

Universidade Federal de Minas Gerais

Instituto de ciências exatas

Departamento de Química

Lucas Pinto da Silva

**VALIDAÇÃO DE UM METODO MULTIANALITO PARA  
DETERMINAÇÃO DE MICOTOXINAS E PESTICIDAS EM ARROZ  
USANDO METODOLOGIA DE EXTRAÇÃO *DILUTE AND SHOOT* E  
UHPLC-MS/MS**

Belo Horizonte

2017

UFMG/ICEx/1.205<sup>a</sup>  
D.664<sup>a</sup>

Lucas Pinto da Silva

**VALIDAÇÃO DE UM METODO MULTIANALITO PARA  
DETERMINAÇÃO DE MICOTOXINAS E PESTICIDAS EM ARROZ  
USANDO METODOLOGIA DE EXTRAÇÃO *DILUTE AND SHOOT* E  
UHPLC-MS/MS**

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

Belo Horizonte

2017

S586v Silva, Lucas Pinto da  
2017 Validação de um método multianalito para  
D determinação de micotoxinas e pesticidas em arroz  
usando metodologia de extração dilute and shoot e  
UHPLC-MS/MS [manuscrito] / Lucas Pinto da Silva. 2017.  
[xvi], 65 f.: il.

Orientador: Rodinei Augusti.  
Coorientadora: Adriana Ferreira Faria.

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

1. Química analítica - Teses 2. Produtos químicos  
agrícolas - Teses 3. Cromatografia líquida de alta  
eficiência - Teses 4. Espectrometria de massa - Teses  
5. Micotoxinas - Teses 5. Arroz - Análise - Teses I.  
Augusti, Rodinei, Orientador II. Faria, Adriana  
Ferreira, Coorientadora III. Título.

CDU 043



**"Validação de um Método Multianalito para Determinação de Micotoxinas e Pesticidas em Arroz Usando Metodologia de Extração *Dilute and Shoot* e UHPLC-MS/MS"**

**Lucas Pinto da Silva**

Dissertação aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:

Prof. Rodinei Augusti - Orientador  
UFMG

Profa. Renata Pereira Lopes Moreira  
UFV

Prof. Mauro Lúcio Gonçalves de Oliveira  
LANAGRO - MG

Profa. Adriana Ferreira Faria  
UFMG

Belo Horizonte, 23 de fevereiro de 2017.

*“Temos de fazer o melhor que podemos. Esta é a nossa sagrada responsabilidade humana.”*  
*Albert Einstein*

## AGRADECIMENTOS

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

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

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

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

Agradeço em especial a Eugênia Vargas pelo apoio e voto de confiança e a Fernando Diniz Madureira, pelo empenho na realização deste projeto.

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

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

Muito obrigado a todos, não seria possível sem vocês.

## SUMÁRIO

1. Introdução .....	1
2. Objetivo .....	3
3. Revisão da literatura .....	4
3.1. Arroz: histórico, classificação, morfologia, composição nutricional, produção e cultivo .....	4
3.2. Agrotóxicos .....	5
3.2.1. Definição, histórico, agrupamento e contaminação.....	5
3.3. Micotoxinas .....	7
3.3.1. Contaminação do arroz por micotoxinas .....	10
3.3.2. Determinação de micotoxinas e agrotóxicos em arroz.....	10
3.4. Técnicas de ensaio .....	16
3.4.1. Cromatografia Líquida de Ultra Alta Eficiência .....	16
3.4.2. Espectrometria de massas .....	17
3.5. Validação .....	17
4. Materiais e métodos .....	19
4.1. Equipamentos .....	20
4.2. Insumos.....	20
Padrões.....	20
Reagentes .....	22
Materiais .....	22
4.3. Soluções.....	23
Soluções padrão estoque .....	23
Soluções pool.....	24
Soluções de eluição, diluição e extração .....	25
Amostras .....	26
4.4. Método.....	27
4.4.1. Otimização das condições espectrométricas.....	27

4.4.2.	Otimização das condições cromatográficas.....	28
4.4.3.	Condições cromatográfica e espectrométrica otimizadas.....	29
	Condições cromatográficas.....	29
	Condições espectrométricas.....	29
4.4.4.	Otimização do procedimento de extração .....	31
4.5.	Validação .....	34
	Seletividade.....	34
	Efeito Matriz.....	34
	Linearidade .....	34
	Veracidade e precisão .....	37
	Limites de Detecção (LD), Quantificação (LD) e decisão ( $CC\alpha$ ) e capacidade de detecção ( $CC\beta$ ) .....	39
	Incerteza de Medição .....	40
5.	Resultados e Discussão.....	41
5.1.	Extração .....	41
5.2.	Validação .....	44
	Seletividade.....	44
	Linearidade e efeito matriz .....	48
	Veracidade .....	50
	Precisão.....	52
	Limites de Detecção (LD), Quantificação (LD) e decisão ( $CC\alpha$ ) e capacidade de detecção ( $CC\beta$ ) .....	55
	Incerteza de Medição .....	57
5.3.	Estudo de ocorrência .....	59
6.	Conclusão.....	62
7.	Referências Bibliográficas .....	64



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Principais micotoxicoses humanas .....	8
Tabela 2: Revisão bibliográfica das metodologias para determinações multianalito de micotoxinas e agrotóxicos em arroz e outros alimentos.....	12
Tabela 3: Número CAS e estrutura dos analitos em estudo neste trabalho .....	20
Tabela 4: Parâmetros para preparo de solução estoque e posterior padronização.....	23
Tabela 5: Concentração de cada analito nas soluções pool .....	25
Tabela 6: Parâmetros para operação do espectrômetro de massas durante o experimento em polaridade positiva.....	30
Tabela 7: Parâmetros para operação do espectrômetro de massas durante o experimento em polaridade negativa.....	31
Tabela 8: Planejamento fracionário $2^{4-1}$ empregado para a otimização de metodologia de extração tipo QuEChERS. ....	33
Tabela 9: Planejamento fatorial $2^3$ empregado para a otimização de extração “dilute and shoot” .....	33
Tabela 10: Concentração obtida na fortificação de extrato branco para elaboração de curva de calibração em relação à quantidade de analito no arroz e em extrato. ....	35
Tabela 11: Preparo da curva de calibração .....	35
Tabela 12: Concentração dos analitos para cada um dos pontos preparados para a elaboração da curva de calibração. ....	36
Tabela 13: Concentração de fortificação de amostras branco para estudos de veracidade e precisão.....	37
Tabela 14: Pontos de caracterização por fragmentos monitorados .....	44
Tabela 15: Tolerâncias máximas permitidas para as intensidades relativas de íons em ensaio por LC-MS/MS.....	45
Tabela 16: Relação entre íons obtida em validação. ....	45
Tabela 17: Curvas de calibração obtidas durante um dos dias da validação.....	49
Tabela 18: Resultado de ensaios de recuperação.....	50
Tabela 19: Desvios padrão de repetibilidade e precisão intermediária calculados para estimativa de precisão do método analítico, assim como dos valores de Horwitz.....	52
Tabela 20: Limite máximo tolerado, limites de detecção e de quantificação, $CC\alpha$ e $CC\beta$ . ....	55
Tabela 21: Incerteza de medição expandida (U) calculada no nível do LQ.....	59

Tabela 22: Resultados obtidos no estudo de ocorrência para micotoxinas e agrotóxicos, com respectivas incertezas associadas.....	60
--	----

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Cromatogramas de injeções de extratos obtidos nas condições A (A1 modo positivo e A2 negativo), B (B1 modo positivo e B2 negativo), baseadas em QuEChERS e C (C1 modo positivo e C2 negativo), fundamentada na metodologia dilute and shoot. As fortificações se deram na concentração aproximada de $10 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ . ....	41
Figura 2: Áreas obtidas para cada uma das condições avaliadas no planejamento de experimentos $2^3$ para otimização da metodologia de extração dilute and shoot .....	43
Figura 3: Fluxograma representativo do procedimento de extração otimizado. ....	44
Figura 4: Cromatogramas típicos referentes aos íons de quantificação obtidos em ensaio de amostra branco.....	47
Figura 5: Cromatogramas típicos referentes aos íons de quantificação obtidos em ensaio de amostra branco fortificadas no mais baixo nível de concentração para ensaios de exatidão. ...	48
Figura 6: Resultados obtidos em ensaios de recuperação, em condição de precisão intermediária.....	51
Figura 7: Estimativa de repetibilidade para nível baixo de fortificação obtido em ensaios de recuperação.....	54
Figura 8: Estimativa de precisão intermediária obtido em ensaios de recuperação. ....	54

## LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1 .....	24
Equação 2 .....	38
Equação 3 .....	39
Equação 4 .....	39
Equação 5 .....	39
Equação 6 .....	39
Equação 7 .....	57
Equação 8 .....	57
Equação 9 .....	58
Equação 10 .....	58
Equação 11 .....	58
Equação 12 .....	58
Equação 13 .....	58

## LISTA DE SIGLAS

A.C.	Antes de Cristo
A.O.A.C	Association of Official Agricultural Chemists
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
DPR <sub>r</sub>	Desvio padrão relativo de repetibilidade
DPR <sub>R</sub>	Desvio padrão relativo de reprodutibilidade
ESI	<i>Electrospray ionization</i>
FIA	<i>FlowInjection Analysis</i>
HR- MS <sup>n</sup>	<i>High Resolution sequential Mass Spectrometry</i>
HRMS	<i>High Resolution Mass Spectrometry</i>
LACQSA	Laboratório de Controle de Qualidade e Segurança Alimentar
LANAGRO/MG	Laboratório Nacional Agropecuário de Minas Gerais
LC-MS/MS	<i>Liquid chromatography – tandem sequential mass spectrometric</i>
LD	Limite de detecção
LLE	Extração líquido-líquido
LMT	Limite máximo tolerado
LMR	Limite máximo de resíduo
LQ	Limite de quantificação
LR-MS <sup>n</sup>	<i>Low Resolution sequential Mass Spectrometry</i>
<i>m/z</i>	Relação massa/carga
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MM	Massa Molar
MRM	<i>Mutiple Reaction Monitoring</i>
MS	<i>Mass Spectrometry</i>
MSPD	Dispersão da matriz em fase sólida
PNCRC	Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes
QuEChERS	<i>Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe</i>
SBSE	Extração sortiva com barra magnética
SPE	Extração em fase sólida
SPME	Micro extração em fase sólida
u	Incerteza
U	Incerteza Expandida

UHPLC	<i>Ultra High performance Liquid chromatography</i>
<i>UHPLC-MS/MS</i>	Cromatografia líquida de ultra alta performance acoplada à espectrometria de massas sequencial
WHO	<i>World Health Organization</i>

## RESUMO

O presente trabalho descreve o desenvolvimento e a validação de um procedimento analítico para a determinação simultânea de agrotóxicos de diferentes classes e de micotoxinas no arroz. O protocolo de preparação da amostra baseou-se num procedimento de extração de uma única etapa com uma solução de acetonitrila e água acidificada sem etapas de limpeza adicionais. Este procedimento *dilute and shoot* simples extraiu eficientemente os compostos químicos das amostras de arroz, uma matriz alimentar bastante complexa. As análises foram realizadas utilizando cromatografia líquida de ultra alta performance acoplada com espectrometria de massa sequencial (UHPLC-MS/MS). O espectrômetro de massa operou nas polaridades negativa e positiva. Duas transições foram escolhidas para cada analito. A corrida cromatográfica foi de 7 minutos. A validação deu em atendimento ao Manual de Garantia da Qualidade Analítica, e com as normativas internacionais SANCO/12571/2013 e Diretiva 2002/657/CE. Deste modo, a recuperação de amostras branco fortificadas foi calculada para estimar a veracidade, que permaneceu entre 70 e 110%. A precisão, mostrada como desvio padrão relativo, foi estimada nas condições de repetibilidade / precisão intermediária e foi comparada com os valores esperados obtidos pela função Horwitz. Os limites de quantificação obtidos para todos os analitos foram consistentes com os estabelecidos pela normativa. Finalmente, as incertezas associadas aos resultados analíticos foram estimadas utilizando a metodologia *bottom-up*. Conclui-se que a presente metodologia pode ser eficientemente aplicada para determinar micotoxinas e agrotóxicos numa matriz complexa como o arroz de uma forma simples, eficiente e confiável. Os resultados da validação indicaram que esta metodologia está dentro das legislações mais restritas em todo o mundo.

**PALAVRAS-CHAVE:** Micotoxinas, Agrotóxicos, Arroz, Metodologia “dilute and shoot”. UHPLC-MS/MS, Validação.

## ABSTRACT

The present work describes the development and validation of an analytical procedure for the simultaneous determination of pesticides of different classes and of mycotoxins without rice (this type of sample was used as representative matrix for cereals and foods with low moisture content). The sample preparation protocol was based on a one-step extraction procedure with a solution of acetonitrile and acidified water without further cleaning steps. This simple process of dilution and burning efficiently extracted the chemical compounds from rice samples, a very complex food matrix. The analyzes were performed using ultra high performance liquid chromatography coupled with sequential mass spectrometry (UHPLC-MS/MS). The mass spectrometer operated in negative and positive modes. Two  $m/z$  transitions were chosen for each analyte. A chromatographic run was 7 minutes. Validation was adopted following the recommendations of Manual de Garantia da Qualidade Analítica, SANCO/12571/2013 and 2002/657/CE. Thus, a recovery of fortified white samples was calculated to estimate an accuracy, which remained between 70 and 110%. The precision, shown as the standard deviation, was estimated under the conditions of repeatability/reproducibility and was compared with the expected values obtained by the Horwitz function. The quantification limits were established for all analytes and were consistent with those established by the regulations. Finally, the uncertainties associated with the analytical results were estimated using a bottom-up methodology. It is concluded that the present methodology can be applied efficiently to determine mycotoxins and pesticides in a matrix as complex as rice in a simple, efficient and reliable way. The validation results indicate that this methodology is within the laws and restricts worldwide. Finally, it can be considered that the analytical treatment can be expanded to be applied to the analysis of other pesticides and mycotoxins and other matrices.

**KEYWORDS:** Mycotoxins, Agrochemicals, Rice, "dilute and shoot" methodology, UHPLC-MS/MS, Validation



## 1. INTRODUÇÃO

O arroz é categorizado como pertencente à divisão angiosperma, à classe das monocotiledôneas, à família das gramíneas e à subfamília *Bambusoideae*, ou ainda *Oryzoideae*. Os seus grãos são constituídos majoritariamente por amido, contendo ainda proteínas, lipídeos, fibras e minerais, sendo capaz de fornecer 20% da energia e 15% da proteína necessários à dieta; desta forma apresenta uma das melhores composições nutricionais. A relação entre seus componentes pode variar em virtude das condições ambientais e de manejo a que estão sujeitas as plantas. É um alimento de elevada importância social e econômica, já que atualmente o cereal é cultivado e consumido em todo o mundo. Estima-se que sejam dedicados cerca de 165 milhões de hectares à cultura do arroz, que produzem aproximadamente 740 milhões de toneladas do grão a cada safra. Os valores de movimentação financeira em virtude do comércio internacional desta *commodity* excedeu 24 bilhões de dólares no ano de 2012.

O Brasil se destaca como líder na produção sul-americana e a maior nação cultivadora de arroz fora do continente asiático, ocupando a nona posição entre os maiores produtores mundiais, colhendo cerca de 11 milhões de toneladas no ano de 2013. A proteção das lavouras se faz por meio da adoção de técnicas modernas de manejo e da aplicação de defensivos agrícolas, uma vez que a cultura do arroz sofre infestação por plantas daninhas, pragas e doenças. Tais condições de manejo podem causar perdas econômicas e prejudicar a qualidade do alimento, propiciando a presença de contaminantes naturais, tais como as micotoxinas e aditivos tóxicos, como é o caso de resíduos de agrotóxicos.

As micotoxinas são metabólitos fúngicos que, quando ingeridos, inalados ou absorvidos pela pele causam patologias que podem levar à morte de humanos e animais. Como são metabólitos secundários, a sua síntese pelo fungo progenitor não é uma condição fundamental ao seu desenvolvimento, sendo condicionada à exposição do microorganismo a situações estressantes. A proliferação dos fungos filamentosos em plantações e produtos alimentícios é potencialmente perigosa. Sua presença na lavoura é desencadeada por elementos como a biodisponibilidade de cepas dos microrganismos, adequações climáticas e competição com outras colônias. Já durante o armazenamento e transporte dos grãos, os fatores principais são a temperatura, as concentrações de cepas, o dano mecânico sofrido pelo alimento e a infestação de insetos e pragas. Portanto, a contaminação por micotoxinas é um processo aditivo, representado pelo somatório da produção de toxinas durante toda a cadeia produtiva do alimento.

Já os agrotóxicos são definidos pelo CODEX *Alimentarius* como as “substâncias destinadas a prevenir, destruir, atraindo, repelindo ou controlando qualquer praga, incluindo espécies indesejáveis de plantas ou animais durante a produção, armazenamento, transporte, distribuição e processamento de alimentos, *commodities* agrícolas, ou ração animal, ou que podem ser administrados a animais para controle de ectoparasitas”. O Brasil conta com a lei Federal nº 7.802, de 11 de julho de 1989, regulamentada pelo decreto nº 4.074, de 04 de janeiro de 2002 para a definição destes agrotóxicos. Cabe à ANVISA a competência de avaliar e classificar a toxicidade de agrotóxicos, e a partir de seus estudos é estabelecido, entre outros parâmetros, o Limite Máximo de Resíduo (LMR) referente à cada substância.

Atualmente, são registrados mais de 800 compostos utilizados como princípio ativo de agrotóxicos, divididos em cerca de 100 classes químicas. Apenas para a cultura do arroz, a União Europeia regula a presença de cerca 460 compostos, sobretudo os de ação inseticida, herbicida e fungicida.

## 2. OBJETIVO

Validar um método multianalito para a determinação simultânea de micotoxinas e agrotóxicos empregando cromatografia líquida de ultra eficiência e espectrometria de massas sequencial, seguindo as principais normativas nacionais e internacionais de qualidade.

Os objetivos específicos incluem:

- Otimizar uma metodologia de extração e avaliar a necessidade e efeito de etapas de *clean-up* na extração de micotoxinas e agrotóxicos na matriz proposta;
- Estabelecer os parâmetros instrumentais ótimos (cromatografia e espectrômetro de massas) para identificação e quantificação dos compostos pesquisados;
- Desenvolver as etapas de validação de acordo com os procedimentos de validação do laboratório, atendendo aos critérios estabelecidos no Manual de Garantia da Qualidade Analítica[1].

Foram selecionados como analitos para o estudo tanto micotoxinas quanto agrotóxicos, em virtude de suas co-ocorrências em matrizes alimentares, suas toxicidades aos consumidores humano e animal e seus semelhantes interesses sanitário e normativo.

As micotoxinas empregadas na validação foram aquelas compreendidas pela resolução RDC nº 7, de 18 de fevereiro de 2011[2], que dispõe sobre os limites máximos tolerados de micotoxinas em alimentos comercializados no Brasil, em adição às toxinas abrangidas pela normativa análoga em vigência na União Europeia, o regulamento (CE) No 1881/2006 da comissão de 19 de dezembro de 2006[3]. Foram considerados os contaminantes monitorados para a matriz alimentar em questão.

Já a escolha pelos agrotóxicos abordados no trabalho deu-se entre aqueles cuja aplicação na cadeia produtiva do arroz é permitida e regulada pelos órgãos fiscalizatórios, nacionais e europeus. Em virtude da grande diversidade desta classe de contaminantes, durante a seleção dos analitos foi favorecida a escolha por espécies de larga aplicação na cultura arrozeira, que representassem, de forma abrangente, muitas das principais classes químicas dentre as quais se distribuem estes agrotóxicos.

