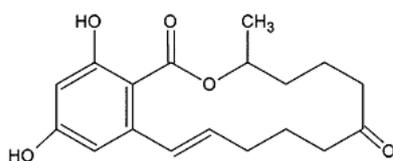
saúde humana são limitadas e não conclusivas. Alguns estudos sugerem que elas estão associadas à incidência de câncer esofágico em populações expostas a milho contaminado (Sánchez & Carrillo, 2010).

Segundo avaliação da IARC (2002), não existem evidências suficientes para comprovar o potencial carcinogênico da FB1 em humanos enquanto que, em animais experimentais, há evidências suficientes para comprovar o potencial carcinogênico desta toxina. A FB1 é classificada como possível carcinógeno aos humanos (grupo 2B).

Zearalenona

A ZEA (**Figura 8**) é uma micotoxina estrogênica produzida principalmente pelo *Fusarium graminearum*, que é um contaminante natural de grãos de milho com alto grau de umidade, sendo também encontrado em feno e rações peletizadas (Desjardins, et al., 2003).

Possui atividade anabólica e estrogênica, sendo responsável por efeitos severos envolvendo o sistema urogenital de animais e afetando sua habilidade reprodutiva, principalmente em suínos. Efeitos como queda de fertilidade, redução no tamanho da ninhada, atrofia de testículos e ovário, hipertrofia das glândulas mamárias e mudança nos níveis séricos de progesterona e estradiol são observados. A presença de ZEA está associada a doenças como a vulvovaginite e o hiperestrogenismo em suínos e, em menor proporção em gado, que apresenta maior resistência aos efeitos da toxina. Aves, com destaque para os frangos, são bem resistentes à ação da ZEA (Kuiper-Goodman, et al., 1987; Desjardins, et al., 2003).



$C_{18}H_{22}O_5$

MM: 318,4

Figura 8. Estrutura química e massa molecular (MM) da zearalenona.

Fonte: Busk, et al (2012).

A ZEA passa por biotransformação formando os metabólitos α e β -zearalenol, que também podem ser produzidos pelo *Fusarium graminearum*, mas em menores quantidades do que a ZEA. Estes metabólitos podem ser reduzidos dando origem ao α e ao β -zearalanol (**Figura 9**). Estes compostos caracterizam-se por competir com o estrógeno endógeno 17β -estradiol (**Figura 10**) pelos sítios receptores de estrógeno podendo provocar respostas estrogênicas em órgãos alvo de humanos e animais (Kuiper-Goodman, et al., 1987).

A afinidade da ZEA com os receptores de estrógeno corresponde à aproximadamente 5 % da afinidade do 17β -estradiol. A formação do metabólito α -zearalenol provoca um aumento na afinidade de ligação enquanto que o β -zearalenol é bem menos ativo. No entanto, todos eles apresentam atividade biológica sendo capazes de estimular respostas estrogênicas, com diferentes intensidades, e seguindo rotas distintas de ação (Kuiper-Goodman, 1995; Busk, et al., 2012).

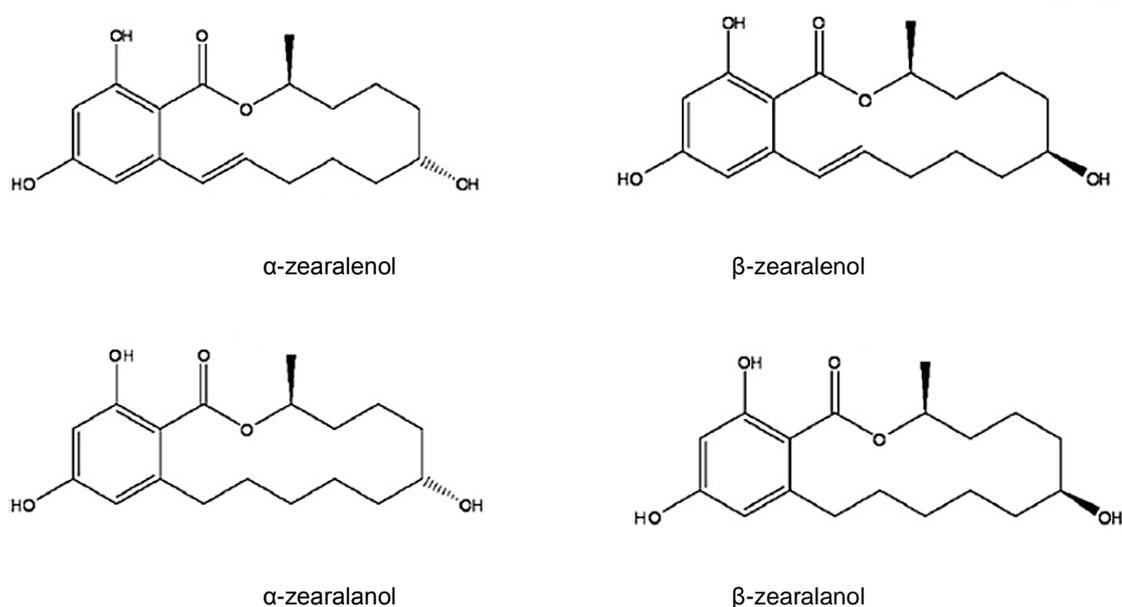


Figura 9. Estrutura química dos metabólitos da zearalenona.

Fonte: Busk, et al. (2012).

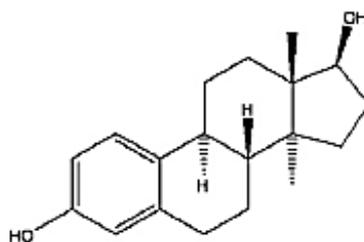


Figura 10. Estrutura química do 17 β -estradiol.

Fonte: Busk, et al. (2012).

As informações com relação aos efeitos da ZEA em humanos não são conclusivas. No entanto, modificações precoces em crianças como telarca e pubarca prematuras, ginecomastia e pseudopuberdade prematura foram observadas em pacientes em que foi constatada a presença de ZEA ou seus derivados em amostras de sangue. Além disso, a ingestão de alimentos contaminados com altos níveis de ZEA pode estar relacionada com a ocorrência de câncer cervical e efeitos duradouros no sistema endócrino (Sáenz de Rodríguez, et al., 1985; Kuiper-Goodman, et al., 1987; Desjardins, et al., 2003).

Segundo a avaliação da IARC, existe evidência limitada para o potencial carcinogênico em animais experimentais e não existem evidências que comprovem o potencial carcinogênico da ZEA em humanos. Sendo assim, esta micotoxina não é classificada pela sua carcinogenicidade em humanos (grupo 3) (IARC, 1993).

3.2.3 FORMAS DE CONTAMINAÇÃO

Várias espécies de fungos são capazes de produzir micotoxinas. Alguns deles são capazes de produzir mais de um tipo e algumas delas são produzidas por mais de uma espécie de fungo. Frequentemente, mais de uma micotoxina é encontrada nos substratos contaminados (Hussein & Jeffrey, 2001). Dentre os fatores que influenciam o desenvolvimento de fungos e a produção de micotoxinas são descritos os fatores implícitos, intrínsecos e extrínsecos.

Fatores implícitos

A capacidade de sintetizar uma micotoxina não depende somente da espécie do fungo, mas também da cepa em questão, podendo diferir o tipo e a quantidade de toxinas produzidas. Espécies de fungos toxigênicos podem produzir cepas não toxigênicas. Outra variável importante é a concentração do inóculo, ou seja, a quantidade de conídios presentes tanto no solo e na atmosfera, quanto no substrato propriamente dito. Quanto maior esta concentração maior a probabilidade de contaminação. Além disso, deve ser levada em conta a possibilidade de o ecossistema microbiano interferir de forma que o crescimento e a produção de micotoxinas sejam estimulados ou prejudicados, dependendo das interações entre as diferentes espécies presentes. Cepas produtoras de micotoxinas podem reduzir ou parar completamente sua produção quando há presença de outros fungos (JICA, 1993; Resnik, 1993).

Fatores Intrínsecos

Quando uma cepa fúngica tem potencial genético para produzir micotoxinas, seu crescimento, bem como o nível de micotoxina produzido, dependerá da disponibilidade de nutrientes presentes no substrato. Parâmetros como a atividade de água e pH do alimento também estão relacionados com a taxa de crescimento fúngico e a produção de micotoxinas. A condição estrutural do substrato também é um parâmetro importante. Nos substratos intactos, a casca constitui uma barreira natural ao ataque dos fungos. A penetração dos esporos de fungos nos vegetais fica facilitada quando há danos estruturais causados por ataques de pragas ou descuidos no manuseio (JICA, 1993; Resnik, 1993).

Fatores Extrínsecos

O meio ambiente interage não somente com o fungo, mas também com o substrato. Parâmetros como temperatura, umidade relativa, luz e tempo são alguns fatores extrínsecos determinantes para a ocorrência de micotoxinas. Além disso, o uso de fertilizantes, fungicidas e praguicidas, afeta as inter-relações entre o fungo, o

substrato e o meio ambiente, interferindo no crescimento destes microrganismos e na produção de micotoxinas (Resnik, 1993).

Os principais parâmetros que influenciam o crescimento dos fungos e a produção de micotoxinas nas etapas de pré e pós-colheita são a temperatura e a umidade. Não é possível descrever um conjunto único de condições que seja favorável ao crescimento e a produção de toxinas pelos fungos, pela grande variedade de espécies envolvidas. Mesmo fungos de um mesmo gênero, como o *Aspergillus*, contém espécies que apresentam grandes diferenças em sua temperatura ótima de crescimento e nas suas habilidades parasíticas. Sendo assim, é de grande dificuldade fazer afirmações gerais sobre estratégias para um controle universal de micotoxinas. A sua ocorrência no campo não pode ser eliminada, mas pode ser diminuída pela aplicação de boas práticas agrícolas com o melhoramento das técnicas de colheita e armazenamento, realizando controles de insetos, limpeza, aplicação de agentes antifúngicos e mantendo a integridade dos grãos (Desjardins, et al., 2003).

3.2.4 OCORRÊNCIA EM MILHO E DERIVADOS

As micotoxinas são comumente encontradas em cereais, café, cacau, nozes e em alimentos de origem animal como carne, leite e ovos. Os cereais são a principal fonte de carboidratos na dieta humana, representando grande risco de exposição da população às micotoxinas. Uma grande variedade de micotoxinas é encontrada em cereais, sendo o milho o produto que apresenta as maiores taxas e variedades de contaminação (Resanovic, et al., 2013).

A contaminação por micotoxinas tem grandes impactos econômicos. Culturas com alto grau de contaminação muitas vezes devem ser destruídas. Alternativamente, os produtos contaminados são utilizados para alimentação animal, o que leva à diminuição nas taxas de crescimento, doenças e morte dos mesmos. Além disso, animais que consomem rações contaminadas com micotoxinas, podem produzir carne e leite que contenham resíduos ou produtos de biotransformação, como é o caso da contaminação de leite por AFM1 (Bennett & Klich, 2003).

Considerando o modelo de vigilância sanitária de alimentos atualmente adotado, com foco no pós-mercado e no gerenciamento do risco, somado aos altos índices de incidência das doenças crônicas não transmissíveis, o monitoramento da qualidade sanitária dos alimentos fornecidos à população torna-se indispensável para a obtenção de dados que permitem avaliar o perfil das diversas categorias de alimentos, identificando os setores produtivos que necessitam de intervenção institucional, bem como a eventual necessidade de medidas regulatórias complementares (ANVISA, 2012).

No estado de Minas Gerais, foi instituído, no ano de 2000, o Programa Estadual de Monitoramento da Qualidade dos Alimentos (PROGVISA). Este programa resultou da pactuação entre a Diretoria de Vigilância em Alimentos do Estado (DVA), as Superintendências e Gerências Regionais de Saúde e a FUNED (LACEN-MG). Anualmente, ocorre um seminário que reúne profissionais dos órgãos envolvidos no programa para definição das ações relacionadas à coleta de amostras e envio destas ao LACEN-MG, bem como os procedimentos administrativos decorrentes dos laudos de análise insatisfatórios tendo como base legal o Código de Saúde de Minas Gerais – Lei N° 13.317/99. As categorias de alimentos a serem analisadas são selecionadas com base no risco epidemiológico e nos índices de consumo pela população. São incluídos os alimentos com maior incidência de irregularidades ou agravos identificados através de denúncias recebidas nos órgãos de vigilância sanitária, bem como aqueles que apresentarem maior percentual de reprovação nas análises laboratoriais no programa do ano anterior. No ano de 2011, 321 vigilâncias regionais e municipais distribuídas por todas as regiões do estado, participaram da execução das ações do programa, sendo feita a coleta de 39 variedades de produtos (Ferreira & Baptista, 2011; SES/MG, 2006).

Em âmbito nacional, com o objetivo de monitorar a presença de aditivos e contaminantes em alimentos expostos ao consumo humano, foi desenvolvido pela ANVISA em parceria com as vigilâncias sanitárias estaduais e os Laboratórios Centrais de Saúde Pública dos estados, o Programa de Monitoramento de Aditivos e Contaminantes (PROMAC), que subsidia a revisão de limites máximos tolerados (LMT) de contaminantes além de avaliar o uso de aditivos e sugerir medidas de gerenciamento de riscos (ANVISA, 2013 a). Devido à crescente preocupação com

relação ao potencial toxigênico das micotoxinas, a ANVISA promoveu, dentro do PROMAC, a estruturação da sub-rede PROMAC-Micotoxinas. Como coordenadora do Sistema Nacional de Vigilância Sanitária (SNVS), a ANVISA assumiu um papel fomentador destinando recursos para ampliar a capacidade analítica dos laboratórios envolvidos no programa, no qual a FUNED atua como referência nacional em análises de micotoxinas. Nos anos de 2013 e 2014, o laboratório de micotoxinas da FUNED realizou a análise de 175 e 263 amostras de alimentos, respectivamente, monitorando a presença de AFB1, AFB2, AFG1, AFG2, ocratoxina A, FB1, AFM1 e desoxinivalenol, empregando métodos específicos para cada grupo. Para o ano 2015, estão previstas análises de 400 amostras de alimentos, monitorando a presença de AFB1, AFB2, AFG1, AFG2, ocratoxina A, FB1, AFM1, desoxinivalenol, ZEA e patulina em matrizes diversas (ANVISA, 2012).

De acordo com os dados obtidos pelo laboratório de micotoxinas da FUNED no ano de 2013, dentre as 37 amostras analisadas de derivados de milho, 5 apresentaram contaminação com AFB1, AFB2, AFG1 e AFG2, sendo que uma delas apresentou contaminação acima do LMT na legislação brasileira em vigor, de 20 µg/kg para aflatoxina total. Dados de 2014, para derivados de milho, mostraram que todas as 43 amostras analisadas apresentaram contaminação por FB1, embora todas abaixo do LMT de 2500 µg/kg para esta toxina.

No âmbito da agricultura, até 2007, o MAPA realizava apenas o controle de micotoxinas em produtos de origem animal (MAPA, 1999). Em 2008, por meio da Instrução Normativa número 42, o MAPA instituiu o Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes em Produtos de Origem Vegetal (MAPA, 2008). Inicialmente, o programa monitorava apenas resíduos de pesticidas nas culturas de maçã e mamão. Para o ano-safra 2009/2010 houve uma ampliação considerável de culturas para pesticidas e a inclusão do monitoramento de aflatoxina total em amendoim, arroz, castanha-do-Brasil e milho. Na referida safra foram analisadas 15 amostras de milho, dos estados de Goiás e Mato Grosso, sendo todas consideradas conformes (MAPA, 2010). No ano-safra 2010/2011 houve a inclusão da matriz feijão. Todas as 26 amostras de milho analisadas, provenientes dos estados de Goiás, Mato Grosso do Sul e Paraná, foram consideradas conformes (MAPA, 2011). Em 2011/2012, trigo e café foram incorporados ao Programa, além das micotoxinas ocratoxina e

deoxinivalenol. Neste ano, 59 amostras de milho, dos estados de Bahia, Goiás, Paraná, Rio Grande do Sul e São Paulo, foram analisadas para aflatoxinas e ocratoxina, sendo duas destas consideradas não-conformes (MAPA, 2013 a). Na safra 2012/2013, cinco amostras de milho, provenientes dos estados de Goiás e São Paulo, foram consideradas conformes para aflatoxinas, fumonisinas (soma de B₁ e B₂) e ocratoxina (MAPA, 2013 b).

Na Europa, o levantamento da ocorrência de micotoxinas nos alimentos é gerido pelo *Rapid Alert System for Food and Feed* (RASFF), que é um relatório anual que reúne os dados de notificações de ocorrências de envenenamento alimentar nos países participantes do programa. O conceito de envenenamento alimentar, neste caso, cobre um espectro de sintomas de doenças mais amplo do que o envenenamento clássico provocado por microrganismos patogênicos como vírus, bactérias e fungos. São consideradas também irregularidades como a presença de substâncias químicas indesejadas, fraudes nas composições de suplementos alimentares ou a rotulagem insuficiente não mencionando a presença de algum composto alergênico. Atualmente, 31 países fazem parte da rede de levantamento da RASFF (RASFF, 2013).

O levantamento feito, referente ao ano de 2013 (**Tabela 4**), mostrou um decréscimo significativo no número de notificações da presença de micotoxinas nos alimentos. Esta diminuição foi explicada pela queda significativa da ocorrência de aflatoxinas em certos produtos importados, que tiveram seu regime de controle de qualidade reforçado. Por outro lado, observou-se um número significativo de notificações de aflatoxinas nas colheitas de milho nos países europeus, que pode ser explicado pelo fato de a região sul da Europa ter sofrido com período de seca na fase de crescimento do milho em 2012 (RASFF, 2013).

Tabela 4. Notificações registradas pelo *Rapid Alert System for Food and Feed (RASFF)* entre 2004 e 2013 para micotoxinas em alimentos e rações

Micotoxina	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013
Aflatoxinas	839	946	801	705	902	638	649	585	484	341
Desoxinivalenol				10	4	3	2	11	4	8
Fumonisinias	14	2	15	9	2	1	3	4	4	7
Ocratoxina A	27	42	54	30	20	27	34	35	32	54
Patulina		6	7		3					
Zearalenona			1	6	2				4	
Total	880	996	878	760	933	669	688	635	528	410

Fonte: RASFF (2013).

3.2.5 REGULAMENTAÇÃO EM MILHO E SEUS PRODUTOS

Em diversas partes do mundo, as micotoxinas representam um grande problema no que diz respeito à segurança alimentar. O conhecimento sobre os sérios efeitos provocados pelas micotoxinas em humanos e animais tem levado vários países a criar legislações para estabelecer limites de contaminação destas substâncias, com o objetivo de assegurar a saúde dos consumidores, bem como os interesses econômicos dos produtores e comerciantes (FAO, 2006).

Assim como acontece com outras legislações sobre segurança alimentar, o controle de micotoxinas tem sido feito por meio da análise do produto ao invés da verificação dos padrões de processamento. Sendo assim, LMT de micotoxinas nos produtos são estabelecidos ao invés de se regulamentar padrões de produção ou tratamento das *commodities* ao longo da cadeia de comercialização (Dohlman, 2003).

Existem diversos fatores, de natureza científica e socioeconômica, que podem influenciar os limites e regulamentos de micotoxinas como: a disponibilidade de dados toxicológicos e de ocorrência de micotoxinas em vários produtos, o conhecimento da distribuição das concentrações de micotoxinas dentro de um lote, a disponibilidade de

metodologias analíticas e as legislações em países com os quais existam relações comerciais (FAO, 2006).

Atualmente, no Brasil, por meio da RDC número 7 de 18 de fevereiro de 2011, são definidos limites para a contaminação por 11 micotoxinas em diversas matrizes de alimentos, incluindo aquelas objetos de estudo do presente trabalho (ANVISA, 2011). Os limites preconizados para as micotoxinas em matrizes diversas são apresentados na **Tabela 5**.

Tabela 5. Limites máximos tolerados para micotoxinas no Brasil

Micotoxina	Alimentos	Limite Máximo Tolerado ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
Aflatoxinas (B_1 , B_2 , G_1 e G_2)	Milho, milho em grão (inteiro, partido, amassado, moído), farinhas ou sêmolos de milho.	20
	Amendoim (com casca, sem casca, cru ou tostado), pasta de amendoim ou manteiga de amendoim.	5
	Cereais e produtos de cereais, exceto milho, incluindo cevada malteada.	5
	Feijão.	10
	Castanhas, exceto castanha do Brasil, incluindo pistaches, avelãs e amêndoas.	10
	Frutas desidratadas e secas.	20
	Castanha do Brasil com casca para consumo direto.	10
	Castanha do Brasil sem casca para consumo direto.	15
	Castanha do Brasil sem casca para processamento posterior.	1
	Alimentos a base de cereal para alimentação infantil .	1
	Fórmulas infantis para lactentes e crianças de primeira infância.	10
	Amêndoas de cacau.	5
	Produtos de cacau e chocolate.	20
	Especiarias.	

	Milho de Pipoca.	2000
Fumonisin (B ₁ + B ₂)	Alimentos a base de milho para alimentação infantil (lactentes e crianças de primeira infância).	200
	Milho em grão para posterior processamento.	5000
	Farinha de milho, creme de milho, fubá, flocos, canjica e canjiquinha.	2500
	Amido de milho e outros produtos a base de milho.	2000
Zearalenona	Milho de pipoca, canjiquinha, canjica, produtos e subprodutos a base de milho.	300
	Trigo integral, farinha de trigo integral, farelo de trigo	400
	Alimentos a base de cereais para alimentação infantil.	20
	Farinha de trigo, massas, <i>crackers</i> e produtos de panificação, cereais e produtos de cereais, exceto trigo, incluindo cevada malteada.	200
	Arroz beneficiado e derivados.	200
	Arroz integral.	800
	Farelo de arroz.	1000
Desoxinivalenol	Arroz beneficiado e derivados.	750
	Alimentos a base de cereais para alimentação infantil.	200
	Trigo integral, trigo para quibe, farinha de trigo integral, farelo de trigo, farelo de arroz e grão de cevada.	2000
	Farinha de trigo, massas, <i>crackers</i> , biscoitos água e sal, produtos de panificação, cereais e produtos de cereais, exceto trigo, incluindo cevada malteada.	1750

	Leite fluído.	0,5
Aflatoxina M ₁	Leite em pó.	5
	Queijos	2,5
	Cereais e produtos de cereais incluindo cevada malteada.	10
	Feijão.	10
	Café torrado (moído e grão) e café solúvel.	10
	Vinho e seus derivados.	2
Ocratoxina A	Suco de uva e polpa de uva.	2
	Especiarias.	30
	Alimentos a base de cereais para alimentação infantil.	2
	Produtos de cacau e chocolate.	5
	Amêndoas de cacau.	10
	Frutas secas e desidratadas.	10
Patulina	Suco de maçã e polpa de maçã.	50

Fonte: ANVISA (2011).

