

**Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Exatas
Departamento de Química**

Gabriel Barros de Oliveira

**Desenvolvimento e Validação de um Método para Determinação das Fumonisinias
B1 e B2 em Milho e Derivados Empregando a Dispersão da Matriz em Fase sólida
e a HPLC-MS/MS**

Orientadora: Prof^a. Dra. Adriana Ferreira Faria

Coorientador: Prof. Dr. Ricardo Mathias Orlando

**Belo Horizonte
2016**

UFMG/ ICEx/ DQ. 1138^a

D. 628^a

Gabriel Barros de Oliveira

**Desenvolvimento e Validação de um Método para Determinação das
Fumonisinias B1 e B2 em Milho e Derivados Empregando a Dispersão da
Matriz em Fase sólida e a HPLC-MS/MS**

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

**Belo Horizonte
2016**

O482d Oliveira, Gabriel Barros de
2016 Desenvolvimento e validação de um método para
D determinação das fumonisinas B1 e B2 em milho e
derivados empregando a dispersão da matriz em fase
sólida e a HPLC-MSIMS [manuscrito] / Gabriel Barros de
Oliveira. 2016.
[xi], 88 f. : il.

Orientadora: Adriana Ferreira Faria.
Coorientador: Ricardo Mathias Orlando.

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

1. Química analítica - Teses 2. Micotoxinas - Teses
3. Cromatografia líquida de alta eficiência - Teses 4.
Milho - Teses 5. Segurança alimentar - Teses 6.
Espectrometria de massa - Teses I. Faria, Adriana
Ferreira, Orientadora II. Orlando, Ricardo Mathias,
Coorientador III. Título.

CDU 043

"Desenvolvimento e Validação de um Método para Determinação das Fumonisinas B1 e B2 em Milho e Derivados Empregando a Dispersão da Matriz em Fase Sólida e a HPLC-MS/MS"

Gabriel Barros de Oliveira

Dissertação aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:


Prof. Adriana Ferreira Faria - Orientadora
UFMG


Prof. Rodinei Augusti
UFMG


Prof. Scheilla Vitorino Carvalho Souza Ferreira
UFMG

Belo Horizonte, 24 de fevereiro de 2016.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me inspirar força sempre e abençoar este trabalho e tudo que eu faço;

À minha família, que eu amo muito, pelo apoio e motivação. Muito obrigado Sônia Mara, Lauro, Lígia e Camila;

À Camila Rodrigues pela paciência, motivação e carinho prestado em todos os momentos difíceis e alegres;

À minha orientadora Prof.^a Dr.^a Adriana Ferreira Faria pela paciência, disponibilidade e boa vontade sempre quando mais precisei;

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Ricardo Orlando pela suas engenhosidades, bom humor e habilidades na execução de tudo o que era proposto;

Ao LACQSA pela disposição, presteza e boa vontade em colaborar com tudo o que precisei. Muito obrigado Eugênia, Fernando e toda equipe;

Ao amigo Sérgio Dracz por ter me auxiliado com tanto carinho e dedicação sempre que eu precisasse;

Ao LEI pela paciência e entendimento sobre todos os momentos que precisei me ausentar.

À UI/CLEM pela excelente infraestrutura cedida para a execução desse trabalho. Muito obrigado Maria Helena;

À Carlyne Menezes pela excelente habilidade no preparo de amostra e pela boa vontade sem igual para me auxiliar;

À Universidade Federal de Minas Gerais e ao Departamento de Química por me proporcionar essa oportunidade de aprender e ser útil à comunidade científica;

À pós graduação pelo apoio e paciência;

In memoriam ao amigo, químico e tio José Ricardo. Seu exemplo e conselhos foram fundamentais.

RESUMO

Este trabalho descreve o desenvolvimento e a validação de um método para determinação das fumonisinas B1 e B2 em milho. O procedimento de extração e purificação otimizado empregou a dispersão da matriz em fase sólida. O procedimento otimizado consistiu em dispersar a amostra moída de sílica gel; montar um cartucho tipo seringa com o material disperso; eluir com solução tampão formiato de amônio (pH 9): THF (70:30 v/v); diluir com solução acetonitrila: água ultrapura (1:1 v/v); centrifugar; filtrar o extrato.

O método validado empregou a técnica HPLC-MS/MS para separação, identificação e quantificação das fumonisinas B1 e B2, avaliando-se uma transição de massas para quantificação e duas para confirmação, pelo modo de MRM.

Os parâmetros de validação avaliados apresentaram bons desempenhos: linearidade ($R^2 > 0,999$), repetitividade ($RSD \leq 22\%$), precisão intermediária ($RSD \leq 18\%$), porcentagem de recuperação (87-101%) e limites de detecção e quantificação inferiores ao limite máximo de fumonisinas permitido pela legislação. A incerteza de medição também foi estimada, considerando as fontes advindas da curva analítica e de cada etapa do preparo de amostra.

Palavras-Chave: Fumonisinas; Milho e derivados; Dispersão da matriz em fase sólida; HPLC-MS/MS; Validação.

ABSTRACT**Development and Validation of a Method for Fumonisin B1 and B2
Determination in Corn and Sub Products applying Matrix Solid Phase Dispersion
and HPLC-MS/MS**

This work describes the development and validation of a method for the determination of fumonisins B1 and B2 in maize. The optimization of the extraction and purification procedures was executed using matrix solid phase dispersion. The final procedure was to disperse the ground sample with silica gel; build a syringe type cartridge with the dispersed material; elute with ammonium formate buffer (pH 9):THF (70:30 v/v); dilute with acetonitrile: ultrapure water (1: 1 v/v); centrifuge; filter the extract.

The validated method employed HPLC-MS/MS technique for separation, identification and quantification of the fumonisin B1 and B2, evaluating one transition of mass for quantification and two for confirmation using the MRM mode.

The evaluated validation parameters showed good performances: linearity ($R^2 > 0.999$), repeatability ($RSD \leq 22\%$), intermediate precision ($RSD \leq 18\%$), percentage of recovery (87-101%) and detection and quantification limits lower than the maximum residue limit of fumonisin allowed by legislation. The uncertainty assessment was also estimated, considering the analytical curve and the sample preparation procedures as the main sources.

Keywords: Fumonisin; Maize and derivatives; Matrix solid phase dispersion;
HPLC-MS/MS; Validation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Panorama geral da ocorrência de micotoxinas no mundo expressa em porcentagem de amostras contaminadas do total de amostras analisadas (FONTE: BIOMIN, 2014).	3
Figura 2. Classificação dos tipos de milho e as suas relativas proporções anatômicas (FONTE: PAES, 2006).	9
Figura 3. Anatomia do grão de milho e suas principais partes e estruturas (FONTE: PAES, 2006).	10
Figura 4. Representação esquemática do procedimento de MSPD (FONTE: BORGES et al., 2015).	24
Figura 5. Esquema de extração por MSPD assistida por campo elétrico (Adaptada de PERUCHI, 2015).	26
Figura 6. Amostras utilizadas na otimização, validação e expansão do escopo do método: (1) milho; (2) milho de pipoca; (3) canjica; (4) canjiquinha; (5) salgadinho à base de milho.	38
Figura 7. Principais etapas do procedimento de extração e purificação das fumonisinas por MSPD otimizado.	44
Figura 8. Diagrama de causa e efeito (Ishikawa) para representar as fontes de incerteza para estimar a incerteza do método de quantificação de fumonisinas (FB) por CLAE. 49	
Figura 9. Cromatograma de íons extraídos de todas as transições da mistura de padrões de FB1 e FB2 em acetonitrila:água (1:1 v/v) nas condições otimizadas. Concentrações de aproximadamente 20 µg L ⁻¹ para FB1 e 10 µg L ⁻¹ para FB2.	53
Figura 10. Perfil de extração das fumonisinas B1 e B2 em função das frações de volume da fase extratora.	54
Figura 11. Resultados das extrações das fumonisinas B1 e B2 obtidos no planejamento fatorial 32 para avaliação da composição da solução extratora (n=2).	55
Figura 12. Resultados obtidos nos ensaios para avaliação da influência do campo elétrico na extração das fumonisinas.	57
Figura 13. Esquema representando a ação dos vetores: fluxo induzido por pressão (P), mobilidade eletroosmótica (vFEO) e mobilidade eletroforética das fumonisinas (vFB), na extração das fumonisinas por MSPD assistida por campo elétrico.	57

Figura 14. Resultados obtidos no planejamento fracionário 2 ⁴⁻¹ para seleção das variáveis significativas para a extração das fumonisinas (n=2).	58
Figura 15. Gráfico normal dos efeitos do planejamento fracionário 2 ⁴⁻¹ para a extração das fumonisinas.	59
Figura 16. Resultados obtidos no planejamento fatorial Box-Behnken (n _{PC} = 3) para a extração das fumonisinas.....	60
Figura 17. Superfícies de respostas construídas com as áreas de FB1 e FB2 obtidas do planejamento fatorial Box-Behnken 3 ³	63
Figura 18. Curvas analíticas em solvente e matrizadas para FB1 e FB2.....	66
Figura 19. Cromatogramas de íons extraídos de FB1 e FB2 das diferentes matrizes analisadas (naturalmente contaminadas).	67
Figura 20. Curvas analíticas ajustadas pelo MMQP para FB1 e FB2 e suas respectivas curvas de limite de previsão.	69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Consumo de milho no Brasil por diversos segmentos de mercado	1
Tabela 2. Nomenclatura e estrutura química das fumonisinas	5
Tabela 3. Algumas propriedades físico-químicas das FB1 e FB2.....	7
Tabela 4. Limites máximos estabelecidos pela ANVISA, CCE e FDA para as fumonisinas em milho e derivados	8
Tabela 5. Distribuição percentual dos compostos principais nas diferentes partes anatômicas do grão de milho	10
Tabela 6. Composição de alimentos por 100 gramas de parte comestível: centesimal e minerais	11
Tabela 7. Resumo de alguns métodos cromatográficos reportados na literatura para análise de micotoxinas, incluindo as fumonisinas.....	15
Tabela 8. Técnicas utilizadas numa otimização multivariada	28
Tabela 9. Parâmetros estatísticos e as respectivas equações para construção do modelo estatístico e obtenção dos intervalos de confiança dos coeficientes.....	30
Tabela 10. ANOVA para o ajuste de um modelo linear nos parâmetros, pelo método dos mínimos quadrados.....	31
Tabela 11. Instrumentos e equipamentos empregados durante as otimização e validação do método	36
Tabela 12. Principais materiais empregados durante as otimização e validação do método	37
Tabela 13. Planejamento fatorial 3^2 para avaliação da composição da solução extratora	41
Tabela 14. Ensaio realizados para avaliação da influência do campo elétrico na extração	41
Tabela 15. Planejamento fracionário 2^{4-1} para seleção das variáveis significativas para a extração.....	42
Tabela 16. Planejamento fatorial Box-Behnken empregado na otimização da extração por MSPD.....	43
Tabela 17. Curva matrizada de milho construída para avaliação da linearidade do método	46

Tabela 18. Valores do parâmetro α em função da faixa de concentração do analito.....	50
Tabela 19. Curva matrizada de salgadinho a base de milho construída para avaliação da linearidade do método	51
Tabela 20. Condições espectrométricas otimizadas para a análise das fumonisinas por HPLC-MS/MS no modo MRM	53
Tabela 21. Resultados estatísticos para os modelos obtidos a partir do planejamento fatorial 3^2	56
Tabela 22. Resultados estatísticos para os modelos obtidos a partir do planejamento Box-Behnken 3^3	62
Tabela 23. Comparação estatística das curvas analíticas para FB1 e FB2 em solvente e em diferentes matrizes	65
Tabela 24. Resultados obtidos na avaliação da linearidade das curvas analíticas para FB1 e FB2.....	68
Tabela 25. Resultados obtidos na avaliação da repetitividade do método	71
Tabela 26. Resultados obtidos na avaliação da precisão intermediária do método.....	71
Tabela 27. Resultados obtidos na avaliação de veracidade do método.....	72
Tabela 28. Resumo dos resultados de recuperação para as concentrações finais em cada nível de FB1 e FB2.....	72
Tabela 29. Concentrações das fumonisinas B1 e B2 determinadas em milho, suas incertezas combinadas e seus respectivos limite máximos de incerteza	73
Tabela 30. Comparação estatística das curvas analíticas para FB1 e FB2 em diferentes matrizes.....	74
Tabela 31. Resultados de precisão em termos de RSD% de repetibilidade e da veracidade em termos dos fatores de recuperação (R%) para as matrizes avaliadas na extensão de escopo	75
Tabela 32. Resultados de incerteza padrão combinada e seus respectivos critérios (U_{\max}) para FB1, FB2 e soma destas nas matrizes avaliadas na extensão de escopo.	77

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

\hat{y}_i	Resposta prevista no nível i
\bar{y}_i	Resposta média no nível i
y_{ij}	Resposta experimental no nível i na replicata j
\bar{y}	Média de todas as respostas experimentais
v_{FB}	mobilidade eletroforética das fumonisinas
v_{FEO}	mobilidade eletrosmótica
ACN	Acetonitrila
ANOVA	Análise de Variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
b	Coefficiente do modelo estatístico
$CC\alpha$	Limite de decisão
CCE	Comissão da Comunidade Europeia
x_{CN}	Concentração da solução utilizada na construção da curva de adição de padrão
$CC\beta$	Capacidade de detecção
$C_{dispersante}$	Concentração do analito no dispersante
CE	Energia de colisão
C_{HPLC}	Concentração obtida através da curva analítica
C_{matriz}	Concentração do analito na matriz
DLLME	Microextração líquido-líquido dispersiva
DP	Potencial de desagregação
d-SPE	Extração em fase sólida dispersiva
FB1	Fumonisina B1

FB2	Fumonisina B2
FB3	Fumonisina B3
FB4	Fumonisina B4
FDA	Food and Drug Administration of United States
FIA	Análise por injeção de fluxo
GC-FID	Cromatografia gasosa com detecção por ionização de chama
GC-MS	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas
HPLC-CAD	Cromatografia líquida de alta eficiência com detector de aerossol carregado
HPLC-DAD	Cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos
HPLC-ELSD	Cromatografia líquida de alto desempenho com detecção de dispersão de luz evaporativa
HPLC-FD	Cromatografia líquida de alta eficiência com detecção de fluorescência
HPLC-MS/MS	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um espectrômetro de massas triplo quadrupolo
HPLC-UV-Vis	Cromatografia líquida de alta eficiência com detecção de absorção na região do ultravioleta-visível
HPTLC-FDD	Cromatografia em camada fina de alto desempenho detecção por densitometria fluorescente
LACQSA	Laboratório de Controle de Qualidade e Segurança Alimentar
LD	Limite de detecção
LLE	Extração líquido-líquido
LRMR	Limite máximo de resíduo máximo
log P	Coefficiente de partição octanol/água
LQ	Limite de quantificação

m	Número de níveis distintos da variável independente
m/z	Razão massa-carga
m_a	Massa da amostra usada no preparo do cartucho
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MMQO	Método dos mínimos quadrados ordinários
MMQP	Método dos mínimos quadrados ponderados
MQ_{ep}	Média quadrática devido ao erro puro
MQ_{faj}	Média quadrática devida à falta de ajuste
MQ_R	Média quadrática devida à regressão
MQ_r	Média quadrática residual
MRM	Monitoramento de reações múltiplas
MRM	Monitoramento de reações múltiplas
MSPD	Dispersão da matriz em fase sólida
n	Número total de observações
n_i	Número de repetições no nível i
NIR	Espectrometria de infravermelho próximo
p	Número de parâmetros ou coeficientes do modelo
P	fluxo induzido por pressão
PC	Ponto central
PLE	Extração com líquido pressurizado
PNCRC	Programa Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes
PTFE	Polietrafluoretileno
R^2	Coefficiente de determinação
RSD	Desvio padrão relativo
s	Desvio padrão
SAX	Trocador aniônico