### 3. REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1. Arroz: histórico, classificação, morfologia, composição nutricional, produção e cultivo

É difícil apontar precisamente a época e local em que o cultivo do arroz se iniciou, já que há diversas evidências de seu plantio em várias partes do mundo, com frequente menção ao continente asiático, com idades de até 10.000 anos[4]. Acredita-se que a cultura deste cereal foi introduzida na Europa por Alexandre da Macedônia, após suas expedições à Índia. Desde então, como consequência das grandes explorações europeias dos séculos XV, XVI e XVII, o cultivo do arroz foi levado aos territórios recém-descobertos, como exemplo ao Brasil. Hoje, este cereal é cultivado em todos os continentes habitados.

O arroz pertence ao gênero *Oryza*, sendo as espécies *Oryza sativa* e *Oryza glaberrima* majoritárias na composição do arroz cultivado comercialmente[5]. O desenvolvimento da planta leva cerca de 3 meses, com variações causadas, sobretudo, por questões ambientais. Este período envolve duas fases distintas: vegetativa e reprodutiva. A fase vegetativa é caracterizada pelo intenso aumento de massa da planta, com notável emissão de folhas. Já durante a fase reprodutiva há o alongamento das hastes, a floração e a formação dos grãos.

A morfologia apresentada pelas plantas de arroz pode variar em virtude de fatores ambientais e variabilidade genética, se apresentando como gramíneas de 0,4 a 5,0 metros de altura[4]. O grão de arroz é um fruto verdadeiro, cujo peso unitário varia entre 10 e 45 miligramas, sendo envolto por uma casca responsável por cerca de 20% de sua massa. A semente é composta pelo embrião e endosperma, que são recobertos por várias camadas finas de tecidos vegetais diversificados[4].

A composição nutricional deste cereal favorece sua relevância energética, 100 gramas de arroz fornecem até 361 kcal. O alimento também é uma importante fonte de proteínas, esta mesma porção contém cerca de 6g, além de fornecer importantes nutrientes inorgânicos como: zinco, ferro e cálcio.

O plantio do arroz é bem-sucedido em uma vasta gama de regiões e configurações climáticas. Porém, a maior parte de sua produção se concentra na Ásia[5], que capitaneada por China, Índia, Indonésia, Bangladesh e Vietnã, responde por cerca de 90% da colheita mundial deste grão. Em dados de 2014 da FAO, o Brasil figura como nono maior produtor deste cereal, o líder fora do continente asiático. A produção mundial desta *commodite* foi a terceira maior

em 2013, atingindo 738 milhões de toneladas, superada apenas pela cana de açúcar e milho, segundo dados apresentados pela FAO.

A produção de arroz tem observado um constante aumento de produtividade, impulsionado pela elevada mecanização e aplicação de tecnologias modernas de manejo. O caráter primordialmente alimentício do cereal torna sua cultura muito sensível ao crescimento demográfico. Por exemplo, no século XX, estima-se que a produção de arroz tenha triplicado entre 1961 e 2010[4].

Cerca de 78% da produção de arroz é destinada à alimentação humana, a maior parcela dentre as commodities agrícolas de cultivo mais intenso (arroz, trigo e milho). A larga representatividade do arroz é percebida ao se analisar os valores de ingestão per capita deste alimento, que em dados de 2000, alcançou cerca de 56 kg por ano[5]. Este cereal é responsável pela principal fonte de calorias da dieta humana, contribuindo com cerca de 20% da energia ingerida, e em países como Bangladesh, Camboja e Myanmar, esta parcela alcança 70%.

O mercado interacional do arroz é pequeno, atingindo apenas 37 milhões de toneladas em transações interfronteiriças em 2013, cerca de 5% do arroz produzido. Esta pequena quantidade se dá em virtude do perfil desta *commodite*, majoritariamente destinada ao consumo humano e, desta forma, de relevância estratégica na política de abastecimento para os governos. A taxa de produção desta *commodite* é alta e a produção nacional fomentada.

O arroz é majoritariamente cultivado pela aplicação de quatro técnicas: irrigado, em terrenos baixos e chuvosos, em terrenos elevados ou ainda em terrenos alagados. Há atualmente preferência pelo método irrigado de cultivo, responsável por cerca de metade da área destinada ao plantio desta cultura[5]. Esta metodologia é caracterizada por alta densidade das plantações e intensa utilização de agrotóxicos, energia e água.

A fim de proteger as lavouras arrozeiras da presença de pestes, as técnicas de manejo convencionais fazem uso de uma vasta gama de agrotóxicos. Já as técnicas modernas de cultivo tentam minimizar a necessidade de aplicação de agrotóxicos, através do desenvolvimento de plantas selecionadas, mais resistentes à presença de pestes.

## **3.2. Agrotóxicos**

### **3.2.1. Definição, histórico, agrupamento e contaminação**

Os agrotóxicos são agentes com ação química, física ou biológica, cuja aplicação é destinada aos setores de produção, armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas,

pastagens, proteção de florestas nativas ou cultivadas, assim como de ambientes urbanos, hídricos e industriais, com a finalidade do manejo de flora e fauna, conforme definição apresentada pela lei brasileira Nº 7.802, de 11 de julho de 1989[6].

A aplicação de defensivos no controle de pestes remota a 70 A.C., quando os romanos utilizavam compostos de arsênio no combate a insetos [7].

O desenvolvimento de espécies inorgânicas com ação inseticida e fungicida se deu com o emprego de antimônio, boro, cobre, flúor, manganês, mercúrio, selênio, enxofre, tálio e zinco. Os compostos gerados apresentavam grande eficiência, porém, um comportamento ambiental preocupante, uma vez que seus resíduos se mantinham ativos no solo por muito tempo [7].

A partir da década de 1940, observou-se um grande aumento no número de compostos orgânicos sintéticos desenvolvidos para a utilização como agrotóxicos, tais como DDT, BHC, aldrin, dieldrin, endrin, clordane, parathion, captan e 2,4-D. Estes compostos foram rapidamente adotados pelo mercado agrícola. Em especial, pode-se destacar o DDT, largamente empregado em virtude de sua eficiência, baixo custo e amplo espectro[7]. Aparentemente, este agrotóxico apresentava baixa toxicidade a mamíferos e sua ampla aplicação no controle de vetores reduziu a incidência de doenças associadas à proliferação de insetos, tais como a malária, a febre amarela e a febre tifoide [7].

As pesquisas em busca de novas substâncias se intensificaram e na década de 1980 foi desenvolvido o herbicida mais vendido mundialmente, o glifosato, e também asulfonilureias e imidazolinona. Entre os compostos de ação inseticida houve avanço significativo com a produção de substâncias de terceira geração: piretróides, avermectinas, benzoilureias e Bt (*Bacillus thuringiensis*). Neste período, ainda se observou a disponibilização para o mercado agrícola dos fungicidas: triazona, morfolina, imidazol, pirimidina e dicarboximida[7].

Na década seguinte, esforços foram concentrados na busca por novas substâncias dos grupos químicos já descobertos, que fossem capazes de demonstrar melhor desempenho agroquímico, mas novas classes de agrotóxicos também foram desenvolvidas[7]. O uso dos defensivos mais eficazes diminuiu bastante o volume de sua aplicação, que passava da ordem de quilogramas por hectare para gramas por hectare[7].

Os agrotóxicos podem ser agrupados em função de diversas propriedades que apresentam, tais como organismo alvo, classe química e toxicidade. A WHO (*World Health Organization*) recomenda o agrupamento dos agrotóxicos em função da toxicidade. Assim, os agrotóxicos são dispostos entre extremamente perigosos, altamente perigosos, moderadamente perigosos e levemente perigosos[8, 9].

A severidade dos efeitos nocivos causados pela exposição aos agrotóxicos depende de alguns fatores, tais como a dose, a rota de exposição, a facilidade com que a substância é absorvida, os mecanismos de ação do agrotóxico e seus metabólitos, assim como de sua capacidade de acumulação no organismo e a velocidade de eliminação[10].

A principal fonte destes contaminantes para os humanos, não se considerando os trabalhadores diretamente envolvidos na sua manipulação e aqueles propriamente responsáveis por sua fabricação, é pela dieta. Os alimentos podem ser contaminados por agrotóxicos durante sua produção, no cultivo das lavouras, no processamento, no transporte e no armazenamento [10].

### **3.3.Micotoxinas**

Micotoxinas são metabólitos secundários de origem fúngica[11], de ocorrência natural em alimentos de origem vegetal colonizados por fungos micotoxigenitores, quando submetidos a condições ambientais que favoreçam sua síntese. Em produtos alimentícios de origem animal, sua presença está condicionada à nutrição do animal por alimento contaminado.

A contaminação fúngica de alimentos, assim como a produção de metabólitos secundários pelos microrganismos, é uma função complexa que combina influências de técnicas de plantio, de manuseio, estocagem, assim como de condições climáticas[11, 12]. A presença de água livre e disponível, assim como a adequação da temperatura são fatores que condicionam a colonização dos fungos capazes de produzir as toxinas em detrimento daqueles microorganismos que inocuamente colonizam a superfície do alimento[13]. Durante o armazenamento dos grãos, os fatores principais são a temperatura, as concentrações de cepas, o dano mecânico sofrido pelo alimento e a infestação de insetos e pragas[13]. Portanto, afirma-se que a contaminação por micotoxinas é um processo aditivo, representado pelo somatório da produção de toxinas no pré e pós-colheita[13].

Uma vez que a produção de micotoxinas em alimentos é um fenômeno complexo e dependente de inúmeros fatores, a síntese dos contaminantes é pontual, caracterizando sua presença de maneira heterogênea. Os níveis observados em grãos, por exemplo, mesmo frutos da mesma planta, podem apresentar grande discrepância, o que torna possível a segregação de elementos intensamente infectados por fungos uma prática válida na diminuição da contaminação de lotes de alimentos[13, 14].

Entre as mais de 100.000 espécies conhecidas de fungos, os principais toxigenitores pertencem aos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*. Os fungos que fazem parte do gênero *Aspergillus* apresentam desenvolvimento preferencial em condições climáticas de alta temperatura e baixa atividade de água. Desta forma, sua ocorrência é intensificada em regiões tropicais. Esse é o gênero fúngico de maior relevância econômica[13]. Já o gênero *Penicillium* reúne fungos que se desenvolvem em uma faixa de temperatura mais ampla, se distribuindo por áreas subtropicais e temperadas. A contaminação de alimentos por espécies desse gênero é mais relacionada a condições pós-colheita inadequadas[13]. O gênero dos *Fusarium* possui representantes capazes de se desenvolver em condições ambientais diversas, sendo este grupo distribuído universalmente, o que o torna um fito-patógeno importante [13].

A contaminação em humanos por micotoxinas ocorre, majoritariamente, pela ingestão de alimentos. Entretanto, a inalação e absorção dérmica também são vias relevantes de contágio[13]. As micotoxicoses podem se manifestar de forma aguda ou crônica, causando tumores ou ainda agindo na fragilização do sistema imunológico humano. Desta forma, a atuação nociva destas toxinas pode ser mascarada pela ação agressiva de doenças infecciosas oportunistas[13]. Os efeitos nefastos destas substâncias são diversos, apresentando comportamento carcinogênico, hepatotóxico, neurotóxico, agindo como inibidor de síntese proteica, como agente hemorrágico ou de emese[15, 16], entre outras diversas consequências nocivas.

O cenário de globalização do comércio de *commodities* alimentícias, com o transporte de alimentos entre países produtores e consumidores percorrendo longos trechos, aliado à grande gama de fungos filamentosos toxigênicos, torna a presença de micotoxinas em alimentos virtualmente inevitável, justificando investimentos em pesquisa e desenvolvimento de técnicas agrícolas e comerciais sanitariamente seguras. As principais micotoxicoses humanas são apresentadas na Tabela 1, a seguir:

**Tabela 1:** Principais micotoxicoses humanas

Micotoxicose	Alimento	Agente etiológico
Akakabio-byo	Trigo, cevada, aveia, arroz	<i>Fusarium spp.</i>
Alimentar aleukiaóxicos	Cereais	<i>Fusarium spp.</i>
Nefropatia dos balcãs	Cereais	<i>Penicillium</i>



<b>Micotoxicose</b>	<b>Alimento</b>	<b>Agente etiológico</b>
Beribéri cardíaca	Arroz	<i>Aspergillus spp.</i> , <i>Penicillium spp.</i>
Dendrodochiotoxicosis	Forragem	<i>Dendrodochiumtoxicum</i>
Ergotismo	Centeio, cereais	<i>Clavicepspurpurea</i>
Tumores de esôfago	Milho	<i>Fusariummoniliforme</i>
Hepatocarcinoma (aflatoxicose aguda)	Cereais, amendoim	<i>Aspergillusflavus</i> , <i>Aspergillusparasiticus</i>
Doença kashin Beck "doença urov"	Cereais	<i>Fusarium</i>
Kwashiorkor	Cereais	<i>Aspergillusflavus</i> , <i>Aspergillusparasiticus</i>
Síndrome de Reye	Grãos de cereais	<i>Aspergillus</i>
Stachybotryotoxicosis	Cereais, forragens	<i>Stachybotrysatra</i>

As micotoxinas podem ser agrupadas em diversos grandes grupos, em função de sua estrutura e fungos genitores. As aflatoxinas são produzidas por *Aspergillus parasitarius* e *Aspergillus flavus*. Dentre as principais toxinas deste grupo estão as aflatoxinas B1 e G1, cujos produtos de transformação são as também tóxicas aflatoxinas B2 e G2[13]. Em meio biológico, a aflatoxina B1 ainda pode se converter em aflatoxina M1, um contaminante comum em alimentos lácticos[15]. Aflatoxinas apresentam capacidade imunossupressora e, conforme relatório expedido pelo IARC (*International Agency for Research on Cancer*), apresenta comprovada ação carcinogênica, com integrantes pertencentes ao Grupo 1 [17].

As ocratoxinas compõem um grupo de grande significação sanitária, e dentre elas, destaca-se a ocratoxina A. São produzidas principalmente pelos fungos *Aspergillus verrucosum*, *Aspergillus ochraceous* e *Penicillium*, em alimentos de grande consumo, como cevada e café. A ocratoxina A é comprovadamente nefrotóxica e hepatotóxica [13, 15].

O grupo das citreoviridinas ganhou relevância quando uma de suas toxinas foi apontada como causadora do beribéri, patologia que atinge largamente países asiáticos. A doença é caracterizada por palpitações, náuseas, vômitos, dificuldade respiratória, pulso rápido, arritmia cardíaca, baixa pressão arterial, podendo levar à morte[13].

Quanto à zearalenona, ainda não há informações que subsidiem conclusões acerca de sua ação em pacientes humanos. Investiga-se o curioso e alarmante caso de aceleração do crescimento e amadurecimento precoce de meninas na faixa de 7 a 8 anos, em Porto Rico[13].

As fumonisinas, que contaminam principalmente o milho colonizado por fungos filamentosos, são um importante agente carcinogênico, atacando principalmente o fígado e o esôfago[17]. Estas micotoxinas ainda são agressivas ao sistema hepático e renal[13].

O risco provocado pela exposição à micotoxinas tem levado governos a regular a sua presença em alimentos. O Brasil conta com a Resolução RDC N° 07, de 9 de março de 2011, emitida pela ANVISA, que estabelece os Limites Máximos Tolerados para diversas micotoxinas em várias matrizes alimentícias, prevendo ainda o acirramento de níveis tolerados para o futuro próximo. Para o mesmo fim, a União Europeia mantém a Regulamentação (EC) No. 1881/2006[3].

### **3.3.1. Contaminação do arroz por micotoxinas**

A presença de micotoxinas no arroz se dá em escala menor do que ocorre com outros importantes cereais, como milho e trigo. Entretanto, tem sido reportada a presença de aflatoxinas B1, B2, G1 e G2, citrinina, desoxinivalenol, fumonisinas B1, B2 e B3, nivalenol, ocratoxina A, estigmastadieno e zearalenona nesta *commodite*. Dentre esta vasta gama de contaminantes, apenas as aflatoxinas, desoxinivalenol, ocratoxina A e zearalenona estão entre as legisladas para esta matriz, tendo em vista os regulamentos europeu e brasileiro.

### **3.3.2. Determinação de micotoxinas e agrotóxicos em arroz**

Uma vasta gama de métodos tem sido desenvolvida para a análise de micotoxinas em alimentos. Em virtude da complexidade e diversidade das matrizes analisadas, os procedimentos analíticos são geralmente compostos por etapas de extração, *clean-up*, separação, detecção, quantificação e confirmação. Os métodos são fundamentados nas mais diversas facetas do comportamento químico das toxinas e apresentam desempenhos distintos no que tange a qualidade analítica e agilidade das análises. Portanto, a escolha dos protocolos de determinação é fundamental para o sucesso de processo investigativo[1].

Dentre os métodos mais difundidos em laboratórios de rotina, destacam-se a Cromatografia em Camada Delgada e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. Observam-se ainda o emprego de técnicas imunoenzimáticas de detecção, além de *kits* comercialmente

disponíveis para testes rápidos, utilizados de maneira exploratória ou com a finalidade de monitoramento por empresas e indústrias alimentícias[1, 13].

Frente a sua capacidade de operação em análises multianalito, diversos métodos para determinação de micotoxinas tem sido desenvolvidos utilizando cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas.

O preparo de amostras para metodologias multianalitos se torna complicado ao se tratar analitos com grande diferença de polaridade. Desta forma, um dos grandes desafios para o desenvolvimento de protocolos genéricos de ensaio é a obtenção de um método de extração com elevada performance em níveis de interesse cada vez mais baixos[18]. Entre as técnicas mais difundidas atualmente estão a extração líquido-líquido (LLE), extração em fase sólida (SPE) e dispersão da matriz em fase sólida (MSPD), microextração em fase sólida (SPME), extração sortiva com barra magnética (SBSE), entre outras.

Segundo Soleimany e colaboradores (2012), ao se considerar as diferenças físico-químicas das substâncias em análises multianalito, métodos com pouco *clean-up* tendem a se mostrar mais aplicáveis[18]. Entretanto, a injeção de extratos sem nenhum *clean-up* em um sistema LC-MS/MS, leva a obtenção de maiores limites de detecção e quantificação, quando comparados aos obtidos em métodos com mais etapas de *clean up*, além da diminuição da vida útil das colunas cromatográficas e do aumento na frequência de manutenções no espectrômetro de massas.

A adoção de métodos do tipo QuEChERS, acrônimo para *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*[19], tem pautado muitos trabalhos de validação de métodos multianalitos[20-22], inclusive para a determinação de micotoxinas e agrotóxicos[23].

Métodos descritos na literatura utilizando extração com solução de acetonitrila/água ou metanol/água, muitas vezes dispensando etapa de *clean-up*, tem sido relatados. Dentre os observados, a diluição do extrato (*dilute and shoot*) parece ser a mais promissora para análises multianalito[24]. A Tabela 2 descreve diferentes métodos de determinação estabelecidos na literatura para análise multianalito de arroz e outros alimentos.

**Tabela 2:** Revisão bibliográfica das metodologias para determinações multianálito de micotoxinas e agrotóxicos em arroz e outros alimentos.