Para janeiro de 2017, tem-se a previsão da revisão de alguns LMT, que ficarão mais rigorosos, como apresentado na **Tabela 6** (ANVISA, 2013 b).

Tabela 6. Limites máximos tolerados para micotoxinas no Brasil - aplicação em janeiro de 2017

Micotoxina	Alimentos	Limites Máximos Tolerados (µg/kg)
Fumonisin (B ₁ + B ₂)	Farinha de milho, creme de milho, fubá, flocos, canjica e canjiquinha.	1500
	Amido de milho e outros produtos a base de milho.	1000
	Milho em grão para posterior processamento	5000
Zearalenona	Milho de pipoca, canjiquinha, canjica, produtos e subprodutos a base de milho.	150
	Farinha de trigo, massas, <i>crackers</i> , produtos de panificação, cereais e produtos de cereais, exceto trigo, incluindo cevada malteada.	100
	Arroz beneficiado e derivados.	100
	Arroz integral.	400
	Farelo de arroz.	600
	Trigo integral, farinha de trigo integral e farelo de trigo	200
Desoxinivalenol	Milho em grão e trigo para posterior processamento	400
	Trigo integral, trigo para quibe, farinha de trigo integral, farelo de trigo, farelo de arroz, grão de cevada.	1000
	Farinha de trigo, massas, <i>crackers</i> , biscoitos água e sal, produtos de panificação, cereais e produtos de cereais, exceto trigo, incluindo cevada malteada.	750
	Milho em grão e trigo para posterior processamento	3000

Fonte: ANVISA (2013 b).

A União Europeia, por meio do Regulamento UE número 1881/2006, fixou os teores máximos de 13 micotoxinas em diversas matrizes alimentares. Na **Tabela 7** os limites para aflatoxinas, fumonisinas e ZEA em milho e derivados são apresentados. Neste regulamento, além da soma das quatro aflatoxinas, o teor máximo de AFB1 presente nos alimentos também foi especificado (UE, 2006 b).

Tabela 7. Limites máximos tolerados para micotoxinas em milho e derivados na União Europeia

Micotoxina	Alimentos	Limites Máximos Tolerados (µg/kg)
Aflatoxinas Total (B ₁ , B ₂ , G ₁ e G ₂)	Milho destinado a ser submetido a um método de triagem ou a outro tratamento físico antes de ser destinado ao consumo humano ou da sua utilização como ingrediente em gêneros alimentícios.	10
Aflatoxina B ₁		5
Fumonisinias	Milho não transformado.	2000
	Farinha de milho, sêmola de milho, <i>grits</i> , gérmen de milho e óleo de milho refinado.	1000
	Alimentos transformados a base de milho e alimentos para bebês destinados a lactentes e crianças jovens.	200
	Alimentos a base de milho para consumo humano direto com exceção dos descritos anteriormente.	400
Zearalenona	Milho não transformado.	200
	Milho destinado ao consumo humano direto, farinha de milho, sêmola de milho, <i>grits</i> , gérmen de milho e óleo de milho refinado.	200
	Refeições leves à base de milho e cereais para pequeno-almoço à base de milho.	50
	Alimentos transformados a base de milho destinados a lactentes e crianças jovens.	20

Fonte: UE (2006 b).

Em 2010, através do Regulamento UE número 165/2010, a União Europeia alterou alguns itens do Regulamento UE número 1881/2006 no que diz respeito às aflatoxinas, sendo que o item referente ao milho se manteve inalterado (UE, 2010).

O *Food and Drug Administration* (FDA), por meio da orientação de agosto de 2011, sugere limites para contaminação de alimentos destinados para humanos e animais para a soma das aflatoxinas (B₁, B₂, G₁ e G₂), AFM₁, soma das três fumonisinas (B₁, B₂ e B₃) e para desoxinivalenol. No caso da soma de aflatoxinas para produtos de milho destinados a animais imaturos e animais leiteiros, o FDA sugere 20 µg/kg. Os limites sugeridos para a soma das fumonisinas em produtos de milho são apresentados na **Tabela 8** (FDA, 2011).

Tabela 8. Níveis de orientação do *Food and Drug Administration* para fumonisina em milho e produtos de milho

Produto	Limite Máximo Tolerado (µg/kg) (FB₁ + FB₂ + FB₃)
Alimentação Humana	
Produtos de milho degerminados de moagem seca (conteúdo de gordura < 2,25 % base seca).	2000
Produtos de milho completamente ou parcialmente degerminados de moagem seca (conteúdo de gordura ≥ 2,25 % base seca).	4000
Farelo de milho de moagem seca.	4000
Milho purificado para produção de massa.	4000
Milho purificado para produção de pipoca.	3000
Alimentação Animal	
Equídeos e coelhos	5000 (não mais que 20 % da dieta)**
Suínos e bagres	20000 (não mais do que 50 % da dieta)
Criação de ruminantes, criação de aves e criação de mink*	30000 (não mais do que 50 % da dieta)
Ruminantes > 3 meses de idade criados para abate e mink criado para a produção de pele.	60000 (não mais do que 50 % da dieta)
Aves criadas para abate.	100000 (não mais do que 50 % da dieta)
Todas as demais espécies ou classes de pecuária ou animais domésticos.	10000 (não mais do que 50 % da dieta)

* Inclui gado leiteiro e aves para produção de ovos para consumo humano ** Massa em base seca.

Fonte: FDA (2011).

A comissão do CODEX ALIMENTARIUS, através do relatório da oitava sessão do comitê de contaminantes em alimentos de abril de 2014, propôs níveis máximos para fumonisinas (B_1+B_2) em produtos de milho, e para soma de aflatoxinas ($B_1+B_2+G_1+G_2$) em diversos produtos para consumo imediato e para posterior processamento (**Tabela 9**) (CODEX, 2014).

Tabela 9. Proposta do CODEX ALIMENTARIUS para níveis de fumonisinas e aflatoxinas em alimentos

Micotoxina	Alimentos	Limite Máximo Tolerado ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
Aflatoxina Total ($B_1+B_2+G_1+G_2$)	Amêndoas, castanha do Brasil, avelã, amendoim, pistache e figo seco.	Consumo Imediato. 10
		Processamento Posterior. 15
Fumonisinas (B_1+B_2)	Milho grão.	4000
	Farinha de milho e fubá.	2000

Fonte: CODEX (2014).

3.3 MÉTODOS DE ANÁLISE

Nos últimos anos, o setor agroalimentar, devido à globalização e ao desenvolvimento de novas tecnologias, está passando por mudanças radicais que requerem maior caracterização da cadeia alimentar, desde a matéria prima até o produto final. Adicionalmente, os consumidores estão mais preocupados com assuntos relacionados à alimentação e exigem mais garantias de qualidade e segurança dos produtos que consomem. A caracterização dos alimentos tem o objetivo de avaliar características de composição desejadas ou detectar a presença de componentes indesejáveis, sendo eles naturais ou sintéticos. A determinação da composição molecular de sistemas complexos, como os alimentos, requer o uso de ferramentas analíticas apropriadas para identificar e quantificar devidamente os compostos de interesse (Di Stefano, et al., 2012).

Para garantir a aplicação dos limites máximos regulamentados nas legislações nacional e internacional, métodos analíticos confiáveis são necessários. Até o momento, os métodos oficiais descritos pela *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC) para a determinação de micotoxinas em alimentos e rações contemplam um único mensurando ou um único grupo de mensurandos. A espectrometria de massas sequencial, que representa uma ferramenta poderosa para a análise simultânea de mais de um grupo de micotoxinas, com alta sensibilidade e seletividade, ainda não compõe o elenco de métodos oficiais da AOAC (Varga, et al., 2012; AOAC, 2012).

Métodos clássicos, descritos na AOAC para a análise de micotoxinas, envolvem técnicas como TLC, *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) e HPLC (AOAC, 2012). Os métodos mais antigos utilizam TLC para a análise individual de grupos de micotoxinas. Esta técnica possui baixa sensibilidade e é muito trabalhosa, o que dificulta a adequação na rotina de laboratórios com grande demanda de determinações. Nos métodos mais recentes, a TLC foi substituída por HPLC com detectores de fluorescência ou ultra violeta-visível. A utilização de colunas de imunoafinidade, nestes casos, assegurou adequada sensibilidade e seletividade aos métodos, além de condições favoráveis para a aplicação às análises de rotina. Porém, o uso de colunas de imunoafinidade faz com que a análise seja limitada, já que, a maioria das colunas bem estabelecidas no mercado, é específica para um grupo de micotoxinas, o que restringe os escopos, não permitindo determinações multigrupos.

Desta forma, o desenvolvimento de métodos multitoxinas, permitindo a determinação de vários grupos presentes simultaneamente nos alimentos com uma única análise, tem sido reportado na literatura recente (**Tabela 10**). A composição complexa das matrizes de alimentos e rações bem como a grande diversidade de propriedades químicas e físicas destes mensurandos requerem técnicas de detecção sensíveis e seletivas. Neste contexto, a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas é a técnica mais avançada disponível atualmente para a detecção multigrupos de micotoxinas (Soleimany, et al., 2012). Contudo, nem sempre são apresentados estudos de validação que envolvem todos os parâmetros de desempenho necessários à garantia da confiabilidade dos métodos propostos, com frequente negligência de parâmetros como incerteza de medição, precisão sob condições intermediárias e efeitos de matriz. Também é recorrente nos processos de

validação publicados o emprego de critérios equivocados, em desacordo com as recomendações de importantes documentos orientativos internacionais (Thompson, et al., 2002) e regulamentações específicas da área de micotoxinas (UE, 2006 a).

Tabela 10. Revisão bibliográfica das metodologias para determinações multi-grupos de micotoxinas em milho e outros alimentos

Micotoxina	Matriz	Parâmetros de validação	Preparo da amostra		Cromatografia Líquida	Coluna	Fase móvel	Volume de injeção Fluxo	Gradiente de Eluição	Espectrometria de Massas	Íons Pesquisados	Referência
			Extração	Purificação								
Fumonisinias B1, B2 e B3	Milho	Linearidade: R ² . Veracidade e precisão: 3 níveis de contaminação em triplicata sob condições de repetibilidade. Limites: razão sinal ruído 3/1 e 10/1 utilizando software do equipamento.	2,5 g de amostra em 10 mL de acetonitrila:água (1:1) em ultrassom por 1 h e centrifugada a 15000 RPM por 6 min a 4 °C. O pH do sobrenadante é ajustado com NaOH para 7-9.	MultiSep 211 FUM cartridge (Romer Labs, Tul In, Austria)	UHPLC (Waters, Milford, MA)	UHPLC BEH C ₁₈ (1,7µm, 100mm x 2.1mm, Waters, Milford, Ma)	A (ácido fórmico 0,1% V/V) B (acetonitrila : metanol 1:1)	2 µL 0,3 mL.min ⁻¹	30% B (inicial), 30-70%B (2,3 min), 70% B (4 min), 70-100% B 4,2 min), 100% B (4,8 min), 100-30% B (5 min). tempo de reequilíbrio 2min (antes da próxima injeção)	Triplo quadrupolo Tandem Micromass Quattro Ultima com fonte ESI, positive ion detection e modo MRM (multiple reaction mode)	FB1 (705,334) FB2 (690,338)	Y. Ren et AL./Analytica Chimica Acta 692 (2011) 138-145
Aflatoxinas B e G, Ocratoxina A, Fumonisinias B1 e B2, DON, ZEA, T-2 e HT-2.	Milho	Veracidade e precisão: 1 nível de contaminação em quadruplicata sob condições de repetibilidade. Teste de efeito de matriz: comparação das inclinações das curvas de calibração usual e matrizada por teste de t.	10 g de amostra em 50 mL de PBS em agitador orbital por 60 minutos e centrifugação a 3000g por 10 minutos. Recolhe-se uma alíquota do extrato de PBS e o sólido remanescente é extraído novamente com adição de metanol.	IAC multi-analito AOFZDT2™	HPLC Série 1100 micro-LC system Agilent Technologies (Waldbronn, Alemanha)	Gemini ^R C-18 (150 mm x 2,0 mm x 5,0 µm; Phenomenex, Torrance, CA, USA), pré coluna Gemini C ₁₈ (4mm x 2mm x 5µm tamanho de partícula)	A (água) B (metanol) ambos contendo 0,5% de ácido acético e 1 mM de acetato de amônio	20 µL 0,2 mL.min ⁻¹	Após três minutos com 20% de B a proporção foi alterada para 40% depois aumentou-se linearmente até 63% em 35 minutos, e manteve-se constante por 11 minutos. A coluna foi reequilibrada com 20% do eluente B por 10 minutos.	Triplo quadrupolo Tandem QTrap MS/MS Applied Biosystem com interface ESI modo MRM	AFB1 (241.0; 213.4;185.2) AFB2 (259.0; 287.2; 243.2) AFG1 (243.1; 311.2;215.2) AFG2 (313.2; 245.3;217.0) FB1 (334.1; 352.2;316.1) FB2 (336.4; 354.4;318.3) ZEA (130.9; 175.1;273.0)	V. M. T. Lattanzio et al, Rapid communication in mass spectrometry. 2007

Micotoxina	Matriz	Parâmetros de validação	Preparo da amostra		Cromatografia Líquida	Coluna	Fase móvel	Volume de injeção Fluxo	Gradiente de Eluição	Espectrometria de Massas	Íons Pesquisados	Referência
			Extração	Purificação								
Aflatoxinas B e G, Ocratoxina A, DON, ZEA, T-2 e HT-2.	Alimentos a base de cereal	Linearidade: r. Veracidade e precisão: 3 níveis de contaminação em triplicata sob condições de repetibilidade. Efeito matriz: supressão/incremento de sinal pela razão das inclinações das curvas matrizada e usual multiplicada por 100. Incerteza: calculada por $u_t = \sqrt{(LD/2)^2 + (\alpha C)^2}$	10 g de amostra em 50 mL de acetonitrila : água (84:16) por 60 minutos no modelo 711 orbital shaker. O extrato é filtrado em papel whatman n° 4 e o extrato foi evaporado até securo.	Oasis ^R HLB column	HPLC Série 1100 micro-LC system Agilent Technologies (Waldbronn, Alemanha)	Kinetex C18 (100 mm x 2.10 mm, 2.6 µm) (Phenomenex, Torrance, CA, USA)	A (água) B (metanol) ambos contendo 0,5% de ácido acético e 1 mM de acetato de amônio	20 µL 0,2 mL.min ⁻¹	A proporção do eluente B foi aumentada linearmente de 10% para 40% em 4 minutos, e então aumentada para 60% em 27 minutos e mantida constante por 5 minutos. A coluna foi reestabilizada com 10% de eluente B por 7 minutos.	Triplo quadrupolo Tandem QTrap MS/MS Applied Biosystem com interface ESI modo MRM	AFB1 (241.1; 213.4) AFB2 (259.0; 287.2) AFG1 (243.1; 311.2) AFG2 (313.2; 245.3) ZEA (130.9; 175.1)	V. M. T. Lattanzio et al, Rapid communication in mass spectrometry . 2011
Fumonisinias B1, B2, B3 e B4	Milho e produtos a base de milho	Linearidade: R ² . Veracidade e precisão: 1 ou 2 níveis de contaminação, dependendo da matriz, sob condições de precisão intermediária por ter considerado o trabalho ao longo da semana. Efeito matriz: comparação de inclinação e intercepto de curvas usual e matrizada por teste de t. Limites: razão sinal ruído 3/1 e 10/1 utilizando software do equipamento.	1 g de amostra finamente moída foi homogeneizada por 15 segundos com 10 mL de acetonitrila : água (75:25) contendo 50 mmol/L de ácido fórmico usando homogeneizador Polytron (?)	Cartucho de C ₁₈ Bakerbond Octadecyl J. T. Backer colocado no vacum manifold e posteriormente no cartucho pré condicionado Carbograph-4 LARA (Roma, Itália)	HPLC Perkin-Elmer series 200 micropumps (Nortwalk, CT, USA)	Altima C ₁₈ (250 x 2.1 mm, 5µm) e pré coluna Phenomenex ODS, 4 x 2 mm i.d.	A (água); B (metanol) ambos contendo 25 mmol/L de ácido fórmico	10 µL 0,2 mL/min	Após período isocrático de três minutos com proporção de 60% de B, B foi linearmente aumentado até 90 % em 5 minutos, então levado a 100 % e mantido constante por 10 minutos.	MDS SCIEX Q TRAP TM linear ion trap mass spectrometer (Concord, Ontario, Canada) turbo spray source, triplo quadrupolo tandem modo ion positive mod MRM.	FB1 (334,352) FB2 (336,354)	A. Faberi et al. Rapid Communication in mass spectrometry , 2005

Micotoxina	Matriz	Parâmetros de validação	Preparo da amostra		Cromatografia Líquida	Coluna	Fase móvel	Volume de injeção Fluxo	Gradiente de Eluição	Espectrometria de Massas	Íons Pesquisados	Referência
			Extração	Purificação								
39 micotoxinas incluindo AFB1, AFB2, AFG1, AFG2, OCRA, ZEA, DON, FB1, FB2	Milho e trigo	Veracidade e precisão: 7 ou 10 níveis dependendo da matriz em triplicata sob condições de repetibilidade. Efeito matriz: supressão/incremento de sinal pela razão das inclinações de curvas matrizada e usual multiplicada por 100.	0,5 g de amostra (trigo ou milho) em 2 mL de acetoneitrila:água :ácido acético (79:20:1) extraídos por 90 minutos em agitador rotatório GFL 3017 e depois centrifugado por 2 minutos a 3000 RPM.	Não houve nada após a extração. Foram injetadas alíquotas diluídas no mesmo solvente de extração diretamente no aparelho.	1100 HPLC Systems (Agilent)	HPLC Gemini [®] C ₁₈ (150 x 4.6 mm x 5µm) Phenomenex	Composta de 2 eluentes, ambos contendo 5mM de acetato de amônio e compostas por metanol:água:ácido acético nas seguintes proporções: A (10:89:1) e B (97:2:1)	5 µL (!) 1 mL/min	Depois de 2 minutos com 100% de A a proporção de B cresceu linearmente para 100% no intervalo de 12 minutos ficando esta proporção constante por 3 minutos. A coluna é re-estabilizada por 4 minutos com 100 % de A.	Q Trap 4000 Applied Biosystems acoplado com turbo ion spray ESI triplo quadrupolo tandem	AFB1 (128.1; 241.1) AFB2 (259.1; 287.1) AFG1 (243.0; 200) AFG2 (245.1; 189.0) FB1 (334.4; 704.4) FB2 (336.3; 688.4) ZEA (131.1; 175.0)	M. Sulyok et al. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2006
Tricotecenos tipo A e B e ZEA	Milho	Linearidade: R ² . Veracidade e precisão: 7 níveis em 5 replicatas sob condições de repetibilidade. Limites: razão sinal ruído 3/1 e 10/1 utilizando software do equipamento.	10 g de amostra foram extraídas por 90 minutos a 180 RPM em agitador automático (GFL) com 40 mL de acetoneitrila:água (84:16). Os extratos foram filtrados.	Coluna MycoSep #226 ou #227	Agilent Technologies	HPLC Aquasil [®] RP-18 (100 x 4.6mm x 3µm) da Thermo Electron	A (metanol:água 20:80) B (Metanol:água 90:10) ambas contendo 5mM de acetato de amônio	25µL 1 mL/min	A Eluição com a fase móvel A foi mantida por 0,5 min, depois a fase móvel B cresceu linearmente para 100% em 4,5 min, esperou-se 2,5 min e depois voltou para 100% de A, proporção que se manteve até o fim da corrida em 10 min.	QTrap LC-MS/MS Applied Biosystem equipado com APCI ou ESI triplo quadrupolo tandem modo MRM	ZEA (131.2; 175.1)	F. Berthiller et al. Journal of Chromatography A. 2005

Micotoxina	Matriz	Parâmetros de validação	Preparo da amostra		Cromatografia Líquida	Coluna	Fase móvel	Volume de injeção Fluxo	Gradiente de Eluição	Espectrometria de Massas	Íons Pesquisados	Referência
			Extração	Purificação								
AFB1, AFB2, AFG1, AFG2, OCRA, ZEA, DON, FB1, FB2, T2 e HT2	Arroz, trigo, aveia, cevada, farinha de milho	Linearidade: R ² . Veracidade e precisão: 1 nível de contaminação em triplicata sob condições de repetibilidade. O autor menciona efeito matriz e limites, mas não detalha os procedimentos para determinação dos parâmetros.	10g de cereal moído homogeneizados por 1h em 40 mL de acetoneitrila:água:ácido acético (79:20:1). O sobrenadante é centrifugado a 3000 RPM por 10 minutos. O,5 mL do extrato final é diluído com 0,5 mL de acetoneitrila:água:ácido acético (20:79:1) e filtrado em filtro de 0,22 µm.	Não tem	HPLC Finnegan TSQ quantum ultra mass	C18 Thermo Scientific (150 x 4.6 mm x 3µm)	Metanol e ácido acético 0,1%	20 µL 0,25 mL.min ⁻¹	5% de metanol (0-8 min) – aumento linear para 90% de metanol (8-22 min) – reduz para 5% de metanol em três minutos (22-25 min)	Finnegan TSQ quantum ultra mass ESI triplo quadrupolo modo SRM modo positivo exceto para DON	AFB1 (241; 285) AFB2 (259; 287) AFG1 (243; 283) AFG2 (245; 275) FB1 (334; 352) FB2 (318; 336) ZEA (185; 187)	Soleimany et al, Food Chemistry 2012
AFB1, AFB2, AFG1, AFG2, OCRA, ZEA, DON, FB1, FB2, T2 e HT2 entre outras	Pasta de amendoim, pistache, trigo, milho, uva passa, figo	Linearidade: R ² . Veracidade e precisão: três níveis injetados 6 vezes cada sob condições de repetibilidade. Efeito matriz: supressão/incremento de sinal pela razão das inclinações de curvas matrizada e usual multiplicada por 100. Limites: razão sinal ruído 3/1 e 10/1 utilizando software do equipamento.	25g extraídos com 100 mL de acetoneitrila:água (80:20) por 2h. 1mL do extrato límpido é diluído com 3mL de água. Soluções turvas devem ser filtradas em filtro de 0,45 µm	Não tem	HPLC Waters Alliance 2695	Altima C18 (150x3.2mm x 5µm)	Ácido fórmico 0,1% em H ₂ O e Ácido fórmico 0,1% em acetoneitrila	20 µL 0,3 mL/min	Proporção de A cai de 90% para 30% (0-12 min) – mantém até 16 min – cai para 10% (16-17.5 min) – mantém até 20 min – aumenta para 90% (20-21 min) – mantém até 25 min.	Quattro Ultima triplo quadrupolo (Waters) ESI modo MRM modo positivo	AFB1 (241; 285) AFB2 (259; 287) AFG1 (243; 283) AFG2 (245; 275) FB1 (334; 352) FB2 (336; 318) ZEA (187; 185)	Spanger et al, Food Additives & Contaminants 2007