SD	Desvio padrão
SO	Solvente orgânico
SPE	Extração em fase sólida
SPE-MIP	Extração em fase sólida com polímero molecularmente impresso
SQ_{ep}	Soma quadrática devido ao erro puro
SQ_{faj}	Soma quadrática devida à falta de ajuste
SQ_R	Soma quadrática devida à regressão
SQ_r	Soma quadrática residual
SQ_T	Soma quadrática total
THF	Tetrahidrofurano
Tr	Nível de traço
u_c	Incerteza combinada
UHPLC-MS/MS	Cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a um espectrômetro de massas triplo quadrupolo
UHPLC-Q/ orbitrap	Cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a um espectrômetro com analisador sequencial (quadrupolo/orbitrap)
U_{max}	Incerteza máxima permitida
UPLC-MS/MS	Cromatografia líquida de ultra pressão acoplada a um espectrômetro de massas triplo quadrupolo
V_a	Volume da alíquota de extrato usado no preparo da amostra que foi injetada no HPLC-MS/MS
V_{df}	Volume do balão usado para a diluição final do extrato
V_{di}	Volume do balão usado para a diluição inicial do extrato
WHO/IARC	Organização Mundial de Saúde/ agência internacional de investigação sobre o câncer

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	O milho: importância econômica e nutricional.....	1
1.2	O impacto da contaminação dos grãos por micotoxinas na agricultura e na saúde vegetal, animal e humana	2
1.3	As fumonisinas: importância toxicológica e características físico-químicas	4
1.4	Limites máximos permitidos para as fumonisinas em alimentos	7
1.5	O milho: características anatômicas e composição.....	9
1.6	Métodos de preparo de amostras para extração e purificação de fumonisinas em alimentos.....	12
1.6.1	Dispersão da matriz em fase sólida	23
1.6.2	Métodos de extração assistidos por campo elétrico.....	25
1.7	Técnicas analíticas empregadas na determinação de fumonisinas	26
1.8	Planejamento de experimentos	27
1.8.1	Triagem.....	28
1.8.2	Avaliação da influência de variáveis relevantes.....	29
1.8.3	Construção de modelos estatísticos	29
1.8.4	Avaliação da qualidade do ajuste dos modelos estatísticos.....	30
1.8.5	Metodologia de superfícies de resposta.....	31
1.9	Validação	32
1.9.1	Efeito de matriz	32
1.9.2	Linearidade	32
1.9.3	Precisão.....	33
1.9.4	Veracidade	33
1.9.5	Limite de decisão, capacidade de detecção, limites de detecção e quantificação.....	33
1.9.6	Incerteza de medição	34
2	OBJETIVO	34
3	EXPERIMENTAL	35
3.1	Padrões, solventes e reagentes	35
3.2	Instrumentos, equipamentos e materiais	35
3.3	Amostras	37
3.4	Preparo das soluções estoque e de trabalho das fumonisinas	38
3.5	Otimização das condições do HPLC-MS/MS	39
3.6	Preparo dos cartuchos	40

3.7	Avaliações preliminares.....	40
3.7.1	Seleção do dispersante.....	40
3.7.2	Avaliação da composição da solução extratora.....	40
3.7.3	Avaliação da influência do campo elétrico na extração das fumonisinas.....	41
3.7.4	Seleção das variáveis significativas para a extração das fumonisinas.....	41
3.8	Otimização da extração das fumonisinas por MSPD.....	42
3.9	Procedimento de preparo da amostra otimizado.....	43
3.10	Validação.....	45
3.10.1	Avaliação do efeito de matriz.....	45
3.10.2	Faixa de trabalho e linearidade.....	45
3.10.3	Repetitividade, precisão intermediária e veracidade.....	46
3.10.4	Limite de decisão, capacidade de detecção e limites de detecção e quantificação.....	47
3.10.5	Estimativa da incerteza de medição.....	48
3.11	Expansão de escopo do método.....	51
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	52
4.1	Otimização das condições do HPLC-MS/MS.....	52
4.2	Seleção do dispersante.....	53
4.3	Avaliação da composição da solução extratora.....	54
4.4	Avaliação da influência do campo elétrico na extração das fumonisinas.....	56
4.5	Seleção das variáveis significativas para a extração das fumonisinas.....	58
4.6	Otimização da extração das fumonisinas por MSPD.....	59
4.7	Validação.....	63
4.7.1	Avaliação do efeito de matriz.....	63
4.7.2	Faixa de trabalho e linearidade.....	68
4.7.3	Repetitividade, precisão intermediária e veracidade.....	69
4.7.4	Limite de decisão, capacidade de detecção e limites de detecção e quantificação.....	72
4.7.5	Estimativa da incerteza de medição.....	73
4.8	Expansão de escopo do método.....	74
5	CONCLUSÃO.....	78
	REFERÊNCIAS.....	80

1 INTRODUÇÃO

1.1 O milho: importância econômica e nutricional

Em 2013 o Brasil chegou à posição de terceiro maior produtor e exportador mundial de milho com a marca de 81,5 milhões de toneladas colhidas em aproximadamente 15,83 milhões de hectares plantados (GALVÃO et al., 2014). Esse alimento tem uma enorme importância econômica devido ao seu alto valor nutricional. Além disso, devido ao baixo custo, o milho participa de uma ampla cadeia agroindustrial de produção e processamento de alimentos e rações (Tabela 1) (GALVÃO et al., 2014).

O milho, juntamente com a soja, representa hoje cerca de 80% da produção brasileira de grãos. Sendo a produção de milho destinada principalmente ao mercado interno a fim de atender vários segmentos de mercado e cadeias produtivas (GALVÃO et al., 2014).

Tabela 1. Consumo de milho no Brasil por diversos segmentos de mercado

Segmento	Consumo (x 1000 toneladas)
Avicultura	22.994
Suinocultura	13.169
Pecuária	2.414
Outros Animais	1.096
Consumo Industrial	4.812
Consumo Humano	756
Perdas/Sementes	453
Exportação	6.830
Outros	-
Total	52.523

Segundo dados de 2010/2011 a exportação de milho do Brasil representou 12% do comércio mundial desse cereal, o que mostra claramente a importância desse grão também no comércio internacional brasileiro (DUARTE et al., 2016). Por esse mesmo motivo, o controle da qualidade do produto exportado torna-se prioritário para atender as exigências dos mercados importadores do milho brasileiro. Os principais países importadores são Irã, Malásia, Colômbia, Taiwan, Arábia Saudita, Coreia do Sul, Marrocos e Espanha, que em 2009 representavam juntos mais de 80% das exportações de milho do Brasil (OLIVEIRA et al., 2010).

Um dos grandes desafios na conservação do milho colhido continua sendo evitar a sua contaminação durante a cadeia produtiva e processamento dos grãos e dos produtos derivados (COSTA et al., 2010). Em condições inapropriadas de umidade, temperatura e higiene, a proliferação de fungos e bactérias acarreta em prejuízos econômicos relevantes e um risco a saúde humana e de animais de criação que irão consumir os grãos ou produtos originários desse cereal (LIMA JÚNIOR et al., 2012).

1.2 O impacto da contaminação dos grãos por micotoxinas na agricultura e na saúde vegetal, animal e humana

A contaminação do milho por fungos produtores de micotoxinas é um dos grandes problemas da cadeia produtiva do milho. Esse problema pode ocorrer na própria lavoura e agravar durante a colheita, transporte, secagem, beneficiamento e armazenamento do milho e dos produtos derivados. As consequências são redução da qualidade nutritiva, interferência na classificação comercial, redução da qualidade sanitária, física e nutricional dos grãos e seus derivados (Bento et al, 2012). A contaminação dos grãos por fungos geralmente causa o aparecimento de bolor ou mofo, descoloração, presença de odor desagradável, perda de matéria seca, aquecimento, mudanças químicas e nutricionais, além da produção de compostos tóxicos, as micotoxinas. Mais de quinhentas micotoxinas importantes para a agricultura já foram identificadas (BENTO et al, 2012).

As micotoxinas são metabólitos secundários produzidos por fungos e representam um grupo muito amplo de substâncias provenientes de inúmeras espécies de fungos micotóxicos. Essas toxinas com grande diversidade estrutural resultam em uma grande variedade de substâncias com propriedades físico-químicas e toxicológicas bem

diferenciadas. Dentre os vários tipos de micotoxinas reconhecidas, apenas algumas tem de fato um impacto significativo à saúde animal e vegetal e estas devem ser avaliadas com critérios mais rigorosos. Essas substâncias estão diretamente associadas a efeitos carcinogênicos, teratogênicos, nefrotóxicos e propriedades hepatotóxicas. Além dos efeitos tóxicos na saúde animal e vegetal, as micotoxinas podem causar perda econômica significativa devido à contaminação de diversas colheitas em todo o mundo (AZAIEZ et al., 2014).

Um exame detalhado da ocorrência de micotoxinas no mundo realizado pela empresa BIOMIN com mais de 6 mil amostras de origem pecuária, totalizando 26 mil análises em 64 países distintos, mostrou um panorama crítico em relação à ocorrência das principais micotoxinas no mundo (BIOMIN, 2014). A Figura 1 ilustra os resultados dessa pesquisa:

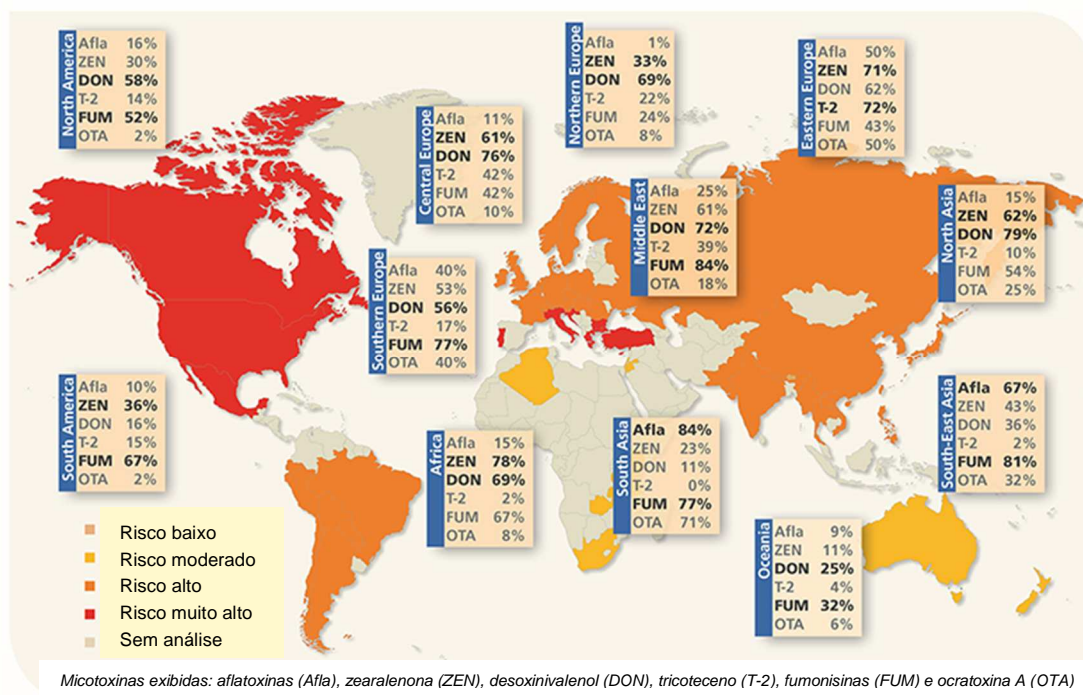


Figura 1. Panorama geral da ocorrência de micotoxinas no mundo expressa em porcentagem de amostras contaminadas do total de amostras analisadas (FONTE: BIOMIN, 2014).

De acordo com essa pesquisa, a América do Norte registrou a maior média de contaminação por zearalenona e fumonisinas, ao passo que as fumonisinas continuam a ser a principal ameaça na América do Sul, com contaminação de mais de dois terços das amostras analisadas (BIOMIN, 2014). O resultado dessa pesquisa evidenciou a

importância do monitoramento contínuo dessas micotoxinas no mundo para que medidas de prevenção e controle sejam devidamente tomadas. Um programa de monitoramento de risco é essencial para a proteção da sanidade animal e vegetal dos impactos causados pelas micotoxinas (BIOMIN, 2014).

1.3 As fumonisinas: importância toxicológica e características físico-químicas

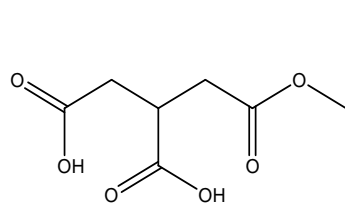
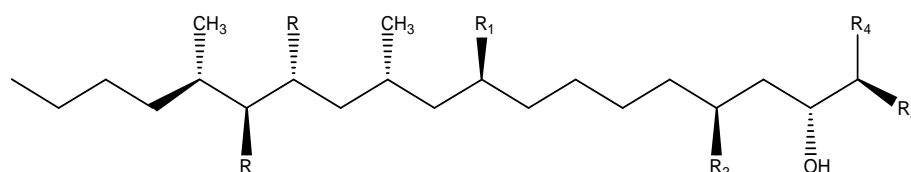
Um grupo de micotoxinas com toxicidade expressiva e grande relevância de estudos é o das fumonisinas, que são metabólitos produzidos por fungos do gênero *Fusarium*, reportadas pela primeira vez na África do Sul em 1988 (ZHANG et al., 2013). A contaminação pelo gênero *Fusarium* ocorre frequentemente no período de amadurecimento do grão, sendo favorecida por temperatura e umidade elevadas (BENTO et al, 2012). As fumonisinas podem contaminar uma ampla gama de produtos agrícolas e commodities alimentícias, causando um crescimento no número de apoptose celular e câncer de esôfago induzido em animais e até em seres humanos (ZHANG et al., 2013).

A incidência de câncer de esôfago em seres humanos relacionados à presença de fumonisinas em alimentos foi relatada pela primeira vez em Transkei, uma região da África. A mesma relação também foi reportada na China, Irã, norte da Argentina e sul do Brasil. Em animais, as fumonisinas estão associadas à leucoencefalomalácia em equinos, edema pulmonar em suínos, nefrotoxicidade e câncer de fígado em ratos, efeitos aterogênicos e arteriosclerosis em macacos, hipertrofia pulmonar média das artérias de suínos, imunossupressão em aves de capoeira e de hemorragia cerebral em coelhos (RUBERT et al., 2013).

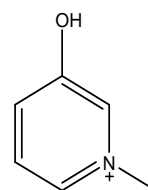
Várias fumonisinas (Tabela 2) já foram identificadas, sendo quatro do tipo B (FB1, FB2, FB3 e FB4) com um grupo amino livre, três do tipo A (FA1, FA2 e FA3) na forma de amida, quatro do grupo C (FC1, FC2, FC3 e FC4) que não possuem o grupo metil terminal e três do grupo P (FP1, FP2 e FP3) (ZHANG et al., 2013).