Analito	Matriz	Preparo da amostra	Equipamento / Modo de ionização	Referência
55 micotoxinas, entre as quais: Aflatoxina B1, Aflatoxina B2, Aflatoxina G1, Aflatoxina G2, Ocratoxina A, Desoxinivalenol	Alho-poró, trigo e chá	10, 2 ou 1g de amostra são homogeneizados, adição de 10 mL de H <sub>2</sub> O acidificada com 0,2% de ácido fórmico, repouso por 30min. Adição de 10mL de ACN e agitação por 30 min. Adicionado 4g de sulfato de magnésio e 1g de cloreto de sódio, segue centrifugação a 10000 rpm por 5 minutos. 2mL da fase orgânica são removidos, recebem 0,1g de C18 e 0,3g de sulfato de magnésio e centrifugado a 10000rpm por 5min. O sobrenadante é injetado.	Thermo Q-Exactive / ESI (+)	Analytica Chimica Acta 863 (2015) 29–40 / Zbynek Dzuman et al[23].
Aflatoxina B1, Aflatoxina B2, Aflatoxina G1, Aflatoxina G2, Ocratoxina A, Desoxinivalenol, HT-2, T-2, Zearalenona, Fumonisina B1, Fumonisina B2	Farinha de trigo	2 a 10 g de amostra recebem de 5 a 20mL de ACN acidificada em 1% de ácido acético. Agitação por alguns minutos. Adição de acetato de sódio e sulfato de sódio. A fase orgânica foi secada em nitrogênio, ressuspensa na fase móvel e injetada.	Thermo Exactive / ESI (+)(-)	J. Mass Spectrom. (2012), 47, 1232–1241 / Emiliano De Dominicis et al[25].

<b>Analito</b>	<b>Matriz</b>	<b>Preparo da amostra</b>	<b>Equipamento / Modo de ionização</b>	<b>Referência</b>
Aflatoxina B1, Aflatoxina B2, Aflatoxina G1, Aflatoxina G2	Especiarias	1 g de amostra homogeneizada recebe 10mL de ACN, o tubo é agitado por 30 s, submetido a banho de ultrassom por 30min. Segue centrifugação a 3700 rpm por 4 minutos. 500 µL do sobrenadante é diluído pelo mesmo volume de água, filtrado e submetido à injeção.	Sciex QTRAP 4000 / ESI(+)	Anal Bioanal Chem (2010) 397:93–107 / C. Ferrer et al[26].
Aflatoxina B1, Aflatoxina B2, Aflatoxina G1, Aflatoxina G2, Desoxinivalenol, Fumonisina B1, Fumonisina B2, HT-2, Ocratoxina A, T-2, Zearalenona	Arroz, Milho, Trigo, Amendoim	5 g de amostra, adição de 25 mL de PBS, agitação por 60 min, centrifugação por 10 min a 3000 rpm. 17,5 mL do sobrenadante são filtrados; adição de 17,5mL de MetOH, a mistura é agitada por 60 min e centrifugada por 10 min a 3000 rpm. A 10 mL do sobrenadante adicionados 90 mL de PBS, clean-up em coluna de imunoafinidade, injeção.	Waters Xevo QQQ / ESI(+)	Food Anal. Methods (2013) 6:727–736 / Yu Y. Tang et al[27].
15- acetildesoxinivalenol, Aflatoxina B1, Aflatoxina B2, Aflatoxina G1, Aflatoxina G2, Beauvericina, Citrinina, Desoxinivalenol,	Arroz, Trigo, Milho, Amendoim, Pistache.	1 g de amostra é homogeneizada, são adicionados 5 mL de solvente de extração (ACN:H <sub>2</sub> O, 85:15), agitação por 30 min, centrifugação por 5 min a 4500 rpm. Alíquota de 500 µL é transferida	Thermo Q- Exactive / ESI(+)(-)	J. Agric. Food Chem. (2015), 63, 8314–8332 / Chia-Ding et al[28].

<b>Analito</b>	<b>Matriz</b>	<b>Preparo da amostra</b>	<b>Equipamento / Modo de ionização</b>	<b>Referência</b>
Ercocristina, Ergocornina, Ergocriptina, Ergometrina, Ergosina, Ergotamina, Fumonisina B1, Fumonisina B2, Fusarenona-X, HT-2, Neosolaniol, Ocratoxina A, Ocratoxina B, Esterigmatocistina, T- 2, Verrucarina A, Zearalenona		para um tubo, adição de 500 µL de formiato de amônio 20 mM, centrifugação por 15 s, filtrado em filtro de seringa e injetado.		
90 agrotóxicos e micotoxinas incluindo: Aflatoxina B1, Aflatoxina B2, Aflatoxina G1, Aflatoxina G2, HT-2, Ocratoxina A, T-2	Pepino e Trigo.	Foram testados 3 métodos, o melhor foi QuEChERS, aqui descrito. Para trigo, 5 g de amostra são homogeneizados, adicionam-se 5 mL de H <sub>2</sub> O, hidratação por 1 h, adição de 10 mL de ACN acidificado com 1% de ác. acético. Agitação por 1 min; adição de 4 g de MgSO <sub>4</sub> , 1g de NaAc e agitação por 1 min. Centrifugação a 5000 rpm por 5 min. Sobrenadante é filtrado em filtro de seringa e injetado	Waters Acquity TQD / ESI (+)	Journal of Chromatography A, 1218 (2011) 1477–1485 / R. Romero- González et al[21].

<b>Analito</b>	<b>Matriz</b>	<b>Preparo da amostra</b>	<b>Equipamento / Modo de ionização</b>	<b>Referência</b>
90 agrotóxicos e micotoxinas, Incluindo: Aflatoxina B1, Aflatoxina B2, Aflatoxina G1, Aflatoxina G2, HT-2, Ocratoxina A, T-2	Purê de maçã para alimentação infantil, avelã, Milho, Pimenta.	0,5 g de amostra é homogeneizado, adicionam-se 2 mL de solvente de extração (ACN:H <sub>2</sub> O:Ac.Acético, 79:20:1). Agitação por 90 min e centrifugação por 2 min a 3000 rpm. Transfere-se uma alíquota de 350 µL do sobrenadante para frasco de vidro, adicionam-se 350 µL de solvente para diluição (ACN:H <sub>2</sub> O:Ac.Acético, 20:79:1) e injetado. Processo miniaturizado para diminuir volume de padrão necessário (redução de 10x).	Sciex QTrap 5500	J. Chromatogr. A 1362 (2014) 145–156 / Malachova et al[29].
331 toxinas, dentre elas: Aflatoxina B1, Aflatoxina B2, Aflatoxina G1, Afiatoxina G2, Ocratoxina A, Desoxinivalenol, nivalenol, T-2, HT-2, Zearalenona	Purê de maçã, avelãs, trigo e pimenta verde	0,5 g da amostra é extraído com 2 mL de ACN:H <sub>2</sub> O:Ac. Acético 79:20:1 por 90 min em um agitador rotatório e então centrifugado por 2 min a 3000 rpm. O extrato é transferido para vial de injeção e diluído com o mesmo volume de ACN:H <sub>2</sub> O:Ac. Acético 79:20:1.	SciexQTrap 5500 ESI(+) e ESI(-) em duas corridas separadas	LC-GC Europe, October 2016, 2 – 9 / Malachova et al[30].

### **3.4. Técnicas de ensaio**

#### **3.4.1. Cromatografia Líquida de Ultra Alta Eficiência**

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência faz uso de diferenças químicas e físicas dos componentes de uma mistura para separá-los [31]. Este método encontra largo emprego na indústria química, farmacêutica e de controle de qualidade por ser capaz de separar compostos em misturas complexas.

O mecanismo de separação por adsorção fundamenta-se na competição entre espécies do analito e as espécies da fase móvel pela ocupação dos sítios ativos disponíveis na fase estacionária[31], de maneira semelhante ao que ocorre na já experimentada Cromatografia em Camada Delgada.

Para a separação é utilizada a fase estacionária como recheio das colunas cromatográficas. São geralmente construídas em partículas de sílica ou alumina [32]. As partículas são porosas, com grande área superficial e alguns fabricantes já oferecem partículas com núcleo rígido e impermeável. A sílica é a fase estacionária mais comum, em virtude de suas características físicas favoráveis, que ainda pode ser modificada e funcionalizada, conferindo seletividade e especificidade aos métodos que às empregam [31].

A detecção neste tipo de análise fica a cargo de uma série muito ampla de detectores. Esses são dispositivos analíticos recorrentes em laboratórios analíticos que em muitos casos foram adaptados à detecção de baixas concentrações[32]. Estes são divididos em dois grupos, aqueles sensíveis às condições da fase móvel são conhecidos como Detectores de Propriedades Universais e os Detectores de Propriedade do Solute, que respondem apenas às características do soluto ignorando condições do eluente, como os detectores de ultravioleta-visível, detector de fluorescência e detectores de massa [31].

Muito em virtude do alto desempenho e grande aplicabilidade da espectrometria de massa, é cada vez mais frequente a utilização de detectores de massas acoplados a sistemas de HPLC para as determinações cromatográficas, como já é observado com sucesso na cromatografia gasosa[32]. A presença de métodos analíticos que empregam esta tecnologia híbrida é cada vez mais frequente em referências importantes, como na Official Methods of AOAC International.



### 3.4.2. Espectrometria de massas

O desenvolvimento da espectrometria de massas é antigo e remota a 1910, quando J.J. Thomson foi capaz de separar os isótopos de nitrogênio  $^{20}\text{Ne}$  e  $^{22}\text{Ne}$ . Características cruciais para seu estabelecimento são a necessidade de pequena quantidade de amostras para a realização dos ensaios e sua capacidade de reproduzir espectros de fragmentação quando concebidas em condições controladas. Atualmente, a espectrometria encontra larga aplicação no controle de poluentes ambientais, no controle da segurança alimentar, entre as ciências forenses, no monitoramento de reações químicas além dos campos de química atômica, nuclear, e mais recentemente em procedimentos médicos[33].

Seu princípio de funcionamento reside na separação de compostos ionizados em virtude de sua relação massa carga ( $m/z$ ). Para isso, o espectrômetro de massas faz uso de cinco partes principais: o sistema de admissão de amostra, o ionizador, equipamento responsável pela conversão de moléculas da amostra em íons e de sua disponibilização na fase gasosa, o analisador de massas, onde os íons são separados em virtude de sua relação massa carga, o detector, onde os íons gerados e separados são contados e o sistema de processamento de dados[33].

A fonte de íons tem como responsabilidade a produção de espécies carregadas a partir das moléculas de analito e sua disponibilidade na fase gasosa e opera, majoritariamente, pela ionização de uma molécula na fase gasosa com a inserção ou captura de elétrons, protonação, desprotonação, formação de adutos ou pela transferência de carga entre espécies do analitos e espécies carregadas providas pela fonte.

A fonte *electrospray* (ESI) operar pela produção de um spray, gerado pela incidência de um campo elétrico forte em um líquido que passa por um tubo capilar em baixo fluxo, sob pressão atmosférica. O solvente presente nas gotas é secado por um gás aquecido até que os íons se encontrem na fase gasosa, que adentra ao espectrômetro de massas. Este desenho de fonte é compatível com o acoplamento da espectrometria de massas cromatográfica líquida.

O desenvolvimento de metodologias que empregam analisadores de alta resolução é capaz de oferecer ionogramas de elevada qualidade, permitindo o estudo de virtualmente, todos os compostos presentes na amostra que sejam capazes de ser ionizados pela técnica de ionização adotada, oferecendo, ainda, dados para prospecção futura.

### 3.5. Validação

Apesar do crescente número de trabalhos disponíveis que apresentam o emprego de LC-MS para a determinação multianalito, pode-se observar que a grande maioria demonstra resultados suficientes para análises semi-quantitativas ou de *screening*, com a execução de protocolos de validação de forma resumida. Critérios de aceitabilidade para validação de métodos de ensaio para resíduos e contaminantes em alimentos são apresentados pelo Commission Regulation 401/2006[14] para as micotoxinas legisladas pela comunidade europeia de forma pragmática. Níveis de desempenho mínimo para ensaios por espectrometria de massas ainda são apresentados separadamente pela Diretiva 2002/657/CE[34], delimitando requerimentos necessários para identificação das espécies em estudo. De forma geral, os critérios para ensaios de agrotóxicos são apresentados pela SANCO/12571/2013[31, 35].

Apesar da ainda distante harmonização de procedimentos de validação, as referências internacionais apresentadas acima vêm sendo adotadas nos principais trabalhos de validação, o que aliada a disponibilização cada vez mais frequente de materiais de referência e ensaios de proficiência, tem contribuído para um cenário mais seguro para comparação e confirmação de resultados analíticos[31].

Métodos analíticos confiáveis são requeridos para conformidade com regulamentos nacionais e exigências internacionais em diversas áreas de análise. É internacionalmente reconhecido que um laboratório deve tomar medidas apropriadas para garantir o fornecimento de dados com a qualidade requerida. Dessa forma, a validação de métodos é um requisito importante na análise química e, por esta razão, vem recebendo considerável atenção na literatura por parte de comitês industriais e agências reguladoras[36].

A validação de método pode ser definida como um processo de estabelecimento das características de desempenho e limitações de um procedimento analítico por meio de suas figuras de mérito, assim como da identificação de fatores capazes de afetar essas características. De maneira geral, a validação verifica se o desempenho do método é adequado à finalidade para a qual ele é proposto.

Os objetivos da validação também incluem avaliar os riscos relacionados à incerteza da medição associada ao resultado. A validação do método, juntamente com a estimativa da incerteza, fornece uma maneira de avaliar se um dado método analítico é corretamente adequado a determinados requisitos. A adequação ao propósito, evidenciada pela validação, é a comprovação de que o desempenho do método atende aos critérios acordados entre o analista e seu cliente ou consumidor[36].

As principais figuras de mérito investigadas durante a validação de metodologias analíticas são, conforme definidas pelo Vocabulário Internacional de Metrologia[37]:

- Seletividade: Entendida como a extensão na qual um procedimento analítico pode determinar analitos particulares em misturas ou matrizes sem a interferência de outros componentes de comportamento semelhante. Portanto, é a capacidade do procedimento analítico de discriminar entre a substância a analisar e substâncias análogas.
- Efeito Matriz: São possíveis interferências causadas pelas diversas substâncias que compõem a matriz amostral, gerando, basicamente, fenômenos de diminuição ou ampliação do sinal instrumental ou resposta instrumental.
- Linearidade (Curva de Calibração): Linearidade é a propriedade do método de ensaio que possibilita a associação entre resposta instrumental e valor de um mensurando em uma faixa de concentração[38].
- Veracidade: Entendida como a concordância entre a média de um número suficientemente grande de resultados de um ensaio e o valor de referência aceito convencionalmente como verdadeiro. A veracidade está inversamente relacionada ao erro sistemático ou à correção ou ao fator de correção
- Precisão: Medida da dispersão entre resultados obtidos sob condição de reprodutibilidade.
- Limite de Detecção (LD); Limite de Quantificação (LQ): O limite de quantificação do procedimento analítico é definido como o nível mais baixo no qual foi demonstrado que os critérios de veracidade e precisão foram atendidos, sendo o limite de detecção definido como a concentração do analito que produz um sinal detectável
- Robustez: Estudo da robustez de um procedimento analítico procura avaliar o quanto sensível o resultado analítico é a variações nas condições experimentais do procedimento analítico.
- Incerteza de Medição: Parâmetro não negativo que caracteriza a dispersão dos valores atribuídos a um mensurando obtido por um procedimento de medição.

#### **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Controle de Qualidade e Segurança Alimentar, LACQSA, integrante da divisão laboratorial do Laboratório Nacional Agropecuário de Minas Gerais, LANAGRO/MG e laboratório de referência do MAPA em análises de micotoxinas em produtos de origem vegetal e animal.

#### 4.1. Equipamentos

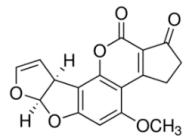
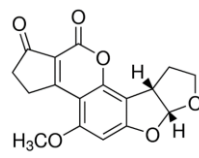
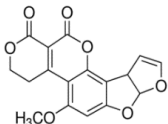
A quantificação foi realizada utilizando cromatografia líquida de ultra alta eficiência associada à detecção por espectrometria de massas sequencial. Para tal, foram empregados um sistema de cromatografia líquida do fabricante Agilent, modelo 1290 (Santa Clara, USA) e um espectrômetro de massas fornecido pela Sciex, modelo QTRAP 6500 (Toronto, Canada).

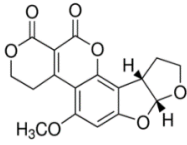
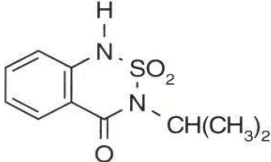
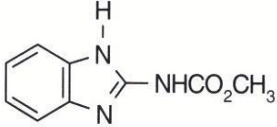
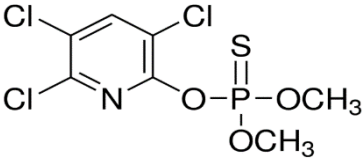
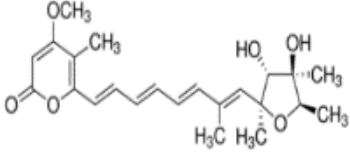
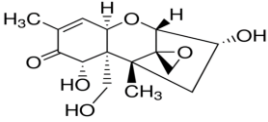
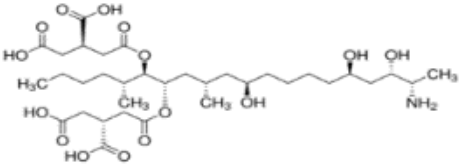
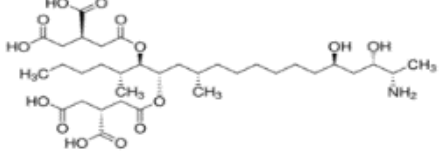
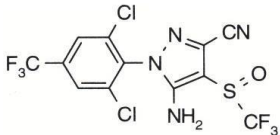
#### 4.2. Insumos


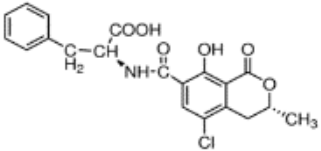
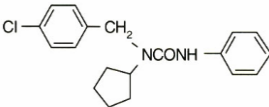
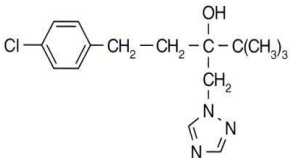
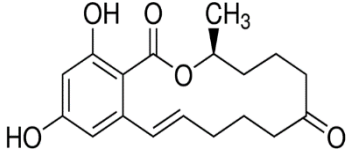
##### *Padrões*

Os padrões de aflatoxinas B1, B2, G1 e G2, citreoviridina e ocratoxina A foram obtidos junto à Biopure (Getzersdorf, Austria). Os padrões de fumonisinas B1 e B2, desoxinivalenol, zearalenona e dos agrotóxicos bentazona, carbendazim, clorpirifós metílico, fipronil, metalaxil, pencicrom e tebuconazol foram adquiridos junto à Sigma-Aldrich (Saint Louis, USA). A relação dos analitos pode ser vista na Tabela 3:

**Tabela 3:** Número CAS e estrutura dos analitos em estudo neste trabalho

Analito	Nº CAS	Estrutura
Aflatoxinas B1	1162-65-8	
Aflatoxinas B2	7220-81-7	
Aflatoxinas G1	1165-39-5	

Analito	N° CAS	Estrutura
Aflatoxinas G2	7241-98-7	
Bentazona	25057-89-0	
Carbendazim	10605-21-7	
Clorpirifós Metílico	5598-13-0	
Citreoviridina	25425-12-1	
Desoxinivalenol	51481-10-8	
Fumonisina B1	116355-83-0	
Fumonisina B2	116355-84-1	
Fipronil	120068-37-3	

Analito	Nº CAS	Estrutura
Metalaxil	70630-17-0	
Ocratoxina A	303-47-9	
Pencicuron	66063-05-6	
Tebuconazol	107534-96-3	
Zearalenona	17924-92-4	

### Reagentes

- Água ultrapura (tipo D);
- Ácido acético glacial p.a., Merck (Darmstadt, Alemanha);
- Metanol para espectrometria de massas, Merck (Darmstadt, Alemanha);
- Acetonitrila grau HPLC, Merck (Darmstadt, Alemanha);
- Metanol grau HPLC, Merck (Darmstadt, Alemanha);
- Tolueno grau HPLC, J.T.Baker (Center Valley, USA).