Micotoxina	Matriz	Parâmetros de validação	Preparo da amostra		Cromatografia Líquida	Coluna	Fase móvel	Volume de injeção Fluxo	Gradiente de Eluição	Espectrometria de Massas	Íons Pesquisados	Referência
			Extração	Purificação								
FB1	Milho	Veracidade: 4 níveis não sendo detalhado o procedimento do teste.	5 g de amostra extraídos em blender por 3 minutos com 10 mL de metanol : 0.1 M HCl (3:1) e em seguida centrifugado a 4000 g por 10 min.	Não houve purificação. O sobrenadante foi filtrado e injetado diretamente	HPLC LiChrospher 60-RP	(10 x2.0mm i.d. 5µm) não deu mais informações	A: 0,05% TFA em metanol B: 0,05% TFA em água.	10 ou 20 µL 200µL/min	0 min: 40% solv. B 1 min: 40% solv. B 7min: 1% solv. B 10 min: 1% solv. B 15 min: 40% solv.B	Triple Stage Quadrupole TSQ 7000 (Finnigan MAT, Bremen, Germany) com interface ESP espectrômetro operando no modo SIM (selected ion monitoring)	Não informado	M. Hartl et al Eur Food Res Technol (1999)
FB1 e FB2	Milho	Este método descreve o desenvolvimento de um experimento interlaboratorial	20 g de amostra extraídos com 100 mL de acetona:metanol: água (25:25:50) em agitador orbital por 60 min.	Após filtração foi purificada em IAC fumoniprep R-Biopharm Rhône Ltd	HPLC Agilent Technologies 1100 HPLC System	Agilent Zorbax XDB-C18, 3,5µm (4,6x100mm)	A:0,005M acetato de amônio B: metanol	20µL 0,2mL/min	0-2 min: 35%A e 65%B 2-15 min: 5%A e 95%B 15-16min: 35%A e 65%B 16-20 min: mantém 35%A e 65% B.	Agilent Technologies 1100	Single Quadrupole	Senyuva et al.: Journal of AOAC International, 2010
ZEA, DON,T2 e HT2	Trigo	Linearidade: R ² Veracidade e precisão: 2 níveis de contaminação em triplicata sob condição de repetibilidade. Limites: razão sinal ruído 3/1 e 10/1 utilizando software do equipamento.	25 g de amostra extraídos com 100 mL metanol:água (75:25) em agitador automático por 30 minutos e centrifugados por 10 min a 1410g	IAC DZT MS- PREP	HPLC Agilent 1200 series LC System	Zorbax Extend C18 1,8µm (100x2,1 mm)	A: água contendo 10mM acetato de amônio B: acetonitrila	5 µL 0,2 mL/min	Gradiente linear 90% A até 30% A em 20 minutos	Agilent 6410 triplo quadrupolo ESI modo MRM	ZEA (187;283)	H. Tanaka et al. Rapid communications em mass spectrometry 2010
DON, ZEA, T2, HT2, FB1, FB2 e FB3	Cereais	Veracidade e precisão: 3 níveis de contaminação em 7 replicatas sob condição de repetibilidade. Efeito matriz: supressão/incremento de sinal pela razão das inclinações de curvas matrizada e usual multiplicada por 100. Limites: razão sinal ruído 3/1 e 10/1 utilizando software do equipamento.	QuEChERS 4g de amostra foram extraídos com 7,5mL de ácido fórmico 0,1% e 10 mL de acetonitrila sob agitação vigorosa. Depois adiciona-se 1g de NaCl e 4g MgSO ₄ misturando novamente. Centrifugou-se (5 min 5000 RPM). Dilui-se a fase orgânica com água e filtrou.	Não tem	HPLC Acquity (Waters, Milliford , MA, USA)	100mmx2,1mm 1.8µm Acquity UPLC HSS T3 column (Waters)	Sistema I: 5mM de formato de amônio pH 5,6 (A1) e metanol (B) Sistema II: 5 mM formato de amônio com 0,1% ácido fórmico ph 2,7 (a2) e metanol (B)	0,3 mL/min	Começa com 0% B. De 1 a 6 min cresce linearmente para 50%B avança para 100% nos próximos 4 min e mantém até 15 minutos.	Time off light mass spectrometer LCT Premier XE (Waters) dual electrospray source	Utilizou os íons moleculares para quantificação e adutos metálicos para confirmação	M. Zachariasova et al. Analytica Chimica Acta (2010)

Micotoxina	Matriz	Parâmetros de validação	Preparo da amostra		Cromatografia Líquida	Coluna	Fase móvel	Volume de injeção Fluxo	Gradiente de Eluição	Espectrometria de Massas	Íons Pesquisados	Referência
			Extração	Purificação								
FB1, FB2 e FB3	Milho	Linearidade: R ² . Veracidade e precisão: três níveis em 5 replicatas sob condições de repetibilidade e precisão intermediária entre dias. Limites: razão sinal ruído 3/1 e 10/1 utilizando software do equipamento.	5 g de amostra extraídas com 100 mL de metanol:água (70:30) com agitação mecânica por 30 min. 25 mL do extrato centrifugados a 3000 RPM por 5 min.	Não houve	UPLC Waters Quattro Premier XE System	UPLC BEH C18 1,7µm (2,1x50 mm)	A: água com 0,1% de ácido fórmico B: metanol com 0,1% de ácido fórmico	0,3 e 0,4 mL/min	Inicial: 50% A - 2,5min: 10% - 3,5 min: 0%A - 3,6min: 50%A - 5min: 50%A	UPLC Waters Quattro Premier XE System fonte ESI modo MRM	FB1 (352.4; 334.4) FB2 (336.4; 318.4)	Li et al. Journal of AOAC International (2010)
AFB1, AFB2, AFG1, AFG2, AFM1, OCRA, DON, FB1, FB2, T2 e HT2	Trigo	Linearidade: R ² . Veracidade e precisão: 2 níveis de contaminação em 6 replicatas sob condições de repetibilidade e precisão intermediária entre dias. Efeito matriz: comparação das inclinações de curvas usual e matricada por análise de covariância. Limites: razão sinal ruído 3/1 e 10/1 utilizando software do equipamento.	5 g de amostra extraídos em 10 mL de acetonitrila:água(80:20) em agitador vortex por 2 minutos. Agitação em agitador orbital e centrifugação a 5000 rpm por 5 min.	Somente filtração em filtro de nylon Millex 0,20	Acquity UPLC system (Waters)	Acquity UPLC BEH C18 (100mm x 2,1mm x 1,7 µm)	A: metanol B: solução aquosa de formato de amônio (5mM)	5µL 0,35 mL/min	Começa com 25% de A que cresce linearmente para para 75% em 3 minutos e, então, para 100% em 2 minutos. Esta composição se mantém por mais 1,5 min e aí volta para 25% em 1 minuto, reequilibrando em mais 1 minuto totalizando 8 minutos	Acquity TQDquadrupolo tandem (Waters) ESI	AFB1 (285.5; 241.3) AFB2 (259.2; 243.3) AFG1 (243.1; 329.2) AFG2 (313.5; 311.4) FB1 (334.7; 352.8) FB2 (336.7; 354.7)	Frenish et al. Food Chemistry (2009)

AFB1: aflatoxina B₁, AFB2: aflatoxina B₂, AFG1: aflatoxina G₁, AFG2: aflatoxina G₂, OCRA: ocratoxina A, ZEA: zearalenona, DON: desoxinivalenol, FB1: fumonisina B₁, FB2: fumonisina B₂, T2: toxina T2, HT2: toxina HT2. HPLC-MS/MS: cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas sequencial, UPLC-MS/MS: : cromatografia líquida de ultra performance acoplada a espectrometria de massas sequencial, TOF: analisador tempo de voo, QuEChERS: método rápido, fácil, barato, eficiente, robusto e seguro.

Independentemente da técnica utilizada, um desempenho mínimo é exigido nas análises de micotoxinas em alimentos, visando garantir a confiabilidade dos resultados. A União Europeia regulamenta parâmetros de desempenho, como porcentagem de recuperação, desvio padrão sob condições de repetitividade e reprodutibilidade e incerteza, para métodos destinados à determinação de diversas micotoxinas, em função das concentrações das mesmas, por meio do regulamento 401/2006 (UE, 2006 a) (Tabela 11).

Tabela 11. Critérios de desempenho para métodos de análise de micotoxinas

Concentração ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	DPR _r (%)	DPR _R (%)	Recuperação (%)
Aflatoxina B ₁ e soma (B ₁ +B ₂ +G ₁ +G ₂)			
< 1,0	2/3 do valor de RSD _R	Derivado da Equação de Horwitz	50 - 120
1,0 - 10,0	2/3 do valor de RSD _R	Derivado da Equação de Horwitz	70 - 110
> 10,0	2/3 do valor de RSD _R	Derivado da Equação de Horwitz	80 - 110
Fumonisinias B ₁ ou B ₂			
≤ 500	≤ 30	≤ 60	60 - 120
> 500	≤ 20	≤ 30	70 - 110
Zearalenona			
≤ 50	≤ 40	≤ 50	60 - 120
> 50	≤ 25	≤ 40	70 - 120

DPR_r: desvio padrão relativo sob condições de repetibilidade; DPR_R: desvio padrão relativo sob condições de reprodutibilidade.

Fonte: UE (2006 a).

Em casos em que existe um número limitado de métodos completamente validados, a União Europeia propõe um critério para avaliação da adequação ao propósito é proposto, por meio da comparação da incerteza combinada estimada com a incerteza de medição máxima (u_f) definida a seguir (**Equação 1**):

$$u_f = \sqrt{(LD/2)^2 + (\alpha C)^2} \quad (\text{Eq. 1})$$

sendo

LD: limite de detecção do método ($\mu\text{g}/\text{kg}$);

C: concentração de interesse ($\mu\text{g}/\text{kg}$);

α : fator numérico cuja utilização depende do valor de C (igual a 0,2 $C \leq 50 \mu\text{g}/\text{kg}$).

3.4 VALIDAÇÃO

3.4.1 VALIDAÇÃO INTRALABORATORIAL

Validações intralaboratoriais correspondem a estudos analíticos que envolvem um único laboratório, utilizando um mesmo método, para analisar a mesma ou diferentes amostras, sob diferentes condições, em um intervalo de tempo justificado (UE, 2002). Estes estudos permitem a avaliação do desempenho de métodos com um número considerável de experimentos, utilizando diferentes combinações de mensurandos, concentrações e matrizes, em um curto intervalo de tempo, facilmente adaptáveis à diferentes situações. As validações intralaboratoriais atendem um importante nicho de processos de validação de métodos devido à sua flexibilidade e habilidade em fornecer resultados rápidos para novos métodos (Souza, et al., 2007).

Procedimentos de validação intralaboratoriais têm sido internacionalmente aceitos, uma vez que diferentes organismos internacionais (EURACHEM, 1998); EC (2002); AOAC *International*, *International Standards Organization* (ISO) e *International*

Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) (Thompson, et al., 2002) e nacionais (INMETRO, 2010) têm proposto documentos orientativos para este tipo de validação, muito embora estes guias sejam divergentes em alguns aspectos.

Processos de validação intralaboratorial permitem avaliar não somente a veracidade e a precisão de um método, mas também outros parâmetros de desempenho como linearidade, faixa de trabalho, sensibilidade, efeitos de matriz, seletividade, limites de detecção e de quantificação. Por outro lado, trabalhar isoladamente reduz, de forma inevitável, a quantidade de dados obtidos, restringindo informações como, por exemplo, àquelas relativas à comparabilidade interlaboratorial. Apesar da impossibilidade de estudo do parâmetro reprodutibilidade nas validações intralaboratoriais, o que exigiria a execução de experimentos em diferentes laboratórios, esta informação nem sempre é necessária. Muitas vezes, estudos de precisão intermediária são suficientes. Também é possível ter uma estimativa da comparabilidade de resultados de medição de qualquer método com outros métodos pelo ensaio de materiais de referência certificados ou pela comparação do método em estudo com outro para o qual a validação já tenha sido feita (Souza, et al., 2007).

3.4.2 PARÂMETROS DE DESEMPENHO

Parâmetro de desempenho é definido pela (UE, 2002) como uma qualidade funcional que pode ser atribuída a um método de ensaio.

Os parâmetros de desempenho típicos na validação intralaboratorial de métodos de ensaio quantitativos são: linearidade da curva de calibração, sensibilidade, faixa de trabalho, efeitos de matriz, seletividade, veracidade, precisão, limite de detecção, limite de quantificação, robustez e incerteza (Thompson, et al., 2002).

3.4.3 LINEARIDADE, SENSIBILIDADE E FAIXA

Calibração é a operação que estabelece, sob condições especificadas, numa primeira etapa, uma relação entre os valores e as incertezas de medição fornecidos por

padrões e as indicações correspondentes com as incertezas associadas; numa segunda etapa, utiliza esta informação para estabelecer uma relação visando a obtenção de um resultado de medição a partir de uma indicação (INMETRO, 2012). Considerando que a maioria dos métodos de ensaio em análises de alimentos utiliza relações lineares, a determinação da equação de calibração é extremamente importante tanto em ensaios de rotina quanto em procedimentos de validação de métodos (RSC, 2005).

Linearidade é a habilidade de um método analítico em produzir resultados que sejam diretamente proporcionais à concentração do mensurando em amostras, em uma dada faixa de concentração (EURACHEM, 1998). Mais ainda, uma adequada avaliação da linearidade é fundamental para a qualidade dos demais parâmetros de desempenho estabelecidos para métodos quantitativos (como sensibilidade, efeitos de matriz, seletividade, veracidade, precisão e limites) (Souza, et al., 2007). Entretanto, exceto quando ocorrem grandes erros no preparo das curvas, os erros devidos à calibração correspondem aos menores componentes na compilação da incerteza total (Thompson, et al., 2002).

A sensibilidade é o gradiente da função de calibração, ou seja, a alteração na resposta do instrumento que corresponde a uma mudança na concentração do mensurando (EURACHEM, 1998; Thompson, et al., 2002).

A faixa de trabalho é o intervalo da concentração do mensurando dentro do qual o método pode ser considerado como validado (Thompson, et al., 2002). Segundo o Vocabulário Internacional de Metrologia (VIM) (INMETRO, 2012) trata-se do conjunto de valores de grandezas da mesma natureza que pode ser medido por um dado instrumento de medição ou sistema de medição com incerteza de medição instrumental especificada, sob condições determinadas.

A faixa de trabalho deve cobrir a faixa de aplicação para a qual o ensaio vai ser usado e a concentração mais esperada da amostra deve, sempre que possível, se situar no centro da faixa de trabalho. No limite inferior da faixa, o fator limitante é o valor do limite de quantificação. No limite superior, os fatores limitantes dependem do sistema de resposta do equipamento de medição. Dentro da faixa de trabalho pode

existir uma faixa de resposta linear e dentro desta, a resposta do sinal terá uma relação linear com o mensurando ou valor da propriedade (INMETRO, 2010).

3.4.4 EFEITOS DE MATRIZ E SELETIVIDADE

Uma amostra consiste do mensurando a ser medido, da matriz e de outros componentes que podem ter algum efeito na medição, mas que não se quer detectar ou quantificar (Bruce, et al., 1998; INMETRO, 2010). A seletividade é um parâmetro de desempenho relacionado ao evento de detecção do mensurando na presença destes componentes. Este parâmetro possui grande importância, principalmente quando se considera a área de análises de alimentos, na qual as matrizes são misturas de constituições químicas complexas (Souza, et al., 2007).

A seletividade é definida como o grau em que um método pode quantificar o mensurando acuradamente na presença de interferentes (Thompson, et al., 2002). Seletividade de um sistema de medição é considerada como a propriedade do sistema, utilizado com um procedimento de medição especificado, segundo a qual o sistema fornece valores medidos para um ou vários mensurandos, tais que os valores de cada mensurando sejam independentes uns dos outros ou de outras grandezas associadas à substância em estudo (INMETRO, 2012).

Dependendo de como a identidade do mensurando é estabelecida, interferentes podem inibir a detecção distorcendo o sinal proveniente do mensurando. Diferentemente, os interferentes também podem contribuir para o sinal atribuído ao mensurando, com efeito de aumentar a concentração do mesmo (EURACHEM, 1998). A medição pode ser alterada porque matriz, reagentes ou outros componentes afetam a sensibilidade do detector que mede o mensurando ou porque estes compostos afetam diretamente a resposta. Assim, efeitos de erros constantes devidos a interferentes e erros proporcionais à calibração devidos a efeitos de matriz podem estar presentes ao mesmo tempo (Bruce, et al., 1998).

Estudos dos efeitos de matriz correspondem um tipo específico de estudo de seletividade que objetiva averiguar possíveis interferências causadas por elementos

diversos que compõem a matriz amostral. A importância do estudo dos efeitos de matriz nos processos de validação, quando se pretende simplificar a calibração pelo emprego de padrões de calibração preparados como soluções simples, é discutida no guia da AOAC, ISO e IUPAC (Thompson, et al., 2002).

3.4.5 VERACIDADE E PRECISÃO

Veracidade e precisão são consideradas os parâmetros de validação mais importantes (Taverniers, et al., 2004). A precisão diz respeito à distribuição dos erros aleatórios de um sistema de medição, enquanto a veracidade expressa os erros sistemáticos (RSC, 2003).

Veracidade é o grau de concordância entre o resultado experimental e o valor de referência aceito para a propriedade que está sendo medida, sendo estimada, quantitativamente, em termos de tendência. Para avaliação da veracidade de um método são utilizados materiais de referência certificados (MRC), materiais de referência (MR), métodos de referência ou ensaios de adição/recuperação (Thompson, et al., 2002).

Precisão é o grau de concordância entre resultados de ensaios independentes obtidos em condições, pré-estabelecidas, específicas. O valor da precisão é geralmente expresso em termos de imprecisão e normalmente calcula-se sob a forma de um desvio padrão do resultado do ensaio. Uma menor precisão é indicada através de um elevado desvio padrão (Thompson, et al., 2002). As três condições mais comuns para obtenção da precisão são repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade (INMETRO, 2010). A repetibilidade avalia a variabilidade encontrada quando resultados independentes são obtidos utilizando o mesmo método, em um mesmo laboratório, com o mesmo analista, usando o mesmo equipamento em um curto intervalo de tempo. A reprodutibilidade representa a variabilidade encontrada quando resultados são obtidos utilizando o mesmo método, em laboratórios diferentes, com diferentes analistas e usando equipamentos diferentes. A precisão intermediária refere-se à precisão avaliada utilizando o mesmo método, no mesmo laboratório, mas variando condições como: diferentes analistas; diferentes equipamentos; diferentes tempos. A

precisão, tanto sob condições de repetibilidade quanto de reprodutibilidade é dependente da concentração do mensurando (EURACHEM, 1998; Thompson, et al., 2002).

3.4.6 LIMITES E INCERTEZA

O limite de detecção é a menor quantidade ou concentração do mensurando que pode ser significativamente distinguida de zero. Este limite corresponde à média mais três desvios padrão das respostas obtidas para as amostras brancas ou três desvios padrão das respostas obtidas para amostras de concentração baixa do mensurando (Thompson, et al., 2002). Trata-se, de acordo com o VIM, do valor medido, obtido por um dado procedimento de medição, para o qual a probabilidade de declarar falsamente a ausência de um constituinte num material é β , sendo α a probabilidade de declarar falsamente a sua presença. Neste documento há uma recomendação para que o termo sensibilidade não seja empregado no sentido de limite de detecção (INMETRO, 2012).

Limite de quantificação é a menor concentração de uma substância que pode ser quantificada com veracidade e precisão aceitáveis nas condições estipuladas do teste (EC, 2002) ou a concentração abaixo da qual o método analítico não pode operar com precisão e veracidade aceitáveis (Thompson, et al., 2002). Sobre o limite de quantificação, Thompson, et al. (2002) sugerem que, enquanto operar acima de um limite fornece alguma segurança, devemos reconhecer que há uma dicotomia artificial na escala de concentração, uma vez que medidas abaixo deste limite não são privadas de informações de conteúdo e podem ser adequadas para o propósito de uso. Estes autores não recomendam o uso deste tipo de limite, sendo preferível tentar expressar a incerteza da medição em função da concentração, comparando com os critérios acordados entre o laboratório e o cliente ou o usuário final dos resultados.

É importante observar que não é verdade que a detecção ou quantificação sejam impossíveis abaixo dos limites. Nestes níveis, a incerteza da medição pode ser maior que o próprio valor da medição. Assim, considerando que os resultados analíticos não são somente concentrações, mas sim estimativas de concentração propensas a erros, nas medições abaixo dos limites estas estimativas acompanhadas

por suas respectivas incertezas podem levar a resultados negativos. Limites não são diretamente relevantes na estimativa de incerteza, porém a incerteza abaixo do limite de detecção e próxima ao limite de quantificação pode exigir cuidados especiais (Souza, et al., 2007).

Segundo o VIM, a incerteza de medição corresponde um parâmetro não negativo que caracteriza a dispersão dos valores atribuídos a um mensurando, com base nas informações utilizadas (INMETRO, 2012).

4. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Micotoxinas da FUNED, em Belo Horizonte, MG, e no Laboratório de Aplicações de Cromatografia e Espectrometria de Massas da Waters Technologies do Brasil, em Barueri, SP, Brasil.

4.1 AMOSTRAS

4.1.1 VALIDAÇÃO

Para os estudos de validação, foram utilizadas amostras de fubá (1 kg) coletadas pela Vigilância Sanitária Estadual em cumprimento ao PROGVISA do ano de 2014.

As amostras foram removidas da embalagem original, homogeneizadas por quarteamento manual e acondicionadas em sacos plásticos, devidamente identificados, os quais foram lacrados em seladora térmica MA-201/5 Politerm (Contagem, Minas Gerais, Brasil) e mantidos refrigerados (2 a 8 °C) até o momento das análises.