Tabela 2. Nomenclatura e estrutura química das fumonisinas

Fumonisina	R	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
FB1	ATC	OH	OH	NH ₂	CH ₃
FB2	ATC	H	OH	NH ₂	CH ₃
FB3	ATC	OH	H	NH ₂	CH ₃
FB4	ATC	H	H	NH ₂	CH ₃
FA1	ATC	OH	OH	NHCOCH ₃	CH ₃
FA2	ATC	H	OH	NHCOCH ₃	CH ₃
FC1	ATC	OH	OH	H	H
FC4	ATC	H	H	H	H
FP1	3HP	OH	OH	3HP	CH ₃
FP2	3HP	H	OH	3HP	CH ₃
FP3	3HP	OH	H	3HP	CH ₃



Ácido tricarbóxico (ATC)



3-Hidroxi piridínio (3HP)

Dentre todas as fumonisinas identificadas, a FB1 e a FB2 são as mais potentes causadoras de câncer de esôfago em seres humanos (ANUKUL et al., 2013), sendo a FB1 classificada no grupo 2B, de acordo com a Agência Internacional de Pesquisa de Câncer. Além disso, o aumento na incidência de defeitos de tubos neurais, na fronteira entre o

estado do Texas e o México, foi correlacionado a alta ocorrência de FB1 em milho e seus derivados (BORDIN et al., 2014).

As FB1 e FB2 puras são sólidos brancos higroscópicos (WASKIEWICZ et al., 2012). As fumonisinas são compostos quirais com vários centros estereogênicos na sua estrutura. A estereoquímica das FB1 e FB2 já foram elucidadas (EDWARDS et al., 1999; HARMANGE et al., 1994; BOYLE & KISHI, 1995; POOH et al., 1994; BLACKWELL et al., 1995) ao passo que para as FB3 e FB4 ainda é desconhecida (BOLGER et al., 2001).

Dependendo da composição do meio ou da temperatura as fumonisinas podem ser degradadas. As soluções preparadas em acetonitrila: água (1:1, v/v) são estáveis a 25 °C, ao passo que as soluções em metanol, nesta mesma temperatura, são instáveis uma vez que são formados mono ou dimetil ésteres (GELDERBLOM et al., 1992; VISCONTI et al., 1994). Porém, a -18 °C as soluções metanólicas são estáveis (VISCONTI et al., 1994). As fumonisinas puras são estáveis a 75 °C por 135 minutos e a 125 °C por 5 minutos (DUPUY et al., 1993). Em soluções com pH entre 4,8 e 9,0, as fumonisinas são estáveis até 78°C (HOWARD et al., 1998).

Algumas propriedades físico-químicas das FB1 e FB2 estão resumidas na Tabela 3.

Tabela 3. Algumas propriedades físico-químicas das FB1 e FB2

Propriedade físico-química	FB1	FB2
Fórmula molecular	C ₃₄ H ₅₉ NO ₁₅	C ₃₄ H ₅₉ NO ₁₄
Massa molecular (g mol ⁻¹)	721,84	705,84
pK _a	pK _{a1} : 3,49; pK _{a2} : 4,56; pK _{a3} : 5,83; pK _{a4} : 9,25	-
Densidade (g cm ⁻³)	1,30	-
Índice de refração (n _{20D})	1,53	-
Coefficiente de partição octanol/água (log P)	-0,67	0,72
Solubilidade	Solúveis em água (25 mg mL ⁻¹), metanol (10 mg mL ⁻¹), acetonitrila e dimetilsulfóxido (10 mmol L ⁻¹)	

1.4 Limites máximos permitidos para as fumonisinas em alimentos

Devido à toxicidade e ocorrência das fumonisinas em diversos alimentos, as autoridades reguladoras de diversos países estipularam níveis máximos de fumonisinas em diferentes matrizes alimentares, com base no consumo diário dessas toxinas. Os principais órgãos regulamentadores no Brasil e no mundo são a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (BRASIL, 2011c), a Comissão da Comunidade Europeia (CCE) (CE, 2006b) e a Food and Drug Administration of United States (FDA, 2001). A Tabela 4 apresenta os limites máximos estipulados por estes órgãos.

Tabela 4. Limites máximos estabelecidos pela ANVISA, CCE e FDA para as fumonisinas em milho e derivados

CCE	
Matriz	Limite Máximo para FB ₁ + FB ₂ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
Milho não transformado	2000
Farinha de milho, sêmola de milho, gérmen de milho e óleo de milho refinado	1000
Alimentos transformados à base de milho e alimentos para bebês destinados a lactentes e crianças jovens	200
Alimentos à base de milho para consumo humano direto, com exceção dos alimentos referidos anteriormente	400
FDA	
Matriz	Limite Máximo para FB ₁ + FB ₂ + FB ₃ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
Produtos a base de milho não-germinado seco e moído	2000
Produtos a base de milho parcialmente germinado ou não germinado seco e moído	4000
Farelo de milho seco moído	4000
Milho limpo direcionado à produção em massa	4000
Milho limpo para produção de pipoca	3000
ANVISA	
Matriz	Limite Máximo para FB ₁ + FB ₂ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
Milho de pipoca	2000
Alimentos a base de milho para alimentação infantil (lactentes e crianças de primeira infância)	200
Milho em grão para posterior processamento	5000
Farinha de milho, creme de milho, fubá, flocos, canjica, canjiquinha	1500
Amido de milho e outros produtos a base de milho	1000

1.5 O milho: características anatômicas e composição

O grão de milho tem peso entre 250 a 300 mg e geralmente apresenta coloração amarela ou branca (GERALDI et al., 2012).

A classificação dos grãos é baseada na forma e no tamanho, que são definidos pela estrutura do endosperma e do tamanho do gérmen (PAES, 2006).

Com base nessas partes anatômicas os milhos são classificados em dentado, duro (ou “flint”), farináceo, pipoca e doce, sendo o duro a principal classe produzida no Brasil (PAES, 2006).

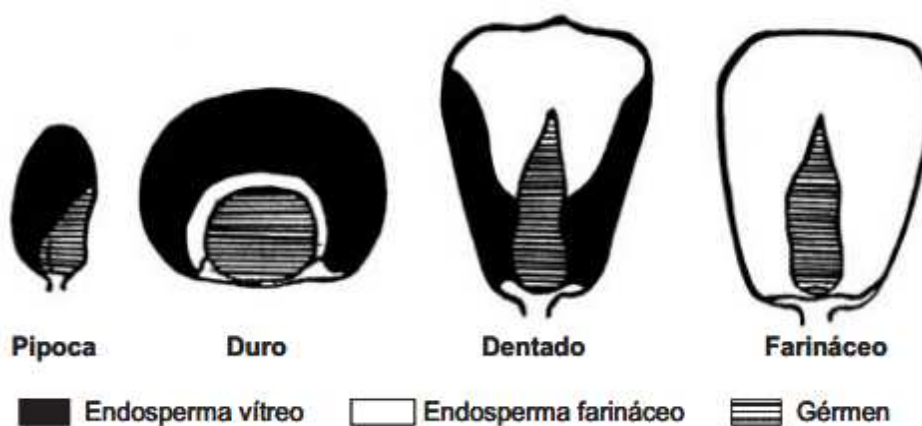


Figura 2. Classificação dos tipos de milho e as suas relativas proporções anatômicas (FONTE: PAES, 2006).

A estrutura e a composição do grão de milho são complexas (Figura 3 e Tabela 6) e a distribuição das diversas substâncias que compõe esse grão não é homogênea em todas as suas diferentes partes anatômicas (Tabela 5). A composição do milho depende do tipo de milho cultivado e também da forma como ele é processado e comercializado (Tabela 6) (BRASIL, 2011b).

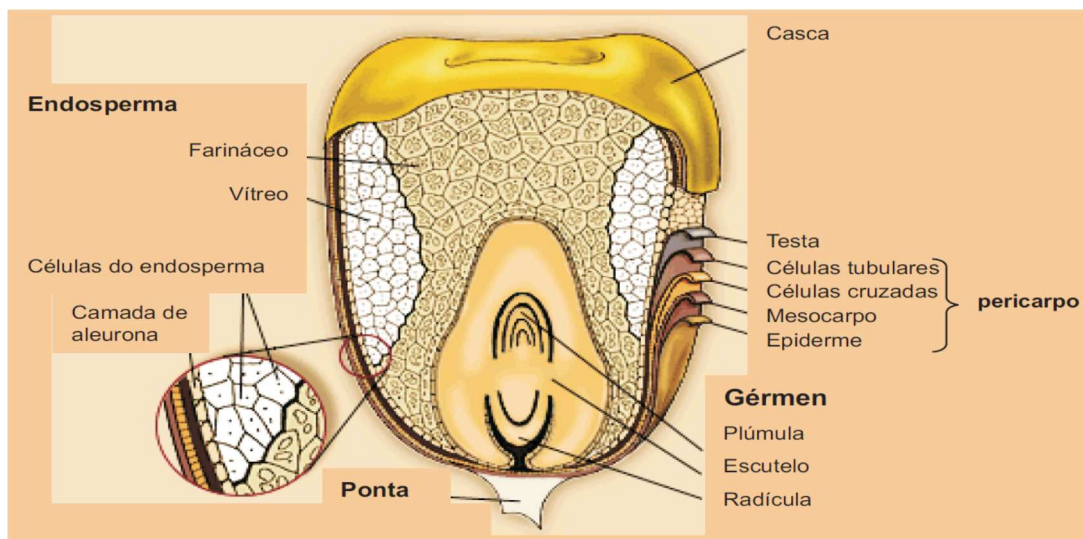


Figura 3. Anatomia do grão de milho e suas principais partes e estruturas (FONTE: PAES, 2006).

Tabela 5. Distribuição percentual dos compostos principais nas diferentes partes anatômicas do grão de milho

Fração	Amido	Lipídeos	Proteínas	Minerais	Açúcares	Fibras
% da parte (base seca)						
Endosperma	98,0	15,4	74,0	17,9	28,9	-
Gérmen	1,3	82,6	26,0	78,4	69,3	12,0
Pericarpo	0,6	1,3	2,6	2,9	1,2	54,0
Ponta	0,1	0,8	0,9	1,0	0,8	7,0

FONTE: PAES, 2006.

Tabela 6. Composição de alimentos por 100 gramas de parte comestível: centesimal e minerais

Componente	Descrição do alimento			
	Milho, amido, cru	Milho, fubá, cru	Milho, verde, cru	Milho, verde, enlatado, drenado
Umidade*	12,2	11,5	63,5	76,2
Proteínas*	0,6	7,2	6,6	3,2
Lipídeos*	Tr	1,9	0,6	2,4
Carboidratos*	87,1	78,9	28,6	17,1
Fibra alimentar*	0,7	4,7	3,9	4,6
Cinzas*	0,1	0,6	0,7	1,1
Cálcio**	1,0	3,0	2,0	2,0
Magnésio**	3,0	41	33,0	20,0
Manganês**	0,02	0,34	0,12	0,09
Fósforo**	13,0	108,00	113,00	61,0
Ferro**	0,1	0,9	0,4	0,60
Sódio**	8,0	Tr	1,0	260,0
Potássio**	9,0	168,00	185,0	162,0
Cobre**	0,02	0,08	0,05	0,05
Zinco**	0,1	1,1	0,5	0,5

*g/100 gramas de parte comestível do alimento; **mg/100 gramas de parte comestível do alimento; Tr: nível de traço;

A complexidade e a variedade na composição e na estrutura morfológica do grão de milho e seus derivados resultam em desafios analíticos, tanto no preparo de amostra quanto na técnica de quantificação, para a análise dessas matrizes. As fumonisinas se concentram especialmente no germe e na casca do milho, e dependendo se a moagem é realizada a seco ou com o milho hidratado a concentração dessas toxinas se altera drasticamente (WHO/IARC, 2002). Alguns estudos indicaram que algumas toxinas, em especial as fumonisinas, podem ter suas concentrações subestimadas devido a não uniformidade da distribuição no grão de milho. Os componentes endógenos do milho podem interagir com essas micotoxinas via estruturas supramoleculares. Parte das micotoxinas também pode estar quimicamente ligada ao amido e outros componentes endógenos. Assim, as fumonisinas presentes no milho algumas vezes são classificadas em duas espécies distintas: as chamadas livres por não estarem quimicamente ligadas ou não formarem estruturas supramoleculares e serem facilmente removida do alimento, e as chamadas ligadas ou hidrolisadas por serem liberadas somente em condições de hidrólise alcalina para a quebra das ligações éster e das estruturas supramoleculares (GIROLAMO et al., 2016; OLIVEIRA et al., 2015; BRYŁA et al., 2015).

1.6 Métodos de preparo de amostras para extração e purificação de fumonisinas em alimentos

Como descrito anteriormente, a composição e a estrutura anatômica dos diferentes grãos de milho são bastante complexas e diversificadas, e esses fatores fazem com que o preparo dessas amostras, em especial a extração dos compostos de interesse e a remoção de interferentes, seja uma tarefa árdua. Por se tratar de uma estrutura sólida/semisólida e com teor de umidade bastante variado, geralmente, é realizada uma etapa prévia de homogeneização e quebra das estruturas do tecido do grão. Nessa etapa as técnicas de moagem associadas às técnicas exaustivas de refluxo como Soxhlet, ou ainda as técnicas energéticas como micro-ondas, extração com líquido pressurizado (PLE) ou ultrassom são amplamente utilizadas para liberar as substâncias de interesse das estruturas internas e, assim, os solventes extratores possam solubilizar os analitos (CIGIĆ & PROSEN, 2009).

Nos primeiros métodos propostos como descrito no artigo de revisão (SHEPHARD, 1998), o preparo de amostras foi baseado na extração sólido-líquido com uma mistura de água e um solvente orgânico, em geral, metanol, acetonitrila ou ambos. Seguida, geralmente por uma etapa de purificação com cartuchos de extração em fase sólida (SPE) contendo sorventes a base de sílica C18, imunoafinidade, polimérico ou ainda trocador aniônico (SAX). Alguns trabalhos relatam que os sorventes trocadores aniônicos produziram extratos mais limpos e com resultados mais reprodutíveis que os sorventes a base de sílica C18, embora a vazão seja crítica para esse tipo de material. Os sorventes de imunoafinidade produzem extratos bastante limpos, porém o alto custo, o menor tempo de armazenamento e a desnaturação com solventes orgânicos restringe sua aplicação (SHEPHARD, 1998). Procedimentos de preparo de amostra envolvendo as etapas descritas anteriormente, além da extração líquido-líquido (LLE), têm sido utilizados durante as duas últimas décadas. Uma breve descrição alguns trabalhos envolvendo esses procedimentos de preparo de amostra é apresentada na Tabela 7 (DAWLATANA et al., 1995; JIMENEZ & MATEO, 1997; SØRENSEN & ELBÆK, 2005; WANG et al., 2008; FRENICH et al., 2009; SILVA et al., 2009; KHAYOON et al., 2010; REN et al., 2011; SOLEIMANY et al., 2012; BELTRÁN et al., 2013; ABIA et al., 2013; ZHANG et al., 2013; WANG et al., 2013; SZEKERES et al., 2014; LIAO et al., 2014; GARCÍA-MORALEJA et al., 2015a; GARCÍA-MORALEJA et al., 2015b; JUNG et al., 2015; EDIAGE et al., 2015; BRYŁA et al., 2015; BRYŁA et al., 2016).