### Materiais

- Agitador de bancada, Eberbach (Eberbach, Alemanha);
- Agitador tipo vórtex, Lab-Line (Illinois, USA)
- Balança analítica com precisão de 0,0001 g para pesagem de padrões, Kern (Balingen, Alemanha);
- Centrífuga com rotores para tubos de 50 mL e capacidade de rotação de até 4000 rpm, Thermo (Waltham, USA);

- Micropipetas com capacidade de 20 a 10000  $\mu\text{L}$ , Gilson (Middleton, USA);
- Tubos de polipropileno com tampa para centrífuga com capacidade de 50 mL.
- Seringas de 3 mL.
- Membrana filtrante, acoplável à seringa, com porosidade de 0,22  $\mu\text{m}$ ;
- Coluna cromatográfica com recheio em C18, da marca Agilent, modelo Zorbax RRHD e dimensões 50mm x 2.1mm x 1.8 $\mu\text{m}$ , Agilent (Santa Clara, USA);
- Pré-coluna com recheio de C18, da marca Phenomenex (Torrance, EUA)

### 4.3.Soluções

#### *Soluções padrão estoque*

As soluções padrão estoque dos analitos foram preparadas por diluição dos padrões sólidos ou em solução utilizando, de forma geral, acetonitrila como diluente. Os casos de utilização de solventes diferentes estão discriminados na Tabela 4, onde também pode-se observar as concentrações objetivadas no preparo destas soluções estoque. As soluções padrão de aflatoxina B1, B2, G1 e G2, ocratoxina A, zearalenona, desoxinivalenol e citreoviridina, após serem preparadas foram padronizadas em espectrofotômetro-UV.

Para a padronização das soluções de micotoxinas referenciadas acima, foi determinada a absorbância (A) do solvente e da solução a ser padronizada em espectrômetro de ultravioleta tipo UV-1800 da Shimadzu (Quioto, Japão). Em seguida, utilizou-se a Equação 1[39] e os parâmetros espectrométricos apresentados na Tabela 4 para determinação da concentração padronizada da solução.

**Tabela 4: Parâmetros para preparo de solução estoque e posterior padronização.**

Micotoxina	Solvente de diluição	Massa molecular ( $\text{g.mol}^{-1}$ )	Absortividade molar ( $\lambda$ )
Aflatoxina B1	Acetonitrila	312	20700 (350 nm)
Aflatoxina B2	Acetonitrila	314	22500 (350 nm)
Aflatoxina G1	Acetonitrila	328	17600 (350 nm)
Aflatoxina G2	Acetonitrila	330	18900 (350 nm)
Ocratoxina A	Tolueno:ácido acético (99:1, v/v)	403	5440 (333nm)
Zearalenona	Metanol	318	6000 (314 nm)

Micotoxina	Solvente de diluição	Massa molecular (g.mol <sup>-1</sup> )	Absortividade molar (λ)
Desoxinivalenol	Acetonitrila	296	6400 (208 nm)
Citreoviridina	Metanol	402	44925 (383 nm)
*Fumonizina B1	Acetonitrila	-	-
*Fumonizina B2	Acetonitrila	-	-
*Bentazona	Acetonitrila	-	-
*Carbendazim	Acetonitrila	-	-
*Clorpirifós metílico	Acetonitrila	-	-
*Fipronil	Acetonitrila	-	-
*Metalazil	Acetonitrila	-	-
*Pencicuron	Acetonitrila	-	-
*Tebuconazol	Acetonitrila	-	-

\*Não absorvem na região do UV/VIS

Fonte: A.O.A.C.[39]

### Equação 1

$$\text{Concentração } \mu\text{g/mL} = A \times MM \times 1000 \times \varepsilon$$

Onde:

A: absorbância da solução;

MM: massa molecular do analito;

ε: absortividade molar do analito.

### Soluções pool

Uma solução *pool* de micotoxinas foi preparada pela diluição das soluções estoque das micotoxinas em acetonitrila, exceto fumonisinas B1 e B2 e desoxinivalenol. Devido à baixa solubilidade das fumonisinas B1 e B2 em acetonitrila, um *pool* de fumonisinas foi preparado pela diluição das soluções estoque destas duas micotoxinas em solução de acetonitrila:água (1:1, v/v). Em virtude da baixa estabilidade da solução de desoxinivalenol [39], esta foi diluída em acetonitrila no momento em que seria utilizada. As soluções estoque de desoxinivalenol foram re-preparadas mensalmente.



Uma solução *pool* de agrotóxicos foi preparada pela diluição das soluções estoque dos agrotóxicos em acetonitrila.

As concentrações de cada analito nas soluções *pool* são mostradas na Tabela 5:

**Tabela 5:** Concentração de cada analito nas soluções *pool*

<i>Pool</i>	<b>Solvente</b>	<b>Analito</b>	<b>Concentração(µg.mL<sup>-1</sup>)</b>
1	Acetonitrila	Aflatoxina B1	0,20
		Aflatoxina B2	0,20
		Aflatoxina G1	0,40
		Aflatoxina G2	0,39
		Citreoviridina	0,40
		Ocratoxina A	0,49
		Zearalenona	23,45
2	Acetonitrila/água (1:1, v/v)	Fumonizina B1	41,22
		Fumonizina B2	36,23
3	Acetonitrila	Desoxinivalenol	20,99
4	Acetonitrila	Bentazona	0,79
		Carbendazin	0,80
		Clorpirifós metílico	0,80
		Fipronil	0,80
		Metalazil	0,81
		Pencicuron	0,79
		Tebuconazol	0,80

As soluções estoques e *pools* foram armazenadas em frasco de vidro borossilicato âmbar, previamente tratados com ácido sulfúrico ou silanizados, e acondicionadas em freezer (-20 ± 2°C). As soluções foram manipuladas em temperatura ambiente e penumbra, sendo homogeneizadas previamente em agitador tipo vórtex.

#### *Soluções de eluição, diluição e extração*

As soluções empregadas como fase móvel nos ensaios cromatográficos, para a diluição de padrões e extratos e na etapa de extração foram:

- Água ultrapura acidificada com 0,5% v/v de ácido acético;
- Metanol acidificado com 0,5% v/v de ácido acético;

- Mistura de acetonitrila e água ultrapura, acidificada com 1% v/v de ácido acético (79:20:1, v/v);
- Mistura de acetonitrila e água ultrapura 1:1 v/v;
- Tolueno acidificado com 1% v/v de ácido acético.

### *Amostras*

#### Amostras de arroz empregadas na otimização e validação do método

Para a validação foram empregadas amostras de arroz pertencentes ao banco de amostras branco mantido pelo LACQSA.

Em observação à variação de composição inerente a produtos alimentícios de origem vegetal, sujeitas à variação em virtude de sua procedência, condições de cultivo e processamento, e com a finalidade de conferir maior abrangência na contemplação destas variações, foram combinadas oito amostras de arroz, divididas entre polido e integral, totalizando 1kg de amostra.

As amostras já previamente processadas foram descongeladas, combinadas em um *pool* e homogeneizadas, dispostas em frasco de plástico inerte, impermeável e resistente a luz, e acondicionado em câmara térmica (2-8°C) durante a realização dos estudos de validação.

#### Amostras de arroz empregadas no estudo de ocorrência

Foram utilizadas 42 amostras de arroz no estudo de ocorrência, provenientes de coleta realizada pelo MAPA, em cumprimento ao PNRC, com caráter de inspeção e fiscalização, e cedidas pelo LACQSA.

A fim de se manter a integridade das amostras, estas foram removidas das embalagens originais utilizadas pelo organismo fiscalizatório e pela agência postal apenas no laboratório, onde foram processadas conforme protocolo oficial do LACQSA por pessoal treinado e autorizado, assim buscou-se assegurar a manutenção das propriedades analíticas, confidencialidade e integridade da cadeia de custódia do material.

A massa total das amostras recebidas foi triturada em um moinho de corte tipo Retsch SM 2000 (Haan, Alemanha) até granulometria média de 10 mm, e sendo, posteriormente, homogeneizadas. Uma fração de cerca de 100 g da amostra foi submetida a processamento em moinho tipo BushiMixer B-400 (Valinhos, Brasil) com granulometria média de 8 mm. Em seguida, as amostras foram armazenadas em frascos de plástico inerte e acondicionadas em câmara fria ( $-8 \pm 2$  °C) até o momento da análise.

## 4.4.Método

### 4.4.1. Otimização das condições espectrométricas

Inicialmente, realizou-se infusões diretas das soluções padrão das micotoxinas e agrotóxicos em um fluxo de  $10 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ , preparadas individualmente em concentrações aproximadas de  $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . As soluções foram previamente aditivadas em 0,1% v/v de ácido acético a fim de favorecer a ionização das moléculas estudadas. Foi empregada a fonte de ionização ESI, operadas nas polaridades positiva e negativa.

Nesta etapa foram identificadas as condições de operação no espectrômetro mais adequadas a cada um dos compostos. Os parâmetros mais relevantes ajustados foram:

- *Declustering Potential (DP)*: Parâmetro que controla a voltagem aplicada ao orifício de entrada do espectrômetro de massas que regula a capacidade de remover íons de clusters formados entre as placas de entrada do equipamento. Relevante para minimizar a entrada de material neutro nas câmaras quadrupolares carregado pelos íons.
- *Entrance Potential (EP)*: Diferença de potencial elétrico aplicada entre a entrada do espectrômetro de massas e a entrada da zona sob alto vácuo. Regulada a fim de favorecer a admissão dos íons do analito em detrimento de íons espúrios.
- *Collision Energy (CE)*: Parâmetro ajustável que regula a diferença de potencial entre a entrada da zona de alto vácuo e a câmara de fragmentação. Utilizado em experimentos de análise de massa sequencial, este parâmetro representa a quantidade de energia fornecida por aceleração ao íon precursor para sua fragmentação por choque com moléculas de gás inerte na câmara de colisão quadrupolar. O ajuste deste parâmetro favorece a fragmentação dos íons precursores.
- *Collision Cell Exit Potential (CXP)*: Aplicável em experimentos de massa sequencial, representa a diferença de potencial elétrico aplicado entre a câmara de colisão e quadrupolo analisador seguinte e pode ser ajustado para favorecer a transmissão de íons filho específicos.

Após o ajuste das condições para cada um dos analitos, seguiu-se a otimização das condições da fonte. Para tal, foram realizados experimentos de *Flow Injection Analysis*(FIA).

Nesta etapa foi utilizada o sistema cromatográfico integrado ao espectrômetro, operando sem a coluna cromatográfica, sob um fluxo de fase móvel composta por metanol:água (1:1, v/v) com em 0,1% de ácido acético. O fluxo da fase móvel foi de  $300 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$  e o fluxo da solução *pool* de padrões ( $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) foi de  $10 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ . Os parâmetros otimizados nesta etapa foram:

- *Ion Spray Voltage (IS)*: Este parâmetro controla a voltagem aplicada ao capilar por onde passa a amostra. O seu controle ajuda na formação do *spray* e na disponibilidade de íons para o espectrômetro.
- *Curtain Gas (CUR)*: Controle o fluxo de gás que flui pela placa de entrada o espectrômetro, com o objetivo de evitar a entrada de matéria espúria do *spray* para as regiões internas do equipamento.
- *Gas 1 (GS1)*: Ajustável para controle do fluxo gás de nebulização, fornecido de forma coaxial ao fluxo de amostra, importante para a geração de gotas menores no *spray*.
- *Gas 2 (GS2)*: Parâmetro que controla o fluxo de gás que incide de forma perpendicular à formação do *spray*. Gás responsável pela secagem de solvente no *spray*.
- *Temperature (TEM)*: Controle a temperatura do gás de secagem do solvente. Deve ser ajustado para maximizar sua ação, porém evitando temperaturas de operação muito elevadas, capazes de degradar componentes da amostra.

As condições identificadas como ótimas para o ensaio de cada um dos analitos foram ajustadas no método de ensaio desenvolvido a fim de se obter máxima resposta instrumental, alta seletividade e preservação do *hardware*.

#### **4.4.2. Otimização das condições cromatográficas**

Para a otimização da separação cromatográfica foi utilizado sistema de UHPLC do fabricante Agilent, modelo 1290 (Santa Clara, USA), sendo avaliados parâmetros como dimensões da coluna cromatográfica assim como tamanho médio e composição de suas partículas, composição da fase móvel, fluxo de eluição, temperatura do forno de coluna e volume de extrato injetado.

Entre as colunas avaliadas, foram testadas a Gemini da Phenomenex (Torrance, EUA), fase estacionária C18 e dimensões de  $150\text{mm}\times 4,6\text{mm}\times 5,0\mu\text{m}$ , e a Zorbax RRHD da Agilent

(Santa Clara, EUA), fase estacionária C18 e dimensões de 50mmx2,1mmx1,8µm e núcleo rígido. Todas foram operadas em linha com pré-coluna C18.

Como componente orgânico da fase móvel foi avaliada a utilização de metanol e acetonitrila, acidificados entre 0,1 e 1,0% v/v em ácido acético. O fluxo e gradiente foram ajustados de forma contínua, até máxima resolução e separação de picos. O volume de injeção foi ajustado conforme a capacidade da coluna cromatográfica adotada.

#### 4.4.3. Condições cromatográfica e espectrométrica otimizadas

As condições de operação otimizadas estão apresentadas a seguir:

##### *Condições cromatográficas*

- Coluna cromatográfica: Zorbax RRHD, C18, 50 mm x 2,1 mm x 1,8 µm;
- Pré-coluna: Phenomenex, C18;
- Volume de injeção: 5µL  
Temperatura do forno de coluna: 30,0 °C;
- Fase móveis:
  - (A) Água acidificada em 0,5% v v<sup>-1</sup> de ácido acético;
  - (B) Metanol acidificado em 0,5% de ácido acético (v/v);
- Gradiente:

Tempo (min)	Composição de A (%)	Composição de B (%)
0.00	60.0	40.0
5.00	10.0	90.0
5.50	10.0	90.0
6.00	60.0	40.0
7.00	60.0	40.0

- Fluxo: 350 µL.min<sup>-1</sup>.

##### *Condições espectrométricas*

Dois experimentos foram realizados simultaneamente nas polaridades positiva e negativa, e os *scans* obtidos na forma de *Multiple Reaction Monitoring*. As voltagens aplicadas à sonda de ionização foram de 5000 V no caso positivo e -4500 V para a polaridade negativa.

Já as demais configurações de fonte foram as mesmas para os dois experimentos e estão apresentadas a seguir:

- CUR: 40.00
- CAD: *Medium*
- TEM: 500.00
- GS1: 45.00
- GS2: 45.00

As configurações para análise dos compostos de interesse são apresentadas a seguir, nas Tabela 6 e Tabela 7, para as polaridades positiva e negativa, respectivamente.

**Tabela 6:** Parâmetros para operação do espectrômetro de massas durante o experimento em polaridade positiva.

<b>Analito</b>	<b>Q1 (m/z)</b>	<b>Q3 (m/z)</b>	<b>DP</b>	<b>EP</b>	<b>CE</b>	<b>CXP</b>
Aflatoxina B1	312,8	<u>285,1</u>	122	10	32	15
	312,8	241,0	122	10	50	15
Aflatoxina B2	315,0	<u>258,9</u>	30	10	40	15
	315,0	287,0	30	10	35	25
Aflatoxina G1	328,8	<u>199,9</u>	70	10	54	15
	328,8	242,9	70	10	37	15
Aflatoxina G2	331,0	<u>189,0</u>	115	10	55	15
	331,0	245,2	115	10	41	15
Citreoviridina	403,0	<u>138,8</u>	131	10	29	18
	403,0	315,0	131	10	10	16
Clorpirifós metílico	321,5	<u>289,7</u>	37	10	22	18
	321,5	211,8	37	10	39	19
Desoxinivalenol	297,1	<u>249,0</u>	60	10	14	16
	297,1	231,0	60	10	16	16
Fumonisina B1	722,2	<u>334,3</u>	151	10	55	14
	722,2	352,2	151	10	49	16
Fumonisina B2	706,2	<u>336,2</u>	126	10	49	14
	706,2	318,2	126	10	51	14
Ocratoxina A	404,0	<u>239,0</u>	60	10	33	14
	404,0	102,0	60	10	101	16
Tebuconazol	308,1	<u>124,9</u>	61	3	57	12
	308,1	150,9	61	3	33	16
Carbendazim	192,0	<u>160,0</u>	60	10	25	10

Analito	Q1 (m/z)	Q3 (m/z)	DP	EP	CE	CXP
Metalaxil	192,0	132,0	50	10	44	12
	280,0	<u>248,0</u>	25	10	16	30
	280,0	220,0	25	10	18	25
Pencicuron	329,0	<u>125,0</u>	70	10	30	10
	329,0	218,0	60	10	46	12

Sublinhado o íon utilizado para quantificação.

**Tabela 7:** Parâmetros para operação do espectrômetro de massas durante o experimento em polaridade negativa.

Analito	Q1 (m/z)	Q3 (m/z)	DP	EP	CE	CXP
Zearalenona	317,0	<u>174,8</u>	-170	-10	-28	-15
	317,0	272,9	-170	-10	-22	-21
Bentazona	239,0	<u>197,0</u>	-60	-10	-28	-15
	239,0	132,0	-60	-10	-34	-10
Fipronil	434,8	<u>330,0</u>	-85	-10	-23	-20
	434,8	250,0	-85	-10	-38	-23

Sublinhado o íon utilizado para quantificação.

#### 4.4.4. Otimização do procedimento de extração

A otimização dos procedimentos de extração foi realizada pela elaboração de um planejamento de experimentos fatorial, cuja ordem e fatores foram manipulados conforme o procedimento de extração em otimização.

Foram reproduzidos três métodos promissores, reportados pela literatura, e com emprego bem-sucedido no tratamento de amostras complexas e analitos com grande diversidade de comportamento analítico. Foram escolhidas duas metodologias fundamentadas no *clean-up* QuEChERS e uma metodologia *dilute and shoot*, com a proposta de *clean-up* zero.

Trabalhou-se, primeiramente, uma metodologia QuEChERS, tratada aqui como Condição A, que consiste na moagem e homogeneização de 5 g de amostra, depositadas em tubo de centrifuga. A seguir, procedeu-se com as seguintes etapas: adição de 10 mL de água, adição de 10 mL de acetonitrila, acidificação em 1% v/v pela adição de ácido acético, homogeneização em vórtex por 1 min, adição de 4 gramas de sulfato de magnésio anidro, adição de 1g de acetato de sódio, agitação em vórtex por 1 min, centrifugação a 4000 rpm por 5 min, transferência de 1mL do sobrenadante para um tubo de micro centrifuga, adição de 150 mg de

sulfato de magnésio anidro, centrifugação a 4000 rpm por 5 min, filtração em filtro de seringa de 0,22 µm e injeção.

Foi testado um segundo método também fundamentado na metodologia QuEChERS, Condição B, que consiste na pesagem de 2 g de amostras, seguido de adição de 10 mL de água acidificada em 0,2% v/v de ácido fórmico, submissão a banho de ultra som por 30 minutos, adição de 10 mL de acetonitrila, submissão a ultra som por mais 30 minutos, adição de 4 g de sulfato de magnésio anidro, adição de 1 g de cloreto de sódio, agitação em vórtex por 1 min, centrifugação por 5 min a 10.000 rpm, transferência de 2 mL do sobrenadante para um tubo de micro centrifuga, adição de 300 mg de sulfato de magnésio anidro, centrifugação por 5 min a 10.000 rpm, filtração do sobrenadante em filtro de seringa com tamanho de poro de 0,22 µm e injeção.