As amostras foram analisadas por métodos cromatográficos oficiais (AOAC, 2012) para cada grupo de micotoxinas, previamente validados, visando à seleção de amostras brancas, ou seja, aquelas para as quais não tenham sido obtidos resultados detectados pelos métodos em questão. Como não foi encontrado, dentre as amostras analisadas, nenhum fubá isento de contaminação por FB1, aquelas para as quais a FB1 foi detectada, mas não quantificada, com os menores valores de área de pico para este mensurando foram selecionadas. Estas amostras foram, então, misturadas e homogeneizadas, por quarteamento manual, seguido de homogeneização, utilizando homogeneizador em Y MA201/5MO da Marconi (Piracicaba, São Paulo, Brasil), por doze horas, dando origem a uma amostra *pool*.

A amostra *pool* de fubá foi acondicionada, em saco plástico devidamente identificado lacrado em seladora MA-201/5 Politerm (Contagem, Minas Gerais, Brasil), e mantida refrigerada (2 a 8 °C) para emprego nos experimentos de validação.

4.1.2 ESTUDO DE OCORRÊNCIA

No ano de 2014 50 amostras de fubá foram utilizadas para o estudo de ocorrência, sendo 20 coletadas pela Vigilância Sanitária Estadual, em 18 municípios, cobrindo 8 de um total de 12 mesorregiões do estado de Minas Gerais, e 30 foram adquiridas no mercado de Belo Horizonte. As datas de fabricação das amostras variaram de julho a novembro de 2014. Nesta amostragem foram contempladas 18 diferentes marcas do produto. Nos casos em que houve repetição de marca, foram amostrados diferentes lotes.

As amostras foram removidas da embalagem original, homogeneizadas por quarteamento manual e acondicionadas em sacos plásticos, devidamente identificados, os quais foram lacrados em seladora MA-201/5 Politerm (Contagem, Minas Gerais, Brasil) e mantidos refrigerados (2 a 8 °C) para o estudo de ocorrência.

4.2 EQUIPAMENTOS

Para quantificação foi utilizado o acoplamento UPLC-MS/MS empregando os sistemas *Acquity UPLC H-Class System* e *Xevo-TQ-S* com fonte de ionização *electrospray* e analisador tipo triplo quadrupolo, da *Waters Corporation* (Millford, Massachusetts, USA).

Para determinação da concentração dos padrões de micotoxinas foi utilizado espectrofotômetro UV-visível UV-1601-PC da *Shimadzu Corporation* (Kyoto, Japan).

4.3 REAGENTES, PADRÕES E OUTROS

Acetonitrila grau HPLC com 99,98 % de pureza foi obtida da *J.T. Baker* (Center Valley, Pennsylvania, USA) e da *Merck* (Kenilworth, New Jersey, USA). Metanol grau HPLC e ácido fórmico grau para análise com 98 a 100 % de pureza foram adquiridos da *Merck* (Kenilworth, New Jersey, USA). Em todos os ensaios utilizou-se água grau reagente tipo I, obtida em sistema *Milli-Q synthesis* da *Merck Millipore* (Darmstad, Deutschland).

Os padrões de AFB1, AFB2, AFG1, AFG2 e ZEA foram obtidos da *Sigma-Aldrich* (Saint Louis, Missouri, USA) enquanto o padrão de FB1 foi da *Biopure* (Union, Missouri, USA). Material de referência certificado (MRC) de milho naturalmente contaminado com FB1 (TR-F-100) foi obtido da *Trilogy Analytical Laboratory* (Washington, Missouri, USA). O MRC foi mantido sob refrigeração, entre 2 e 8 °C, até o momento das análises.

4.4 SOLUÇÕES

As soluções estoque de micotoxinas foram preparadas por diluição dos padrões conforme descrito na **Tabela 12**. Tais soluções foram mantidas em frascos de vidro, ao abrigo da luz, sob congelamento (-15 a -25 °C). As concentrações foram determinadas como descrito em AOAC (2012), com exceção da FB1. Foram realizadas leituras em espectrofotômetro UV-vis na faixa de comprimentos de onda de 300 a 400 nm. Os valores máximos de absorbância de cada micotoxina foram substituídos na **Equação 2**:

$$\text{Concentração } \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} \right) = \frac{A \times \text{MM} \times \text{CF} \times 1000}{\epsilon} \quad (\text{Eq. 2})$$

sendo

A: absorbância máxima;

MM: massa molecular da micotoxina;

CF: fator de correção do equipamento, calculado conforme descrito em AOAC (2012);

ε: absortividade molar da micotoxina.

Como a FB1 não possui propriedade de fluorescência, não foi possível determinar a concentração por este método. O padrão desta toxina foi adquirido sólido em pó, com massa de 5,0 mg, que foi diluída em 100 mL de solução aquosa de acetonitrila a 50 %, dando origem à solução estoque de 50 µg/mL utilizada para realização dos ensaios.

Tabela 12. Concentrações das soluções estoque de micotoxinas e respectivos diluentes

Micotoxina	Concentração (µg/mL)	Diluyente
Aflatoxina B ₁	9,20	Benzeno:Acetonitrila (98:2, v/v)
Aflatoxina B ₂	10,07	Benzeno:Acetonitrila (98:2, v/v)
Aflatoxina G ₁	15,06	Benzeno:Acetonitrila (98:2, v/v)
Aflatoxina G ₂	8,46	Benzeno:Acetonitrila (98:2, v/v)
Fumonisina B ₁	50	Acetonitrila:Água (50:50, v/v)
Zearalenona	49,99	Metanol

A partir das soluções individuais de cada micotoxina, foi preparado uma solução estoque *pool* de micotoxinas. Para isso, alíquotas das soluções estoque dos padrões de AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂ e ZEA foram transferidas para um frasco âmbar de 7 mL. As alíquotas foram totalmente evaporadas com auxílio de fluxo de nitrogênio, sem aquecimento. A alíquota correspondente da solução estoque de FB₁ foi, então, adicionada no mesmo frasco, e o volume foi completado para 6,0 mL com metanol. Os volumes de cada solução estoque de micotoxina e suas respectivas concentrações na solução *pool* estoque encontram-se descritos na **Tabela 13**.

Tabela 13. Composição da solução estoque *pool* de micotoxinas

Micotoxina	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Volume da Solução Estoque (μL)
Aflatoxina B ₁	0,25	162
Aflatoxina B ₂	0,25	150
Aflatoxina G ₁	0,26	102
Aflatoxina G ₂	0,25	180
Fumonisina B ₁	20,00	2400
Zearalenona	7,00	840

Para construção das curvas de calibração, uma alíquota de 150 μL da solução *pool* estoque foi transferida para um frasco âmbar de 22 mL e totalmente evaporada com auxílio de fluxo de nitrogênio, sem aquecimento. No mesmo frasco foram adicionados 12,0 mL de solução aquosa de acetonitrila a 50 %, resultando em uma solução *pool* intermediária, com concentrações de 3,10; 3,15; 3,20; 3,17; 250,00 e 87,48 ng/mL para AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂, FB₁ e ZEA, respectivamente.

As soluções *pool*, estoque e intermediária, foram preparadas a cada uso, empregando micropipetadores de volume variável *Pipetman* P200, P1000 e P5000 da Gilson (Middleton, Wisconsin, USA).

4.5 PROCEDIMENTOS ANALÍTICOS

Os procedimentos analíticos foram baseados nos métodos descritos por Spanjer et al. (2007), Soleimany et al. (2012) e Li et al. (2010) (**Tabela 10**), com adaptações (**Figura 11**).

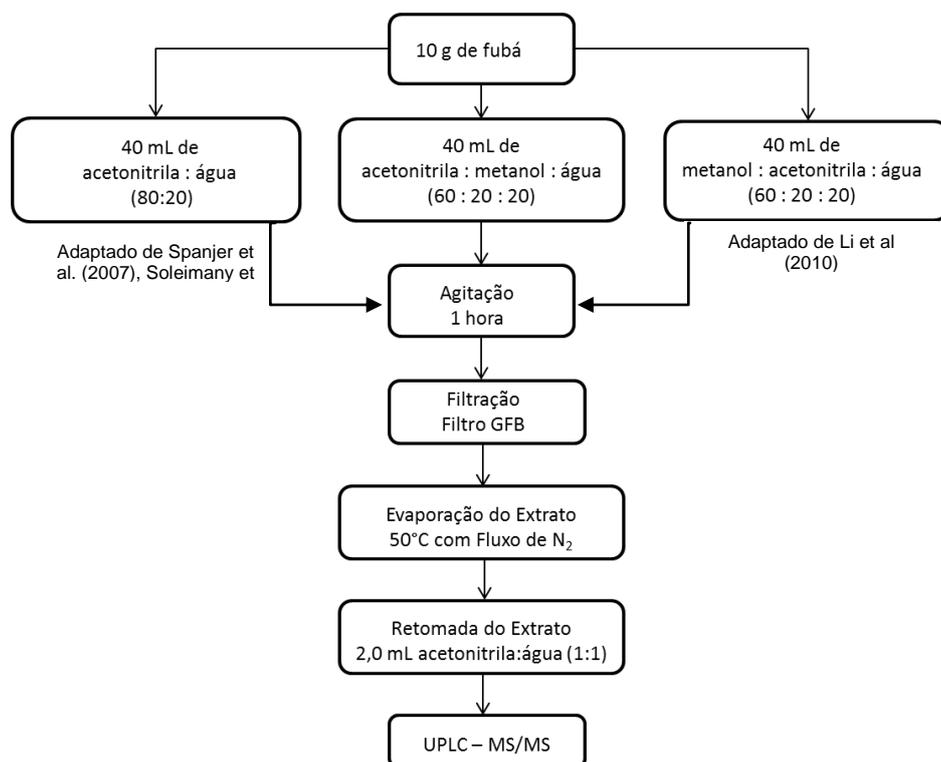


Figura 11. Marcha analítica do método proposto, empregando três diferentes soluções extratoras.

GFB: filtro de fibra de vidro tipo B; N₂: nitrogênio; UPLC-MS/MS: cromatografia líquida de ultra performance acoplada à espectrometria de massas sequencial.

4.5.1 EXTRAÇÃO

Alíquotas de 10,00 g de fubá foram pesadas e adicionadas de 40,0 mL de solução extratora, seguido de homogeneização em agitador mecânico *multi-wrist* da *Lab-Line* (Illinois, USA), por uma hora.

Três diferentes soluções extratoras foram testadas: solução aquosa de acetonitrila a 80%, acetonitrila:metanol:água (60:20:20) e metanol:acetonitrila:água (60:20:20).

4.5.2 PURIFICAÇÃO

A mistura homogeneizada foi filtrada a vácuo em filtro de fibra de vidro tipo B (GFB) da marca Whatman (Buckinghamshire, England), com 1,0 µm de porosidade, 0,68 mm de espessura e 47 mm de diâmetro.

4.5.3 DETERMINAÇÃO

Uma alíquota de 1,0 mL do extrato filtrado foi transferida para um frasco âmbar de 7 mL e evaporada à 50°C, sob fluxo de nitrogênio. O extrato seco foi, então, reconstituído com 2,0 mL de solução aquosa de acetonitrila a 50 % e filtrado em filtro de seringa GHP *Waters Corporation* (Millford, Massachusetts, USA) de 13 mm de diâmetro e 0,22 µm de poro, para injeção no sistema de UPLC-MS/MS.

O volume de injeção no sistema UPLC foi de 1,0 µL e o fluxo de eluição das fases móveis 0,3 mL/min. A coluna utilizada foi a ACQUITY UPLC BEH C18 *Waters Corporation* (Millford, Massachusetts, USA) com dimensões 2,1 mm de diâmetro interno, 100 mm de comprimento e tamanho de partícula de 1,7 µm. Foi otimizado um gradiente de eluição (**Tabela 14**) constituído de duas fases móveis: fase móvel A: solução aquosa de ácido fórmico a 0,2 % e fase móvel B: solução de ácido fórmico a 0,2 % em acetonitrila. No intervalo de 4 a 8 minutos foi realizada a limpeza do sistema, com alto teor de solvente orgânico, para eliminação de efeitos de *carry over* dos sinais das micotoxinas, com destaque para a FB1. De 8 a 10 minutos foi restabelecida a condição para a próxima injeção.

Tabela 14. Gradiente de eluição

Tempo (min)	% Fase Móvel A	% Fase Móvel B
0	60	40
2	60	40
4	1	99
8	1	99
8,1	60	40
10	60	40

Fase móvel A: solução aquosa de ácido fórmico a 0,2 %; Fase móvel B: solução de ácido fórmico a 0,2 % em acetonitrila.

As análises foram feitas no modo MRM (*Multiple Reaction Monitoring*) no modo positivo e duas transições foram selecionadas, sendo uma para quantificação e uma para confirmação.

O tempo de permanência foi de 29 ms para AFB1, AFB2, AFG1, AFG2 e FB1 e 163 ms para ZEA. A voltagem do cone foi de 40 V para AFB1, AFB2 e AFG2, 35 V para AFG1, 20 V para ZEA e 47 V para FB1. As energias de colisão foram de 36 e 24 eV para as transições de quantificação e confirmação de AFB1 respectivamente, 30 e 26 eV para as transições de AFB2, 25 eV para ambas as transições de AFG1, 30 eV para ambas as transições de AFG2, 40 e 38 eV para as transições de FB1 e para ZEA foram de 23 e 19 eV.

A voltagem aplicada no *eletro spray* capilar foi de 3,0 kV e a temperatura da fonte foi mantida em 150 °C, sendo nitrogênio o gás de nebulização mantido a 7 bar. A temperatura de dessolvatação foi de 450 °C. Nitrogênio também foi empregado como gás de dessolvatação, com fluxo de 800 L/h. O gás de colisão foi argônio a um fluxo de 0,17 mL/min. A pressão na célula de colisão foi mantida em $3,88 \times 10^{-3}$ bar.

4.6 VALIDAÇÃO DO MÉTODO

Os parâmetros linearidade, sensibilidade, faixa linear, efeitos de matriz e seletividade, veracidade, precisão, limites de detecção, de quantificação e incerteza foram estabelecidos em ensaios intralaboratoriais com soluções padrão das micotoxinas e amostras adicionadas de padrão conforme proposto por Souza & Junqueira, 2005, Souza, et al., 2007 e Thompson, et al., 2002. A adequação para o propósito de uso do método foi avaliada em função dos parâmetros estudados e respectivos critérios de aceitabilidade definidos (UE, 2002; UE, 2006 b). O nível de significância adotado nos testes de hipóteses foi $\alpha = 0,05$.

4.6.1 LINEARIDADE, SENSIBILIDADE E FAIXA LINEAR

A linearidade do método foi avaliada em experimentos com curvas de calibração dos mensurandos, conforme procedimento descrito por Souza & Junqueira (2005).

Soluções dos mensurandos (*pool*) foram preparadas em seis níveis de concentração, igualmente espaçados, além do branco, com três replicatas verdadeiras

e independentes de cada nível, as quais foram preparadas e analisadas em ordem aleatória (**Figura 12**).

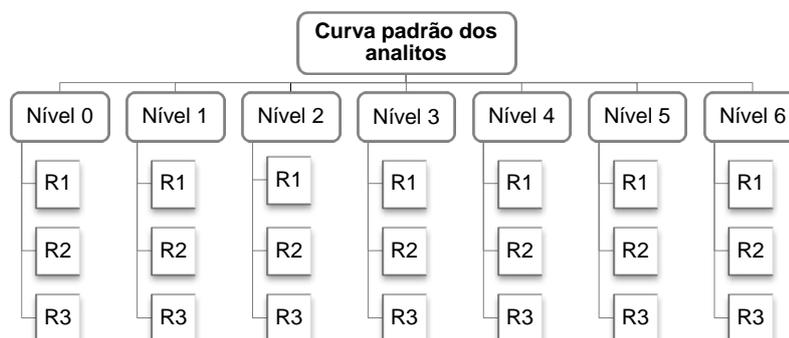


Figura 12. Representação esquemática do delineamento experimental para avaliação da linearidade.

R: replicata.

Para construção da curva de calibração foram tomadas alíquotas de 80, 160, 240, 320, 400 e 480 μL da solução *pool* intermediária, as quais foram diluídas para 1,0 mL com solução aquosa de acetonitrila a 50 %, resultando nos níveis descritos na **Tabela 15**. As faixas de concentração validadas foram definidas com base na legislação, nas tendências de redução dos níveis regulamentados, bem como no histórico de monitoramento do laboratório quando empregados métodos oficiais.

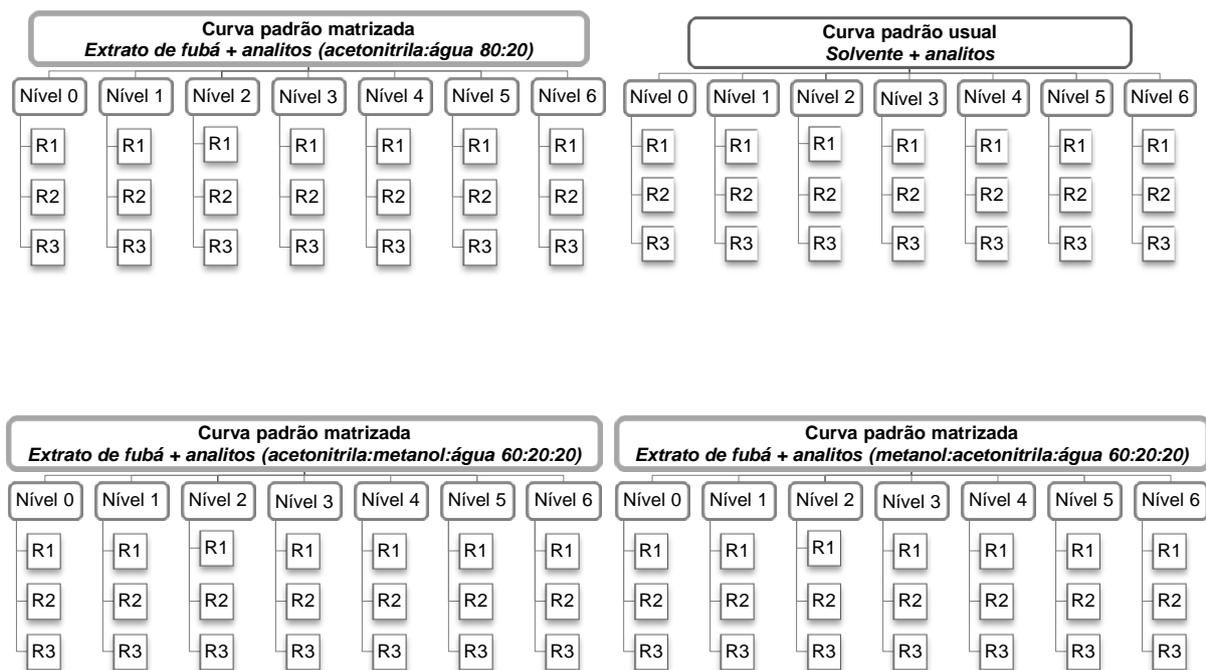
Tabela 15. Níveis de concentração estudados nas curvas de calibração

Nível	Concentração (ng/mL)					
	Aflatoxina B ₁	Aflatoxina B ₂	Aflatoxina G ₁	Aflatoxina G ₂	Fumonisina B ₁	Zearalenona
1	0,25	0,25	0,26	0,25	20,00	7,00
2	0,50	0,50	0,51	0,51	40,00	14,00
3	0,75	0,76	0,77	0,76	60,00	20,99
4	0,99	1,01	1,02	1,02	80,00	27,99
5	1,24	1,26	1,28	1,27	100,00	34,99
6	1,49	1,51	1,54	1,52	120,00	41,99

Outliers foram investigados pelo teste de Jacknife. Os parâmetros das curvas foram estimados pelo método dos mínimos quadrados ordinários, sendo verificadas as premissas de normalidade (teste de Ryan & Joiner), homoscedasticidade (teste de Brown & Forsythe), independência dos resíduos da regressão (teste de Durbin & Watson), significância da regressão e adequação do ajuste ao modelo linear (ANOVA) (Souza & Junqueira, 2005).

4.6.2 EFEITOS DE MATRIZ E SELETIVIDADE

Para avaliação dos efeitos de matriz foi empregado o método de comparação de curvas de padrões. Quatro curvas de calibração foram preparadas, com as mesmas concentrações dos mensurandos, sendo uma preparada com o solvente como descrito no procedimento de linearidade do item 4.6.1 (curva usual) e as outras preparadas em extratos da amostra *pool* de fubá (amostras brancas), empregando cada uma das três soluções extratoras pesquisadas (curvas matrizadas) (**Figura 13**).



R: replicata

Figura 13. Representação esquemática do delineamento experimental para avaliação dos efeitos de matriz.

Para construção das curvas matrizadas, 21 alíquotas de 1,0 mL foram tomadas do extrato purificado da amostra *pool* de fubá, em cada condição de extração avaliada. As alíquotas eram evaporadas à 50°C, sob fluxo de nitrogênio. Os extratos secos eram adicionados de 160, 320, 480, 640, 800, e 960 µL da solução *pool* intermediária, em triplicata, e adicionados de solução aquosa de acetonitrila a 50 % para um volume final de 2,0 mL. Brancos também foram preparados em triplicata. Em seguida, extratos foram filtrados em filtro de seringa GHP *Waters Corporation* (Millford, Massachusetts, USA) de 13 mm de diâmetro e 0,22 µm de poro, para injeção no sistema de UPLC-MS/MS.

As curvas foram avaliadas como descrito para o estudo da linearidade. Em casos de confirmação de adequação dos modelos lineares, a interferência da matriz foi investigada pela comparação das inclinações e interseções das curvas matrizadas com aquelas obtidas para a curva usual, pelo teste de t (Thompson, et al., 2002; Souza & Junqueira, 2005; Souza, et al., 2007).

Como houve a detecção da micotoxina FB1 na amostra *pool* de fubá, optou-se por realizar a extração e leitura de 21 replicatas da referida amostra, para estimativa de um valor médio da área dos picos cromatográficos, que foi descontado das leituras obtidas, para cada ponto da curva de FB1, o que permitiu a comparação dos interceptos também para este mensurando. Para as demais micotoxinas, que não foram detectadas na amostra *pool*, a comparação dos interceptos foi realizada sem necessidade de correção.

Para determinação da seletividade, foi realizada a análise de amostras adicionadas de padrão, amostra branca *pool*, soluções padrão das curvas matrizadas e soluções padrão das curvas usuais, nas diferentes condições de extração avaliadas, para avaliação de possíveis interferências de matriz ou espectrais, tais como sinais, picos e vestígios iônicos.