Contudo, nos últimos anos, outros procedimentos de preparo das amostras têm sido utilizados para a extração e purificação de micotoxinas, incluindo as fumonisinas. Entre os quais, pode-se destacar: PLE (D'ARCO et al., 2008); dispersão da matriz em fase sólida (MSPD) (RUBERT et al., 2011; YE et al., 2013); microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME) (ARROYO-MANZANARES et al., 2013a; ARROYO-MANZANARES et al., 2013b), QuEChERS (ARROYO-MANZANARES et al., 2013a; ARROYO-MANZANARES et al., 2013b; AZAIEZ et al., 2014; ARROYO-MANZANARES et al., 2014; PIZZUTTI et al., 2014; BOLECHOVÁ et al., 2015; NIELSEN et al., 2015; ARROYO-MANZANARES et al., 2015); extração em fase sólida dispersiva (d-SPE) (PIZZUTTI et al., 2014; PETRARCA et al., 2014; GARCÍA-MORALEJA et al., 2015b; PETRARCA et al., 2016) e extração em fase sólida com polímero molecularmente impresso (SPE-MIP) (OLIVEIRA et al., 2015). Uma breve descrição desses métodos também é apresentada na Tabela 7.

Entre as técnicas para o preparo de amostras apresentadas na Tabela 7 é a MSPD apresenta interessantes características vantajosas às demais e foi selecionada como para ser utilizada no presente trabalho. Assim, uma descrição mais detalhada dos princípios da MSPD será apresentada a seguir.

Tabela 7. Resumo de alguns métodos cromatográficos reportados na literatura para análise de micotoxinas, incluindo as fumonisinas

Matriz	Preparo de amostra	Quantificação	Referência
Arroz	Extração com metanol: água; purificação com SPE-SAX	HPTLC-FDD	DAWLATANA et al., 1995
Banana	Extração com 15etanol: água; purificação com coluna Amberlite XAD-2; derivatização com 4-fluor-7-nitrobenzofurazan	HPLC-FD HPLC-UV-Vis GC-FID	JIMENEZ & MATEO, 1997
Milho	Extração com metanol: água; purificação com coluna de imunoafinidade; derivatização com 2-mercaptoetanol e o-ftaldialdeído	HPLC-FD e fluorescência	DUNCAN et al., 1998
Leite bovino	Extração com hexano: acetonitrila; purificação com cartucho Oasis	HPLC-MS/MS	SØRENSEN & ELBÆK, 2005
Alimento infantil a base de milho	PLE com metanol, 40 °C	HPLC-MS/MS	D'ARCO et al., 2008

Milho	Extração com acetonitrila: água; purificação com resina amberlite	HPLC-ELSD	WANG et al., 2008
Fígado, rim e músculo de pato	Homogeneização com Ultraturrax; precipitação de proteínas com acetonitrila: metanol: cloreto de sódio; extração; purificação com coluna de imonuafinidade	HPLC-FD	TARDIEU et al., 2008
Milho, nozes, biscoitos e cereais matinais	Extração com acetonitrila: água em vórtex	UHPLC-MS/MS	FRENICH et al., 2009
41 amostras de milho e a base de milho	Extração com metanol: água; purificação com coluna de imunoafinidade	HPLC-FD; HPLC-MS/MS	SILVA et al., 2009
Milho, arroz, alimentos processados e ração	Extração com acetonitrila: água; purificação com SPE-C18	HPLC-FD; HPLC-MS/MS	KHAYOON et al., 2010
Farinha de trigo, farinha de milho, farinha de arroz, farinha de soja, farinha de aveia e preparações para bolos, pão e pizza	MSPD com C18	HPLC-MS/MS	RUBERT et al., 2011

Milho	Extração com acetonitrila: água em ultrassom; purificação por SPE	UHPLC-MS/MS	REN et al., 2011
Arroz, aveia, cevada, milho e trigo	Extração com acetonitrila: água: ácido acético; diluição 1:1 do extrato	UPLC-MS/MS	SOLEIMANY et al., 2012
Alimento infantil	MSPD com sílica C18	HPLC-MS/MS (QTRAP)	RUBERT et al., 2012a
Chufa (tigernuts)	MSPD com sílica C18	HPLC-MS/MS (QTRAP)	RUBERT et al., 2012b
Cevada	QuEChERS, MSPD, SLE e SPE	UHPLC - Orbitrap [®] MS	RUBERT et al., 2012c
Cereais (arroz, milho, cevada, trigo e sorgo) e produtos a base de cereais (lanches, massas, farinhas, sopas e biscoitos)	MSPD com sílica C18	HPLC-MS/MS	SERRANO et al., 2012
Milho	MSPD com sílica C18	HPLC-DAD	YE et al., 2013

Pão de trigo, pão fatiado, pão cereais, massas, arroz, frutas secas, biscoitos, assados processados, cereais matinais, azeitonas, picles, maçã, pêra, ovos, leite, iogurte, produtos de soja, queijo, uvas, vinho, cerveja, suco de laranja, abacaxi, uva e pêsego, azeite de oliva e óleo de girassol	Extração com acetonitrila: água com 0,1% v/v de ácido fórmico Para azeite de oliva e óleo de girassol, LLE com hexano seguida de LLE com acetonitrila	UHPLC-MS/MS		BELTRÁN et al., 2013
Milho, produtos à base de milho, nozes, produtos à base de nozes, soja e cerveja	LLE ou SPE	HPLC-MS/MS		ABIA et al., 2013
Leite e alimentos à base de leite	Diluição; centrifugação; filtração	HPLC-MS/MS	utilizando	ZHANG et al., 2013
<i>Silybummarianum</i>	QuEChERS DLLME	UHPLC-MS/MS		ARROYO-MANZANARES et al., 2013a

Milho	Extração com acetonitrila: água; purificação com cartucho OASIS HLB	HPLC-MS/MS	WANG et al., 2013
Nozes e sementes	QuEChERS DLLME	UHPLC-MS/MS	ARROYO-MANZANARES et al., 2013b
Trigo em grãos	MSPD	HPLC-MS/MS	BLESA et Al., 2014
Frutas secas	QuEChERS	HPLC-MS/MS	AZAIEZ et al., 2014
Milho	Extração com acetonitrila: água; purificação SPE-SAX	HPLC-CAD	SZEKERES et al., 2014
Trigo sarraceno, quinoa e amaranto	QuEChERS	UHPLC-MS/MS	ARROYO-MANZANARES et al., 2014
Vinho	QuEChERS d-SPE	UPLC-MS/MS	PIZZUTTI et al., 2014

Arroz, trigo, milho, amendoim, pistache, amêndoa e manteiga de amendoim	Moagem com gelo seco seguido de extração com acetonitrila: água em shaker	UHPLC-Q/orbitrap		LIAO et al., 2014
Arroz	Extração com acetonitrila: água: ácido acético; partição líquido-líquido com adição de sulfato de sódio anidro e cloreto de sódio; purificação por d-SPE com terra de diatomáceas	HPLC-FD		PETRARCA et al., 2014
Cevada e malte	QuEChERS	UHPLC-MS/MS		BOLECHOVÁ et al., 2015
Café verde, torrado e instantâneo	QuEChERS; purificação com cartucho Oasis Max	UHPLC-MS/MS diluição isotópica	usando	NIELSEN et al., 2015
Xarope de arroz, trigo e cevada	QuEChERS	UHPLC-MS/MS		ARROYO-MANZANARES et al., 2015
Café	Extração com acetonitrila: água em Ultraturrax; purificação com cartucho SPE-C18	HPLC-MS/MS		GARCÍA-MORALEJA et al., 2015b

Bebidas de café	Homogeneização com Ultraturrax; LLE com acetato de etila:ácido fórmico	HPLC-MS/MS	GARCÍA-MORALEJA et al., 2015a
<i>Sunsik</i>	Extração com tampão fosfato; seguida de extração do resíduo com metanol; purificação com coluna de imunoafinidade	HPLC-MS/MS	JUNG et al., 2015
Sorgo	Extração com metanol: acetato de etila: água; purificação por SPE	UHPLC-MS/MS	EDIAGE et al., 2015
Milho	Extração com metanol: acetonitrila: água; purificação com SPE-MIP	HPLC-MS/MS	OLIVEIRA et al., 2015
Milho seco moído	Extração com metanol: acetonitrila: água; purificação com cartucho de SPE polimérico	HPLC-MS/MS	BRYŁA et al., 2015
Cereal, concentrado de amido, macarrão, farinha, flocos de milho e lanches à base de milho	Extração com metanol: acetonitrila: água; purificação com cartucho de SPE polimérico	HPLC-MS/MS	BRYŁA et al., 2016

Arroz	Extração com acetonitrila: água: ácido acético; partição líquido-líquido com adição de sulfato de sódio anidro e cloreto de sódio; purificação por d- SPE com terra de diatomáceas	HPLC-FD	PETRARCA et al., 2016
-------	---	---------	--------------------------

HPTLC-FDD: Cromatografia em camada fina de alto desempenho detecção por densitometria fluorescente;
 HPLC-FD: Cromatografia líquida de alta eficiência com detecção de fluorescência;
 HPLC-UV-Vis: Cromatografia líquida de alta eficiência com detecção de absorção na região do ultravioleta-visível;
 HPLC-MS/MS: Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um espectrômetro de massas triplo quadrupolo;
 HPLC-ELSD: Cromatografia líquida de alto desempenho com detecção de dispersão de luz evaporativa;
 UHPLC-MS/MS: Cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a um espectrômetro de massas triplo quadrupolo;
 HPLC-CAD: Cromatografia líquida de alta eficiência com detector de aerossol carregado;
 UHPLC-Q/ orbitrap: Cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a um espectrômetro com analisador sequencial (quadrupolo/orbitrap);
 HPLC-DAD: Cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos.

1.6.1 Dispersão da matriz em fase sólida

A MSPD foi introduzida em 1989 por Baker, com o objetivo de extrair analitos de amostras sólidas e semissólidas (BARKER et al., 1989). Desde então, tem sido utilizada como método de extração e purificação de contaminantes em diversas matrizes de alimentos (BARKER, 2000; BARKER, 2007; BOGIALLI & DICORCIA, 2007; RUBERT et al., 2011; YE et al., 2013), demonstrando a ampla aplicação dessa técnica para o isolamento de uma ampla gama de medicamentos, pesticidas, contaminantes naturais e outros compostos advindos de amostras vegetais e de origem animal.

A MSPD é uma técnica de preparo de amostras baseada na distribuição e sorção diferencial dos analitos e interferentes em um agente dispersante e por isso compartilha alguns princípios com a SPE e a LLE. Os princípios fundamentais das três técnicas estão baseados na reação de distribuição reversível entre duas fases imiscíveis (Equação 1), segundo a lei de distribuição de Nernst (Equação 2) (BORGES et al., 2015):



$$K = \frac{[C_{\text{dispersante}}]}{[C_{\text{matriz}}]} \quad (2)$$

Uma das principais vantagens da MSPD em relação às demais técnicas de preparo de amostras deve-se ao fato da extração e purificação dos analitos serem realizadas idealmente em uma única etapa (BARKER, 2000; BARKER, 2007; BORGES et al., 2015). De forma geral, a extração MSPD em sua forma mais simplificada é realizada em duas etapas principais (Figura 4):

Etapa da dispersão: é realizada através da mistura e trituração da matriz em um sorvente sólido adequado. Nesta etapa o agente dispersante rompe as partículas e/ou tecidos da matriz liberando os analitos para a etapa subsequente e, ao mesmo tempo, promove a sorção seletivamente dos interferentes da matriz. Após a dispersão da matriz a mistura (matriz com dispersante) é introduzida em uma coluna de extração (i.e. cartucho de SPE).

Etapa de extração e coleta dos analitos: é realizada através da eluição do cartucho com um solvente adequado. Nesta etapa busca-se por meio da utilização de solvente ou misturas de solventes adequados a remoção seletiva dos analitos de interesse da matriz que são coletados em

um tubo para posterior análise, ao passo que os interferentes permanecem retidos no material dispersante.

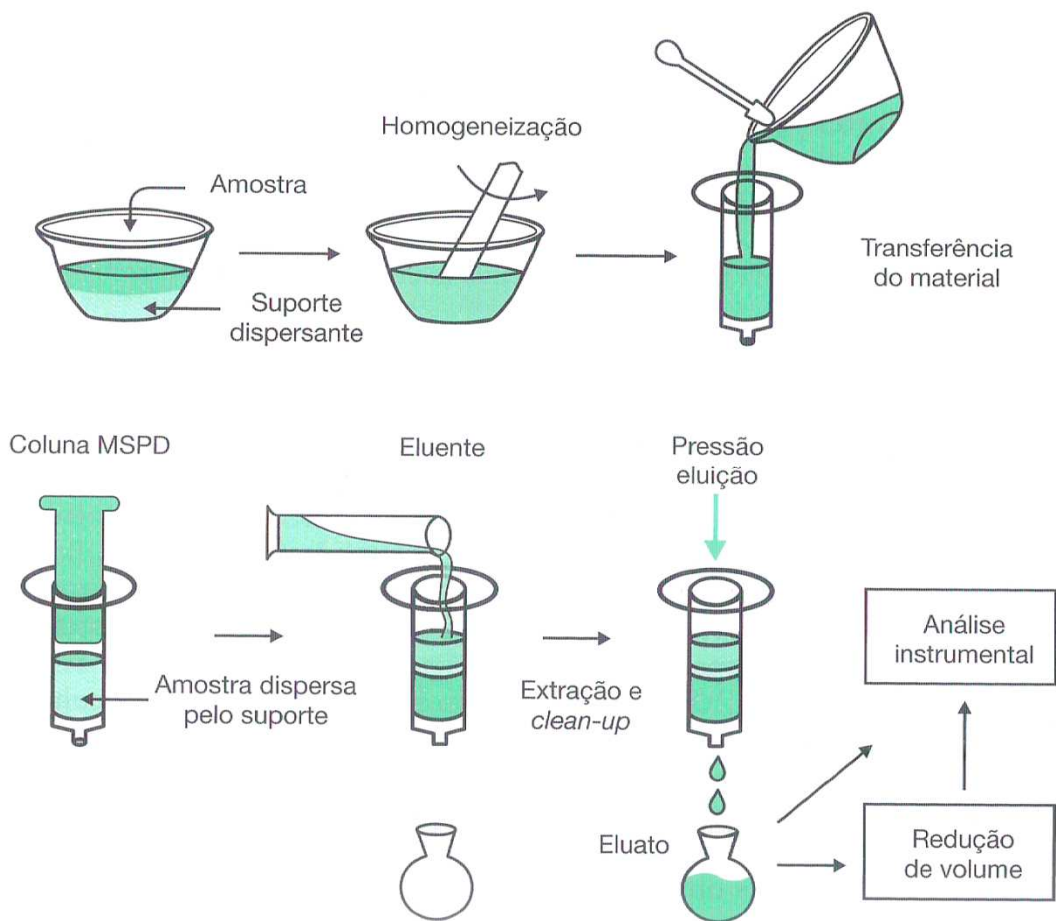


Figura 4. Representação esquemática do procedimento de MSPD (FONTE: BORGES et al., 2015).

Outra grande vantagem da técnica de MSPD é que ela pode ser empregada para amostras líquidas, semissólidas e sólidas, não sendo necessário tornar a amostra uma solução antes do procedimento de preparo (BARKER, 2000; BARKER, 2007). Na primeira etapa da MSPD ocorre a ruptura das estruturas celulares e das organizações supramoleculares pela combinação de trituração mecânica e interações químicas da superfície do dispersante sobre a matriz. Dependendo da matriz e das características do material dispersante empregado interações como dipolo, dipolo-dipolo, van der Waals, hidrofóbicas, coulômbicas e de ligações de hidrogênio estarão contribuindo tanto para a dispersão como para a sorção dos analitos e interferentes (BARKER, 2000; BARKER, 2007).