Por fim, foi avaliado um terceiro método analítico, Condição C, de abordagem diferente dos demais, baseada em metodologia *dilute and shoot* que dispensa a etapa de *clean-up*, com o intuito de favorecer um extrato rico em possíveis analitos. Pesou-se 2 g de amostra, devidamente cominuída e homogeneizada, que foi disposta em um tubo de centrífuga. Seguiu-se a adição de 8 mL de solução extratora, composta por acetonitrila, água e ácido acético nas concentrações de 79:19:2 v/v, agitação em vórtex por 1 min, agitação em mesa agitadora por 90 min, centrifugação a 4000 rpm por 5 min, filtração do sobrenadante em filtro de seringa com tamanho de poro de 0,22 µm e injeção.

A fim de estimar o método de preparo mais promissor, amostras branco de arroz foram preparadas e fortificadas com uma solução *pool* de analitos em concentrações iguais a 10 µg kg<sup>-1</sup>. As amostras de arroz foram então extraídas com aplicação das metodologias supracitadas, injetadas e tratadas, em condições instrumentais e analíticas equivalentes.

Uma tentativa de se obter resultados mais favoráveis com o emprego da metodologia QuEChERS foi realizada. Foi realizado um planejamento de experimentos para a otimização da metodologia de extração primeiramente abordada, Condição A, que apresenta etapa de *clean-up* mais simples. Optou-se pelo emprego de um modelo fatorial fracionado de 2<sup>4-1</sup>, capaz de elucidar os parâmetros mais sensíveis para o desempenho do método em otimização sem que seja necessária a realização de um grande número de ensaios, o que demandaria grande quantidade de insumos e tempo. Os parâmetros elencados para avaliação foram: a proporção de água e acetonitrila na solução extratora, a concentração de ácido na solução extratora, o sal de secagem e o sal de *clean-up* (Tabela 8).



**Tabela 8:** Planejamento fracionário 2<sup>4-1</sup> empregado para a otimização de metodologia de extração tipo QuEChERS.

Ensaio	Solução de extração (v/v)	Concentração de ácido (%)	MgSO <sub>4</sub> / PSA (m/m)	Clean-up
1	H <sub>2</sub> O/ACN (2/8)	1%	1:1	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
2	H <sub>2</sub> O/ACN (5/5)	1%	1:1	MgSO <sub>4</sub>
3	H <sub>2</sub> O/ACN (2/8)	0%	1:1	MgSO <sub>4</sub>
4	H <sub>2</sub> O/ACN (5/5)	0%	1:1	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
5	H <sub>2</sub> O/ACN (2/8)	1%	1:0	MgSO <sub>4</sub>
6	H <sub>2</sub> O/ACN (5/5)	1%	1:0	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
7	H <sub>2</sub> O/ACN (2/8)	0%	1:0	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
8	H <sub>2</sub> O/ACN (5/5)	0%	1:0	MgSO <sub>4</sub>

Foi testada uma outra modificação do procedimento inicial descrito como Condição A, pela inserção de uma etapa de congelamento após a centrifugação da mistura obtida entre solução extratora e amostra, com objetivo de favorecer a migração de analitos da fase aquosa para a fase orgânica do extrato. Para tal, o tubo de centrifuga, com a mistura centrifugada e com as fases separadas, foi mantida a -20 °C por 12 horas. Após este período o sobrenadante orgânico líquido foi recolhido e submetido às demais etapas do processo, conforme descrito anteriormente.

Para a abordagem *dilute and shoot*, realizou-se um planejamento fatorial completo 2<sup>3</sup>, avaliando: a composição percentual de solventes orgânico e aquoso na fase extratora, seu volume relativo à massa de amostra e a concentração de ácido adicionado na solução. (Tabela 9).

**Tabela 9:** Planejamento fatorial 2<sup>3</sup> empregado para a otimização de extração “*dilute and shoot*”

Ensaio	Sol. Extratora (v/v)	Concentração de ácido (%)	Massa de amostra (g) /
			Volume de solução de extração (mL)
1	ACN:H <sub>2</sub> O (9:1)	2,0 %	2:12
2	ACN:H <sub>2</sub> O (8:2)	2,0 %	2:12
3	ACN:H <sub>2</sub> O (9:1)	1,0 %	2:12
4	ACN:H <sub>2</sub> O (9:1)	1,0 %	2:8
5	ACN:H <sub>2</sub> O (8:2)	2,0 %	2:12
6	ACN:H <sub>2</sub> O (8:2)	2,0 %	2:8
7	ACN:H <sub>2</sub> O (9:1)	1,0 %	2:8
8	ACN:H <sub>2</sub> O (8:2)	1,0 %	2:8

#### **4.5. Validação**

A validação se procedeu em acordo com o Manual de Garantia da Qualidade Analítica[1], e com as normativas internacionais SANCO/12571/2013[35] e Diretiva 2002/657/CE[34]. A performance do procedimento foi avaliada na forma da estimação de suas figuras de mérito.

##### *Seletividade*

Foram analisadas seis amostras branco a fim de se investigar a presença de interferentes. A seletividade foi estabelecida como aceitável se o sinal de interferentes não ultrapassasse 30% do sinal apresentado para o analito na concentração referente ao limite de detecção.

##### *Efeito Matriz*

Este foi evitado pela utilização de curvas de calibração matrizadas.

##### *Linearidade*

A linearidade foi avaliada por estudo das curvas de calibração, cujo preparo se deu com o objetivo de fornecer uma faixa de trabalho ampla e adequada a fins de prospecção de dados de ocorrência da contaminação de alimentos por micotoxinas e agrotóxicos, assim como contemplar os limites máximos tolerados previstos em legislação.

Soluções dos analitos foram preparadas pela diluição de soluções pool de toxinas e agrotóxicos com o uso de extratos obtidos de amostras branco. Foram preparadas soluções em seis níveis de concentração, além do branco, em triplicatas reais de preparo e injetadas em duplicata, durante três dias distintos, perfazendo 18 resultados para cada ponto da curva, obtidos em condição de precisão intermediária.

Para a elaboração da curva de calibração, 1800 µL de extrato obtido de amostra branco foi fortificado pela adição de 50 µL de cada uma das quatro soluções pool, perfazendo 2000 µL de extrato branco fortificado, cujas concentrações podem ser observadas na Tabela 10. Este extrato fortificado foi então diluído em diversas concentrações pela adição extrato branco, a diluição está apresentada na Tabela 11. Desta forma, a concentrações obtidas para a curva de calibração estão expressas da Tabela 12.

**Tabela 10:** Concentração obtida na fortificação de extrato branco para elaboração de curva de calibração em relação à quantidade de analito no arroz e em extrato.

<b>Analito</b>	<b>Concentração (<math>\mu\text{g.kg}^{-1}</math>)</b>	<b>Concentração (<math>\mu\text{g.mL}^{-1}</math>)</b>
Aflatoxina B1	9,81	0,005
Aflatoxina B2	9,91	0,005
Aflatoxina G1	19,93	0,010
Aflatoxina G2	19,71	0,010
Bentazona	39,41	0,020
Carbendazim	40,10	0,020
Clorpirifós metílico	40,00	0,020
Citreoviridina	20,17	0,010
Desoxinivalenol	1049,45	0,520
Fumonisina B1	2060,92	1,030
Fumonisina B2	1811,25	0,910
Fipronil	40,14	0,020
Metalaxil	40,25	0,020
Ocratoxina A	24,45	0,010
Pencicuron	39,70	0,020
Tebuconazol	40,00	0,020
Zearalenona	1172,59	0,590

**Tabela 11:** Preparo da curva de calibração

<b>Ponto</b>	<b>Volume de extrato fortificado (<math>\mu\text{L}</math>)</b>	<b>Volume de extrato branco (<math>\mu\text{L}</math>)</b>	<b>Volume final (<math>\mu\text{L}</math>)</b>
Branco	0	1000	1000
1	25	975	1000
2	50	950	1000
3	100	900	1000
4	250	750	1000
5	500	500	1000
6	900	100	1000

**Tabela 12:** Concentração dos analitos para cada um dos pontos preparados para a elaboração da curva de calibração.

Nível	Concentração ( $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ )					
	1	2	3	4	5	6
Aflatoxina B1	0,25	0,49	0,98	2,45	4,91	8,83
Aflatoxina B2	0,25	0,50	0,99	2,48	4,95	8,92
Aflatoxina G1	0,50	1,00	1,99	4,98	9,97	17,94
Aflatoxina G2	0,49	0,99	1,97	4,93	9,85	17,74
Bentazona	0,99	1,97	3,94	9,85	19,70	35,47
Carbendazim	1,00	2,01	4,01	10,03	20,05	36,09
Clorpirifós metílico	1,00	2,00	4,00	10,00	20,00	36,00
Citreoviridina	0,50	1,01	2,02	5,04	10,08	18,15
Desoxinivalenol	26,24	52,47	104,94	262,36	524,72	944,50
Fumonisina B1	51,52	103,05	206,09	515,23	1030,46	1854,83
Fumonisina B2	45,28	90,56	181,13	452,81	905,63	1630,13
Fipronil	1,00	2,01	4,01	10,03	20,07	36,12
Metalaxil	1,01	2,01	4,03	10,06	20,13	36,23
Ocratoxina A	0,61	1,22	2,45	6,11	12,23	22,01
Pencicuron	0,99	1,98	3,97	9,92	19,85	35,73
Tebuconazol	1,00	2,00	4,00	10,00	20,00	36,00
Zearalenona	29,31	58,63	117,26	293,15	586,29	1055,33

A avaliação de *outliers* foi realizada pela aplicação do teste de Grubbs. Os parâmetros das curvas foram estimados pelo Método dos Mínimos Quadrados Ponderados[1], sendo verificadas as premissas de normalidade pela aplicação do teste de Ryan & Joiner e independência dos resíduos da regressão pelo teste de Durbin & Watson. A adequação do ajuste ao modelo polinomial adotado foi realizado pela aplicação dos testes de t e F [1].

### *Veracidade e precisão*

A veracidade do método foi estimada por meio da avaliação da recuperação obtida no ensaio de amostras branco fortificadas em três níveis, preparadas em sextuplicata, durante três dias distintos. A precisão ainda foi estimada pelo estudo da dispersão dos resultados obtidos nestes ensaios, realizados em condição de repetitividade e precisão intermediária.

As concentrações de fortificação das amostras branco podem ser observadas na Tabela 13:

**Tabela 13:** Concentração de fortificação de amostras branco para estudos de veracidade e precisão.

<b>Analito</b>	<b>Concentração 1° nível (<math>\mu\text{g.kg}^{-1}</math>)</b>	<b>Concentração 2° nível (<math>\mu\text{g.kg}^{-1}</math>)</b>	<b>Concentração 3° nível (<math>\mu\text{g.kg}^{-1}</math>)</b>
Aflatoxina B1	0,49	0,98	1,47
Aflatoxina B2	0,50	0,99	1,49
Aflatoxina G1	1,00	1,99	2,99
Aflatoxina G2	0,99	1,97	2,96
Bentazona	1,97	3,94	5,91
Carbendazim	2,01	4,01	6,02
Clorpirifós metílico	2,00	4,00	6,00
Citreoviridina	1,01	2,02	3,03
Desoxinivalenol	52,47	104,94	157,42
Fumonisina B1	103,05	206,09	309,14
Fumonisina B2	90,56	181,13	271,69
Fipronil	2,01	4,01	6,02

<b>Analito</b>	<b>Concentração 1° nível (µg.kg<sup>-1</sup>)</b>	<b>Concentração 2° nível (µg.kg<sup>-1</sup>)</b>	<b>Concentração 3° nível (µg.kg<sup>-1</sup>)</b>
Metalaxil	2,01	4,03	6,04
Ocratoxina A	1,22	2,45	3,67
Pencicuron	1,98	3,97	5,95
Tebuconazol	2,00	4,00	6,00
Zearalenona	58,63	117,26	175,89

Os valores obtidos nos ensaios de recuperação foram combinados e foi calculada a média de recuperação para cada um dos analitos. Os valores médios de recuperação foram avaliados por parâmetros da normativa[34], conforme sua concentração de fortificação e foram entendidos como aceitáveis aqueles compreendidos entre 50% e 120%, para as fortificações em concentração menor do que 1 µg.kg<sup>-1</sup>, entre 70% e 110% para fortificações entre 1 µg.kg<sup>-1</sup> e 10 µg.kg<sup>-1</sup>, e recuperações entre 80% e 110% para concentrações de fortificação acima de 10 µg.kg<sup>-1</sup>.

A precisão foi expressa por meio da repetitividade e precisão intermediária. A repetitividade foi estabelecida pela estimativa da dispersão dos resultados obtidos, com o cálculo do desvio padrão relativo dos resultados de ensaio de amostra branco fortificada nos três níveis distintos, em um mesmo dia. Para se estimar a precisão intermediária do método de ensaio foi calculado o desvio padrão relativo dos resultados das amostras ensaiadas em dias diferentes.

Como critério de aceitabilidade para os ensaios de precisão, utilizou-se como limite os valores calculados pela equação de Horwitz[1] para cada nível de fortificação, devendo o desvio padrão relativo obtido em condições de precisão intermediária não superar aquele obtido pela função de Horwitz e o desvio padrão relativo obtido em condição de repetitividade não superar a 2/3 do previsto por esta equação. A equação de Horwitz é apresentada na Equação 2:

### **Equação 2**

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

Sendo:

$RSD_{Horwitz}$ : Desvio padrão previsto por Horwitz.

C: Concentração em fração mássica expressa sob a forma de uma potência de dez.

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

Os limites de detecção, de quantificação e decisão, assim como a capacidade de detecção foram calculados a partir dos parâmetros de regressão obtidos da combinação das curvas e calibração preparadas para os ensaios de anteriores, conforme orienta as referências adotadas neste trabalho[1, 34]. Foram empregadas as Equação 3 a 6.

### **Equação 3**

$$LD = 3 \cdot \frac{S_a}{b}$$

### **Equação 4**

$$LQ = 10 \cdot \frac{S_a}{b}$$

### **Equação 5**

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

### **Equação 6**

$$CC\beta = LMR + 3,28 \cdot \mu_{LMR}$$

Sendo:

LD: Limite de detecção.

LQ: Limite de quantificação.

$S_a$ : Desvio padrão do intercepto da curva de calibração.

b: Inclinação da curva de calibração.

LMR: Limite máximo de resíduo ou tolerado

$\mu_{LMR}$ : incerteza combinada ou desvio padrão no nível de concentração do LMR.

### *Incerteza de Medição*

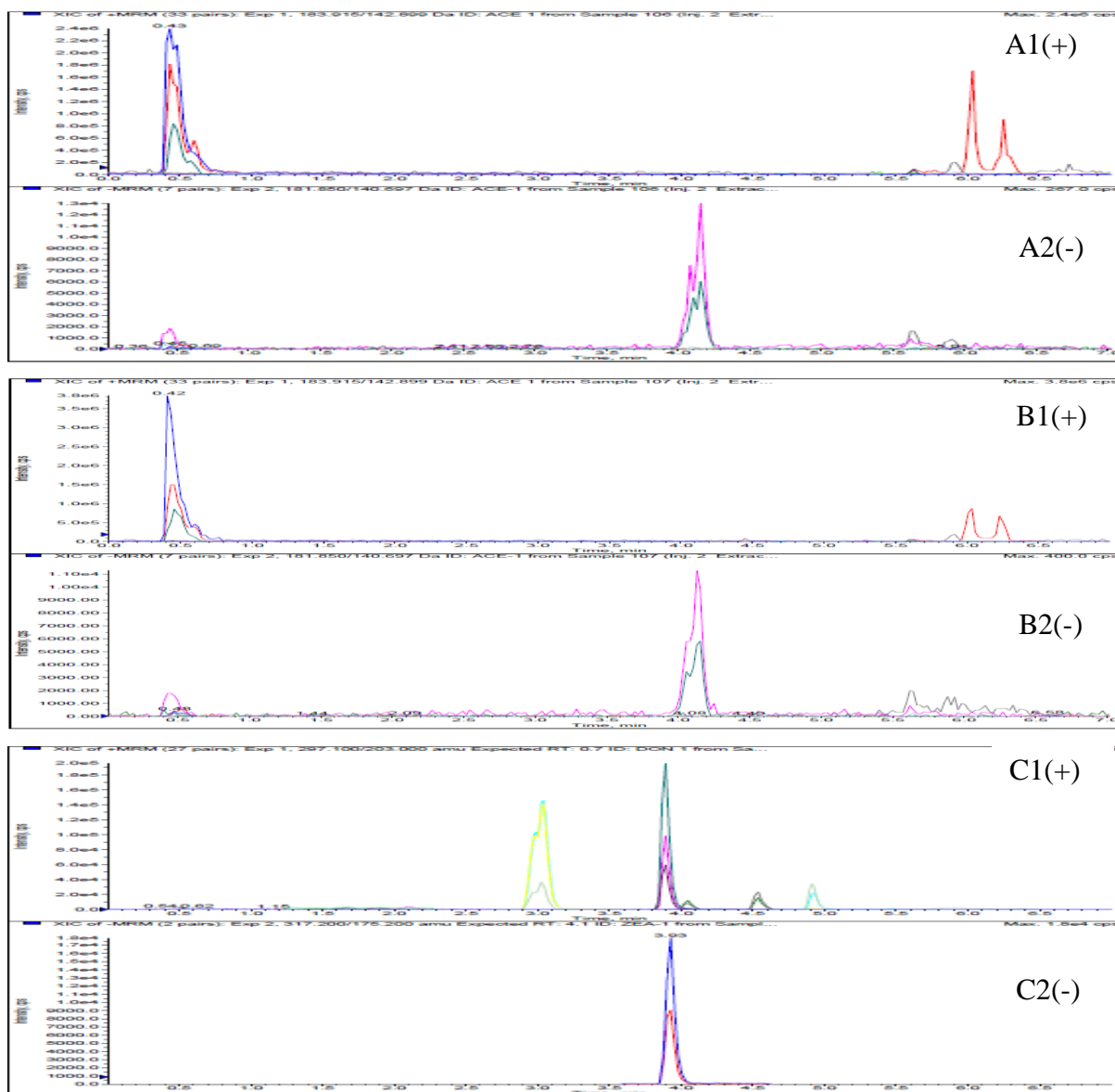
Foi utilizada a abordagem *Bottom-Up* para a etapa de estimativa de incerteza de medição e aplicada metodologia de cálculo proposta pelo Manual de Garantia da Qualidade Analítica[1]



## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1.Extração

Os extratos obtidos utilizando-se as condições de extração A, B e C, apresentadas anteriormente no item 4.4.4 da secção Materiais e Métodos, foram ensaiadas utilizando a metodologia analítica otimizada, empregando os parâmetros instrumentais descritos no item 4.4.3.



**Figura 1:** Cromatogramas de injeções de extratos obtidos nas condições A (A1 modo positivo e A2 negativo), B (B1 modo positivo e B2 negativo), baseadas em QuEChERS e C (C1 modo positivo e C2 negativo), fundamentada na metodologia *dilute and shoot*. As fortificações se deram na concentração aproximada de  $10 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ .

Na Figura 1 são apresentados os cromatogramas de íons extraídos (XIC, *Extracted Ion Chromatogram*) resultantes da análise realizadas nas três condições de extração avaliadas. As fortificações foram realizadas em triplicata, e em virtude da grande semelhança observada entre os cromatogramas das replicatas, a Figura 1 relata apenas os resultados de uma das replicatas para cada uma das condições, por serem estes entendidos como representativos.