4.6.3 RECUPERAÇÃO, PRECISÃO, LIMITES E INCERTEZA

Para estudo da recuperação, da precisão, sob condições de repetibilidade e precisão intermediária, e dos limites foram empregadas amostras adicionadas de solução estoque *pool*, em três níveis de concentração, além do branco, na faixa linear, como descrito na **Tabela 16**.

Tabela 16. Níveis de contaminação das amostras adicionadas de padrão nos estudos de veracidade e precisão

Micotoxina	Volume do Pool Estoque (µL)	Contaminação (ng/mL)	Concentração na Amostra (µg/kg)
Aflatoxina B ₁	80	0,25	1,99
Aflatoxina B ₂		0,25	2,01
Aflatoxina G ₁		0,26	2,05
Aflatoxina G ₂		0,25	2,03
Fumonisina B ₁		20,00	160,00
Zearalenona		7,00	55,99
Aflatoxina B ₁	240	0,75	5,96
Aflatoxina B ₂		0,76	6,04
Aflatoxina G ₁		0,77	6,15
Aflatoxina G ₂		0,76	6,09
Fumonisina B ₁		60,00	480,00
Zearalenona		20,99	167,96
Aflatoxina B ₁	480	1,49	11,92
Aflatoxina B ₂		1,51	12,08
Aflatoxina G ₁		1,54	12,29
Aflatoxina G ₂		1,52	12,19
Fumonisina B ₁		120,00	960,00
Zearalenona		41,99	335,91

Para cada nível de concentração estudado, vinte e uma replicatas verdadeiras e independentes foram preparadas, as quais foram divididas em três baterias analíticas distintas, com sete replicatas cada. As baterias analíticas envolveram diferentes dias e analistas, para simular condições de precisão intermediária (Thompson, et al., 2002; Souza, et al., 2007). Este delineamento foi realizado para cada uma das três soluções extratoras avaliadas, conforme esquema apresentado na **Figura 14**. Em cada bateria analítica foi preparada uma nova curva de calibração matrizada.

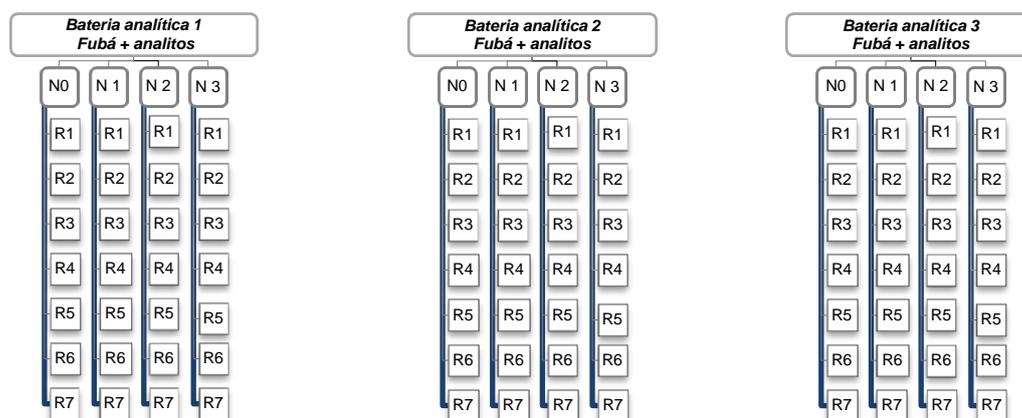


Figura 14. Representação esquemática da avaliação dos parâmetros: veracidade, precisão, limite de detecção e limite de quantificação, para cada solução extratora

N: nível; R: replicata.

As porcentagens de recuperação médias foram estimadas, para cada nível de concentração estudado, após tratamento de *outliers* pelo teste de Grubbs, em cada condição de extração. No caso da FB1, o valor médio das áreas dos picos cromatográficos foi descontado da resposta encontrada, assim como realizado no estudo de efeito matriz. Estes resultados foram submetidos à análise de variância para estimativa dos desvios padrões relativos sob condições de repetibilidade (DPR_r) e de precisão intermediária (DPR_R), com verificação prévia das premissas de normalidade e homoscedasticidade (Thompson, et al., 2002; Souza, et al., 2007). Os valores adotados como referência para avaliação da recuperação foram os estabelecidos pela UE (2006). Os valores de referência para a precisão intermediária, para o caso das aflatoxinas, foram os obtidos pelas equações de (Horwitz, 1982) ou de (Thompson,

2000) dependendo da faixa de concentração do mensurando, conforme definido pela UE (2006).

O MRC de milho naturalmente contaminado com FB1 foi analisado, em triplicata, na melhor condição de extração. A estatística adotada na avaliação da veracidade foi o índice z-escore, conforme descrito no ISO Guia 33, sendo considerados satisfatórios valores de z-escore na faixa $-2 \leq z \leq +2$ (ABNT, 2002).

Os limites de detecção e quantificação teóricos foram estimados considerando-se resultados das curvas de calibração matrizadas, em cada condição de extração. Os limites de detecção e quantificação foram, então, definidos como sendo três e dez vezes o desvio padrão do intercepto dividido pela inclinação as curvas, respectivamente (Thompson, et al., 2002; Souza & Junqueira, 2005; Souza, et al., 2007).

Para a estimativa da incerteza foi utilizada a abordagem *Top Down*, considerando os dados obtidos nos estudos de validação, na condição de extração escolhida. Os componentes considerados foram a incerteza-padrão devida à precisão intermediária obtida nos estudos de precisão e a incerteza-padrão devida à curva de calibração obtida no estudo da linearidade. As incertezas estimadas foram avaliadas frente aos critérios descritos em (UE, 2006 a), de forma que as incertezas combinadas devem ser inferiores à incerteza de medição máxima definida no referido documento.

4.7 ESTUDO DE OCORRÊNCIA

As 50 amostras coletadas foram analisadas pelo método validado, para determinação dos seis mensurandos objetos deste estudo, em duplicata. Os resultados foram reportados com respectivas estimativas de incerteza e comparados com os limites das legislações vigentes.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 VALIDAÇÃO DO MÉTODO

Utilizando o analisador tipo triplo quadrupolo no modo MRM (*Multiple Reaction Monitoring*), foram selecionados dois fragmentos do íon precursor, sendo um utilizado para quantificação e o outro para confirmação. A escolha destes íons foi conduzida segundo critérios da União Europeia (**Tabela 17**), que determina as tolerâncias máximas para as intensidades relativas destes íons em diferentes técnicas de espectrometria de massas (UE, 2002).

Os resultados obtidos para as intensidades relativas na curva de padrões em matriz e em amostras adicionadas de padrão são apresentados na **Tabela 18**. Seguindo o critério de variação máxima de 10 % das intensidades relativas, conclui-se que os íons escolhidos para todas as micotoxinas são adequados para condução dos experimentos.

Tabela 17. Tolerância máxima permitida para intensidade relativa dos íons em diferentes técnicas de espectrometria de massas

Intensidade Relativa (% do pico base)	EI-GC-MS (variação)	CI-GC-MS, GC-MS ⁿ LC-MS, LC-MS ⁿ (variação)
>50%	± 10%	± 20%
>20% até 50%	± 15%	± 25%
>10% até 20%	± 20%	± 30%
≤ 10%	± 50%	± 50%

Fonte (UE, 2002)

EI-GC-MS: cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas com fonte de ionização por elétrons; CI-GC-MS: cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas com fonte de ionização química; GC-MSⁿ: cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas sequencial; LC-MS: cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas; LC-MSⁿ: cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas sequencial.

Tabela 18. Intensidades relativas dos íons confirmatórios obtidas para soluções padrões de curva matrizada e amostras adicionadas de padrão, por mensurando, e respectivas variações

Micotoxina	Íons ¹ (m/z)	Intensidade Relativa Média padrões ² (%)	Intensidade Relativa Média amostras ² (%)	Varição ³ (%)
Aflatoxina B1	241 – <u>285</u>	106,0 ± 7,2	105,3 ± 9,1	0,6
Aflatoxina B2	259 – <u>287</u>	114,9 ± 6,2	113,2 ± 9,5	1,5
Aflatoxina G1	283 – <u>243</u>	210,1 ± 50,9	191,7 ± 61,9	8,7
Aflatoxina G2	257 – <u>245</u>	135,0 ± 18,4	134,0 ± 26,3	0,8
Fumonisina	352 – <u>334</u>	117,7 ± 1,3	119,3 ± 2,8	1,3
Zearalenona	185 – <u>187</u>	118,9 ± 1,9	118,8 ± 2,6	0,1

¹ Os íons sublinhados correspondem aos íons de maior intensidade no espectro de massas de cada composto e utilizados na quantificação. m/z: razão entre massa e carga.

² Número de observações: para determinação da intensidade relativa média dos padrões foram utilizadas 18 repetições, e das amostras foram utilizadas 63, para cada micotoxina.

³ Valor absoluto da diferença entre as intensidades relativas médias dos padrões e amostras, dividida pelas intensidades relativas médias dos padrões, expressa em porcentagem.

⁴ Consideradas as intensidades dos 6 níveis de concentração da curva de calibração (tabela 17)

⁵ Consideradas as intensidades dos 3 níveis de concentração de amostras adicionadas (tabela 18).

Perfil cromatográfico similar foi observado em todas as condições de extração avaliadas, os picos cromatográficos não sofreram interferências espectrais ou de elementos da matriz. Nas **Figuras 15, 16, 17 e 18** encontram-se representados cromatogramas típicos daqueles obtidos para amostras adicionadas de padrão, amostra branca *pool*, soluções padrão das curvas matrizadas e soluções padrão das curvas usuais, respectivamente.

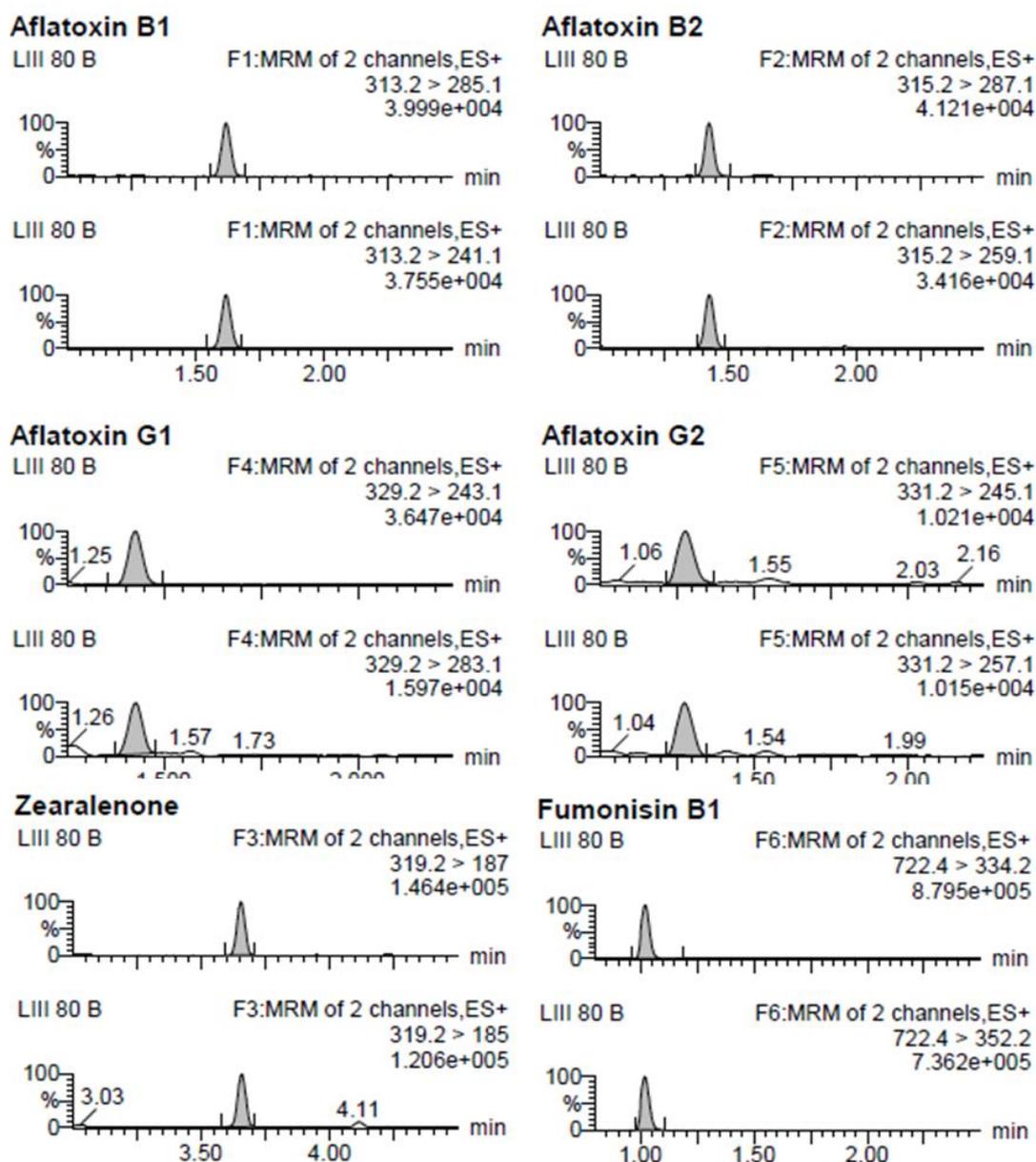
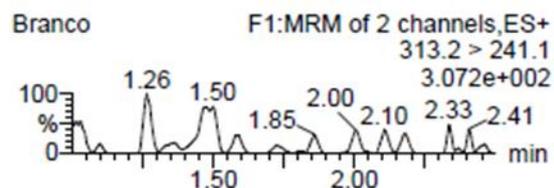
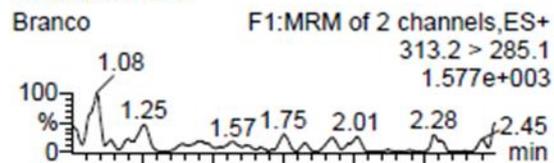


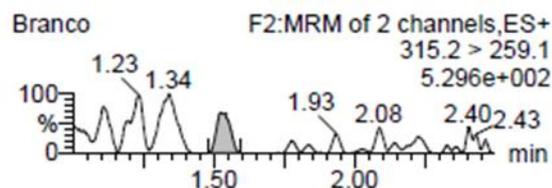
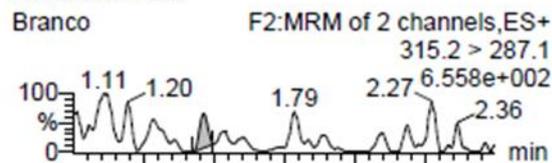
Figura 15. Cromatogramas típicos obtidos para amostras adicionadas de 80 μ L da solução estoque *pool* de micotoxinas, utilizando metanol:acetonitrila:água (60:20:20) como solução extratora.

Tempos de retenção de 1,62 min para AFB1; 1,43 min para AFB2; 1,43 min para AFG1; 1,28 min para AFG2; 1,02 min para FB1 e 3,65 min para ZEA.

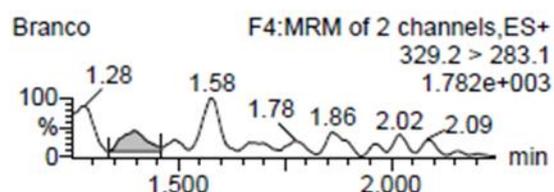
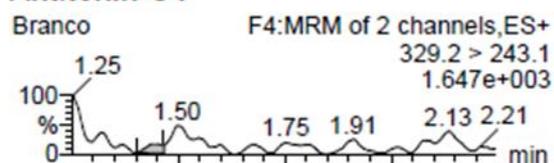
Aflatoxin B1



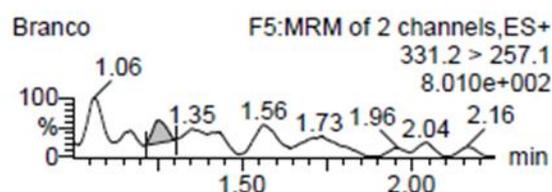
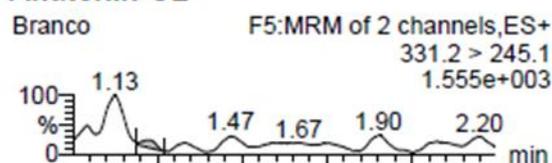
Aflatoxin B2



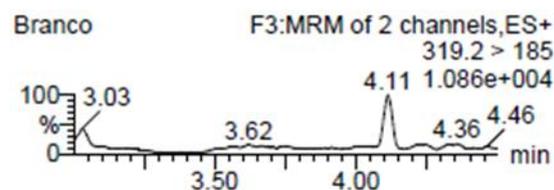
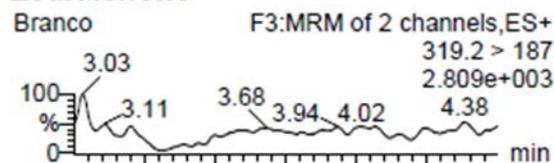
Aflatoxin G1



Aflatoxin G2



Zearalenone



Fumonisin B1

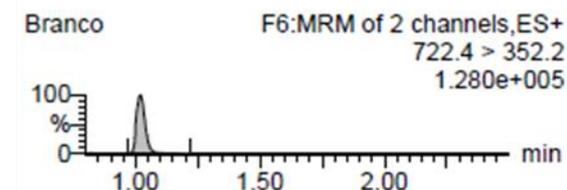
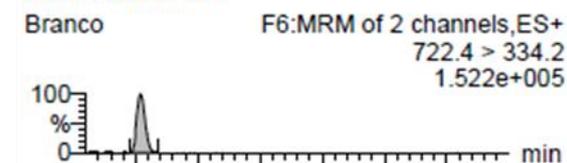


Figura 16. Cromatogramas típicos obtidos para o *pool* de amostras brancas, utilizando metanol:acetonitrila:água (60:20:20) como solução extratora.

Tempos de retenção de 1,62 min para AFB1; 1,43 min para AFB2; 1,43 min para AFG1; 1,28 min para AFG2; 1,02 min para FB1 e 3,65 min para ZEA.

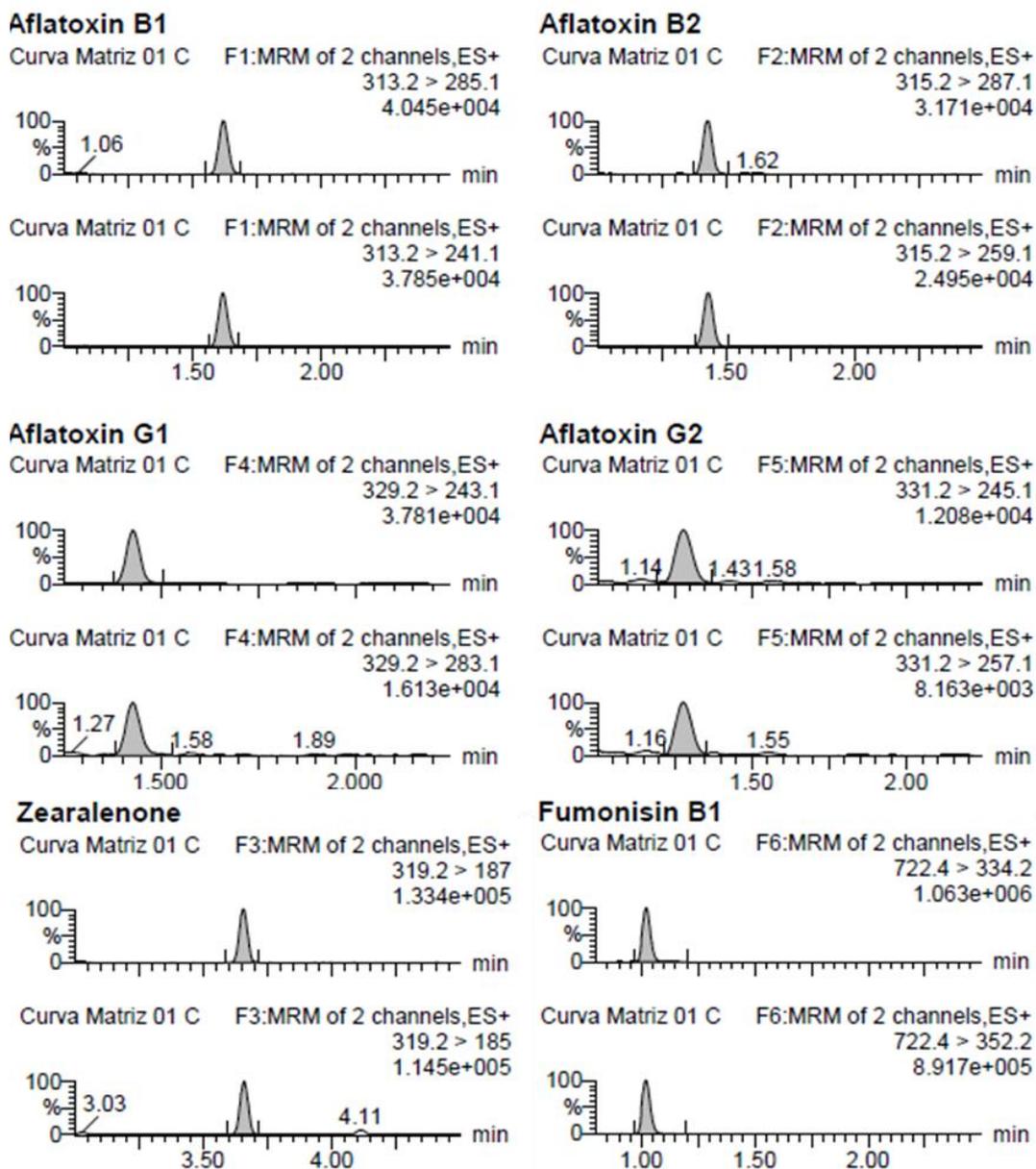
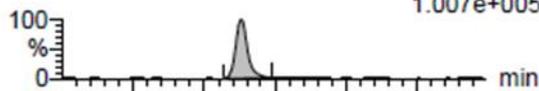


Figura 17. Cromatogramas típicos obtidos para as soluções padrão da curva matrizada, utilizando metanol:acetonitrila:água (60:20:20) como solução extratora.

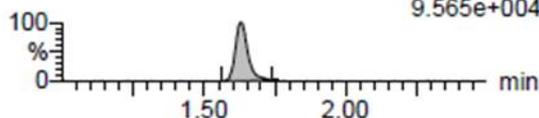
Tempos de retenção de 1,62 min para AFB1; 1,43 min para AFB2; 1,43 min para AFG1; 1,28 min para AFG2; 1,02 min para FB1 e 3,65 min para ZEA.