Os principais fatores que afetam o desempenho da MSPD e que devem ser otimizados no desenvolvimento do método são: características do material dispersante, como polaridade

granulometria e quantidade; natureza e quantidade da amostra; composição, volume e ordem dos solventes extratores (BARKER, 2007).

1.6.2 Métodos de extração assistidos por campo elétrico

Uma área de desenvolvimento mais recente no avanço das técnicas de preparo de amostras é aquela em que diferentes princípios físico-químicos são combinados para alterar, ampliar, modular as técnicas originais, visando contornar as limitações e aumentar a eficiência de extração e purificação (MORALES-CID et al., 2010; MAJORS, 2014; YAMINIA Et al., 2014).

O uso de campos elétricos em técnicas de preparo de amostras é uma abordagem que atende a combinação de princípios físico-químicos e teve suas primeiras citações na literatura mundial nos últimos dez anos. Apesar de ser uma abordagem recente, já foi descrito que os componentes eletroforéticos de movimento (fluxo eletrosmótico e a migração eletroforética) provenientes da aplicação de campos elétricos são capazes de conferir tanto seletividade quanto maiores taxas de transferência de massa do que os processos baseados somente em convecção e difusão (MORALES-CID et al., 2010).

O uso de campos elétricos aplicados à SPE em cartuchos tipo seringa foi proposto com sucesso por Orlando et al. O objetivo da associação de campos elétricos com a SPE foi explorar os diferentes efeitos eletroforéticos (fluxo eletrosmótico e migração eletroforética) dos compostos carregados e não carregados, para promover a eliminação de interferentes e/ou elevar a recuperação dos analitos de interesse (ORLANDO et al., 2014; ORLANDO et al., 2015; CAMPOS et al., 2015).

Outra proposta recente foi a associação da aplicação de campos elétricos a MSPD para a extração de antimicrobianos em solo. Com essa abordagem foi possível obter maiores recuperações com um menor consumo de solvente, em comparação com os procedimentos convencionais (PERUCHI, 2015). A Figura 5 (adaptada de PERUCHI, 2015) mostra um esquema de extração por MSPD assistida por campo elétrico, similar ao procedimento que foi avaliado no presente trabalho.

Outras técnicas também têm sido associadas a aplicação de campos elétricos, como a LLE, extração em membrana, microextração em fase sólida, entre outras, todas apresentando vantagens interessantes quando comparadas as técnicas convencionais (CAMPOS et al., 2015).

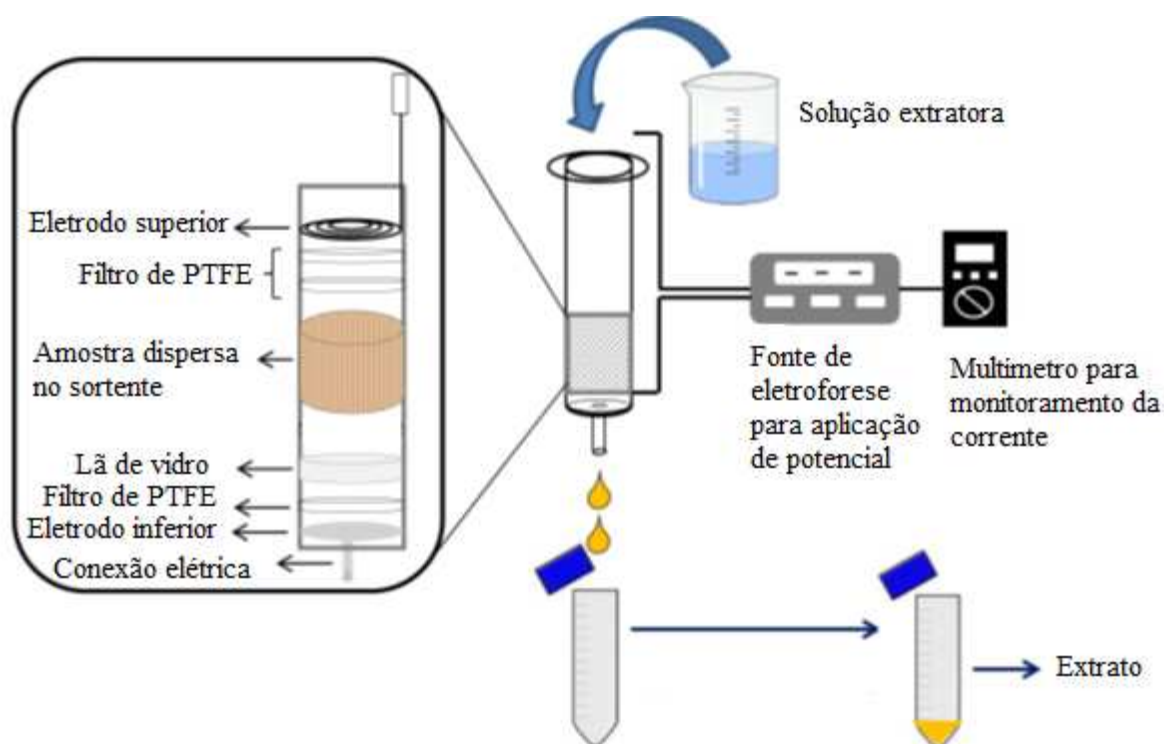


Figura 5. Esquema de extração por MSPD assistida por campo elétrico (Adaptada de PERUCHI, 2015).

1.7 Técnicas analíticas empregadas na determinação de fumonisinas

Devido a grande diversidade química das micotoxinas, bem como a ocorrência, muitas vezes simultânea, em diversas matrizes, torna-se necessário o desenvolvimento de métodos multi-analitos suficientemente sensíveis para a detecção das micotoxinas em limites abaixo dos valores estabelecidos pela legislação. Normalmente, os métodos de separação atendem a esses requisitos, mas exigem procedimentos de extração e purificação da amostra (CIGIĆ & PROSEN, 2009). A cromatografia líquida com diferentes detectores: ultravioleta-visível (HPLC-UV-Vis ou HPLC-DAD) (JIMENEZ & MATEO, 1997; YE et al., 2013), fluorescência (HPLC-FD) (JIMENEZ & MATEO, 1997; DUNCAN et al., 1998; TARDIEU et al., 2008; SILVA et al., 2009; KHAYOON et al., 2010; PETRARCA et al., 2014; PETRARCA et al., 2016) e espectrometria de massas (HPLC-MS ou UHPLC-MS ou UPLC-MS) (SØRENSEN & ELBÆK, 2005; D'ARCO et al., 2008; FRENICH et al., 2009; SILVA et al., 2009; KHAYOON et al., 2010; RUBERT et al., 2011; REN et al., 2011; SOLEIMANY et al., 2012; BELTRÁN et al., 2013; ABIA et al., 2013; ZHANG et al., 2013; ARROYO-MANZANARES et al., 2013a; ARROYO-MANZANARES et al., 2013b;

WANG et al., 2013; AZAIEZ et al., 2014; ARROYO-MANZANARES et al., 2014; PIZZUTTI et al., 2014; LIAO et al., 2014; BOLECHOVÁ et al., 2015; NIELSEN et al., 2015; GARCÍA-MORALEJA et al., 2015a; GARCÍA-MORALEJA et al., 2015b; JUNG et al., 2015; EDIAGE et al., 2015; OLIVEIRA et al., 2015; BRYŁA et al., 2015; BRYŁA et al., 2016), tem sido a técnica mais utilizada para esse fim (Tabela 7). A HPLC-FD apresenta um menor custo de aquisição e manutenção quando comparada a HPLC-MS. Entretanto, para determinação das fumonisinas, na HPLC-FD faz-se necessário uma etapa de derivatização, pois estas não apresentam grupos cromóforos. A HPLC-MS apresenta ainda a vantagem de identificação inequívoca dos analitos, o que é relevante em amostras complexas como alimentos.

Além da HPLC, a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS) também já foi utilizada para a determinação de fumonisinas (PESTKA et al., 1994; JIMENEZ & MATEO, 1997). Na GC também é necessário uma etapa de derivatização, uma vez que as fumonisinas apresentam baixa volatilidade.

A eletroforese capilar é outra técnica de separação que já foi empregada para a determinação de fumonisinas (MARAGOS et al., 1996; MARAGOS, 1997).

Além dos métodos de separação, vários métodos imunoenaios têm sido desenvolvidos para a determinação de fumonisinas (QUAN et al., 2006; He et al., 2012; MIRASOLI et al., 2012; OSWALD et al., 2013; WANG et al., 2013; BELOGLAZOVA et al., 2014; BURMISTROVA et al., 2014; JODRA et al., 2015; EZQUERRA et al., 2015; LING et al., 2015), tais métodos são normalmente associados às técnicas eletroquímicas ou de quimiluminescência. A espectrometria de infravermelho próximo (NIR) associada à calibração multivariada também foi empregada para a determinação de fumonisinas (GIACOMO et al., 2013).

1.8 Planejamento de experimentos

Planejamento de experimentos é uma ferramenta estatística poderosa para a otimização de um método analítico, pois permite selecionar as variáveis relevantes, avaliar a influência dessas variáveis em diferentes níveis, bem como as suas interações, e definir a condição ótima, realizando um número reduzido de experimentos. Uma otimização multivariada normalmente segue a ordem descrita na Tabela 8 (NETO et al., 2010). Em função das inúmeras vantagens da otimização multivariada, esta foi aplicada durante toda a otimização da extração e purificação

das fumonisinas do milho. Portanto, uma síntese das ferramentas utilizadas neste trabalho será apresentada a seguir.

Tabela 8. Técnicas utilizadas numa otimização multivariada

Objetivo	Técnica
Triagem de variáveis	Planejamentos fracionários ou completos 2^k
Avaliação da influência de variáveis relevantes	Planejamentos fatoriais completos
Construção de modelos estatísticos	Regressão pelo método dos mínimos quadrados
Definição da condição ótima	Metodologia de superfícies de resposta

1.8.1 Triagem

O primeiro passo para a otimização multivariada é selecionar quais variáveis são importantes para o sistema. O processo de triagem pode ser realizado por meio de planejamentos fatoriais completos 2^k ou de planejamentos fracionários 2^{k-i} (NETO et al., 2010).

Um planejamento fatorial completo inclui todas as possíveis combinações entre os níveis dos fatores. O planejamento fatorial 2^k envolve a análise de k fatores em dois níveis: inferior (-) e superior (+), requerendo a realização de 2^k experimentos (NETO et al., 2010).

À medida que o número de fatores aumenta, o número de experimentos aumenta exponencialmente, fato que, a partir de um determinado ponto, inviabiliza a realização de um planejamento fatorial completo. Uma alternativa mais simples, para avaliar um número elevado de fatores é a utilização de frações de um planejamento fatorial completo, ou seja, um planejamento fracionário (2^{k-i}). O problema dessa abordagem é que algumas interações entre fatores (efeitos) ficam mascaradas com outras interações do mesmo planejamento e geram um “confundimento” na interpretação desses resultados chamados de contrastes. Isso ocorre porque o número de graus de liberdade do planejamento diminui proporcionalmente com a fração aplicada e assim as interações passam a ter uma dependência linear entre elas (NETO et al., 2010).

1.8.2 Avaliação da influência de variáveis relevantes

Os planejamentos fatoriais de três níveis (3^k) são normalmente utilizados para avaliação da influência de variáveis previamente selecionada. Tais planejamentos envolvem a análise de k fatores em três diferentes níveis: inferior (-1), intermediário (0) e superior (+1) e requer a realização de 3^k experimentos (NETO et al., 2010).

1.8.3 Construção de modelos estatísticos

Após a execução de um planejamento de experimentos, um modelo estatístico pode ser construído para descrever o melhor ajuste entre resposta instrumental e as variáveis independentes. Tradicionalmente, o método dos mínimos quadrados tem sido utilizado na regressão, a fim de obter um modelo cuja soma dos quadrados dos resíduos seja mínima (Equação 3). Após a obtenção dos coeficientes de modelo, é necessário avaliar se esses são ou não significativos para o sistema em estudo, ou seja, é preciso construir intervalos de confiança para os coeficientes (Equação 7). Entretanto, para calcular os intervalos de confiança, é necessário primeiro estimar os erros padrões dos coeficientes (Equação 6), que por sua vez, dependem das estimativas das variâncias dos coeficientes (Equação 5) e da variância conjunta (Equação 4). Se o zero estiver incluso no intervalo de confiança, o coeficiente não é significativo, ou seja, o parâmetro analisado não exerce influência relevante sobre a resposta do ensaio (NETO et al., 2007).

Tabela 9. Parâmetros estatísticos e as respectivas equações para construção do modelo estatístico e obtenção dos intervalos de confiança dos coeficientes

Parâmetro estatístico	Equação
Coefficiente do modelo	$b = (\mathbf{X}^t \mathbf{X})^{-1} \mathbf{X}^t \mathbf{y}$ (3)
Variância conjunta	$\hat{V}_c = \frac{\mathbf{d}^t \mathbf{d}}{2N}$ ou $\hat{V}_c = \hat{V}_{ponto\ central}$ (4)
Variâncias dos coeficientes	$\hat{V}(b_i) = (diagonal\ principal\ da\ (\mathbf{X}^t \mathbf{X})^{-1} \times \hat{V}(c))$ (5)
Erro padrão dos coeficientes	$(e.p.(b_i)) = \sqrt{\hat{V}(b_i)}$ (6)
Intervalo de confiança	$IC = b_i \pm (t_{(\alpha, \nu)} \times e.p.(b_i))$ (7)

\mathbf{X} : matriz de coeficientes de contraste do planejamento fatorial; \mathbf{y} : vetor das respostas; \mathbf{d} : vetor das diferenças entre as respostas dos ensaios realizados em duplicata; N : número de ensaios necessários para o planejamento; $t_{(\alpha, \nu)}$: valor de t de Student.

1.8.4 Avaliação da qualidade do ajuste dos modelos estatísticos

Após a construção de um modelo estatístico, normalmente, avalia-se a qualidade do ajuste através da Análise de Variância (ANOVA). As fontes de variação, com as respectivas equações, avaliadas na ANOVA são apresentadas na Tabela 10, bem como as equações do teste F para avaliação da falta de ajuste do modelo e as estimativas da porcentagem de variação explicada e da porcentagem máxima explicável pelo modelo (NETO et al., 2007).

Se o valor de $F_{calculado} < F_{crítico}$ não há evidências de falta de ajuste no modelo, no nível de confiança avaliado. Além disso, quanto maior for a porcentagem máxima explicável, menor será a contribuição devido ao erro puro, ou seja, devido a erros aleatórios. A diferença entre a porcentagem máxima explicável e a porcentagem de variação explicada deve-se a desvios da resposta prevista em relação às respostas experimentais, ou seja, ao ajuste do modelo (NETO et al., 2007).