Em análise dos resultados obtidos na polaridade positiva, pôde constatar que, apesar dos cromatogramas A1 e B1 apresentarem sinais nos tempos de retenção aproximados de 0,4 e 6,0 min, esses não podem ser atribuídos a nenhum dos analitos, uma vez que diferem em tempo de retenção e forma daqueles definidos durante a etapa de otimização cromatográfica, apresentados pela Figura 5. Estes sinais, predominantes nos cromatogramas, são referentes a substâncias extraídas da matriz e alheias ao escopo da validação. Por outro lado, no cromatograma C1 observa-se a presença de picos cromatográficos nos tempos de retenção aproximados de 3,1; 3,9; 4,0; 4,5 e 4,9 min, referentes aos analitos fumonisina B1, fumonisina B2, ocratoxina A, tebuconazol e Pencicuron, respectivamente.

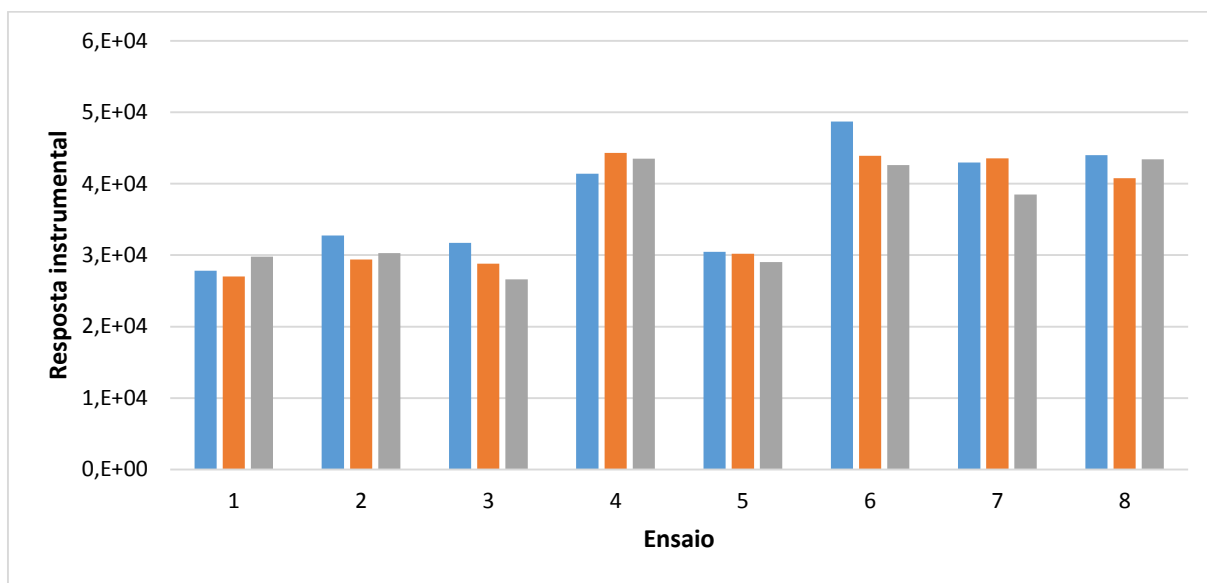
Já, ao se estudar os cromatogramas obtidos na polaridade negativa, nota-se que nos dados apresentados em A2 e B2, foram obtidos sinais cromatográficos no tempo de retenção aproximado de 4,0 min, condizentes com o tempo de retenção determinado para a zearalenona. Porém, os picos cromatográficos observados demonstram perfis pouco simétricos, o que pode estar associado à presença de interferentes. O mesmo comportamento não foi observado ao se estudar o cromatograma C2, que também apresenta um pico cromatográfico com tempo de retenção aproximado de 4,0 min, porém com perfil mais simétrico do que aqueles representados em A2 e B2. O cromatograma C2 ainda apresenta ruído em nível menor do que aqueles observados nos casos de A2 e B2.

Frente a estas constatações, pode-se inferir que as extrações baseadas na metodologia *dilute and shoot*, conduzidas sob a condição C, provedoras dos extratos cujo ensaios geram os cromatogramas C1 e C2, representam um método de extração mais promissor, ao terem seus resultados comparados a aqueles obtidos pelas duas metodologias fundamentadas em QuEChERS, descritas como condições A e B, cujos resultados são apresentados pelos cromatogramas A1, A2, B1 e B2.

As otimizações dos métodos de extração A e C, conduzidas para que fosse elevada a eficiência de extração dos analitos, reforçou esta conclusão. Ao se otimizar a condição A de extração, apesar das acentuas variações de parâmetros propostas, não foi possível sequer a

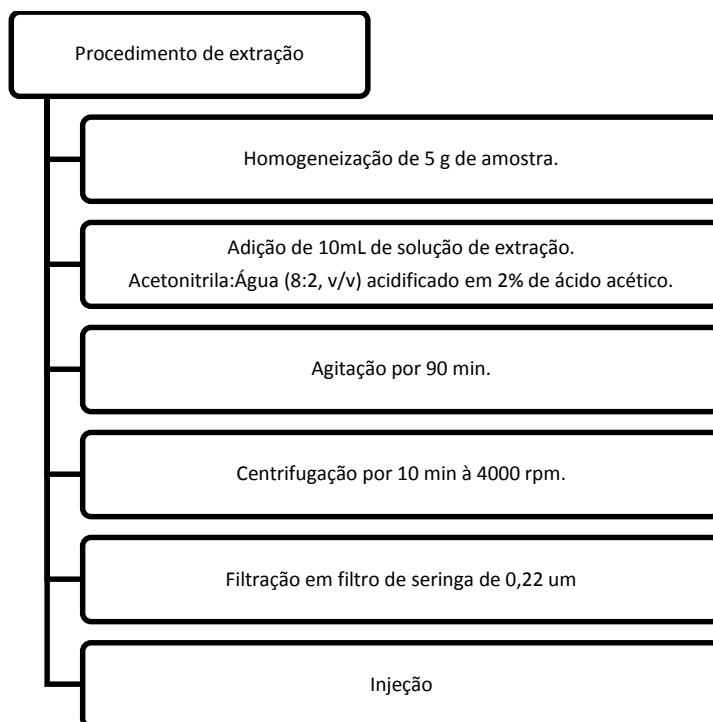
obtenção de nenhum pico cromatográfico referente aos analitos na polaridade positiva e a avaliação pela inadequabilidade da técnica de extração foi realizada por análise qualitativa.

Por outro lado, a otimização das condições de extração da metodologia correspondente à condição C se mostrou promissora. Adotou-se a área cromatográfica referente a aflatoxina B1 como parâmetro de avaliação de desempenho, uma vez que este analito é o que apresente limite máximo tolerado mais baixo entre os analitos abordados neste trabalho. A condição que favoreceu a extração deste analito foi aquela descrita pelo ensaio 6 na Tabela 9. Os resultados em termos de área cromatográfica de aflatoxina B1 podem ser contemplados na Figura 2.



**Figura 2:** Áreas obtidas para cada uma das condições avaliadas no planejamento de experimentos 2<sup>3</sup> para otimização da metodologia de extração *dilute and shoot*

Foi então escolhida a metodologia baseada em *dilute and shoot* para a realização da validação. Fatores observados durante a otimização da metodologia foram contempladas, assim como elementos de ordem prática, como adequação dos volumes e massas utilizadas aos dispositivos de medição disponíveis. A massa de amostra empregada foi ainda ajustada para 5 g em virtude da heterogeneidade inerente à contaminação de alimentos por micotoxinas. O procedimento de extração obtido está descrito na Figura 3.



**Figura 3:** Fluxograma representativo do procedimento de extração otimizado.

## 5.2. Validação

### *Seletividade*

O método foi estabelecido com a realização de experimentos em MRM, nas polaridades positiva e negativa. As demandas foram atendidas integralmente para todos os analitos, no que tange recomendações para confirmação de identidade das substâncias analisadas. Desta forma, a fim de se garantir seletividade, foram monitorados o íon precursor e duas de suas transições para cada um dos analitos, sendo uma considerada para fins quantitativos e outra reservada apenas para confirmação de identidade. Alcançou-se os 4 pontos de caracterização, atendendo a pontuação necessária para caracterização inequívoca de compostos, conforme apresentado pela Diretiva 2002/657/CE[34] e representada na Tabela 14.

**Tabela 14:** Pontos de caracterização por fragmentos monitorados

Técnica de MS	Pontos de identificação obtidos por íon
Espectrometria de massa de baixa resolução	1,0
LR-MS <sup>n</sup> íon precursor	1,0
LR-MS <sup>n</sup> produtos de transição	1,5
HRMS	2,0

HR- MS <sup>n</sup> íon precursor	2,0
HR-MS <sup>n</sup> produtos de transição	2,5

Adaptado da Diretiva 2002/657/CE[34]

LR-MS<sup>n</sup>: *Low Resolution sequential Mass Spectrometry*; HRMS: *High Resolution Mass Spectrometry*; HR- MS<sup>n</sup>: *High Resolution sequential Mass Spectrometry*.

Para se confirmar a identidade de um sinal cromatográfico em amostras de ensaio, a relação percentual entre as áreas dos íons de quantificação e qualificação devem ser coerentes com aquela estabelecida em validação, sendo permitida a pequena tolerância, descrita na

Tabela 15. Este parâmetro foi observado durante a validação e foram considerados apenas os resultados obtidos em atendimento a esta norma.

Como pode ser visto na Tabela 16, que apresenta a relação percentual obtida em validação, nem sempre foi adotada como transição de quantificação aquela que oferece sinal mais intenso. Notou-se que nos casos de ocratoxina A, metalaxil, desoxinivalenol, aflatoxina G1, aflatoxina B2 e fumonisina B1, a transição monitorada que oferecia sinal como menor intensidade apresentava desempenho cromatográfico superior, sendo escolhida para a demanda quantitativa.

**Tabela 15:** Tolerâncias máximas permitidas para as intensidades relativas de íons em ensaio por LC-MS/MS.

Intensidade relativa (% do pico de base)	Varição permitida (%)
>50%	±20%
>20% a 50%	±25%
>10% a 20%	±30%
≤ 10%	±50%

Adaptado da Diretiva 2002/657/CE[34]

**Tabela 16:** Relação entre íons obtida em validação.

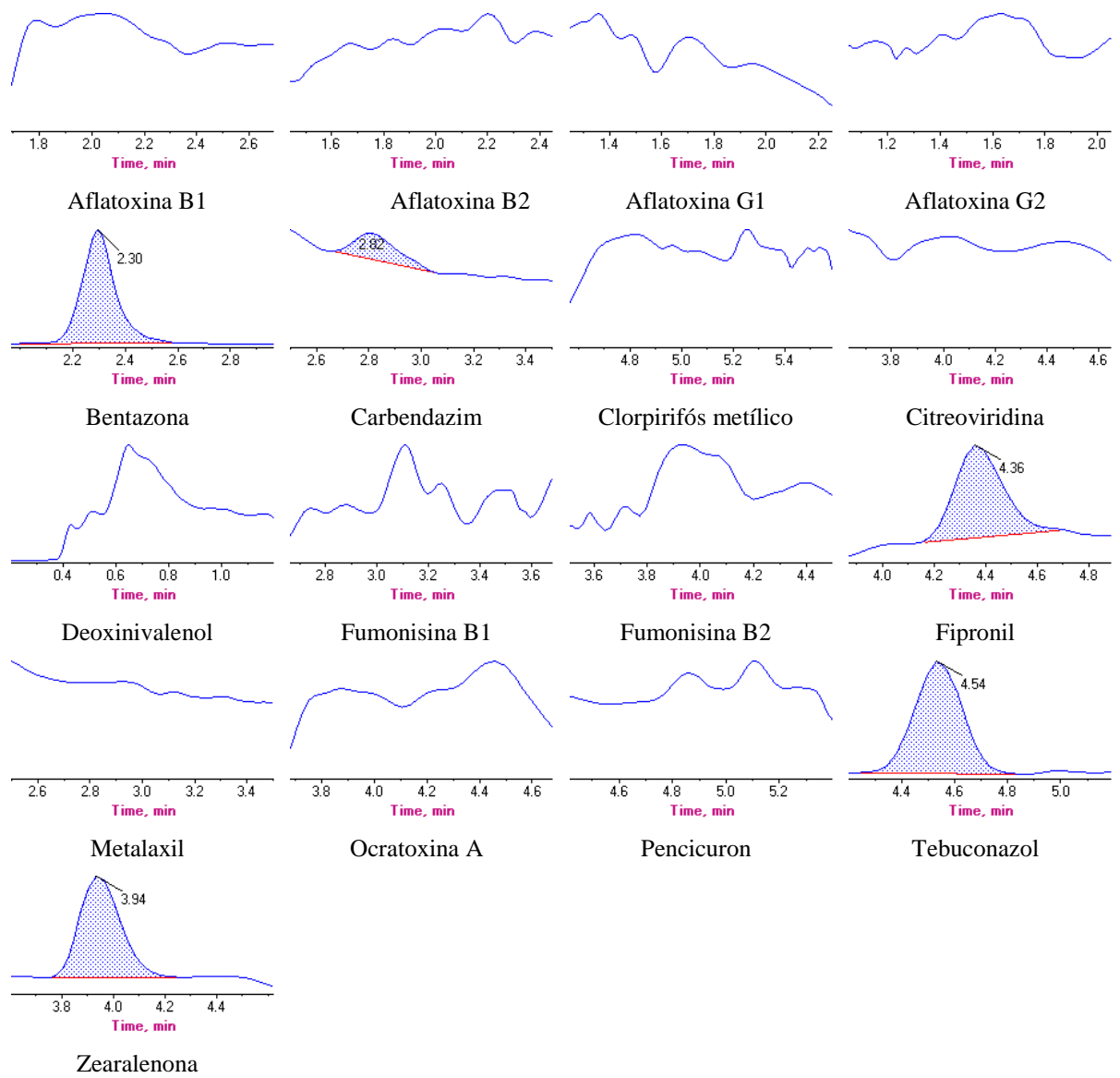
Analito	Relação entre íons
Aflatoxina B1	78,90%
Aflatoxina B2	118,63%
Aflatoxina G1	164,62%
Aflatoxina G2	86,33%
Bentazona	73,32%

Carbendazim	5,35%
Clorpirifós metílico	15,13%
Citreoviridina	24,37%
Desoxinivalenol	191,34%
Fumonisina B1	102,68%
Fumonisina B2	56,85%
Fipronil	26,63%
Metalaxil	235,80%
Ocratoxina A	483,37%
Pencicuron	3,68%
Tebuconazol	62,27%
Zearalenona	41,50%

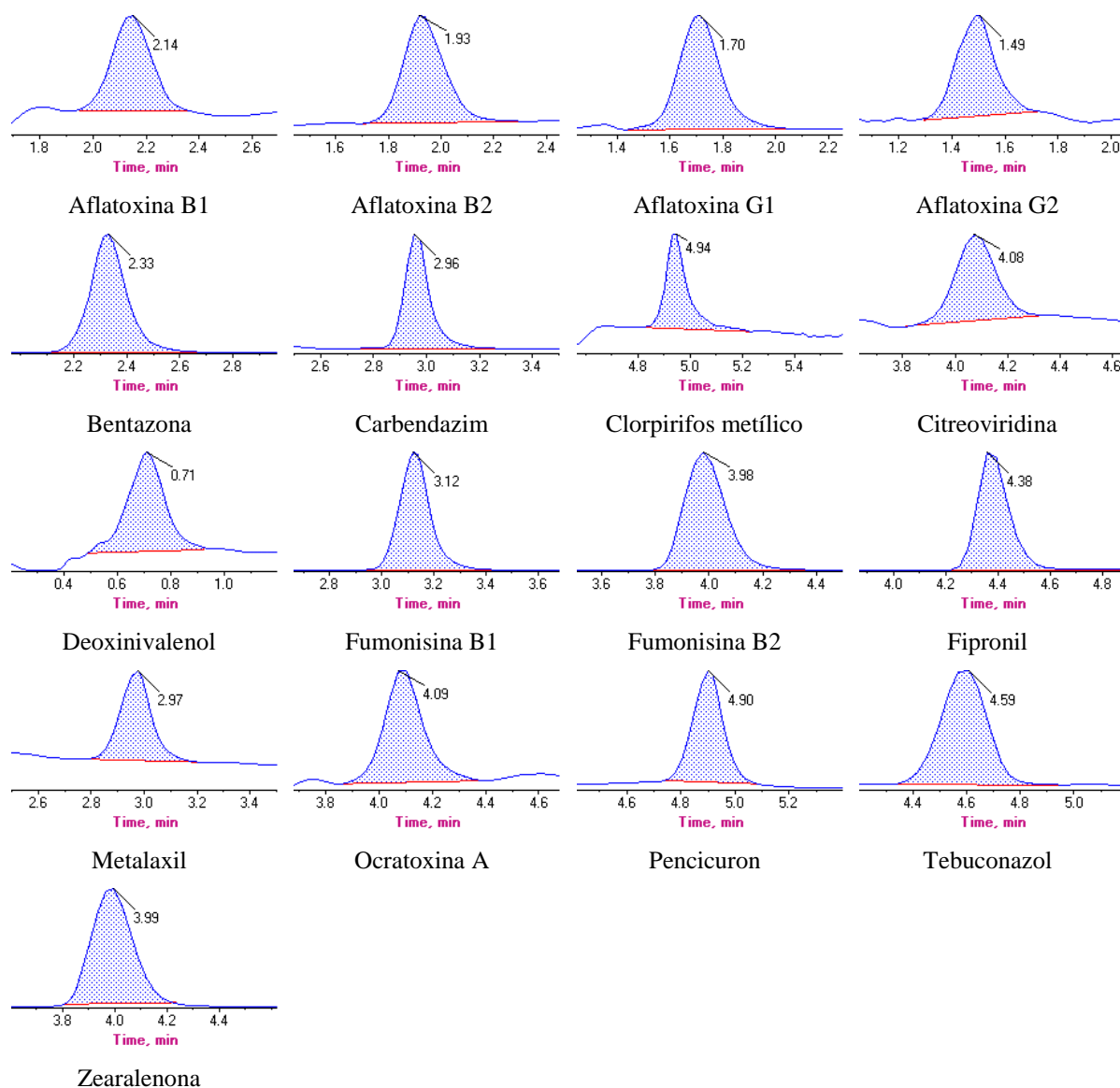
O estudo de cromatogramas obtidos em ensaios de amostras branco, Figura 4, confirmou a seletividade do método por constatar-se a inexistência de interferentes para nenhum dos analitos.

Porém, constata-se a presença dos agrotóxicos bentazona, fipronil e tebuconazol na amostra utilizada como branco. Esta ocorrência é esperada, uma vez que a validação se deu para agrotóxicos largamente aplicados na cultura arrozeira e a aquisição de amostras deste cereal cultivado sem a utilização destes defensivos é uma tarefa difícil. Cenário semelhante ao caso da zearalenona.

Apesar da presença dos analitos no material utilizado como branco analítico, o fato de suas concentrações estarem muito reduzidas frente às fortificações para ensaios de veracidade e preparo de curva calibração permitiram que sua utilização fosse segura, com a exceção de tebuconazol, cuja presença em altas concentrações no branco influenciou os resultados da validação. A Figura 5 representa os cromatogramas típicos obtidos nos ensaios de fortificação de amostra branco, no nível menos concentrado.



**Figura 4:** Cromatogramas típicos referentes aos íons de quantificação obtidos em ensaio de amostra branco.



**Figura 5:** Cromatogramas típicos referentes aos íons de quantificação obtidos em ensaio de amostra branco fortificadas no mais baixo nível de concentração para ensaios de exatidão.

### *Linearidade e efeito matriz*

As curvas de calibração foram preparadas pela diluição de soluções *pool* de padrões de micotoxinas e agrotóxicos em extrato a fim de evitar o efeito de matriz e o comprometimento da representatividade da curva de calibração construída.