Aflatoxin B1

Curva Usual 06 C F1:MRM of 2 channels,ES+
313.2 > 285.1
1.007e+005



Curva Usual 06 C F1:MRM of 2 channels,ES+
313.2 > 241.1
9.565e+004

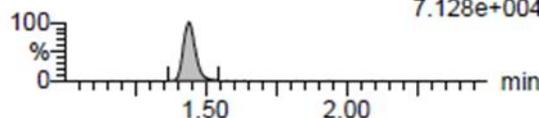


Aflatoxin B2

Curva Usual 06 C F2:MRM of 2 channels,ES+
315.2 > 287.1
8.762e+004

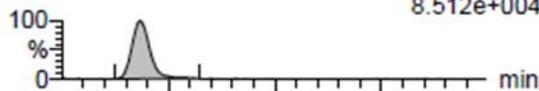


Curva Usual 06 C F2:MRM of 2 channels,ES+
315.2 > 259.1
7.128e+004

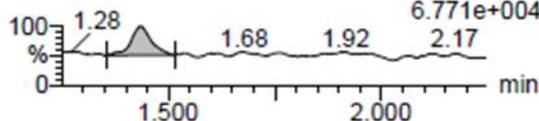


Aflatoxin G1

Curva Usual 06 C F4:MRM of 2 channels,ES+
329.2 > 243.1
8.512e+004



Curva Usual 06 C F4:MRM of 2 channels,ES+
329.2 > 283.1
6.771e+004

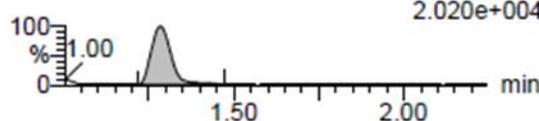


Aflatoxin G2

Curva Usual 06 C F5:MRM of 2 channels,ES+
331.2 > 245.1
2.696e+004

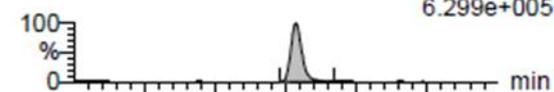


Curva Usual 06 C F5:MRM of 2 channels,ES+
331.2 > 257.1
2.020e+004

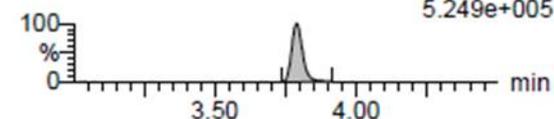


Zearalenone

Curva Usual 06 C F3:MRM of 2 channels,ES+
319.2 > 187
6.299e+005

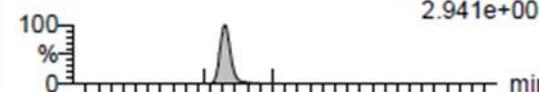


Curva Usual 06 C F3:MRM of 2 channels,ES+
319.2 > 185
5.249e+005



Fumonisin B1

Curva Usual 06 C F6:MRM of 2 channels,ES+
722.4 > 334.2
2.941e+006



Curva Usual 06 C F6:MRM of 2 channels,ES+
722.4 > 352.2
2.497e+006

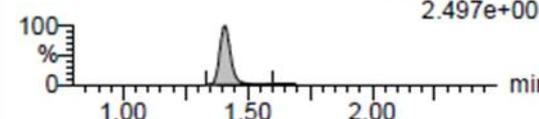


Figura 18. Cromatogramas típicos obtidos para as soluções padrão da curva usual

Tempos de retenção de 1,63 min para AFB1; 1,44 min para AFB2; 1,43 min para AFG1; 1,28 min para AFG2; 1,41 min para FB1 e 3,79 para ZEA.

Linearidade foi demonstrada para todos os mensurandos, nas faixas de concentração estudadas, tanto para curvas usuais quanto para aquelas matrizadas, com confirmação de todas as premissas da regressão linear simples (**Tabela 19**).

No teste de *outliers*, em nenhum caso houve indicação de quantidade de valores dispersos superior ao limite máximo recomendado, ou seja, 22 % do montante de dados originais. A análise de resíduos mostrou que, para todos os mensurandos, os resíduos seguiram a distribuição normal ($p > 0,10$, com exceção de zearalenona na curva usual para a qual $p > 0,01$). Tais resultados indicaram que os dados poderiam ser submetidos aos testes de hipóteses de t e F.

A variabilidade dos resíduos foi homogênea ($p > 0,05$), para todos os mensurandos, ao longo das faixas de concentração selecionadas no presente estudo. Independência dos resíduos foi evidenciada em todos os casos, exceto para AFB2 e AFG2 na curva usual e ZEA na curva matrizada obtida com solução extratora acetonitrila:metanol:água (60:20:20), visto que nestes casos foram obtidos resultados inconclusivos pelo teste de Durbin-Watson. Desta forma, com a confirmação das premissas de homoscedasticidade e independência, foi possível empregar a regressão linear simples para estimativa dos parâmetros da regressão, sem necessidade de ponderações.

Nas curvas matrizadas em que foi utilizado metanol na solução extratora, os valores das inclinações foram significativamente superiores àqueles encontrados nas demais condições ($p < 0,05$), considerando os seis mensurandos do escopo. Tais resultados indicaram que a adição de metanol proporcionou um aumento na sensibilidade quando comparado com a curva usual e com a curva matrizada obtida com solução aquosa de acetonitrila como solução de extração. Quando comparadas as inclinações estimadas para curvas matrizadas utilizando diferentes proporções de metanol, diferenças significativas na sensibilidade também foram evidenciadas ($p < 0,05$), exceto para ZEA ($p > 0,05$).

Tabela 19. Avaliação dos parâmetros de regressão para as curvas de calibração das seis micotoxinas do escopo, preparadas em solvente e matriz, nas três condições de extração estudadas

Micotoxina	Equação	R^{2a}	n^b	Normalidade		Independência		Homoscedasticidade		Regressão		Falta de Ajuste	
				R^c	p^d	d^e	p^d	t_L^f	p^d	F^g	p^d	F^g	p^d
<i>Curva Usual</i>													
Aflatoxina B1	$y = (3213,55 \pm 61,37)x + (38,73 \pm 56,91)$	0,9946	17	0,9626	$p > 0,10$	1,85	$p > 0,05$	0,30	0,77	2741,53	$2,12 \times 10^{-18}$	0,66	0,63
Aflatoxina B2	$y = (2498,23 \pm 35,00)x + (44,54 \pm 33,62)$	0,9971	17	0,9895	$p > 0,10$	0,96	Não conclusivo	0,54	0,60	5093,60	$2,07 \times 10^{-20}$	3,08	0,06
Aflatoxina G1	$y = (2676,29 \pm 34,75)x - (55,79 \pm 31,72)$	0,9980	14	0,9837	$p > 0,10$	2,16	$p > 0,05$	1,11	0,29	5931,95	$1,53 \times 10^{-17}$	0,49	0,75
Aflatoxina G2	$y = (971,58 \pm 36,67)x + (42,70 \pm 35,16)$	0,9805	16	0,9814	$p > 0,10$	2,90	Não conclusivo	1,32	0,21	702,08	$2,31 \times 10^{-13}$	0,65	0,64
Fumonisinina B1	$y = (1137,47 \pm 15,38)x - (4645,84 \pm 1197,90)$	0,9971	18	0,9642	$p > 0,10$	3,03	$p > 0,02$	0,18	0,86	5470,01	$1,03 \times 10^{-21}$	2,77	0,08
Zearalenona	$y = (685,10 \pm 3,83)x - (931,50 \pm 104,94)$	0,9996	14	0,9292	$p > 0,01$	2,49	$p > 0,05$	0,37	0,72	32055,24	$6,20 \times 10^{-22}$	1,209	0,38
<i>Curva Matrizada (acetoneitrila:água 80:20)</i>													
Aflatoxina B1	$y = (3234,67 \pm 28,35)x + (135,01 \pm 29,03)$	0,9991	14	0,9630	$p > 0,10$	2,26	$p > 0,05$	0,76	0,46	13016,68	$1,38 \times 10^{-19}$	0,29	0,88
Aflatoxina B2	$y = (2663,51 \pm 26,58)x - (43,72 \pm 26,11)$	0,9987	15	0,9857	$p > 0,10$	1,67	$p > 0,05$	0,01	0,99	10043,24	$3,64 \times 10^{-20}$	2,03	0,17
Aflatoxina G1	$y = (2649,61 \pm 53,49)x + (33,03 \pm 53,24)$	0,9939	17	0,9773	$p > 0,10$	2,44	$p > 0,05$	0,67	0,51	2453,88	$4,84 \times 10^{-18}$	0,29	0,88
Aflatoxina G2	$y = (990,96 \pm 23,05)x + (71,24 \pm 20,67)$	0,9930	15	0,9887	$p > 0,10$	1,69	$p > 0,05$	0,43	0,67	1848,85	$2,11 \times 10^{-15}$	2,12	0,16
Fumonisinina B1	$y = (1277,92 \pm 6,42)x - (514,99 \pm 454,74)$	0,9997	16	0,9800	$p > 0,10$	2,10	$p > 0,05$	0,96	0,35	39684,97	$1,42 \times 10^{-25}$	0,57	0,69
Zearalenona	$y = (513,10 \pm 3,82)x + (241,59 \pm 99,73)$	0,9992	17	0,9804	$p > 0,10$	2,50	$p > 0,05$	0,42	0,68	18072,27	$1,57 \times 10^{-24}$	0,63	0,65

<i>Curva Matrizada (acetonitrila:metanol:água 60:20:20)</i>													
Aflatoxina B1	$y = (8160,60 \pm 52,45)x + (148,46 \pm 49,60)$	0,9994	16	0,9921	$p > 0,10$	1,80	$p > 0,05$	0,13	0,89	24206,93	$4,52 \times 10^{-24}$	2,80	0,09
Aflatoxina B2	$y = (7127,54 \pm 16,55)x + (58,06 \pm 16,61)$	0,9999	14	0,9826	$p > 0,10$	2,61	$p > 0,05$	0,55	0,59	184696,34	$1,70 \times 10^{-26}$	0,50	0,74
Aflatoxina G1	$y = (7324,52 \pm 87,53)x + (210,81 \pm 86,60)$	0,9980	16	0,9773	$p > 0,10$	2,90	$p > 0,02$	0,69	0,50	7002,88	$2,64 \times 10^{-20}$	0,34	0,84
Aflatoxina G2	$y = (3240,80 \pm 46,55)x + (48,45 \pm 45,16)$	0,9969	17	0,9605	$p > 0,10$	2,46	$p > 0,05$	0,25	0,81	4847,26	$3,00 \times 10^{-20}$	2,01	0,16
Fumonisina B1	$y = (2036,16 \pm 7,17)x - (302,41 \pm 558,64)$	0,9998	18	0,9833	$p > 0,10$	2,85	$p > 0,02$	1,51	0,15	80595,98	$4,73 \times 10^{-31}$	1,63	0,23
Zearalenona	$y = (709,87 \pm 4,38)x + (17,35 \pm 116,86)$	0,9995	16	0,9866	$p > 0,10$	2,97	Não conclusivo	0,55	0,59	26202,15	$2,60 \times 10^{-24}$	0,18	0,95

<i>Curva Matrizada (metanol:acetonitrila:água 60:20:20)</i>													
Aflatoxina B1	$y = (7003,04 \pm 79,09)x - (54,59 \pm 73,84)$	0,9983	15	0,9793	$p > 0,10$	2,16	$p > 0,05$	0,21	0,83	7840,01	$1,82 \times 10^{-19}$	0,89	0,51
Aflatoxina B2	$y = (5894,06 \pm 79,19)x + (19,74 \pm 77,56)$	0,9971	18	0,9852	$p > 0,10$	1,99	$p > 0,05$	0,51	0,62	5539,88	$9,30 \times 10^{-22}$	2,09	0,15
Aflatoxina G1	$y = (6022,19 \pm 79,58)x - (46,27 \pm 77,74)$	0,9976	16	0,9614	$p > 0,10$	2,32	$p > 0,05$	0,41	0,69	5726,65	$1,08 \times 10^{-19}$	0,66	0,64
Aflatoxina G2	$y = (2361,66 \pm 26,51)x + (45,31 \pm 23,65)$	0,9984	15	0,9881	$p > 0,10$	2,48	$p > 0,05$	0,94	0,93	7935,35	$1,68 \times 10^{-19}$	1,62	0,25
Fumonisina B1	$y = (1930,45 \pm 10,39)x + (1643,89 \pm 776,14)$	0,9996	16	0,9725	$p > 0,10$	1,98	$p > 0,05$	0,86	0,40	34488,86	$3,79 \times 10^{-25}$	1,65	0,24
Zearalenona	$y = (698,47 \pm 5,86)x - (163,43 \pm 152,33)$	0,9990	16	0,9807	$p > 0,10$	2,20	$p > 0,05$	0,44	0,67	14222,24	$1,86 \times 10^{-22}$	1,14	0,39

R^2 = coeficiente de determinação, n = número de observações, R = coeficiente de correlação de Ryan-Joiner, p = significância, d = estatística de Durbin-Watson, t_L = estatística t de Levene, F = razão entre variâncias.

Avaliando os trabalhos sobre métodos de análise de micotoxinas de escopo similar ao do presente estudo (**Tabela 10**), foi possível verificar que o estudo do parâmetro linearidade não tem sido conduzido de forma adequada, pela maioria dos autores. Na maioria dos casos, é utilizado somente o coeficiente de correlação R^2 como evidência de linearidade do método (Faberi, et al., 2005; Berthiller, et al., 2005; Spanjer, et al., 2007; Frenich, et al., 2009; Tanaka, et al., 2010; Li, et al., 2010; Lattanzio, et al., 2011; Soleimany, et al., 2012). Em alguns trabalhos, os autores não apresentam as curvas utilizadas e não comentam sobre a avaliação da linearidade (Lattanzio, et al., 2007; Sulyok, et al., 2006; Zachariasova, et al., 2010; Varga, et al., 2012). Embora o coeficiente de correlação seja muito utilizado como indicador de ajuste ao modelo linear, esta abordagem é inapropriada para teste de linearidade e não deve ser utilizada (Thompson, et al., 2002). O valor de R^2 assumirá valores próximos de um no caso de uma relação entre variáveis seguir o modelo linear, mas, se esta relação não tiver sido predita, o valor próximo de um deste coeficiente não é necessariamente evidência de linearidade (Souza & Junqueira, 2005).

Alguns autores apresentaram faixas lineares muito amplas para a execução dos ensaios como 0,4 a 2000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ para FB1; 0,2 a 2000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ para ZEA e 0,01 a 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ para aflatoxinas (Soleimany, et al., 2012), o que potencializa erros nas determinações. É recomendado na literatura que os níveis de concentração estejam igualmente espaçados ao longo da faixa de interesse, no estudo de linearidade, evitando que ocorra o efeito de alavanca na estimativa dos parâmetros da regressão (Thompson, et al., 2002; Burke, 2011).

Os resultados agrupados na **Tabela 20** resumem o estudo dos efeitos da matriz nas análises de multigrupos de micotoxinas em fubá. Para a solução extratora acetonitrila:água (80:20), observou-se efeitos de matriz para AFB2 somente na inclinação ($p < 0,05$), enquanto que, para FB1 e ZEA, a ocorrência de efeitos matriz foi observada tanto na comparação da inclinação quanto do intercepto ($p < 0,05$). Considerando as AFB1, AFG1 e AFG2, não foram evidenciados efeitos de matriz em relação a nenhum dos parâmetros da curva ($p > 0,05$).

No procedimento utilizando a solução extratora acetonitrila:metanol:água (60:20:20), foram detectados efeitos de matriz devidos às diferenças significativas nas

inclinações das curvas de todas as micotoxinas ($p < 0,05$). Considerando os interceptos das curvas, efeitos de matriz foram observados para AFG2, FB1 e ZEA ($p < 0,05$).

Quando a solução extratora metanol:acetonitrila:água (60:20:20) foi empregada, observou-se que, com exceção da ZEA ($p > 0,05$), todos os mensurandos apresentaram efeitos de matriz devidos às diferenças significativas nas inclinações das curvas ($p < 0,05$). Efeitos de matriz devidos às comparações dos interceptos das curvas foram evidenciados para os mensurandos ZEA e FB1.

Tabela 20. Comparações das inclinações e interceptos das curvas usuais e matrizadas, para as seis micotoxinas do escopo, nas três condições de extração estudadas

Micotoxina	Comparações das inclinações		$t_{\text{crítico}}^b$	Comparações dos interceptos	
	t^c	p^d		t^c	p^d
<i>Solução extratora (acetonitrila:água 80:20)</i>					
Aflatoxina B ₁	0,312	0,758	2,080	1,507	0,147
Aflatoxina B ₂	3,654	0,001	2,048	2,006	0,055
Aflatoxina G ₁	0,418	0,679	2,064	1,433	0,165
Aflatoxina G ₂	0,448	0,659	2,074	0,700	0,491
Fumonisina B ₁	8,428	0,000	2,086	3,224	0,004
Zearalenona	31,772	0,000	2,052	8,085	0,000
<i>Solução extratora (acetonitrila:metanol:água 60:20:20)</i>					
Aflatoxina B ₁	61,298	0,000	2,045	1,452	0,157
Aflatoxina B ₂	119,514	0,000	2,080	0,360	0,722
Aflatoxina G ₁	49,359	0,000	2,110	2,891	0,010
Aflatoxina G ₂	37,873	0,000	2,045	1,578	0,125
Fumonisina B ₁	52,958	0,000	2,074	3,286	0,003
Zearalenona	4,195	0,000	2,056	5,937	0,000

Solução extratora (metanol:acetonitrila:água 60:20:20)

Aflatoxina B ₁	38,213	0,000	2,048	1,011	0,320
Aflatoxina B ₂	39,222	0,000	2,074	0,293	0,772
Aflatoxina G ₁	39,769	0,000	2,093	0,117	0,908
Aflatoxina G ₂	29,910	0,000	2,052	0,061	0,952
Fumonisina B ₁	41,692	0,000	2,042	4,339	0,000
Zearalenona	1,872	0,072	2,056	4,022	0,000

Os dados em destaque evidenciam os parâmetros em que foram observados efeitos de matriz.

Com base nestes resultados, as determinações quantitativas destes grupos de micotoxinas em fubá foram conduzidas empregando curvas matrizadas nas etapas subsequentes da validação. Isto porque as curvas usuais forneceram respostas que diferiram significativamente daquelas obtidas para curvas matrizadas obtidas pelos três procedimentos (soluções extratoras) descritos neste trabalho.

Alguns autores que publicaram métodos de análise de escopos semelhantes ao da presente estudo optaram pela utilização de curvas matrizadas, embora não tenham relatado que conduziram uma verificação prévia da ocorrência de efeitos de matriz (Ren, et al., 2011; Hartl, et al., 1999; Tanaka, et al., 2010; Soleimany, et al., 2012).

A comparação dos parâmetros de curvas de calibração construídas em solvente e matriz, como recomendado nos protocolos internacionais de validação, foi executada em alguns trabalhos reportados na literatura (Lattanzio, et al., 2007; Faberi, et al., 2005), sendo detectados os efeitos de matriz e utilizadas curvas matrizadas para quantificação dos mensurandos, corroborando com os resultados desta pesquisa.

Em outros trabalhos, o efeito matriz foi avaliado por meio da relação entre as inclinações das curvas matrizadas e usuais, *signal suppression/enhancement* (SSE) (Lattanzio, et al., 2011; Sulyok, et al., 2006; Spanjer, et al., 2007; Zachariasova, et al., 2010), embora tal procedimento não seja citado em nenhum documento orientativo de validação. Nestes casos, os autores optaram pela utilização da curva matrizada,

embora não tenham apresentado nenhum critério para avaliação dos resultados obtidos.

Nas **Tabelas 21, 22 e 23** são apresentados os resultados dos ensaios de recuperação e precisão, considerando as diferentes condições de extração testadas.

No procedimento utilizando acetonitrila:água (80:20), as porcentagens de recuperação variaram de 81,11 a 90,69 % para AFB1, de 86,15 a 93,07 % para AFB2, de 81,83 a 87,56 % para AFG1, de 74,97 a 85,42 % para AFG2, de 39,73 a 46,35 % para FB1 e de 89,48 a 94,46 % para ZEA. Então, para FB1 os valores de porcentagem de recuperação não atenderam aos critérios preconizados pela União Europeia de 60 a 120 % e de 70 a 110 % para níveis menores e maiores que 500 µg/kg, respectivamente. DPR_r foram estimados entre 5,15 e 11,25 % para AFB1, 4,31 e 8,17 % para AFB2, 5,31 e 12,50 % para AFG1, 5,44 e 17,12 % para AFG2, 3,00 e 5,99 % para FB1 e 2,40 e 3,43 % para ZEA. Tais desvios foram inferiores aos valores máximos permitidos para todas as micotoxinas e níveis de contaminação estudados, com exceção do nível 2,03 µg/kg de AFG2, no qual foi calculado um valor de 17,12 %, superior ao valor máximo de 14,7 %. Para os DPR_R, os valores encontraram-se entre 18,17 % e 26,37 % para AFB1, 14,91 e 22,95 % para AFB2, 13,83 e 21,51 % para AFG1, 10,04 e 23,31 % para AFG2, 5,24 e 6,63 % para FB1 e 2,40 e 13,53 % para ZEA. Nos níveis de contaminação de 1,99 µg/kg de AFB1, 12,08 µg/kg de AFB2 e 12,19 µg/kg de AFG2 também foram obtidos valores de DPR_R acima do valor máximo estipulado de 22 % (**Tabela 21**).

Quando acetonitrila:metanol:água (60:20:20) foi empregada como solução extratora, a recuperação variou de 91,52 a 96,99 % para AFB1, de 92,58 a 102,64 % para AFB2, de 93,03 a 95,31 % para AFG1, de 90,08 a 104,25 % para AFG2, de 41,49 a 61,85 % para FB1 e de 88,36 a 99,76 % para ZEA. Embora os valores estimados para DPR_r e DPR_R tenham ficado abaixo dos valores máximos permitidos para todas as micotoxinas em todos os níveis de contaminação estudados, os valores de recuperação para FB1 não atenderam aos critérios preconizados pela União Europeia supramencionados (**Tabela 22**).