Tabela 10. ANOVA para o ajuste de um modelo linear nos parâmetros, pelo método dos mínimos quadrados

Fonte de Variação	Soma Quadrática	v	Média Quadrática
Regressão	$SQ_R = \sum_i^m \sum_j^{n_i} (\hat{y}_i - \bar{y})^2$ (8)	p - 1	$MQ_R = \frac{SQ_R}{p-1}$ (13)
Resíduo	$SQ_r = \sum_i^m \sum_j^{n_i} (y_{ij} - \hat{y}_i)^2$ (9)	n - p	$MQ_r = \frac{SQ_r}{n-p}$ (14)
Falta de ajuste	$SQ_{faj} = \sum_i^m \sum_j^{n_i} (\hat{y}_i - \bar{y}_i)^2$ (10)	m - p	$MQ_{faj} = \frac{SQ_{faj}}{m-p}$ (15)
Erro Puro	$SQ_{ep} = \sum_i^m \sum_j^{n_i} (y_{ij} - \bar{y}_i)^2$ (11)	n - m	$MQ_{ep} = \frac{SQ_{ep}}{n-m}$ (16)
Total	$SQ_T = \sum_i^m \sum_j^{n_i} (y_{ij} - \bar{y})^2$ (12)	n - 1	
% de variação explicada			$\frac{SQ_R}{SQ_T}$ (17)
% máxima de variação explicada			$\frac{SQ_T - SQ_{ep}}{SQ_T}$ (18)
Teste F para avaliação da falta de ajuste			$F_{(calculado)(faj,ep)} = \frac{MQ_{faj}}{MQ_{ep}}$ (19)

SQ_R : soma quadrática devida à regressão; SQ_r : soma quadrática residual; SQ_{faj} : soma quadrática devida a falta de ajuste; SQ_{ep} : soma quadrática devido ao erro puro; SQ_T : soma quadrática total; MQ_R : média quadrática devida à regressão; MQ_r : média quadrática residual; MQ_{faj} : média quadrática devida a falta de ajuste; MQ_{ep} : média quadrática devida ao erro puro; n_i : número de repetições no nível i; m: número de níveis distintos da variável independente; n: número total de observações; p: número de parâmetros ou coeficientes do modelo; \hat{y}_i : resposta prevista no nível i; \bar{y}_i : resposta média no nível i; y_{ij} : resposta experimental no nível i na replicata j; \bar{y} : média de todas as respostas experimentais.

1.8.5 Metodologia de superfícies de resposta

Quando o modelo ajustado não apresenta falta de ajuste, pode-se construir superfícies de resposta. Tal superfície pode apresentar uma região de máximo e/ou de mínimo no domínio

estudado, e é nessa região que, normalmente, se encontra o objetivo do estudo: a condição ótima. Os principais modelos utilizados são simples (lineares ou quadráticos) e não necessitam de muitos experimentos. Porém, o número de níveis de cada fator deve ser maior que dois para que o ajuste não tenha um número de parâmetros de regressão maior ou igual ao número de níveis de cada fator (NETO et al., 2007).

1.9 Validação

De acordo com o Manual da Garantia da Qualidade Analítica do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), a validação consiste é um estudo experimental documentado, cujo objetivo é demonstrar que o método analítico avaliado é adequado à finalidade proposta, de forma a assegurar a confiabilidade dos resultados obtidos (BRASIL, 2011a).

Para atingir tal finalidade, o planejamento, a preparação e a execução do procedimento de validação devem ser baseadas em critérios de desempenho pré-estabelecidos, indicados em guias ou protocolos específicos. No presente trabalho, o Manual da Garantia da Qualidade Analítica do MAPA foi usado como guia (BRASIL, 2011a).

A seguir, os parâmetros de desempenho mais usualmente avaliados são:

1.9.1 Efeito de matriz

Efeito matriz é um estudo de seletividade que averigua possíveis interferências causadas pelas diversas substâncias presentes na matriz, o que geralmente causa uma diminuição ou ampliação da resposta instrumental do analito de interesse (BRASIL, 2011a). A comparação do coeficiente angular da curva analítica em solvente com o coeficiente angular da curva matrizada é um dos possíveis procedimentos para avaliar o efeito de matriz.

1.9.2 Linearidade

Linearidade é a capacidade de o método produzir resultados diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo específico (BRASIL, 2011a). A

avaliação da qualidade de ajuste do modelo de regressão obtido para curvas analíticas é usada para estimar a linearidade do método.

1.9.3 Precisão

A precisão de um método analítico é a estimativa da dispersão dos resultados de ensaios independentes de amostras ou padrões, em condições definidas (BRASIL, 2011a). A precisão é normalmente avaliada através do desvio padrão relativo, em duas condições: repetibilidade e precisão intermediária.

1.9.4 Veracidade

A veracidade é a concordância entre a média dos resultados de um ensaio e o valor de referência aceito como verdadeiro (BRASIL, 2011a). A recuperação é usualmente utilizada para estimar a veracidade do método.

1.9.5 Limite de decisão, capacidade de detecção, limites de detecção e quantificação

O limite de decisão ($CC\alpha$) e a capacidade de detecção ($CC\beta$) são parâmetros definidos na Decisão 2002/657/CE (2002/657/EC, 2002) que medem o desempenho do procedimento analítico, levando em consideração a incerteza da medição no nível de concentração no qual se toma alguma decisão, o chamado nível de interesse (BRASIL, 2011a).

O $CC\alpha$ é definido como o menor nível de concentração em que o método pode discriminar com uma certeza estatística de $1-\alpha$ que o analito em questão está presente (2002/657/EC, 2002).

A $CC\beta$ representa a menor quantidade da substância que pode ser detectada, identificada e/ou quantificada em uma amostra com uma probabilidade de erro aceitável (β) (PASCHOAL, 2008).

O valor $CC\alpha$ e $CC\beta$ no nível de concentração zero (como para substância banida) corresponde respectivamente aos valores de limite de detecção (LD) e quantificação (LQ)

empíricos, mesmo se a substância possuir um limite máximo de resíduo (LMR) (BRASIL, 2011a).

1.9.6 Incerteza de medição

A incerteza de medição é definida como um parâmetro não negativo que caracteriza a dispersão dos valores atribuídos a um mensurando, com base nas informações utilizadas (BRASIL, 2011a). Uma das metodologias que podem ser utilizadas para estimar a incerteza de medição é conhecida como *Bottom-up* (BRASIL, 2014).

2 OBJETIVO

Desenvolver e validar um método para determinação das fumonisinas B1 e B2 em diferentes tipos de milho e em salgadinho à base de milho, empregando a MSPD para extração e purificação das fumonisinas e a HPLC-MS/MS para a determinação desses analitos.

Os objetivos específicos foram:

1. Desenvolver um método de quantificação das fumonisinas B1 e B2 por HPLC-MS/MS.
2. Avaliar e otimizar a MSPD e, de forma alternativa, a eletro-dispersão da matriz em fase sólida como técnicas de preparo de amostras para extração e purificação das fumonisinas B1 e B2 em milho.
3. Utilizar os planejamentos de experimentos para realizar a otimização multivariada da extração e purificação das fumonisinas B1 e B2 em milho.
4. Validar o método desenvolvido de acordo com recomendações de órgãos competentes nacionais e internacionais.
5. Expandir o escopo do método validado para outros tipos de milho e salgadinho à base de milho.

3 EXPERIMENTAL

3.1 Padrões, solventes e reagentes

Os padrões das fumonisinas B1 e B2 foram adquiridos da Sigma-Aldrich (pureza mínima de 98%) e da Wako Pure Chemical Industries (pureza maior que 90%), respectivamente. Acetonitrila (ACN), metanol, ácido acético 99% m/m, ácido fórmico 88% m/m, hidróxido de amônio 29% m/m grau HPLC foram obtidos da J. T. Baker. Tetrahidrofurano (THF) grau P.A. foi obtido da Dinâmica Química Contemporânea Ltda. Sílica gel 70-120 mesh foi adquirida da Fluka (Sigma-Aldrich). Sílica quimicamente ligada com grupos octadecil (sílica C18) (50 µm, 65A) foi obtida da Sepra - Phenomenex. A água ultrapura (resistividade de 18.2 MΩ cm) foi purificada através do purificador Millipore-Direct Q3 UV.

3.2 Instrumentos, equipamentos e materiais

Os principais instrumentos e equipamentos empregados nas etapas de otimização e validação da metodologia estão apresentados na Tabela 11, enquanto que os materiais estão apresentados na Tabela 12.

Tabela 11. Instrumentos e equipamentos empregados durante as otimização e validação do método

Instrumentos/Equipamentos	Marca/Descrição
HPLC-MS/MS	Espectrômetro API 5000 da Applied Biosystems acoplado a Sistema HPLC Agilent 1200
Balança analítica	Shimadzu, AUY220, capacidade de 220g e sensibilidade 0,1 mg
pHmetro	Jenway, 3510, empregando um eletrodo de vidro combinado
Bomba peristáltica	Ismatec, com quatro canais
Bomba de vácuo	Sargent-Welch - Direct Torr® - Vacuum pump
Balões volumétricos	Classe A, borossilicato, 5 mL Classe A, borossilicato, 10 mL
Fonte de eletroforese	Fisher-Scientific, modelo FISH-FB3000Q
Multímetro	Protek, modelo 506 com saída RS-232
Centrífuga	DAIKI, 80-2B
Sistema da purificação de água	Millipore, Direct Q3 UV
	Gilson, capacidade de 20 a 100 µL
	Gilson, capacidade de 50 a 200 µL
Micropipetas	Gilson, capacidade de 100 a 1000 µL
	Gilson, capacidade de 0,5 a 5 mL
	Gilson, capacidade de 1 a 10 mL

Tabela 12. Principais materiais empregados durante as otimização e validação do método

Materiais	Marca/Descrição
Coluna cromatográfica	Poroshell da Agilent Technologies C18 (100 x 3 mm, 2,7 µm)
Cartucho para DMFS	Varian, polipropileno
Filtro para cartucho	Varian, filtro de PTFE (politetrafluoretileno) sinterizado com poro de 20 µm
Tela de aço inoxidável	Steelmesh, de 80 mesh (diâmetro do fio de 0,080 mm e abertura de malha de 0,131 mm)
Membrana filtrante para seringa	Millipore, membrana de nylon (0,22 µm, 13 mm d.i)
Lã de vidro	Fibra média/ ISO FAR Indústria e Comércio de Produtos Químicos Ltda
Tubos de centrífuga	15 mL
	50 mL
	500 mL
Provetas	10 mL
	Porcelana
Graal e pistilo	Porcelana
Seringas plásticas	1 mL
Graal e pistilo	20 mL

3.3 Amostras

As amostras utilizadas na otimização, validação e expansão de escopo do método foram milho, milho de pipoca, canjica, canjiquinha e salgadinho à base de milho (Figura 6). O milho, o

milho de pipoca, a canjica e a canjiquinha foram moídos em moinho Retsch, com granulometria adequada, e cedidos pelo Laboratório de Controle de Qualidade e Segurança Alimentar (LACQSA) do MAPA. O salgadinho à base de milho foi adquirido no comércio de Belo Horizonte. Todas as amostras foram armazenadas sobre refrigeração a -10 °C.

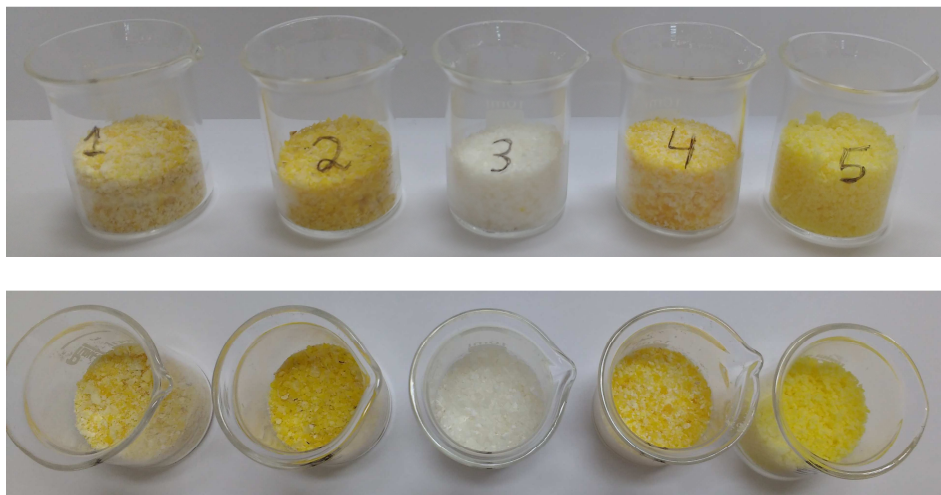


Figura 6. Amostras utilizadas na otimização, validação e expansão do escopo do método: (1) milho; (2) milho de pipoca; (3) canjica; (4) canjiquinha; (5) salgadinho à base de milho.

3.4 Preparo das soluções estoque e de trabalho das fumonisinas

Para preparar a solução estoque de cada fumonisina, pesou-se todo o conteúdo contido no frasco do padrão com o auxílio de um pesa-padrão em uma balança analítica. Transferiu-se a massa pesada para um balão volumétrico de 10,00 mL e completou o volume com ACN:água ultrapura (1:1 v/v). A concentração final de cada solução estoque foi de 0,848 mg mL⁻¹ para FB1 e 0,647 mg mL⁻¹ para FB2.

As soluções trabalho foram preparadas em forma de “pool” de padrões com 780 µL da solução estoque de FB1 e 270 µL da solução estoque de FB2 em balão volumétrico de 5,00 mL, sendo o volume aferido com ACN:água ultrapura (1:1 v/v). A concentração final de cada solução trabalho foi de 100,9 µg mL⁻¹ para FB1 e 45,8 µg mL⁻¹ para FB2.

As curvas analíticas foram preparadas a partir da diluição da solução trabalho com ACN:água ultrapura (1:1 v/v), sendo a faixa de trabalho de 2,5 a 60 ng mL⁻¹ para FB1 e 1 a 30 ng

mL⁻¹ para FB2. Todas as soluções padrão foram armazenadas a aproximadamente -10 °C em frascos âmbar.

3.5 Otimização das condições do HPLC-MS/MS

Foram realizados ensaios utilizando água ultrapura com 0,1% v/v de ácido fórmico (solvente A) e metanol ou ACN (solvente B) com 0,1% v/v de ácido fórmico. A condição ótima para a separação das fumonisinas, utilizando uma coluna C18 PoroShell da Agilent Technologies (100 x 3 mm, 2,7 µm) foi obtida com o solvente B consistindo de ACN com 0,1% de ácido fórmico. O gradiente otimizado foi: início com 20% do solvente B com variação linear até 90% em 3 minutos; composição constante de 90% do solvente B entre 3-3,4 minutos; redução linear para 20% do solvente B em 3,5 minutos; composição constante de 20% do solvente B de 3,5 até 6 minutos. A vazão da fase móvel foi 0,500 mL min⁻¹, o volume de injeção foi 10 µL e a temperatura da coluna foi mantida a 40°C.

Para a otimização das condições do espectrômetro de massas triplo quadrupolo, com fonte de ionização eletronebulização operando no modo positivo, realizou-se inicialmente a infusão direta de soluções padrão 10 µg L⁻¹ de FB1 e 5 µg L⁻¹ de FB2. Assim, identificou-se o íon precursor e os íons produtos resultantes da fragmentação dos íons precursores, selecionou-se o potencial de desagregação (*declustering potential* - DP) e a energia de colisão (*collision energy* - CE).

Em seguida, realizou-se a análise por injeção de fluxo (Flow Injection Analysis- FIA) para otimizar a voltagem do capilar, o curtain gas, a vazão do gás nebulizador e a temperatura da fonte. FIA foi realizada com uma vazão de fase móvel (água ultrapura com 0,1 % v/v de ácido fórmico e ACN com 0,1% v/v de ácido fórmico, numa mistura isocrática 50:50 v/v) de 0,5 mL min⁻¹. A seleção do valor ótimo para cada parâmetro baseou-se na combinação dos valores que levaram a maiores intensidades de sinal analítico para as respectivas transições, empregando o modo de monitoramento de reações múltiplas (MRM).