Os dados obtidos para a construção das curvas de calibração foram previamente testados quanto à presença de dados *outliers* pela aplicação do teste de Grubbs[1], que foram prontamente retirados do tratamento sem que fosse excedido o limite tolerado de 22%. Também foi avaliada a normalidade da distribuição estatística dos resíduos, aplicando-se o teste de Ryan-Joiner[1], a qual foi confirmada em todos os casos.



Prevedo a possível divergência estatística dos desvios padrão de repetitividade da resposta instrumental entre os pontos da curva de calibração, representando heterocedasticidade, e a conseqüente necessidade de tratamento dos dados pelo método dos mínimos quadrados ponderados (MMQP) em detrimento do método dos mínimos quadrados ordinários (MMQO), e tendo em vista que o método de tratamento ordinário é um caso particular do método de tratamento ponderado[1], foi adotado o tratamento via ponderação para todas as curvas de calibração construídas durante a validação. Foi aplicado o protocolo de ponderação apresentado pelo Manual de Garantia da Qualidade Analítica[1].

Adotou-se um ajuste linear para o modelamento das curvas de calibração de todos os analitos, cuja qualidade de ajuste foi investigado pela aplicação do teste de t[1], demonstrando adequação da modelagem de dados em todos os casos. Foi ainda comprovada a inexistência de pontos de alavanca na distribuição dos pontos ao longo da curva de calibração, para isto foi aplicado o teste de independência de Durbin-Watson. Os parâmetros obtidos na elaboração das curvas de calibração estão apresentados na Tabela 17.

**Tabela 17:** Curvas de calibração obtidas durante um dos dias da validação.

<b>Analito</b>	<b>a</b>	<b>b</b>	<b>N</b>	<b>R<sup>2</sup></b>	<b>t calculado</b>	<b>t crítico</b>
Aflatoxina B1	1981,7	19414,2	36	0,99998	514,6	1,8
Aflatoxina B2	408,5	15856,8	36	0,99999	1540,2	1,8
Aflatoxina G1	666,4	10762,4	36	0,99999	4933,3	1,8
Aflatoxina G2	-56,7	4482,5	36	0,99999	1360,9	1,8
Bentazona	118769,1	94189,5	36	0,99999	667,8	1,8
Carbendazim	-10096,5	15571,9	36	0,99999	3491,5	1,8
Clorpirifós metílico	305,5	931,0	36	0,99987	180,0	1,8
Citreoviridina	1679,5	4188,0	36	0,99999	5193,6	1,8
Desoxinivalenol	1161,6	2425,7	36	0,99999	1144,7	1,8
Fumonisina B1	-18144,6	3006,8	36	0,99997	1166,7	1,8
Fumonisina B2	-48787,9	10.077,4	36	0,99999	1075,9	1,8
Fipronil	329,4	18181,2	36	0,99999	2189,5	1,8
Metalaxil	-5399,7	76955,6	36	0,99999	39484,6	1,8
Ocratoxina A	-187,4	4709,1	36	0,99999	722,2	1,8
Pencicuron	12780,7	244418,4	36	0,99999	2318,5	1,8
Tebuconazol	-195,5	1451,0	36	0,99999	5394,5	1,8
Zearalenona	8856,6	3837,4	36	0,99999	6851,5	1,8

r<sup>2</sup> = coeficiente de determinação, N = número de dados, t calculado = valor calculado para estatística de t, t crítico = valor crítico para estatística de t.

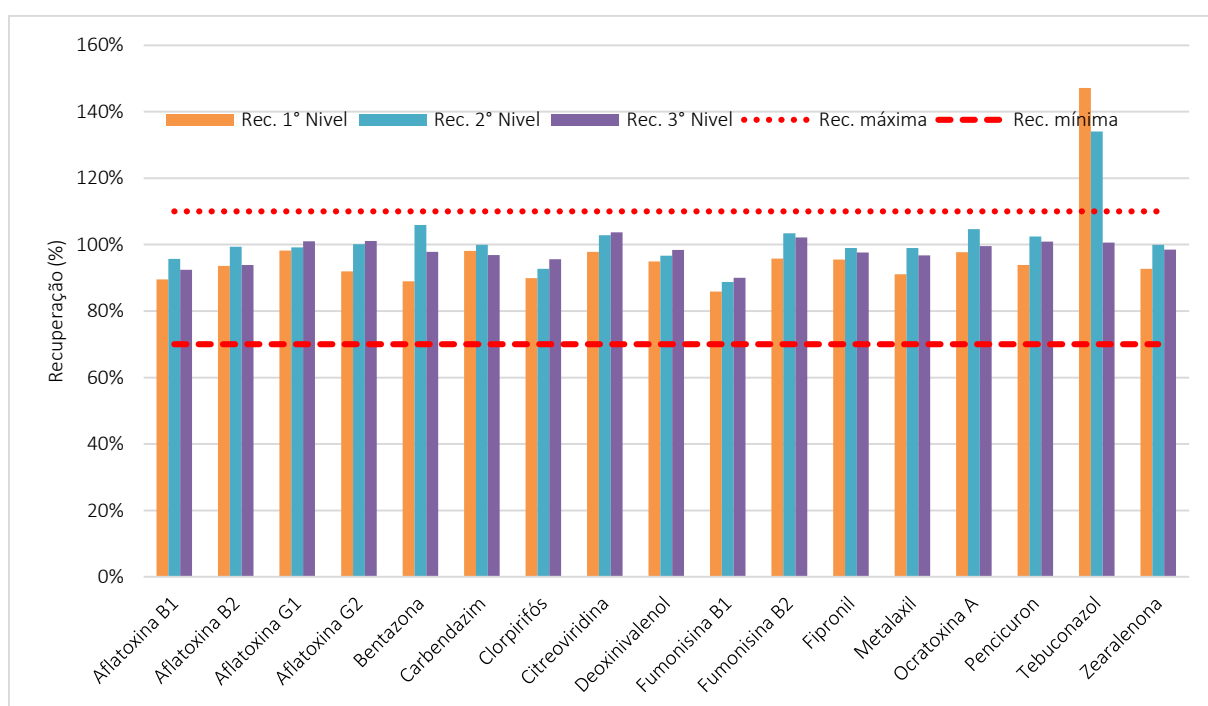
### *Veracidade*

A veracidade do método de ensaio foi estimada pelo cálculo de recuperação de amostras fortificadas em três níveis, preparadas em sextuplicata e considerada a área média das injeções em duplicata. Os ensaios foram repetidos em três dias distintos, em condição de precisão intermediária. Os resultados médios podem ser observados na Tabela 18 e na Figura 6, apresentados a seguir.

**Tabela 18:** Resultado de ensaios de recuperação.

<b>Analito</b>	<b>Média da recuperação</b>		
	<b>1° nível (%)</b>	<b>2° nível (%)</b>	<b>3° nível (%)</b>
Aflatoxina B1	89,51	95,71	92,44
Aflatoxina B2	93,55	99,41	93,85
Aflatoxina G1	98,22	99,18	101,00
Aflatoxina G2	91,95	100,18	101,09
Bentazona	88,97	105,95	97,80
Carbendazim	98,12	99,90	96,89
Clorpirifos metílico	89,90	92,71	95,64
Citreoviridina	97,83	102,85	103,67
Desoxinivalenol	94,89	96,69	98,41
Fumonisina B1	85,89	89,18	90,03
Fumonisina B2	95,77	103,42	102,19
Fipronil	95,54	99,01	97,59
Metalaxil	91,06	98,99	96,74

Analito	Média da recuperação		
	1º nível (%)	2º nível (%)	3º nível (%)
Ocratoxina A	97,74	104,62	99,59
Pencicuron	93,90	102,47	100,89
Tebuconazol	147,17	134,07	100,62
Zearalenona	92,69	99,93	98,51



**Figura 6:** Resultados obtidos em ensaios de recuperação, em condição de precisão intermediária.

Rec. = recuperação

Nota-se pelos dados expostos na Tabela 18, que os valores de recuperação obtidos para os ensaios de tebuconazol não atendem aos critérios de aceitabilidade propostos pelas normativas adotadas. A determinação teve seu resultado comprometido pela significativa presença deste analito na matriz utilizada como branco. O fato da recuperação apresentar desvio mais contundente em concentrações menores corrobora esta hipótese.

Estima-se que o desempenho insuficiente apresentado pelo método nos estudos de exatidão de tebuconazol tenha se dado de causas pontuais e não por capacidade limitada do procedimento de extração ou detecção. Futuros ensaios de recuperação podem demonstrar a

capacidade do procedimento em determinar também este analito. Os demais analitos desempenharam dentro do aceitável, com recuperações entre 85,89% no caso de fumonisina B1 e 104,62% para ocratoxina A.

### *Precisão*

A precisão foi estimada pelo cálculo da dispersão dos resultados obtidos nos ensaios de recuperação, executados em condição de repetibilidade e reprodutibilidade interna. Foi calculado o desvio padrão relativo de repetibilidade,  $DPR_r$ , entre os resultados dos ensaios realizadas a cada dia, por nível de fortificação. A precisão intermediária foi estimada pelo cálculo do desvio padrão de reprodutibilidade,  $DPR_R$ , entre os dados obtidos em três dias, para cada nível de fortificação.

Para fim de confirmação de desempenho analítico, usa-se como limite para o  $RSD_R$  os valores do desvio padrão relativo de Horwitz,  $RSD_R$  Horwitz. Como limite para o  $RSD_r$ , adota-se dois terços deste valor,  $RSD_r$  Horwitz[1]. Pôde-se observar que a precisão dos resultados se encontra dentro dos limites recomendados pelas normativas adotadas nos três níveis, testados para todas as substâncias, com exceção de tebuconazol, influenciada pela contaminação do branco analítico adotado. Os resultados podem ser observados na Tabela 19, Figura 7 e Figura 8.

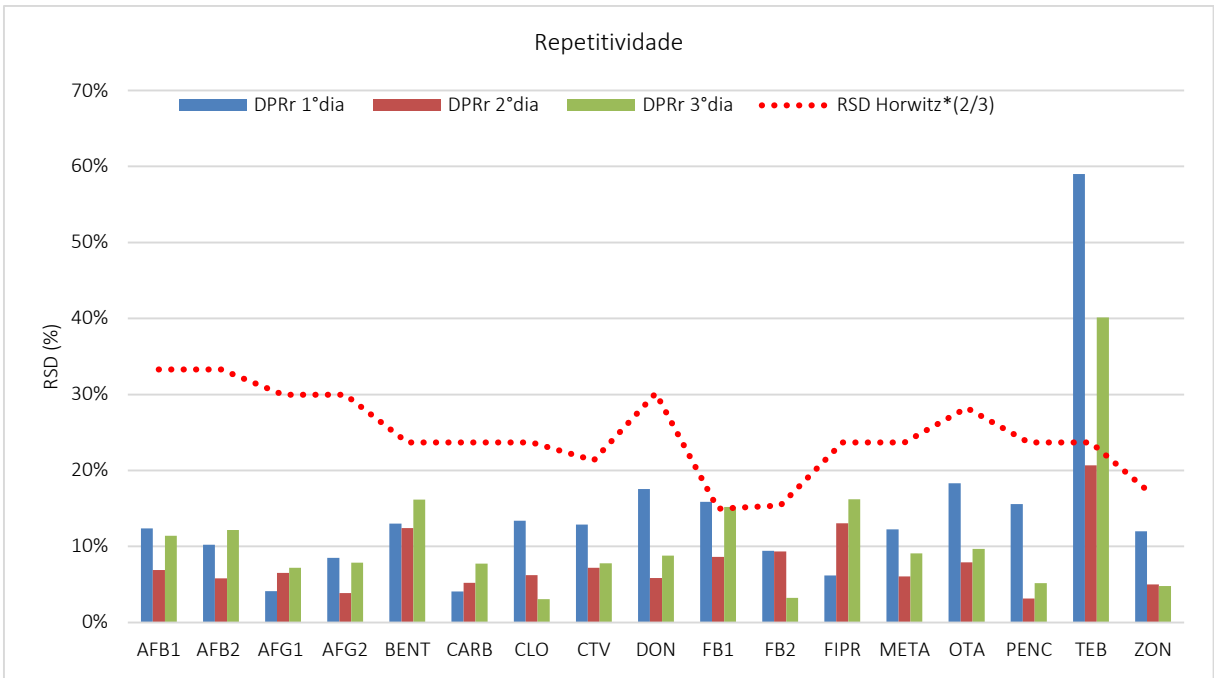
**Tabela 19:** Desvios padrão de repetibilidade e precisão intermediária calculados para estimativa de precisão do método analítico, assim como dos valores de Horwitz.

Analito	DPRr dia	DPRr dia	DPRr dia	DPRR	RSDrHorwitz	RSDRHorwitz
	1	2	3			
Aflatoxina B1	12,39%	6,88%	11,40%	11,16%	33,29%	49,94%
Aflatoxina B2	10,21%	5,79%	12,16%	10,21%	33,29%	49,94%
Aflatoxina G1	4,10%	6,52%	7,21%	6,13%	29,95%	44,92%
Aflatoxina G2	8,52%	3,85%	7,88%	7,35%	29,95%	44,92%
Bentazona	13,00%	12,39%	16,15%	19,52%	23,68%	35,52%
Carbendazim	4,06%	5,19%	7,73%	6,81%	23,68%	35,52%

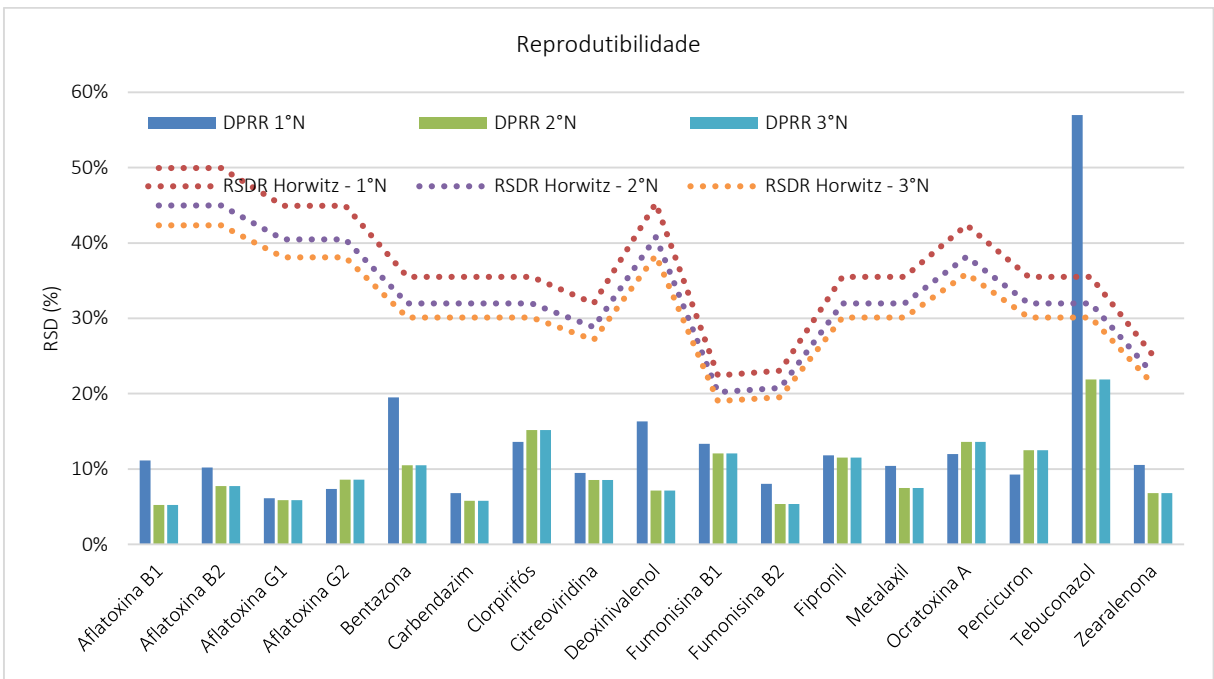
<b>Analito</b>	<b>DPRr dia 1</b>	<b>DPRr dia 2</b>	<b>DPRr dia 3</b>	<b>DPRR</b>	<b>RSDrHorwitz</b>	<b>RSDRHorwitz</b>
Clorpirifos metílico	13,37%	6,23%	3,06%	13,60%	23,68%	35,52%
Citreoviridina	12,87%	7,17%	7,79%	9,47%	21,33%	32,00%
Desoxinivalenol	17,57%	5,83%	8,78%	16,34%	30,17%	45,25%
Fumonisina B1	15,87%	8,61%	15,20%	13,36%	14,96%	22,44%
Fumonisina B2	9,40%	9,33%	3,23%	8,02%	15,37%	23,06%
Fipronil	6,19%	13,06%	16,22%	11,80%	23,68%	35,52%
Metalaxil	12,25%	6,05%	9,10%	10,40%	23,68%	35,52%
Ocratoxina A	18,31%	7,91%	9,67%	11,99%	28,24%	42,37%
Pencicuron	15,55%	3,13%	5,18%	9,27%	23,68%	35,52%
Tebuconazol	59,02%	20,67%	40,14%	56,96%	23,68%	35,52%
Zearalenona	12,00%	5,01%	4,79%	10,53%	16,73%	25,10%

$RSD_R$  Horwitz = Desvio padrão relativo conforme determinado pela equação de Horwitz para ensaio de precisão intermediária.

$RSD_r$  Horwitz = Desvio padrão relativo máximo conforme determinado pela equação de Horwitz para ensaio de repetibilidade.



**Figura 7:** Estimativa de repetitibilidade para nível baixo de fortificação obtido em ensaios de recuperação.



**Figura 8:** Estimativa de precisão intermediária obtido em ensaios de recuperação.

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

Os limites de quantificação e detecção, assim como os valores de CC $\alpha$  e CC $\beta$ , foram calculados utilizando os dados das curvas de calibração e estão representados na Tabela 20. Nos casos em que os limites de quantificação e detecção calculados apresentaram valores menores do que aqueles compreendidos pela curva de calibração, a menor concentração da curva foi utilizada como limite de detecção e o segundo menor ponto como limite de quantificação (Tabela 20).

Para o cálculo dos valores de CC $\alpha$  e CC $\beta$ , utilizou-se como limites máximos tolerados os valores apresentados no regulamento da Comissão Europeia N $^{\circ}$  1881/2006[3] para as micotoxinas. Para os agrotóxicos aqueles valores apresentados na base de dados de LMR da Comissão Europeia e em monografias autorizadas mantidas pela ANVISA.

Como citreoviridina e as fumonisinas B1 e B2 não possuem limite máximo tolerado previsto em legislação nacional ou europeia para arroz, para fins de cálculo utilizou-se 10  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  como limite máximo de tolerado.