Para a solução de extração metanol:acetonitrila:água (60:20:20), as porcentagens de recuperação variaram de 85,85 a 88,99 % para AFB1, de 91,36 a

94,68 % para AFB2, de 92,54 a 94,33 % para AFG1, de 91,12 a 97,66 % para AFG2, de 75,68 a 85,44 % para FB1 e de 94,12 a 98,43 % para ZEA. Os valores máximos estimados para DPR_r e DPR_R foram 7,59 e 8,10 % para AFB1, 10,83 e 11,46 % para AFB2, 8,03 e 9,08 % para AFG1, 13,55 e 13,55 % para AFG2, 6,26 e 0,26 % para FB1 e 3,98 e 0,24 % para ZEA, respectivamente. Tanto as porcentagens de recuperação quando os DPR estimados cumpriram com os critérios definidos pela União Europeia, para todas as micotoxinas, em todos os níveis de contaminação estudados (**Tabela 23**).

Desta forma, utilizando a solução de extração acetonitrila:água (80:20), além das recuperações médias para FB1 terem sido insatisfatórias, algumas toxinas apresentaram DPR acima dos valores máximos permitidos. Para a condição de extração utilizando acetonitrila:metanol:água (60:20:20) foram obtidos valores satisfatórios de precisão, sob condições de repetibilidade e precisão intermediária, porém as recuperações médias, para FB1, ficaram abaixo do determinado para este mensurando nesta faixa de concentração. Então, concluiu-se que o procedimento empregando metanol:acetonitrila:água (60:20:20) como solução extratora assegurou melhor adequação ao objetivo proposto, com evidências de precisão e valores de recuperação satisfatórios, para todos os níveis de contaminação propostos, frente aos critérios considerados da UE (2006).

O MRC analisado tinha o valor de propriedade certificado para FB1 de 800 $\mu\text{g}/\text{kg} \pm 23,4$ %. Na análise do referido material, em triplicata, empregando a condição de extração considerada satisfatória nos estudos de recuperação e precisão, um valor de escore-z de 0,19 foi alcançado, assumindo como desvio padrão alvo o desvio máximo de 30 % regulamentado pela UE (2006). O resultado obtido indicou veracidade do método.

A adição de metanol na solução extratora teve como consequência a melhora na eficiência de extração da FB1. Esta toxina possui maior massa molecular do que os outros grupos de micotoxinas estudados, além de apresentar vários sítios de interação ao longo de sua cadeia molecular, o que permite maior interação com as matrizes, resultando em maior dificuldade de extração. A maior polaridade e acidez do metanol

em relação à acetonitrila resultou em melhores recuperações quando se utilizou uma proporção maior deste solvente nos procedimentos de extração.

Pela análise do MRC pôde-se verificar que os dados de recuperação de FB1 em milho foram melhores do que aqueles obtidos para o fubá. Isso ocorreu, provavelmente, devido a uma diferença estrutural existente entre estes dois produtos. O grão de milho, no processamento por moagem a seco, passa por degerminação e a fração amilácea do grão, ao ser submetida a processos de moagem e classificação, sofre grandes alterações na estrutura do endosperma (Paes, 2006), o que resultaria em diferenças na intensidade de interação da toxina com a matriz alimentícia. O arranjo proteico que envolve os grânulos de amido dentro das células do endosperma é desestruturado resultando em maior quantidade de sítios de interação o que dificultaria a extração das toxinas da matriz fubá neste novo arranjo.

Outro fenômeno a ser considerado é a associação da fumonisinas com macronutrientes da matriz, como o amido e a proteína, por meio de interações não covalentes. Esta interação resulta na ocorrência de fumonisinas ocultas, as quais não são detectadas pelos métodos utilizados para análise da micotoxinas em sua forma nativa, resultando em uma subestimação do teor total deste contaminante no alimento. A ocorrência de fumonisinas ocultas em derivados de milho, como consequência de etapas de processamento térmico e moagem do grão, foi verificada (Dall'Asta, et al., 2009 a), podendo levar a erros na determinação do teor de contaminação por fumonisina em amostras de fubá. Estas interações podem ser quebradas, durante os procedimentos de extração, devido às diferenças nos parâmetros experimentais como, polaridade do solvente, pH, força iônica, tempo e temperatura, devolvendo a micotoxina a sua forma nativa, o que explica as diferenças nas recuperações devido a diferentes procedimentos analíticos utilizados (Dall'Asta, et al., 2009 b; Rychlik, et al., 2014).

Tabela 21. Médias de recuperação e desvios padrão relativos, sob condições de repetibilidade e precisão intermediária, para as seis micotoxinas do escopo, empregando extração com acetonitrila:água (80:20)

Micotoxina	Concentração (µg/kg)	n	Recuperação		
			Média (%)	DPR _r (%)	DPR _R (%)
Aflatoxina B1	1,99	21	81,11	11,25	26,37
	5,96	21	90,69	6,61	18,17
	11,92	21	86,79	5,15	21,23
Aflatoxina B2	2,01	21	87,27	8,17	20,37
	6,04	21	93,07	6,46	14,91
	12,08	21	86,15	4,31	22,95
Aflatoxina G1	2,05	21	86,89	12,50	20,05
	6,15	21	87,56	7,23	13,83
	12,29	21	81,83	5,31	21,51
Aflatoxina G2	2,03	19	74,97	17,12	19,27
	6,09	21	85,42	7,67	10,04
	12,19	21	84,05	5,44	23,31
Fumonisina B1	160,00	21	46,35	3,55	6,35
	480,00	21	39,73	5,99	6,63
	960,00	21	38,73	3,00	5,24
Zearalenona	55,99	21	89,64	3,43	5,51
	167,96	21	94,46	2,40	2,40
	335,91	21	89,48	4,04	13,53

n: número de observações após tratamento de outliers pelo teste de Grubbs.

DPR_r: desvio padrão relativo de repetibilidade.

DPR_R: desvio padrão relativo de reprodutibilidade (precisão intermediária no caso deste estudo intralaboratorial).

Os dados em destaque indicam os parâmetros não conformes, segundo os critérios de aceitação considerados.

Tabela 22. Médias de recuperação e desvios padrão relativos, sob condições de repetibilidade e precisão intermediária, para as seis micotoxinas do escopo, empregando extração com acetonitrila:metanol:água (60:20:20)

Micotoxina	Concentração (µg/kg)	n	Recuperação Média (%)	DPR _r (%)	DPR _R (%)
Aflatoxina B1	1,99	21	96,99	9,37	11,77
	5,96	21	91,52	4,91	7,58
	11,92	21	92,70	4,73	7,25
Aflatoxina B2	2,01	21	102,64	8,44	8,44
	6,04	21	92,58	5,13	6,60
	12,08	21	94,73	4,40	5,03
Aflatoxina G1	2,05	21	95,31	7,17	8,26
	6,15	20	93,03	4,02	5,28
	12,29	21	94,75	5,39	5,73
Aflatoxina G2	2,03	20	104,25	6,43	12,81
	6,09	21	90,08	6,39	9,92
	12,19	21	91,25	6,63	8,61
Fumonisina B1	160,00	21	61,85	7,27	7,29
	480,00	21	44,81	6,02	6,21
	960,00	21	41,49	4,36	4,36
Zearalenona	55,99	21	99,76	5,74	6,43
	167,96	21	89,33	3,22	4,30
	335,91	21	88,36	3,40	3,40

n: número de observações após tratamento de outliers pelo teste de Grubbs.

DPR_r: desvio padrão relativo de repetibilidade.

DPR_R: desvio padrão relativo de reprodutibilidade (precisão intermediária no caso deste estudo intralaboratorial)

Os dados em destaque indicam os parâmetros não conformes, segundo os critérios de aceitação considerados.

Tabela 23. Médias de recuperação e desvios padrão relativos, sob condições de repetibilidade e precisão intermediária, para as seis micotoxinas do escopo, empregando extração com metanol:acetonitrila:água (60:20:20)

Mensurando	Concentração ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	n	Recuperação	DPR _r	DPR _R
			Média (%)	(%)	(%)
Aflatoxina B1	1,99	21	88,99	7,59	8,10
	5,96	21	85,85	4,90	5,40
	11,92	21	87,87	3,14	4,70
Aflatoxina B2	2,01	21	94,68	10,83	11,46
	6,04	21	91,36	4,20	5,70
	12,08	21	93,49	3,73	5,63
Aflatoxina G1	2,05	21	93,17	8,03	9,08
	6,15	21	92,54	5,23	5,23
	12,29	21	94,33	5,59	5,85
Aflatoxina G2	2,03	19	91,12	13,55	13,55
	6,09	21	93,83	5,68	7,16
	12,19	21	97,66	4,44	6,32
Fumonisina B1	160,00	21	85,44	3,70	6,26
	480,00	21	75,68	2,69	2,69
	960,00	21	75,16	2,12	2,60
Zearalenona	55,99	21	98,43	3,54	3,54
	167,96	21	95,39	3,20	3,98
	335,91	21	94,12	2,47	3,85

n: número de observações após tratamento de outliers pelo teste de Grubbs.

DPR_r: desvio padrão relativo de repetibilidade.

DPR_R: desvio padrão relativo de reprodutibilidade (precisão intermediária no caso deste estudo intralaboratorial).

Verificou-se pelos trabalhos publicados na literatura, de escopo similar, que poucos autores avaliaram a precisão sob condições de precisão intermediária (Faberi, et al., 2005; Li, et al., 2010; Frenich, et al., 2009). Faberi et al. (2005) desenvolveram um método para análise de FB1 em milho e derivados, com resultados de recuperação média de 98 % e DPR_R de 4 %, considerando dois níveis de concentração, 1000 e 5000 $\mu\text{g}/\text{kg}$, superiores aqueles investigados neste estudo. Li, et al. (2010) trabalharam com as fumonisinas B₁, B₂ e B₃ em milho em três níveis de concentração, entre 200 e 1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$, em 5 replicatas. As recuperações médias e DPR sob condições de precisão intermediária reportados por tais autores variaram entre 93 e 95 % e entre 3 e 6 %, respectivamente. Ressalta-se que os resultados satisfatórios obtidos e níveis de concentração estudados foram similares aos do presente estudo. Frenish, et al. (2009) obtiveram, com a matriz trigo, recuperações médias de FB1 de 74 e 84 % e DPR_R de 9 e 12 % para os níveis de 50 e 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$, respectivamente, cumpre destacar a diferença em relação a matriz e níveis de concentração investigados na presente validação.

Alguns autores apresentaram propostas de análises multigrupos cobrindo um número significativo de micotoxinas (Spanjer, et al., 2007; Sulyok, et al., 2006). Spanjer, et al. (2007) desenvolveram um método para a análise simultânea de 33 micotoxinas em diversas matrizes alimentícias, obtendo recuperação média de 20 % e DPR_r de 72 % para FB1, em faixa de concentração compreendida entre 20 e 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Ressalta-se que os valores reportados para recuperação e DPR_r não cumprem com os limites máximos preconizados pela União Europeia. Sulyok et al. (2006) trabalharam com 39 micotoxinas em milho e trigo, obtendo recuperações médias em torno de 80 % para AFB1, AFB2, AFG1 e AFG2 com DPR_r variando entre 3 e 5 % para estas micotoxinas em uma faixa compreendida entre 2 e 160 $\mu\text{g}/\text{kg}$. A recuperação média estimada para FB1 neste trabalho foi insatisfatória, 41 %, com DPR_r de 2,6 % ,cobrindo uma faixa de 10 a 816 $\mu\text{g}/\text{kg}$ para esta toxina.

Hartl, et al. (1999) trabalharam com FB1 em milho e obtiveram recuperações de 80 a 87 % na faixa de 30 a 3000 $\mu\text{g}/\text{kg}$, porém não apresentaram dados de estudos do parâmetro precisão. No estudo realizado por Tanaka, et al. (2010), as recuperações de ZEA para a matriz trigo variaram de 102 a 109 % com DPR_r variando entre 3 e 6 %, em faixa compreendida entre 10 e 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Soleimany, et al. (2012) apresentaram faixas lineares muito amplas para as micotoxinas estudadas como, 0,01 a 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ para

AFB1, AFB2, AFG1 e AFG2, 0,4 a 4000 µg/kg para FB1 e 0,2 a 2000 µg/kg para ZEA. A recuperação reportada pelos referidos autores para FB1 foi de 87,5 % no nível de concentração de 62,5 µg/kg com desvio padrão de repetibilidade de 14,4 %. Para as aflatoxinas as recuperações variaram de 84 a 106 % com desvios padrão de 7 a 9 % em níveis de concentração de 2,5 µg/kg para AFB1 e AFG1, e de 0,75 µg/kg para AFB2 e AFG2. A recuperação no nível de contaminação de 62,5 µg/kg para ZEA foi de 88 % com desvio padrão de 12 %. Sendo assim, foram reportados resultados de apenas um nível de concentração para cada toxina, em diferentes matrizes.

Os limites de detecção e quantificação teóricos estimados para os mensurandos encontram-se detalhados na **Tabela 24**. Os limites foram similares nas três formas de extração estudadas e apropriados em relação aos LMT para as micotoxinas do escopo. Contudo, como os limites estimados encontraram-se abaixo das faixas de concentração validadas, para efeito de quantificação, foram assumidos como limites de quantificação os níveis inferiores das curvas de calibração de cada mensurando, ou seja, 1,99; 2,01; 2,05; 2,03; 160 e 55,99 µg/kg para AFB1, AFB2, AFG1, AFG2, FB1 e ZEA, respectivamente.

Nos trabalhos reportados na literatura, frequentemente, os limites de detecção e quantificação não são mencionados (Lattanzio, et al., 2007; Lattanzio, et al., 2011; Sulyok, et al., 2006; Hartl, et al., 1999). Quando estabelecidos, normalmente foram empregados os critérios das razões entre sinal e ruído, de 3/1 para o limite de detecção e de 10/1 para o limite de quantificação, calculados pelos *softwares* dos equipamentos (Ren, et al., 2011; Faberi, et al., 2005; Berthiller, et al., 2005; Spanjer, et al., 2007; Tanaka, et al., 2010; Zachariasova, et al., 2010; Li, et al., 2010; Frenich, et al., 2009). Para as estimativas das razões entre sinal e ruído, os autores utilizaram amostras contendo os mensurandos em baixas concentrações. Os valores obtidos foram, geralmente, baixos e os critérios para quantificação em amostras reais não foram apresentados, mesmo com os valores estando fora das faixas lineares validadas pelos referidos autores.

Tabela 24. Limites de detecção e de quantificação teóricos estimados para as seis micotoxinas do escopo, nas três condições de extração estudadas

Mensurando	Limites teóricos (µg/kg)	
	Detecção	Quantificação
<i>Solução extratora (acetoneitrila:água 80:20)</i>		
Aflatoxina B ₁	0,22	0,72
Aflatoxina B ₂	0,24	0,78
Aflatoxina G ₁	0,48	1,61
Aflatoxina G ₂	0,50	1,67
Fumonissina B ₁	8,54	28,47
Zearalenona	4,67	15,55
<i>Solução extratora (acetoneitrila:metanol:água 60:20:20)</i>		
Aflatoxina B ₁	0,15	0,49
Aflatoxina B ₂	0,06	0,19
Aflatoxina G ₁	0,28	0,95
Aflatoxina G ₂	0,33	1,12
Fumonissina B ₁	6,59	21,95
Zearalenona	3,95	13,17
<i>Solução extratora (metanol:acetoneitrila:água 60:20:20)</i>		
Aflatoxina B ₁	0,25	0,84
Aflatoxina B ₂	0,32	1,05
Aflatoxina G ₁	0,31	1,03
Aflatoxina G ₂	0,24	0,80
Fumonissina B ₁	9,65	32,16
Zearalenona	5,23	17,45

Na **Tabela 25** são apresentadas as estimativas das incertezas de medição nos três níveis de contaminação estudados, considerando a melhor condição de extração obtida. Para cada toxina escolheu-se o maior valor de incerteza obtida entre os níveis estudados, ficando estes valores abaixo dos limites máximos estipulados pela UE (2006). Cumpre destacar que a contribuição da incerteza-padrão devida à precisão intermediária foi significativamente maior que a da incerteza-padrão devida à curva de calibração na composição da incerteza combinada.

Tabela 25. Estimativas das incertezas de medição por nível estudado e respectivas incertezas máximas aceitáveis, para as seis micotoxinas do escopo, empregando a condição de extração selecionada - metanol:acetona:água (60:20:20)

Mensurando	U, k = 2						U a ser utilizada	U _f , k=2
	N1		N2		N3			
	µg/kg	%	µg/kg	%	µg/kg	%		
Aflatoxina B ₁	0,32	16,26	0,64	10,81	1,12	9,40	16,26	41,98
Aflatoxina B ₂	0,46	23,10	0,69	11,44	1,36	11,27	23,10	42,97
Aflatoxina G ₁	0,37	18,32	0,64	10,49	1,44	11,71	18,32	42,76
Aflatoxina G ₂	0,55	27,12	0,87	14,32	1,54	12,64	27,12	41,71
Fumonisina B ₁	20,05	12,53	25,84	5,38	49,93	5,20	12,53	40,45
Zearalenona	3,96	7,08	13,37	7,96	25,86	7,70	7,96	40,12

Níveis de adição N1: 1,99; 2,01; 2,05 e 2,03 µg/kg para aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂, respectivamente, 160,00 para fumonisina B₁ e 55,99 para zearalenona; N2: 5,96; 6,04; 6,15 e 6,09 µg/kg para aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂, respectivamente, 480,00 para fumonisina B₁ e 167,96 para zearalenona e N3: 11,92; 12,08; 12,29 e 12,19 µg/kg para aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂, respectivamente, 960,00 para fumonisina B₁ e 335,91 para zearalenona.

U: incerteza expandida.

K: fator de abrangência

U_f: incerteza expandida máxima aceitável de acordo com critério UE (2006).

Nos trabalhos de escopo similar publicados na literatura, normalmente, a estimativa de incerteza não é reportada (Ren, et al., 2011; Lattanzio, et al., 2007; Faberi, et al., 2005; Sulyok, et al., 2006; Berthiller, et al., 2005; Soleimany, et al., 2012; Spanjer, et al., 2007; Hartl, et al., 1999; Senyuva, et al., 2010; Tanaka, et al., 2010; Zachariasova, et al., 2010; Li, et al., 2010; Frenich, et al., 2009). Lattanzio, et al. (2011) menciona o cálculo de incerteza, da mesma forma que no presente trabalho, contudo, as incertezas são apresentadas somente quando relatados os resultados da análise de um material de referência certificado. Resultados como $49 \pm 10 \mu\text{g/kg}$ para ZEA, $5,3 \pm$

1,2 µg/kg para AFB1, $1,1 \pm 0,5$ µg/kg para AFB2, $2,8 \pm 0,7$ µg/kg para AFG1 e $1,2 \pm 0,5$ µg/kg para AFG2 foram apresentados, os quais corresponderiam a incertezas percentuais de 20,41 % para ZEA, 22,64 % para AFB1, 45,45 % para AFB2, 25 % para AFG1 e 41,67 % para AFG2, superiores aquelas obtidas no presente estudo.

5.2 ESTUDO DE OCORRÊNCIA

Na análise de incidência em amostras do estado de Minas Gerais, verificou-se que, em 44 % das 50 amostras analisadas, foi detectada a presença de FB1 em níveis quantificáveis. As concentrações variaram de 166,68 a 1460,76 µg/kg, sendo que 13 amostras tiveram níveis entre 160 e 500 µg/kg, sete amostras entre 500 e 1000 µg/kg e duas apresentaram níveis de FB1 acima de 1000 µg/kg. Nenhuma das amostras apresentou níveis superiores aos limites máximos toleráveis previsto na legislação brasileira, de 2500 µg/kg. Considerando o limite previstos pela União Europeia, de 1000 µg/kg, uma amostra que apresentou contaminação correspondente a $1460,76 \pm 183,03$ µg/kg seria considerada não conforme enquanto que outra amostra, contaminada com $1027,22 \pm 128,71$ µg/kg, poderia ser considerada não conforme dependendo do critério de avaliação do órgão fiscalizador. Para ZEA, 18 % das amostras apresentaram níveis detectáveis da micotoxina, porém nenhuma apresentou contaminação superior ao limite de quantificação do método. Não foram detectadas aflatoxinas nas amostras analisadas, sendo 0,25; 0,32; 0,31 e 0,24 µg/kg, os limites de detecção para AFB1, AFB2, AFG1 e AFG2, respectivamente.

Os resultados médios obtidos para as 50 amostras, com as respectivas incertezas, são apresentados na **Tabela 26**.

Tabela 26. Resultados obtidos no estudo de ocorrência para fumonisina B1 e zearalenona, com respectivas estimativas de incerteza

Amostra	Fumonissina B1	Zearalenona
01	<LQ	ND
02	<LQ	ND
03	ND	ND
04	ND	ND
05	ND	ND
06	321,89 ± 40,33	<LQ
07	329,46 ± 41,28	<LQ
08	472,30 ± 59,18	ND
09	208,40 ± 26,11	<LQ
10	ND	ND
11	545,88 ± 68,40	ND
12	<LQ	ND
13	960,55 ± 120,36	ND
14	226,83 ± 28,42	ND
15	<LQ	ND
16	ND	ND
17	166,68 ± 20,88	ND
18	<LQ	ND
19	ND	ND

20	<LQ	ND
21	542,11 ± 67,93	ND
22	575,68 ± 72,13	ND
23	231,19 ± 28,97	ND
24	303,99 ± 38,09	ND
25	<LQ	ND
26	729,10 ± 91,36	<LQ
27	189,30 ± 23,72	<LQ
28	438,81 ± 54,98	ND
29	176,23 ± 22,08	<LQ
30	659,98 ± 82,70	ND
31	<LQ	ND
32	1460,76 ± 183,03	<LQ
33	<LQ	<LQ
34	<LQ	ND
35	<LQ	ND
36	<LQ	ND
37	587,85 ± 73,66	<LQ
38	<LQ	ND
39	ND	ND
40	<LQ	ND
41	292,51 ± 36,65	ND
42	<LQ	ND

43	<LQ	ND
44	<LQ	ND
45	<LQ	ND
46	<LQ	ND
47	309,56 ± 38,79	ND
48	1027,22 ± 128,71	ND
49	<LQ	ND
50	<LQ	ND

ND: não detectado.

<LQ: abaixo do limite de quantificação do método.

Limite de quantificação para fumonisina B1: 160 µg/kg.

Limite de detecção para fumonisina B1: 9,65 µg/kg.

Limite de quantificação para zearalenona: 55,99 µg/kg.

Limite de detecção para zearalenona: 5,23 µg/kg.

6. CONCLUSÕES

Foi desenvolvido um método rápido de extração em única etapa para a análise simultânea das micotoxinas, AFB1, AFB2, AFG1, AFG2, FB1 e ZEA, em fubá, utilizando o acoplamento de cromatógrafo líquido de ultra performance com espectrômetro de massas com analisador tipo triplo quadrupolo e fonte de ionização *electrospray*.