3.6 Preparo dos cartuchos

Foi pesado 1 g ($\pm 0,5$ mg) da amostra e 1 g ($\pm 0,5$ mg) de sílica gel em béqueres de vidro com capacidade para 10 mL. Ambas as massas foram transferidas para um graal de cerâmica e foram maceradas com pistilo. Os cartuchos de polipropileno (15 mL) foram montados usando um filtro de teflon com porosidade de 20 μm na parte inferior, seguido de uma porção de lã de vidro e da amostra dispersa. Os cartuchos foram compactados com auxílio de uma bomba de vácuo e finalizados com um filtro de teflon na parte superior.

3.7 Avaliações preliminares

3.7.1 Seleção do dispersante

Foram avaliados os dispersantes sílica gel e sílica C18. Os cartuchos foram preparados como descrito no item 3.6 e os analitos foram eluídos com 16,00 mL da solução extratora (mistura na proporção 9:1 (v/v) de 20 mmol L⁻¹ de tampão formiato de amônio (pH 7) e metanol). Foram coletadas frações de aproximadamente 2 mL do eluato. Os extratos foram centrifugados a 4000 rpm por 10 minutos, filtrado com filtro de seringa de 0,22 μm e 10 μL injetados no HPLC-MS/MS.

3.7.2 Avaliação da composição da solução extratora

Fixando o dispersante sílica gel, avaliou-se a composição da solução extratora através de um planejamento fatorial 3² (Tabela 13). Os cartuchos foram preparados como descrito no item 3.6 e eluídos 6,5 mL de solução extratora. Os extratos foram centrifugados a 4000 rpm por 10 minutos, filtrado com filtro de seringa de 0,22 μm e 10 μL injetados no HPLC-MS/MS.

Tabela 13. Planejamento fatorial 3^2 para avaliação da composição da solução extratora

Ensaio	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Solvente orgânico	-1	-1	-1	0	0	0	1	1	1
Solvente aquoso	-1	0	1	-1	0	1	-1	0	1

Solvente orgânico: (-) metanol; (0) ACN; (+) THF; Solvente aquoso: (-) 20 mmol L⁻¹ de tampão formiato de amônio pH 6; (0) água ultrapura; (+) 20 mmol L⁻¹ de tampão formiato de amônio pH 9; proporção de solvente orgânico e solvente aquoso (30:70 v/v).

3.7.3 Avaliação da influência do campo elétrico na extração das fumonisinas

Mantendo constantes o dispersante sílica gel e o pH 9 da solução tampão, realizou-se seis experimentos (Tabela 14) para avaliar a influência da aplicação de campo elétrico na extração por MSPD. Os cartuchos foram preparados como descrito no item 3.6, com a inclusão de um eletrodo na parte inferior e um eletrodo na parte superior. Os cartuchos foram eluídos com 6,5 mL da solução extratora (mistura na proporção 70:30 (v/v) de 20 mmol L⁻¹ de tampão formiato de amônio e ACN ou THF). Os extratos foram centrifugados a 4000 rpm por 10 minutos, filtrado com filtro de seringa de 0,22 µm e 10 µL injetados no HPLC-MS/MS.

Tabela 14. Ensaios realizados para avaliação da influência do campo elétrico na extração

Ensaio	Solvente orgânico	Voltagem (V)	Pólo superior	Pólo inferior
1	ACN	0	-----	-----
2	ACN	50	(-)	(+)
3	ACN	50	(+)	(-)
4	THF	0	-----	-----
5	THF	50	(-)	(+)
6	THF	50	(+)	(-)

3.7.4 Seleção das variáveis significativas para a extração das fumonisinas

Mantendo constantes o dispersante sílica gel, o pH 9 da solução tampão e a eluição sem aplicação de campo elétrico, realizou-se o planejamento fracionário $2^{(4-1)}$ para avaliar a influência

na extração por MSPD das variáveis: proporção de solvente orgânico:tampão, volume de eluição, solvente orgânico e concentração do tampão formiato de amônio (Tabela 15). Os cartuchos foram preparados como descrito no item 3.6. Os extratos foram centrifugados a 4000 rpm por 10 minutos, filtrado com filtro de seringa de 0,22 µm e 10 µL injetados no HPLC-MS/MS.

Tabela 15. Planejamento fracionário 2^{4-1} para seleção das variáveis significativas para a extração

Ensaio	Concentração do tampão (1)	Volume de eluição (2)	Solvente orgânico (3)	Proporção tampão:SO (1*2*3)
1	-1	-1	-1	-1
2	+1	-1	-1	+1
3	-1	+1	-1	+1
4	+1	+1	-1	-1
5	-1	-1	+1	+1
6	+1	-1	+1	-1
7	-1	+1	+1	-1
8	+1	+1	+1	+1

Concentração do tampão (mmol L^{-1}): (-1) 20 e (+1) 40; Volume de eluição (mL): (-1) 6 e (+1) 10; Solvente orgânico: (-1) ACN e (+1) THF; Proporção tampão:SO (v/v): (-1) 70:30 e (+1) 90:10; SO: solvente orgânico.

3.8 Otimização da extração das fumonisinas por MSPD

Mantendo constantes o dispersante sílica gel, o pH 9 da solução tampão, a eluição sem aplicação de campo elétrico e o solvente orgânico THF, realizou-se o planejamento Box-Benhken 3^3 para otimizar a extração das fumonisinas por MSPD (Tabela 16). Os cartuchos foram preparados como descrito no item 3.6. Os extratos foram centrifugados a 4000 rpm por 10 minutos, filtrado com filtro de seringa de 0,22 µm e 10 µL injetados no HPLC-MS/MS.

Tabela 16. Planejamento fatorial Box-Behnken empregado na otimização da extração por MSPD

Ensaio	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	PC
Concentração do tampão	-1	+1	-1	+1	-1	+1	-1	+1	0	0	0	0	0
Volume de eluição	-1	-1	+1	+1	0	0	0	0	-1	+1	-1	+1	0
THF:tampão	0	0	0	0	+1	-1	+1	+1	-1	-1	+1	+1	0

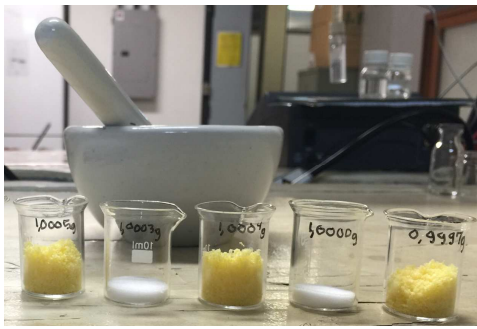
Volume de eluição (mL): (-) 4, (0) 6 e (+) 8; Concentração do tampão formiato (mmol L^{-1}): (-) 30, (0) 40 e (+) 50; proporção de THF:tampão: (-) 20:80, (0) 30:70 e (+) 40:60; PC: ponto central (n=3).

3.9 Procedimento de preparo da amostra otimizado

Foi pesado 1 g ($\pm 0,5$ mg) da amostra e 1 g ($\pm 0,5$ mg) de sílica gel em béqueres de vidro com capacidade para 10 mL. Ambas as massas foram transferidas para um graal de cerâmica e foram macerados com pistilo. Os cartuchos de polipropileno (15 mL) foram montados usando um filtro de teflon com porosidade de 20 μm na parte inferior, seguido de um pouco de lã de vidro e da amostra dispersa. Os cartuchos foram compactados com auxílio de uma bomba de vácuo e finalizados com um filtro de teflon na parte superior.

Após o empacotamento, eluiu-se o cartucho com 8,00 mL de solução extratora (mistura na proporção 70:30 (v/v) de 50 mmol L^{-1} de tampão formiato de amônio (pH 9) e THF). O extrato foi coletado, diluído para 10,00 mL com ACN:água ultrapura (1:1 v/v). Em seguida, o extrato diluído foi homogeneizado e centrifugado a 2600 rpm por 10 min. Posteriormente, uma alíquota de 5,00 mL desse extrato foi diluída para 25,00 mL com ACN:água ultrapura (1:1 v/v). Por fim, o extrato final foi centrifugado a 4000 rpm por 10 minutos, filtrado com filtro de seringa de 0,22 μm e injetado no HPLC-MS/MS.

A Figura 7 mostra fotos das principais etapas do procedimento otimizado.



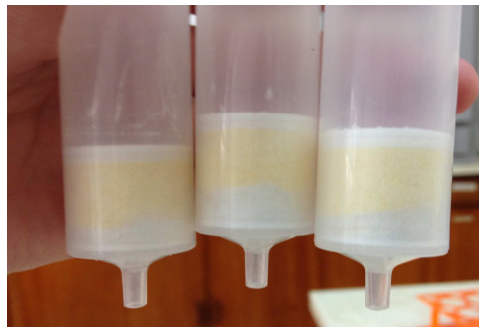
Amostra e sílica gel pesadas



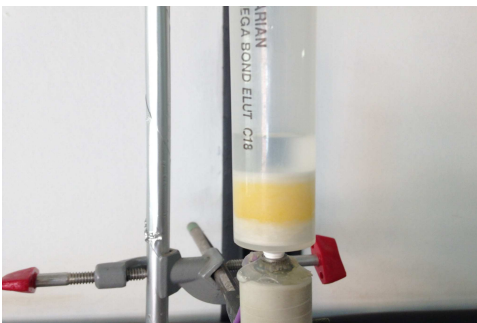
Maceração da amostra



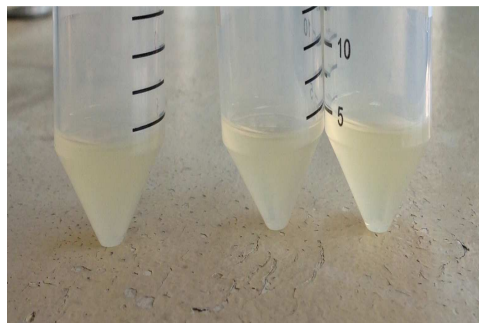
Amostra dispersa na sílica gel



Cartuchos montados



Eluição



Extrato eluído

Figura 7. Principais etapas do procedimento de extração e purificação das fumonisinas por MSPD otimizado.

3.10 Validação

3.10.1 Avaliação do efeito de matriz

A avaliação do efeito de matriz foi realizada comparando a inclinação da curva de padrão em solvente com as inclinações das curvas matrizadas para as amostras: milho, milho de pipoca, canjica, canjiquinha e salgadinho à base de milho (BRASIL, 2011a). Para o preparo das curvas matrizadas foram preparados três cartuchos, como descrito no item 3.6, para cada amostra. Em seguida, 3,90 mL do extrato foram transferidos para balões volumétricos de 5,00 mL, aos quais foram adicionadas alíquotas da solução trabalho tal a concentração final fosse: 0; 2,5; 5; 10,1; 20,2, 30,3 e 60,5 $\mu\text{g L}^{-1}$ para FB1 e 0; 1,1; 2,3; 4,6; 9,2; 13,7 e 27,5 $\mu\text{g L}^{-1}$ para FB2.

3.10.2 Faixa de trabalho e linearidade

A faixa de trabalho otimizada foi de 0,5; 1,0 e 1,5 vezes o LMR para milho (2000 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para a soma de FB1 e FB2), de acordo com a CE/1881/2006 (CE, 2006b).

Para o preparo da curva matrizada de milho preparou-se um cartucho como descrito no item 3.6. Em seguida, 4,00 mL do extrato foram transferidos para balões volumétricos de 5,00 mL, aos quais foram adicionadas alíquotas da solução trabalho tal a concentração final em cada nível fosse igual à descrita na Tabela 17. Tal procedimento foi realizado em três dias diferentes. Os sete pontos das curvas analíticas foram injetados no HPLC-MS/MS em duplicata, e as áreas obtidas dos picos de FB1 e FB2 foram utilizadas para construção das curvas.

Tabela 17. Curva matrizada de milho construída para avaliação da linearidade do método

Nível	[FB ₁] (µg L ⁻¹)	[FB ₂] (µg L ⁻¹)	*[FB ₁] na amostra (µg kg ⁻¹)	*[FB ₂] na amostra (µg kg ⁻¹)
1	0,0	0,0	0	0
2	2,5	1,3	125	65
3	7,5	3,8	375	190
4	15,0	7,5	750	375
5	20,0	10,0	1000	500
6	30,0	15,0	1500	750
7	60,0	30,0	3000	1500

* Valores calculados com base nos volumes de solventes e na massa de amostra utilizados no processo de extração e purificação.

Utilizou-se o teste *F* para avaliar a homocedasticidade das variâncias das áreas, fazendo a razão entre o nível com maior dispersão e o nível com menor dispersão. O método dos mínimos quadrados ponderado (MMQP) foi utilizado na regressão, usando a razão entre o somatório das variâncias das áreas pela variância áreas em cada nível de concentração como ponderador.

Para avaliar a linearidade estimou-se o coeficiente de correlação (*r*) e o coeficiente de determinação (*R*²), e em seguida, calculou-se *t_r* (Equação 8):

$$t_r = |r| \sqrt{\frac{N_x - 2}{1 - R^2}} \quad (8)$$

Onde, *r* é o coeficiente de correlação obtido do ajuste da curva de calibração pelo MMQP, *N_x* é o produto entre o número de níveis da curva e o número de preparos independentes de cada nível e *R*² é o coeficiente de determinação obtido do ajuste da curva de calibração pelo MMQP.

Se o valor de *t_r* calculado for maior ou igual ao valor crítico de *t*_(0,05; *N_x-2*) bilateral, considera-se que a faixa é linear (BRASIL, 2011a).

3.10.3 Repetitividade, precisão intermediária e veracidade

Para avaliar a veracidade do método foram preparadas amostras fortificadas de milho em três níveis de concentração, que correspondem a 0,5, 1,0 e 1,5 vezes o LMR como descrito na CE/1881/2006 (CE, 2006b) e no Manual de Garantia da Qualidade Analítica do MAPA (Brasil,

2011a). Neste procedimento, amostras naturalmente contaminadas de milho foram fortificadas em cada nível de interesse e extraídas utilizando-se o procedimento otimizado descrito no item 3.9. Cada nível de concentração foi preparado em triplicata para avaliar a repetitividade. Este procedimento foi efetuado em três dias diferentes pelo mesmo analista para avaliar a precisão intermediária.

A veracidade foi avaliada através da porcentagem de recuperação (R (%)) (BRASIL, 2011a). Para estimar a R (%), além das amostras fortificadas, supracitadas, foram realizadas extrações da amostra de milho naturalmente contaminado em triplicata, repetindo o procedimento em três dias diferentes. As R (%) foram calculadas de acordo com a Equação 9:

$$R = \frac{C_F - C_N}{C_{ad}} \times 100 \quad (9)$$

Onde, C_F é a concentração de fumonisina estimada pela curva analítica na amostra fortificada em $\mu\text{g kg}^{-1}$; C_N é a concentração de fumonisina estimada pela curva analítica na amostra natural contaminada em $\mu\text{g kg}^{-1}$ e C_{ad} é concentração adicionada de fumonisina na amostra em $\mu\text{g kg}^{-1}$.

As concentrações médias, as estimativas dos desvios padrões, os desvios padrões relativos (RSD) e R (%) foram calculados utilizando-se uma planilha Excel® validada pelo LANAGRO/MG.