**Tabela 20:** Limite máximo tolerado, limites de detecção e de quantificação, CC $\alpha$  e CC $\beta$ .

Analito	Limite Máximo Tolerado		Limites calculados ( $\mu\text{g.kg}^{-1}$ )			Limites estabelecido( $\mu\text{g.kg}^{-1}$ )		
	Limite ( $\mu\text{g.kg}^{-1}$ )	Referência	LD	LQ	LD	LQ	CC $\alpha$	CC $\beta$
Aflatoxina B1	2*	Reg, (EU) No 1881/2006[3]	0,09	0,3	0,25	0,49	2,24	2,48
Aflatoxina B2	2*	Reg, (EU) No 1881/2006[3]	0,07	0,22	0,25	0,5	2,28	2,57
Aflatoxina G1	2*	Reg, (EU) No 1881/2006[3]	0,08	0,27	0,5	1	2,33	2,66
Aflatoxina G2	2*	Reg, (EU) No 1881/2006[3]	0,12	0,41	0,49	0,99	2,54	3,07

Analito	Limite Máximo Tolerado		Limites calculados ( $\mu\text{g.kg}^{-1}$ )			Limites estabelecido( $\mu\text{g.kg}^{-1}$ )		
	Limite ( $\mu\text{g.kg}^{-1}$ )	Referência	LD	LQ	LD	LQ	CC $\alpha$	CC $\beta$
Bentazona	100	Reg, (EU) No 1146/2014[40]	1,9	6,34	1,9	6,34	108,86	117,71
Carbendazim	500	Monografia C24[41]	1,51	5,05	1,51	5,05	787,22	1074,44
Clorpirifós	3000	Reg, (EC) No 839/2008[42]	2,08	6,93	2,08	6,93	3400,74	3801,47
Citreoviridina	10	-	0,85	2,84	0,85	2,84	23,09	36,18
Desoxinivalenol	750	Reg, (EU) No 1881/2006[3]	0,98	3,28	26,24	52,47	1716,36	2682,72
Fumonisina B1	10	-	8,27	27,56	51,52	103,05	10,3	10,6
Fumonisina B2	10	-	3,48	11,58	45,28	90,56	18,81	27,62
Fipronil	10	Monografia F43[43]	1,38	4,6	1,38	4,6	15,66	21,31
Metalaxil	50	Reg, (EU) 2016/486[44]	1,38	4,6	1,38	4,6	76,32	102,64
Ocratoxina A	3	Reg, (EU) No 1881/2006[3]	0,22	0,74	0,61	1,22	3,56	4,12
Pencicuron	50	Reg, (EC) No 149/2008[45]	0,92	3,06	0,92	3,06	67	84



Analito	Limite Máximo Tolerado		Limites calculados ( $\mu\text{g.kg}^{-1}$ )			Limites estabelecido( $\mu\text{g.kg}^{-1}$ )		
	Limite ( $\mu\text{g.kg}^{-1}$ )	Referência	LD	LQ	LD	LQ	CC $\alpha$	CC $\beta$
Tebuconazol	1000	Reg, (EU) 2016/1003[46]	2,63	8,77	2,63	8,77	1398,14	1796,27
Zearalenona	75	Reg, (EU) No 1881/2006[3]	5,01	16,71	29,31	58,63	88,19	101,39

\*A normativa referenciada apresenta limite máximo tolerado para aflatoxina B1, 2,0  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  e para o somatório das aflatoxinas B1, B2, G1 e G2, 4  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ . Para fins de cálculo foi adotado 2  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  como limite máximo tolerado para as demais aflatoxinas em estudo.

### *Incerteza de Medição*

O cálculo de incerteza medição foi realizado segundo recomendações do Guia para a Expressão da Incerteza de Medição (GUM) [38], utilizando metodologia *botton-up*. A função de medição obtida está apresentada pela Equação 7, enquanto as Equação 8 a 13 apresentam os coeficientes de sensibilidade calculados. A Tabela 21 apresenta os valores de incerteza de medição expandida, U, calculados no nível do LQ para todos os analitos. Ressalta-se que os valores obtidos estão em acordo com o valor mínimo determinado pela normativa da Comissão Europeia[34] e Manual de Garantia da Qualidade Analítica[1]. Pode-se observar que o fator de contribuição majoritária é a incerteza-padrão proveniente da curva de calibração.

#### **Equação 7**

$$C = \frac{(AREA - a)}{b} \cdot \frac{V_{ext}}{M_{am}} \cdot FC_{rec} \cdot FC_{dil} \cdot FC_{repro}$$

#### **Equação 8**

$$\frac{\partial C}{\partial CC} = \frac{V_{ext}}{M_{am}} \cdot FC_{Rec} \cdot FC_{Dil} \cdot FC_{Repro}$$

**Equação 9**

$$\frac{\partial C}{\partial V_{ext}} = CC \cdot \frac{1}{M_{am}} \cdot FC_{Rec} \cdot FC_{Dil} \cdot FC_{Repro}$$

**Equação 10**

$$\frac{\partial C}{\partial M_{am}} = -CC \cdot \frac{1}{M_{am}^2} \cdot V_{ext} \cdot FC_{Rec} \cdot FC_{Dil} \cdot FC_{Repro}$$

**Equação 11**

$$\frac{\partial C}{\partial FC_{Rec}} = CC \cdot \frac{1}{M_{am}} \cdot V_{ext} \cdot FC_{Dil} \cdot FC_{Repro}$$

**Equação 12**

$$\frac{\partial C}{\partial FC_{Dil}} = CC \cdot \frac{1}{M_{am}} \cdot V_{ext} \cdot FC_{Rec} \cdot FC_{Repro}$$

**Equação 13**

$$\frac{\partial C}{\partial FC_{Repro}} = CC \cdot \frac{1}{M_{am}} \cdot V_{ext} \cdot FC_{Rec} \cdot FC_{Dil}$$

Sendo:

AREA: Área cromatográfica do pico da amostra.

a: Intercepto da curva de calibração.

b: Inclinação da curva de calibração.

V<sub>ext</sub>: Volume de solução de extração (mL).

M<sub>am</sub>: Massa de amostra (kg).

FC<sub>rec</sub>: Fator de correção devido ao erro sistemático corrigido pela recuperação. Igual a 1 quando o mensurando não for corrigido.

FC<sub>dil</sub>: Fator de correção devido às possíveis diluições. Igual a 1 se não houver diluições.

FC<sub>repro</sub>: Fator de correção devido à reprodutibilidade interna do laboratório, igual a 1.

**Tabela 21:** Incerteza de medição expandida (U) calculada no nível do LQ

Analiso	LQ ( $\mu\text{g.kg}^{-1}$ )	U ( $\mu\text{g.kg}^{-1}$ )	U (%)
Aflatoxina B1	0,49	0,13	24,09%
Aflatoxina B2	0,50	0,13	24,64%
Aflatoxina G1	1,00	0,14	12,96%
Aflatoxina G2	0,99	0,13	12,15%
Bentazona	6,34	2,44	38,56%
Carbendazim	5,05	1,74	34,40%
Clorpirifós metílico	6,93	2,77	40,00%
Citreoviridina	2,84	0,77	7,65%
Desoxinivalenol	52,47	5,83	31,43%
Fumonisina B1	103,05	29,57	25,71%
Fumonisina B2	90,56	5,93	5,81%
Fipronil	4,6	1,56	31,28%
Metalaxil	4,6	1,51	30,19%
Ocratoxina A	1,22	0,27	17,58%
Pencicuron	3,06	0,95	18,94%
Tebuconazol	8,77	4,01	45,70%
Zearalenona	58,63	2,67	10,65%

### 5.3. Estudo de ocorrência

No estudo de ocorrência verificou-se que, das 42 amostras analisadas, 3 apresentaram nível de contaminação por desoxinivalenol acima do limite de quantificação variando entre 63,29 e 227,77  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ . Apesar da incidência desta toxina, seus teores se encontram abaixo do limite máximo tolerado (750  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ ). Foi ainda determinada uma amostra contaminada por aflatoxina B1 e uma amostra contaminada por zearalenona, nas concentrações de 0,54  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  e 76,31  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ , respectivamente. Nota-se que no caso da aflatoxina B1, a contaminação está abaixo do limite máximo tolerado. A contaminação por zearalenona foi superior ao limite máximo tolerado, entretanto, o valor estimado encontra-se no intervalo de incerteza, sendo, desta forma uma amostra não violada.

Os resultados obtidos para as 42 amostras ensaiadas, assim como de sua incerteza associada, estão apresentados na Tabela 22.

**Tabela 22:** Resultados obtidos no estudo de ocorrência para micotoxinas e agrotóxicos, com respectivas incertezas associadas.

Amostra	Aflatoxina B1	Aflatoxina B2	Aflatoxina G1	Aflatoxina G2	Bentazona	Carbendazim	Clorpirifós metílico	Citreoviridina	Desoximi valenol	Fumonisina B1	Fumonisina B2	Fipronil	Metalaxil	Ocratoxina A	Pencicuron	Zearalenona	Concentração ( $\mu\text{g.kg}^{-1}$ )
1	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ
2	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ
3	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ
4	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ
5	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ
6	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	76,31
7	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	227,77	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ
8	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ
9	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ
10	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ
11	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ
12	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ
13	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ
14	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ
15	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ
16	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ
17	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ
18	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ
19	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ
20	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ
21	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ
22	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ
23	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ
24	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ
25	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ
26	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ
27	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	63,29	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ
28	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ
29	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ
30	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ
31	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ
32	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ
33	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ
34	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ

Amostra	Aflatoxina B1	Aflatoxina B2	Aflatoxina G1	Aflatoxina G2	Bentazona	Carbendazim	Clorpirifós metílico	Citreoviridina	Desoxinivalenol	Fumonissina B1	Fumonissina B2	Fipronil	Metaxil	Ocratoxina A	Pencicuron	Zearalenona
Concentração ( $\mu\text{g.kg}^{-1}$ )																
35	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ
36	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	131,21	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ
37	0,54	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ
38	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ
39	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ
40	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ
41	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ
42	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ

NQ = Não quantificado.

## 6. CONCLUSÃO

Foi desenvolvida uma metodologia para extração simultânea de micotoxinas e agrotóxicos em arroz em uma única etapa, sem a necessidade de *clean-up*, utilizando sistema UHPLC-MS/MS e fonte de ionização *electrospray*.

A seletividade da metodologia foi confirmada através do ensaio de amostras branco e a não verificação da presença de interferentes nas regiões de eluição dos analitos em estudo.

As curvas de calibração foram preparadas com extrato obtido de amostras branco, evitando os efeitos causados pelo efeito matriz. A metodologia apresentou linearidade nas faixas de 0,26 a 9,36  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  para aflatoxinas B1 e B2; de 0,52 a 18,90  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  para aflatoxinas G1 e G2; de 1,00 a 36,00  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  para bentazona, carbendazim, clorpirifós metílico, fipronil, metalaxil, pencicuron e tebuconazol; de 0,50 a 18,00  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  para citreoviridina; de 26,23 a 944,50  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  para desoxinivalenol; de 51,52 a 1854,82  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  para fumonisina B1; de 45,28 a 1630,12  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  para fumonisina B2; de 0,61 a 22,00  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  para ocratoxina A e de 29,31 a 1055,32  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  para zearalenona. Foram testadas e aprovadas todas as premissas para a regressão linear.

Os valores médios alcançados para recuperação variaram entre 92,55 observados para aflatoxina B1 e 101,43 no caso de citreoviridina. Os resultados foram obtidos em ensaios de amostras fortificadas em três níveis de concentração, em três dias distintos.

Os desvios padrão relativos obtidos em condições de repetibilidade variaram entre 4,06 e 18,31%, referentes à carbendazim e ocratoxina A, respectivamente. Já os desvios obtidos em condição de precisão intermediária variaram entre 6,13 e 19,52%, obtidos em ensaio de aflatoxina G1 e bentazona, respectivamente.

Os valores das incertezas expandidas obtidas em cálculo se estendem desde 5,81 a 40,00% para fumonisina B2 e clorpirifós metílico, respectivamente. Constatou-se ainda que a fonte de incerteza que contribui majoritariamente para a incerteza do método foi a incerteza da curva de calibração.

Os resultados obtidos para tebuconazol não foram considerados, uma vez que os parâmetros de validação obtidos para este agrotóxico se encontram a quem do esperado. O comprometimento do desempenho do método na determinação se deu pela indisponibilidade de amostras branco, comprometendo a representatividade dos seus resultados analíticos.

Foi realizado estudo de ocorrência em 42 amostras de arroz provenientes do plano nacional de controle de resíduos e contaminantes, PNCRC. Dentre as amostras ensaiadas, em 3

delas foi quantificado desoxinivalenol em concentrações entre 63,29 a 227,77  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ ; em 1 amostra foi quantificado aflatoxina B1, na concentração de 0,54  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  e em uma amostra quantificou-se zearalenona, na concentração de 76,31  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ . Desta forma, em nenhuma amostra ensaiada determinou-se presença das micotoxinas ou agrotóxicos em estudo acima do limite máximo tolerado ou limite máximo de resíduo pelas normativas nacional ou europeia.

Desta forma, a metodologia validada demonstrou-se adequada para a determinação das micotoxinas dos agrotóxicos em estudo, podendo ser utilizada em análises fiscais para o controle de qualidade e a segurança alimentar, seguindo as principais normativas nacionais e internacionais de qualidade analítica. A utilização de metodologia de extração generalista propicia a expansão do escopo do método, tanto no sentido de contemplar outros analitos destas classes de resíduos e contaminantes como para matrizes diferentes.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Brasil, *Manual de garantia da qualidade analítica*, M.d.A.P.e. Abastecimento, Editor. 2011: Brasília.
2. Brasil, *RESOLUÇÃO - RDC Nº 7, DE 18 DE FEVEREIRO DE 2011*. 2011.
3. Européia, U., *Regulamento (CE) N.º 1881/2006 da comissão de 19 de dezembro de 2006*. 2006.
4. Partnership, G.R.S., *Rice Almanac*. 2013, Los Baños, Philippines.
5. Nations, F.a.A.O.o.t.U., *Rice international Commodity Profile*. 2006.
6. Brasil, *Lei Nº 7.802, de 11 de julho de 1989*. 1989.
7. Rathore, L.M.L.N.a.H.S., *Handbook of pesticides : methods of pesticide residues analysis*. 2010, Boca Raton, USA: CRC Press.
8. Organization, W.H., *The WHO recommended classification of pesticides by hazard and guidelines to classification: 2009*. 2010, Stuttgart, Germany.
9. Nowell, L.H., et al., *Pesticide Toxicity Index--a tool for assessing potential toxicity of pesticide mixtures to freshwater aquatic organisms*. *Sci Total Environ*, 2014. **476-477**: p. 144-57.
10. Organization, W.H., *Public health impact of pesticide used in agriculture*. 1990, England.
11. Pitt, J.I., *Toxigenic fungi and mycotoxins*. *British Medical Bulletin*, 2000. **56**.
12. Paterson, R.R.M. and N. Lima, *How will climate change affect mycotoxins in food?* *Food Research International*, 2010. **43(7)**: p. 1902-1914.
13. Technology, C.f.A.S.a., *Mycotoxins: Risks in Plant, Animal, and Human Systems*. 2003.
14. Européia, C., *401/2006/CE*. 2006.
15. Etzel, R.A., *Mycotoxins*. American Medical Association, 2002. **287**.
16. Turner, N.W., S. Subrahmanyam, and S.A. Piletsky, *Analytical methods for determination of mycotoxins: a review*. *Anal Chim Acta*, 2009. **632(2)**: p. 168-80.
17. IARC, *IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans*. 2002.
18. Soleimany, F., et al., *A UPLC-MS/MS for simultaneous determination of aflatoxins, ochratoxin A, zearalenone, DON, fumonisins, T-2 toxin and HT-2 toxin, in cereals*. *Food Control*, 2012. **25(2)**: p. 647-653.
19. Anastassiades, M., K. Maštovská, and S.J. Lehotay, *Evaluation of analyte protectants to improve gas chromatographic analysis of pesticides*. *Journal of Chromatography A*, 2003. **1015(1-2)**: p. 163-184.
20. Hou, X., et al., *A multi-residue method for the determination of 124 pesticides in rice by modified QuEChERS extraction and gas chromatography-tandem mass spectrometry*. *Food Chemistry*, 2013. **138(2-3)**: p. 1198-1205.
21. Romero-Gonzalez, R., et al., *Simultaneous determination of pesticides, biopesticides and mycotoxins in organic products applying a quick, easy, cheap, effective, rugged and safe extraction procedure and ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. *J Chromatogr A*, 2011. **1218(11)**: p. 1477-85.
22. Wilkowska, A. and M. Biziuk, *Determination of pesticide residues in food matrices using the QuEChERS methodology*. *Food Chemistry*, 2011. **125(3)**: p. 803-812.
23. Dzuman, Z., et al., *Multi-analyte high performance liquid chromatography coupled to high resolution tandem mass spectrometry method for control of pesticide residues, mycotoxins, and pyrrolizidine alkaloids*. *Anal Chim Acta*, 2015. **863**: p. 29-40.
24. Ferrer, C., et al., *Overcoming matrix effects using the dilution approach in multiresidue methods for fruits and vegetables*. *J Chromatogr A*, 2011. **1218(42)**: p. 7634-9.



25. De Dominicis, E., I. Commissati, and M. Suman, *Targeted screening of pesticides, veterinary drugs and mycotoxins in bakery ingredients and food commodities by liquid chromatography-high-resolution single-stage Orbitrap mass spectrometry*. J Mass Spectrom, 2012. **47**(9): p. 1232-41.
26. Ferrer Amate, C., et al., *Development and validation of a LC-MS/MS method for the simultaneous determination of aflatoxins, dyes and pesticides in spices*. Anal Bioanal Chem, 2010. **397**(1): p. 93-107.
27. Tang, Y.Y., et al., *Development of a Quantitative Multi-Mycotoxin Method in Rice, Maize, Wheat and Peanut Using UPLC-MS/MS*. Food Analytical Methods, 2012. **6**(3): p. 727-736.
28. Liao, C.D., et al., *Multi-mycotoxin Analysis of Finished Grain and Nut Products Using Ultrahigh-Performance Liquid Chromatography and Positive Electrospray Ionization-Quadrupole Orbital Ion Trap High-Resolution Mass Spectrometry*. J Agric Food Chem, 2015. **63**(37): p. 8314-32.
29. Malachova, A., et al., *Optimization and validation of a quantitative liquid chromatography-tandem mass spectrometric method covering 295 bacterial and fungal metabolites including all regulated mycotoxins in four model food matrices*. J Chromatogr A, 2014. **1362**: p. 145-56.
30. Malachová, A., et al., *Multi-Toxin Determination in Food — The Power of “Dilute and Shoot” Approaches in LC–MS–MS*. LC.GC Europe, 2015.
31. Núñez, O., et al., *Fast liquid chromatography-mass spectrometry*. 2015.
32. Skoog, D., F.J. Holler, and D. West, *FUNDAMENTOS DE QUÍMICA ANALÍTICA*. 2014.
33. Edmond de Hoffmann, V.S., *Mass Spectrometry Principles and Application*. Third Edition ed. 2007: John Wiley & Sons Ltd.
34. Européia, U., 2002/657/CE. 2002.
35. Européia, C., *SANCO/12571/2013 - Guidance document on analytical quality control and validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed.*, H.C.P. DIRECTORATE-GENERAL, Editor. 2013.
36. Rambla-Alegre, M., J. Esteve-Romero, and S. Carda-Broch, *Is it really necessary to validate an analytical method or not? That is the question*. J Chromatogr A, 2012. **1232**: p. 101-9.
37. INMETRO, *Vocabulário Internacional de Metrologia: conceitos fundamentais e gerais de termos associados (VIM 2012)*. 2012, INMETRO: Duque de Caxias, RJ.
38. Metrology, J.C.f.G.i., *Avaliação de dados de medição - Guia para a expressão de incerteza de medição*. 2008.
39. A.O.A.C, *Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL*. 2016: EUA.
40. Européia, U., *REGULAMENTO (UE) N.º 1146/2014 DA COMISSÃO*. 2014.
41. ANVISA, *C24 – CARBENDAZIM*. 2007.
42. Européia, U., *REGULAMENTO (CE) N.º 839/2008 DA COMISSÃO*. 2008.
43. ANVISA, *F43 - FIPRONIL*. 2005.
44. Européia, U., *REGULAMENTO (UE) 2016/486 DA COMISSÃO*. 2016.
45. Européia, U., *COMMISSION REGULATION (EC) No 149/2008*. 2008.
46. Européia, U., *REGULAMENTO (UE) 2016/1003 DA COMISSÃO*. 2016.