O método foi validado em três condições de extração distintas. Foram utilizadas diferentes composições e proporções de reagentes orgânicos nas soluções extratoras, acetonitrila:água (80:20), acetonitrila:metanol:água (60:20:20) e metanol:acetonitrila:água (60:20:20), sendo que última condição foi a que forneceu melhores resultados, sendo adotada para uso.

A seletividade do método foi confirmada, pela análise de soluções de padrões e amostras brancas, não sendo verificada a presença de interferências de matriz ou espectrais, tais como sinais, picos, vestígios iônicos, na região em que se previa a eluição dos mensurandos pesquisados.

O método apresentou linearidade nas faixas de 0,25 a 1,50 ng/mL para AFB1, AFB2, AFG1 e AFG2, de 20,00 a 120,00 ng/mL para FB1 e de 7,00 a 42,00 para ZEA, com comprovação de todas as premissas da regressão linear simples. Foram evidenciados efeitos de matriz para todos os grupos de micotoxinas estudados.

Recuperações médias de 85,85 a 97,66 %; de 75,16 a 85,44 %; e de 94,12 a 98,43 % foram obtidas para aflatoxinas, FB1 e ZEA, respectivamente, em ensaios com amostras adicionadas, em três níveis de concentração, nas respectivas faixas lineares do método. Foi analisado um MRC de milho contendo FB1, sendo obtido índice z-escore satisfatório, indicando veracidade.

No ensaio de precisão, os desvios padrão relativos obtidos, sob condições de repetibilidade, variaram de 3,14 a 13,55 % para aflatoxinas, de 2,12 a 3,70 % para FB1 e de 2,47 a 3,54 % para ZEA. Os desvios sob condições de precisão intermediária

variaram entre 4,70 e 13,55 %, entre 2,60 e 6,26 %, e entre 3,54 e 3,98 % para aflatoxinas, FB1 e ZEA, respectivamente.

O método foi aplicado a um estudo de ocorrência em 50 amostras de fubá provenientes de 19 municípios, cobrindo 8 das 12 mesorregiões do estado de Minas Gerais. A FB1 foi quantificada em 44% das amostras, enquanto que ZEA foi detectada em 18 %.

Todas as amostras foram consideradas conformes segundo os limites da legislação brasileira em vigor. Pela legislação europeia, duas amostras poderiam ser consideradas inadequadas ao consumo.

A metodologia validada mostrou adequação ao propósito de análises multigrupos de micotoxinas em fubá, com finalidade de monitoramento fiscal no controle de qualidade de alimentos para promoção da saúde pública, associada à redução no consumo de tempo, materiais, solventes e geração de resíduos.

7. Referências Bibliográficas

ABIMILHO, 2011. *Associação Brasileira das Indústrias de Milho*. [Online] Available at: <http://www.abimilho.com.br/milho/cereal> [Acesso em 02 Setembro 2013].

ABNT, 2002. *Associação Brasileira de Normas Técnicas - ABNT. ABNT ISO GUIA 33:2002. Utilização de materiais de referência certificados*. 28 p. ed. Rio de Janeiro

AGEITEC, 2013. *Agência Embrapa de Informação Tecnológica*. [Online] Available at: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/milho/arvore/CONT000fdyq37cx02wx5a900e1qe5b1sjh62.html> [Acesso em 04 Setembro 2013].

ANVISA, 2005. *Resolução RDC nº 263, de 22 de setembro de 2005 - Regulamento Técnico para Produtos de Cereais, Amidos, Farinhas e Farelos*.

ANVISA, 2011. *RESOLUÇÃO - RDC Nº 7, DE 18 DE FEVEREIRO DE 2011 - Limites Máximos Tolerados para Micotoxinas em Alimentos*. Brasil.

ANVISA, 2012. *GT-MONITORALIMENTOS- Monitoramento da qualidade sanitária dos alimentos: importância e estratégia de estruturação das sub-redes*.

ANVISA, 2013 a. ANVISA. [Online] Available at: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/Anvisa+Portal/Anvisa/Inicio/Alimentos/Assuntos+de+Interesse/Monitoramento+e+Pesquisa/PROMAC> [Acesso em 11 Outubro 2013].

ANVISA, 2013 b. *Resolução - RDC Nº 59, de 26 de dezembro de 2013 - Prorrogação dos prazos estabelecidos na RDC Nº7, de 18 de fevereiro de 2011*. Brasil.

AOAC, 2012. *Official Methods of Analysis of AOAC International*. 19th ed. Maryland: AOAC.

Barnes, J. M., 1970. Aflatoxin as a Health Hazard. *Journal of Applied Bacteriology*, Volume 33, pp. 285-298.

Bennett, J. W. & Klich, M., 2003. Mycotoxins. *Clinical Microbiology Reviews*, 16(3), pp. 497-516.

Berthiller, F., Schuhmacher, R., Buttinger, G. & Krska, R., 2005. Rapid simultaneous determination of major type A- and B-trichothecenes as well as zearalenone in maize by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography*, Volume 1062, pp. 209-216.

Bruce, B., Minkinen, P. & Riekkola, M. L., 1998. Practical method validation: validation sufficient for an analysis method. *Microchim. Acta*, Volume 128, pp. 93-106.

Burke, S., 2011. *Regression and Calibration*, Buckinghamshire: LC GC Europe Online Supplement,

Busk, O. L. et al., 2012. Cytosol protein regulation in H295R steroidogenesis model induced by the zearalenone metabolites, alfa- and beta-zearalenol. *Toxicol*, Volume 59, pp. 17-24.

Carvalho, E. C. Q., 1995. Micotoxinas em alimentos: implicações na saúde humana e animal.. *Revista Brasileira de Ciência Veterinária*, Volume 2, pp. 27-31.

Cayman, 2015. *Cayman Chemical*. [Online] Available at: <https://www.caymanchem.com/app/template/Product.vm/catalog/13227> [Acesso em 11 Fevereiro 2015].

Cifuentes, A., 2012. Food Analysis: Present, Future and Foodomics. *Analytical Chemistry*, Volume 2012, pp. 1-16.

CODEX, 2014. *Report of the Eighth Session of the CODEX COMMITTEE ON CONTAMINANTS IN FOODS*, The Hague, The Netherlands: CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION.

CONAB, 2013. *Companhia Nacional de Abastecimento - Importações e Exportações de Arroz, algodão e Milho*. [Online]

Available at: <http://www.conab.gov.br/conteudos.php?a=546&t=2>
[Acesso em 27 Agosto 2013].

CONAB, 2014. *Acompanhamento da Safra Brasileira de Grãos 2014/2015 - Terceiro Levantamento - Dezembro 2014*, Brasil: Companhia Nacional de Abastecimento.

Covarelli, L., Beccari, G. & Salvi, S., 2011. Infection by mycotoxigenic fungal species and mycotoxin contamination of maize grain in Umbria, central Italy. *Food and Chemical Toxicology*, Volume 49, pp. 2365-2369.

Dall'Asta, C. et al., 2009 a. Free and bound fumonisins in gluten-free food. *Molecular Nutritional Food Research*, Volume 53, pp. 492-499.

Dall'Asta, C. et al., 2009 b. Difficulties in fumonisin determination: the issue of hidden fumonisins. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, Volume 395, pp. 1335 - 1345.

Desjardins, A. et al., 2003. *Mycotoxins: risks in plant, animal, and humans systems*. Ames, Iowa, USA: CAST.

Di Stefano, V. et al., 2012. Applications of liquid chromatography - mass spectrometry for food analysis. *Journal of Chromatography A*, Volume 1259, pp. 74-85.

Dohlman, E., 2003. Mycotoxin Hazards and Regulations: Impacts on Food and Animal Feed Crop Trade. In: *International Trade and Food Safety: Economic Theory and Case Studies*. USA: USDA - Economic Research Service, pp. 97-108.

Ehrlich, V. et al., 2002. Fumonisin B1 is genotoxic in human derived hepatoma (HepG2) cells. *Mutagenesis*, Volume 17, pp. 257-260.

EMBRAPA, 2012. *Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária*. [Online]
Available at:
https://www.spo.cnptia.embrapa.br/conteudo?p_p_id=conteudoportlet_WAR_sistemasdeproducaolf6_1ga1ceportlet&p_p_lifecycle=0&p_p_state=normal&p_p_mode=view&p_p_col_id=column-3&p_p_col_count=1&p_r_p_-76293187_sistemaProducaold=3821&p_r_p_-996514994_topicold=3
[Acesso em Janeiro 2015].

Essigman, J. M., Croy, R. G., Bennett, R. & Wogan, G. N., 1982. Metabolic activation of aflatoxin B1: Patterns of DNA adduct formation, removal and excretion in relation to carcinogenesis. *Drug Metabolism Review*, Volume 13, pp. 581-602.

EURACHEM, 1998. *The fitness for purpose of analytical methods - A laboratory guide to method validation and related topics*. Teddington: LGC 61 p.

Evers, T. & Millart, S., 2002. Cereal Grain Structure and Development: Some Implications for Quality. *Journal of Cereal Science*, Volume 36, pp. 261-284.

Faberi, A. et al., 2005. Determination of type B fumoisins mycotoxins in maize and maize-based products by liquid chromatography/tandem mass spectrometry using QqQ linear ion trap mass spectrometer. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, Volume 19, pp. 275-282.

FAO, 2006. *Worldwide regulations for mycotoxins in food and feed in 2003*, Netherlands: FAO Food and Nutrition Papers.

FDA, 2011. *FDA Mycotoxin Regulatory Guidance - A guide for grain elevators, feed manufactures, grain processors and exporters*. Whashington D.C..

Ferreira, M. & Baptista, K., 2011. *Programa de Monitoramento da Qualidade de Alimentos do Estado de Minas Gerais - Uma Ferramenta de Gestão*. Minas Gerais: Seminário de Pactuação dos Programas da Superintendência de Vigilância Sanitária de Minas Gerais.

Frenich, A. G., Vidal, J. L., Romero-Gonzalez, R. & Aguilera-Luiz, M. d. M., 2009. Simple and high-throughput method for the multimycotoxin analysis in cereals and related foods by ultra high performance liquid chromatography / tandem mass spectrometry. *Food Chemistry*, Volume 117, pp. 705-712.

Gelderblom, W. C. A. et al., 1988. Fumonisin - Novel mycotoxins with cancer-promoting activity produced by fusarium moniliforme. *Applied and Environmental Microbiology*, Volume 54, pp. 1806-1811.

Guengerich, F. P. et al., 1998. Activation and detoxication of aflatoxin B1. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, Volume 402, pp. 121-128.

Hartl, M., Herderich, M. & Humpf, H.-U., 1999. Rapid determination of fumonisin B1 in corn products by high-performance liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. *European Food Research Technology*, Volume 209, pp. 348-351.

Helferich, W. G., Garrett, W. N., Hsieh, D. P. H. & Baldwin, R. L., 1986. Feedlot Performance and Tissue Residues of Cattle Consuming Diets containing Aflatoxins. *Journal of Animal Science*, Volume 62, pp. 691-696.

Horwitz, W., 1982. Evaluation of analytical methods used for regulation of food and drugs. *Analytical Chemistry*, Volume 54, pp. 67A-76A.

Hussein, S. & Jeffrey, M. B., 2001. Toxicity, metabolism and impact of mycotoxins on humans and animals. *Toxicology*, pp. 101-134.

Hustert, E. et al., 2001. The genetic determinants of the CYP3A5 polymorphism. *Pharmacogenetics*, Volume 11, pp. 773-779.

IARC, 1993. *Some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. Vol. 56.* s.l.:World Health Organization.

IARC, 2002. *Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans - Some Traditional Herbal Medicines, Some Mycotoxins, Naphtalene and Styrene. Vol. 82.* Lyon: World Health Organization.

IBGE, 2009. *Pesquisa Orçamentária Familiar*, Brasil: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística.

INMETRO, 2010. *Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. DOQ-CGCRE-008. Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos.* Rio de Janeiro: INMETRO 35 p.

INMETRO, 2012. *Vocabulário Internacional de Metrologia: conceitos fundamentais e gerais de termos associados (VIM 2012)*. Duque de Caxias, RJ: INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial).

ISO, 1993. *International Standards Organization. International vocabulary of basic and general terms in metrology - VIM*. Geneva: ISO 29 p.

Ito, Y., Stephen, W., Wicklow, D. T. & Goto, T., 2001. *Aspergillus pseudotamarii*, a new aflatoxin producing species in *Aspergillus* section *Flavi*. *Mycological Research*, 105(2), pp. 233-239.

JICA, 1993. *Mycotoxin inspection in food*. Hyogo International Centre: Japan International Cooperation Agency.

Johnson, W., Harris, T. & Guengerich, P., 1996. Kinetics and Mechanism of Hydrolysis of Aflatoxin B1 exo-8,9-Epoxy and Rearrangement of the Dihydrodiol. *Journal of American Chemical Society*, Volume 118, pp. 8213-8220.

Kuiper-Goodman, T., 1995. Mycotoxins: risk assessment and legislation. *Toxicology Letters*, pp. 853-859.

Kuiper-Goodman, T., Scott, P. M. & Watanabe, H., 1987. Risk assessment of the mycotoxin zearalenone. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, Volume 7, pp. 253-306.

Lattanzio, V. M. T., Della Gatta, S., Suman, M. & Visconti, A., 2011. Development and in-house validation of a robust and sensitive solid-phase extraction liquid chromatography/tandem mass spectrometry method for the quantitative determination of aflatoxins B1, B2 G1, G2, ochra, don, zon, T-2 e HT-2 in cereal-based foods. *Rapid Communication in Mass Spectrometry*, Volume 25, pp. 1869-1880.

Lattanzio, V., Solfrizzo, M., Powers, S. & Visconti, A., 2007. Simultaneous determination of aflatoxins, ochratoxin A and fusarium toxins in maize by liquid chromatography/tandem mass spectrometry after multitoxin immunoaffinity cleanup. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, Volume 21, pp. 3253-3261.

Li, W., Herrman, T. J. & Dai, S. Y., 2010. Rapid determination of fumonisins in corn-based products by liquid chromatography / tandem mass spectrometry. *Food Chemical Contaminants*, Volume 93, pp. 1472-1481.

Lye, M. S. et al., 1995. An outbreak of acute hepatic encephalopathy due to severe aflatoxicosis in Malaysia. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, Volume 53, pp. 68-72.

MAPA, 1999. *Instrução Normativa SDA/MAA 42/1999 (D.O.U. 22/12/1999)*. Brasil: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - Secretaria de Defesa Agropecuária.

MAPA, 2008. *Instrução Normativa N° 42, de 31 de Dezembro de 2008*. Brasil: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - Secretaria de Defesa Agropecuária.

MAPA, 2010. *Instrução Normativa N° 22, de 8 de setembro de 2010*. Brasil: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - Secretaria de Defesa Agropecuária.

MAPA, 2011. *Instrução Normativa N° 40, de 11 de novembro de 2011*. Brasil: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - Secretaria de Defesa Agropecuária.

MAPA, 2013 a. *Instrução Normativa N° 1, de 4 de janeiro de 2013*. Brasil: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - Secretaria de Defesa Agropecuária.

MAPA, 2013 b. *Portaria SDA N° 115, de 30 de agosto de 2013*. Brasil: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - Secretaria de Defesa Agropecuária.

Merril, A. et al., 1997. Esphingolipids- The enigmatic lipid class: biochemistry, physiology and pathophysiology. *Toxicology Applied Pharmacology*, Volume 42, pp. 208-225.

Paes, M. C. D., 2006. *Aspectos físicos, Químicos e tecnológicos do Grão de Milho*, Sete Lagoas, MG: Embrapa Milho e Sorgo.

Ramjee, G., Berjak, P., Adhikari, M. & Dutton, M., 1992. Aflatoxins and kwashiorkor in Durban, South Africa. *Annals of Tropical Paediatrics*, Volume 12, pp. 241-247.

RASFF, 2013. *The Rapid Alert System for Food and Feed*, European Commission: Health and Consumers.

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

Resanovic, R. D. et al., 2013. Mycotoxins and their effect on human health. *Journal of Natural Science*, pp. 315-324.

Resnik, S. L., 1993. *Prevencion y control de las micotoxinas durante la cadena de postcosecha*, Buenos Aires: Reunion Técnica Secamento.

Riley, R. et al., 2001. Sphingolipid perturbations as mechanisms for fumonisin carcinogenesis. *Environmental Health Perspectives*, Volume 109, pp. 301-308.

Rios, S. et al., 2011. Indústria do Milho. In: A. Borém & S. Rios, eds. *Milho biofortificado*. Visconde do Rio Branco: Suprema, pp. 175-195.

RSC, 2003. *Royal Society of Chemistry. Analytical Methods Committee Technical Brief: Terminology - the key to understanding the analytical science. Part 1: accuracy, precision and uncertainty*. s.l.:RSC 2p.

RSC, 2005. *Royal Society of Chemistry. Analytical Methods Committee technical Brief: Is my calibration linear?*, s.l.: RSC 2 p.

Rychlik, M. et al., 2014. Proposal of a comprehensive definition of modified and other forms of mycotoxins including “masked” mycotoxins. *Mycotoxin Research*, Volume 30, pp. 197-205.

Sabbioni, G., Skipper, P. L., Buchi, G. & Tannenbaum, S. R., 1987. Isolation and characterization of the major serum albumin adduct formed by aflatoxin B1 in vivo in rats. *Carcinogenesis*, Volume 8, pp. 819-824.

Sáenz de Rodríguez, C., Bougiovanni, A. & Conde de Borrego, L., 1985. An epidemic of precocious development in Puerto Rican children. *The Journal of Pediatrics*, Volume 107, pp. 393-396.

Samson, R. A., Hoekstra, E. S., Frisvad, J. C. & Filtenborg, O., 1995. *Introduction to Food-Borne Fungi*. 4^a ed. Baarn: Centraalbureau voor Schimmel-cultures.

Sánchez, L. T. & Carrillo, L. L., 2010. Consumo de fumonisinas y daños a la salud humana. *Salud Pública del México*, Volume 52, pp. 461-467.

Senyuva, H. Z., Gilbert, J. & Stroka, J., 2010. Determination of fumonisins B1 and B2 in corn by LC/MS with immunoaffinity column cleanup: interlaboratory study. *Food Chemical Contaminants*, 93(2), pp. 611-621.

SES/MG, 2006. *Código de Saúde de Minas Gerais - Lei N° 13.317/99*. Minas Gerais: Secretaria de Estado e Saúde de Minas Gerais.

Shukla, R. & Cheryan, M., 2001. Zein: the industrial protein from corn. *Industrial Crops and Products*, Volume 13, pp. 171-192.

Silva, S. C. C., Tanamati, F., Garcia, A. L. S. & Gasparino, E., 2012. *Fumonisina: mecanismos de ação*. Maringá.

Singh, N. et al., 2009. Physico-chemical, thermal and pasting properties of fractions obtained during three successive reduction milling of different corn types. *Food Chemistry*, Volume 113, pp. 71-77.

Soleimany, F., Jinap, S. & Abas, F., 2012. Determination of mycotoxins en cereals by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Food Chemistry*, Volume 130, pp. 1055-1060.

Souza, S., Pinto, C. & Junqueira, R., 2007. In-house method validation: application in arsenic analysis. *Journal of Food Composition and Analysis*, Volume 20, pp. 241-247.

Souza, S. V. C. & Junqueira, R. G., 2005. A procedure to assess linearity by ordinary least squares method.. *Analítica Chimica Acta*, Volume 552, pp. 25-35.

Spanjer, M. C., Rensen, P. M. & Scholten, J. M., 2007. LC-MS/MS multi-method for mycotoxins after single extraction, with validation data for peanut, pistachio, wheat, maize, raisins and figs. *Food Additives & Contaminants*, Volume 25, pp. 1-18.

Stevens, A. J., Saunders, C. N. & Spence, J. B., 1960. Investigations into "disease" of turkey poults. *The Veterinary Record*, 72(31), pp. 627-628.

Sulyok, M., Berthiller, F., Krska, R. & Schuhmacher, R., 2006. Development and validation of a liquid chromatography/tandem mass spectrometry method for the determination of 39 mycotoxins in wheat and maize. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, Volume 20, pp. 2649-2659.

Tanaka, H. et al., 2010. Determination of fusarium mycotoxins by liquid chromatography / tandem mass spectrometry coupled with immunoaffinity extraction. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, Volume 24, pp. 2445-2452.

Taverniers, I., De Loose, M. & Van Bockstaele, E., 2004. Trends in quality in the analytical laboratory. II. Analytical method validation and quality assurance. *Trends Anal. Chem.*, Volume 23, pp. 535-552.

Thompson, M., 2000. Recent trends in inter-laboratory precision at ppb and sub-ppb concentrations in relation to fitness for purpose criteria in proficiency testing. *Analyst*, Volume 125, pp. 385-386.

Thompson, M., Ellison, S. L. R. & Wood, R., 2002. Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis. *Pure and Applied Chemistry*, Volume 74, pp. 835-855.

UE, 2002. *Implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results*. s.l.:Official Journal of the European Communities.

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

UE, 2006 b. *Regulamento UE N.º 1881/2006 da comissão de 19 de Dezembro de 2006 que fixa os teores máximos de certos contaminantes presentes nos géneros alimentícios*. s.l.:Jornal Oficial da União Europeia.

UE, 2010. *Regulamento (UE) N° 165/2010 da Comissão de 26 de fevereiro de 2010 que fixa os teores máximos de certos contaminantes presentes nos gêneros alimentícios*. s.l.:Jornal Oficial da União Européia.

USDA, 2013. *United States Department of Agriculture*. [Online] Available at: <http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/search/> [Acesso em 27 Agosto 2013].

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

Varga, E. et al., 2012. Stable isotope dilution assay for the accurate determination of mycotoxins en maize by UHPLC-MS/MS. *Anal Bioanalytical Chemistry*, Volume 402, pp. 2675-2686.

Wang, E. et al., 1991. Inhibition of Sphingolipid Biosynthesis by Fumonisin. *The Journal of Biological Chemistry*, 266(22), pp. 14486-14490.

Wogan, G. N., Paglialunga, S. & Newberne, P. M., 1974. Carcinogenic effects of low dietary levels of aflatoxin B1 in rats. *Food Cosmetic Toxicology*, Volume 12, pp. 681-685.

Zachariasova, M. et al., 2010. Novel aproach in analysis of fusarium mycotoxins in cereals employing ultra performance liquid chromatography coupled with high resolution mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, Volume 662, pp. 51-51.