3.10.4 Limite de decisão, capacidade de detecção e limites de detecção e quantificação

A determinação dos valores de $CC\alpha$ e $CC\beta$ foi executada a partir da curva analítica conforme instruções contidas na norma ISO 11843 (ISO 11843, 1997; ISO 11843, 2000) e no documento 2002/657/EC (2002/657/EC, 2002). Os valores de $CC\alpha$ (Equação 10) e $CC\beta$ (Equação 11) foram calculados no nível de concentração zero para estimar os valores de LD e LQ (BRASIL, 2011a).

$$CC\alpha = x_{NC} + \frac{t(\alpha, \nu)}{\hat{b}_w} \sqrt{\frac{s^2(\bar{y}_0)}{K} + s^2(\hat{a}_w) + (x_0)^2 s^2(\hat{b}_w) + 2(x_0)\text{cov}(\hat{a}_w, \hat{b}_w)} \quad (10)$$

$$CC\beta = x_{NC} + 2 \frac{t(\alpha, \nu)}{\hat{b}_w} \sqrt{\frac{s^2(\bar{y}_0)}{K} + s^2(\hat{a}_w) + (x_0)^2 s^2(\hat{b}_w) + 2(x_0)\text{cov}(\hat{a}_w, \hat{b}_w)} \quad (11)$$

Em que x_{NC} é concentração da solução do nível zero ($x = 0$), em $\mu\text{g kg}^{-1}$, utilizada no preparo da curva de calibração matrizada; x_0 é a concentração da solução do nível zero ($x = 0$), em $\mu\text{g L}^{-1}$, utilizada no preparo da curva de calibração matrizada; $s^2(\hat{a}_w)$ é a variância de intercepto estimada pela regressão MMQP; $s^2(\hat{b}_w)$ é a variância estimada da inclinação pela regressão MMQP; $cov(\hat{a}_w, \hat{b}_w)$ é a covariância entre intercepto e inclinação; K é o número de replicatas utilizadas para estimar \bar{y}_0 (resposta instrumental em $x = 0$) e $t(\alpha, \nu)$ é o t de student para uma significância α com ν graus de liberdade.

3.10.5 Estimativa da incerteza de medição

A incerteza de medição foi estimada de acordo com a metodologia *Bottom-up* (BRASIL, 2014) e esta foi dividida em três etapas básicas:

1. Especificar o mensurando;

O mensurando foi definido pela seguinte equação:

$$c_{FB}(\mu\text{g kg}^{-1}) = \frac{(C_{HPLC} + C_{CN}) \cdot V_{di} \cdot V_{df}}{V_a \cdot m_a} \quad (12)$$

Em que C_{HPLC} é a concentração obtida através da curva analítica, m_a é a massa da amostra usada no preparo do cartucho, V_{di} é o volume do balão usado para a diluição inicial do extrato, V_{df} é o volume do balão usado para a diluição final do extrato, V_a é o volume da alíquota de extrato, medido com auxílio de uma micropipeta, usado no preparo da amostra que foi injetada no HPLC-MS/MS e x_{CN} é a concentração da solução do nível zero ($x = 0$), em $\mu\text{g kg}^{-1}$, utilizada no preparo da curva de calibração matrizada.

2. Identificar as fontes de incerteza;

A identificação de todas as possíveis fontes de incerteza foi realizada com o auxílio de um diagrama de causa e efeito ou diagrama de Ishikawa (Figura 8)

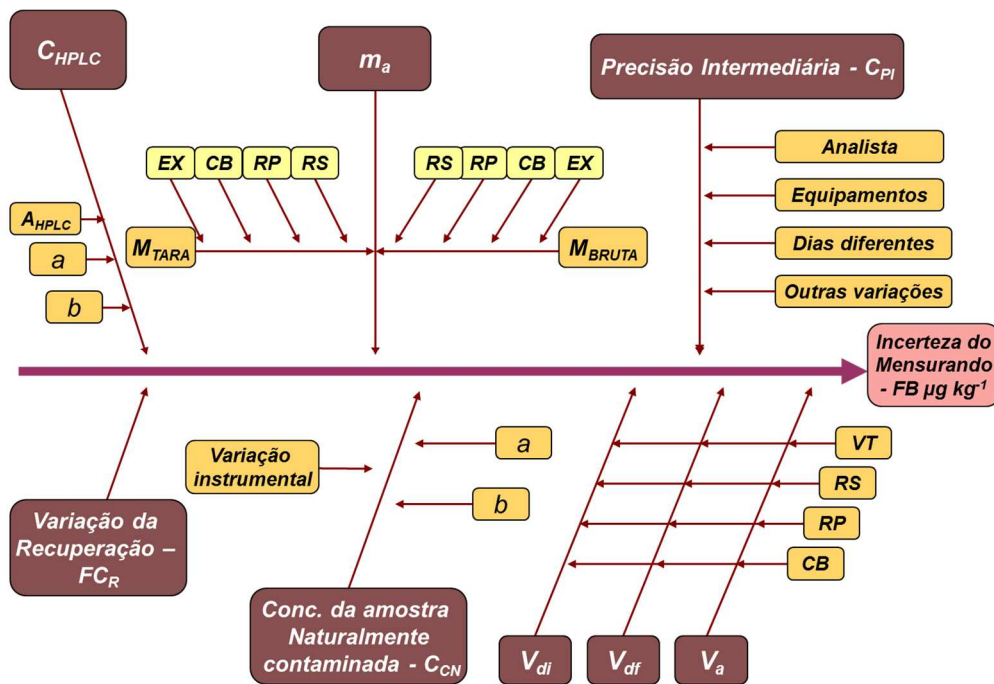


Figura 8. Diagrama de causa e efeito (Ishikawa) para representar as fontes de incerteza para estimar a incerteza do método de quantificação de fumonisinas (FB) por CLAE.

Em que,

■ Fontes de incertezas primárias

■ Fontes de incertezas secundárias

■ Fontes de incertezas terciárias

RS: incerteza devido à resolução do instrumento de medição;

RP: incerteza devido à repetibilidade ou reprodutibilidade interna do instrumento de medição;

CB: incerteza devido à calibração do instrumento de medição;

EX: incerteza devido à excentricidade da balança analítica;

VT: incerteza na medição de volume devido à variação de temperatura do laboratório;

M_{TARA} : massa de tara é a massa média do béquer, recipiente onde é pesada as amostra e

M_{BRUTA} : massa bruta de amostra é a massa média do béquer mais a massa pesada de amostra (1 g).

3. Estimar as incertezas de cada fonte de incerteza e calcular a incerteza padrão combinada;

A incerteza padrão combinada (u_c) foi calculada através da lei de propagação das incertezas usando as grandezas de entrada especificadas na equação do mensurando:

$$u_c^2 = (u_{b_0})^2 \left(\frac{\partial u_c}{\partial u_{b_0}} \right)^2 + (u_{b_1})^2 \left(\frac{\partial u_c}{\partial u_{b_1}} \right)^2 + 2cov(b_0, b_1) \left(\frac{\partial u_c}{\partial u_{b_0}} \right) \left(\frac{\partial u_c}{\partial u_{b_1}} \right) + (u_{v_{di}})^2 \left(\frac{\partial u_c}{\partial u_{v_{di}}} \right)^2 + (u_{v_{df}})^2 \left(\frac{\partial u_c}{\partial u_{v_{df}}} \right)^2 + (u_{m_a})^2 \left(\frac{\partial u_c}{\partial u_{m_a}} \right)^2 + (u_{v_a})^2 \left(\frac{\partial u_c}{\partial u_{v_a}} \right)^2 + (u_{c_{CN}})^2 \left(\frac{\partial u_c}{\partial u_{c_{CN}}} \right)^2 \quad (13)$$

A estimativa da incerteza para o método apresentado foi simplificada devido ao não uso de equipamentos calibrados e/ou com alguma rastreabilidade metrológica. Os cálculos apresentados foram baseados em estimativas de incertezas fornecidas pelo fabricante.

Um critério que permite comparar e avaliar a magnitude das incertezas estimadas está descrito na diretiva CE/401/2006 (CE, 2006a) onde assume-se que a incerteza padrão combinada do ensaio não deve ultrapassar o limite máximo de incerteza (U_{max}) calculado pela equação abaixo:

$$U_{max} = \sqrt{(LD/2)^2 + (\alpha \times C)^2} \quad (14)$$

Em que LD é o limite de detecção, em $\mu\text{g kg}^{-1}$, do método; C é a concentração média em $\mu\text{g kg}^{-1}$ da toxina na qual se estima a incerteza e α é um parâmetro que depende de C. A Tabela 18 mostra a dependência de α com C:

Tabela 18. Valores do parâmetro α em função da faixa de concentração do analito

C ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	α
≤ 50	0,2
51-500	0,18
501-1000	0,15
1001-10000	0,12
>10000	0,1

3.11 Expansão de escopo do método

A expansão de escopo foi realizada para quatro matrizes diferentes: milho de pipoca, canjica, canjiquinha e salgadinho à base de milho.

Para a avaliação da linearidade, faixa de trabalho, limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ), foram construídas curvas matrizadas para cada uma das matrizes. Tais curvas foram feitas a partir do extrato de amostra naturalmente contaminada. Foram sete níveis construídos cada um com 3 mL do extrato de amostra naturalmente contaminada em balões de 5 mL. Os 2 mL restantes foram preenchidos com uma mistura de solução padrão ([FB1] = 403,6 ng mL⁻¹ e [FB2] = 183,2 ng mL⁻¹) e solvente (acetoneitrila:água 1:1 v/v). Cada nível da curva foi construído com um volume diferente de solução padrão adicionada. As concentrações das curvas são as mesmas descritas na Tabela 17, exceto para salgadinho a base de milho, que estão descritas na Tabela 19.

Tabela 19. Curva matrizada de salgadinho a base de milho construída para avaliação da linearidade do método

Nível	[FB ₁] (µg L ⁻¹)	[FB ₂] (µg L ⁻¹)	*[FB ₁] na amostra (µg kg ⁻¹)	*[FB ₂] na amostra (µg kg ⁻¹)
1	0,0	0,0	0	0
2	1,2	0,5	60	25
3	3,6	1,6	180	80
4	7,7	3,5	385	175
5	10,1	4,6	505	230
6	14,9	6,8	745	340
7	30,3	13,7	1515	685

* Valores calculados com base nos volumes de solventes e na massa de amostra utilizados no processo de extração e purificação.

O procedimento para estimar o LD e o LQ foram os mesmos adotados no estudo com a matriz milho (item 3.10.4). A faixa de trabalho otimizada para cada matriz foi de 0,5; 1,0 e 1,5 vezes o LMR para milho (2000 µg kg⁻¹ para a soma de FB1 e FB2), exceto para o salgadinho a base de milho, que foi de 0,5; 1,0 e 1,5 vezes o valor de referência (1000 µg kg⁻¹ para a soma de FB1 e FB2).

Para a avaliação da precisão e veracidade da extensão de escopo, foram feitas duplicatas de extração de amostras fortificadas artificialmente nos níveis 1000, 2000 e 3000 $\mu\text{g kg}^{-1}$ da soma de FB1 e FB2, exceto para o salgadinho a base de milho, que foi 500, 1000 e 1500 $\mu\text{g kg}^{-1}$ soma de FB1 e FB2. A precisão foi estimada em termos de coeficiente de variação (CV) de repetibilidade em cada nível e a veracidade estimada por cálculo da recuperação (R%) da quantidade fortificada artificialmente para cada nível avaliado.

A incerteza de medição foi calculada da mesma maneira como descrito no item 3.10.5

Todos os extratos e níveis das curvas analíticas foram injetados no HPLC-MS/MS em duplicata.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Otimização das condições do HPLC-MS/MS

Após a realização da FIA, foi selecionada uma transição para quantificação e duas transições para identificação para cada FB. As transições selecionadas, os tempos de retenção dos analitos (t_r), os potenciais de desagregação (DP) e as respectivas energias de colisão (CE) estão relacionadas na Tabela 20. Um cromatograma obtido para mistura de padrões de FB1 e FB2 nas condições otimizadas é mostrado na Figura 9.

Tabela 20. Condições espectrométricas otimizadas para a análise das fumonisinas por HPLC-MS/MS no modo MRM

FB	Íon precursor (<i>m/z</i>)	Fragmento 1 (<i>m/z</i>) (quantificação)	Fragmento 2 (<i>m/z</i>) (identificação)	Fragmento 3 (<i>m/z</i>) (identificação)	<i>t_r</i> (min)	DP	CE 1	CE 2	CE 3
FB1	722,5	352,4	334,5	316,4	2,87	71	51	57	53
FB2	706,5	336,4	354,3	318,3	3,15	136	53	47	47

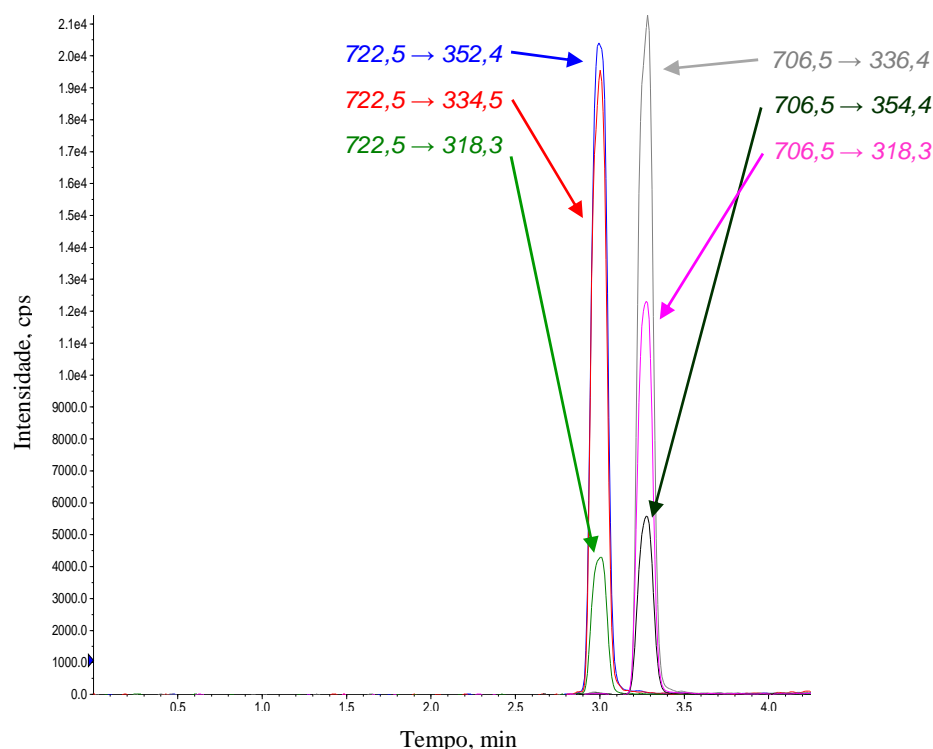


Figura 9. Cromatograma de íons extraídos de todas as transições da mistura de padrões de FB1 e FB2 em acetonitrila:água (1:1 v/v) nas condições otimizadas. Concentrações de aproximadamente 20 µg L⁻¹ para FB1 e 10 µg L⁻¹ para FB2.

4.2 Seleção do dispersante

Nesse experimento o volume de eluição foi fracionado em porções de 2 mL, de modo a verificar o perfil de eluição das fumonisinas quando sílica gel ou sílica C18 foram utilizadas como dispersante.

Com sílica gel, observou-se que a extração de FB1 e FB2 ocorreu majoritariamente nas frações iniciais. Entretanto, quando C18 foi utilizada, as fumonisinas apresentaram maior retenção e só começaram a eluir nas frações finais (Figura 10). Esses resultados mostraram que

as fumonisinas B1 e B2 apresentam um caráter mais apolar, apesar de apresentarem vários grupos ionizáveis, devido à alta retenção na sílica C18. Em virtude do menor tempo de extração, do menor consumo de solventes e do menor custo da sílica gel se comparada à sílica C18, esta foi selecionada como dispersante.

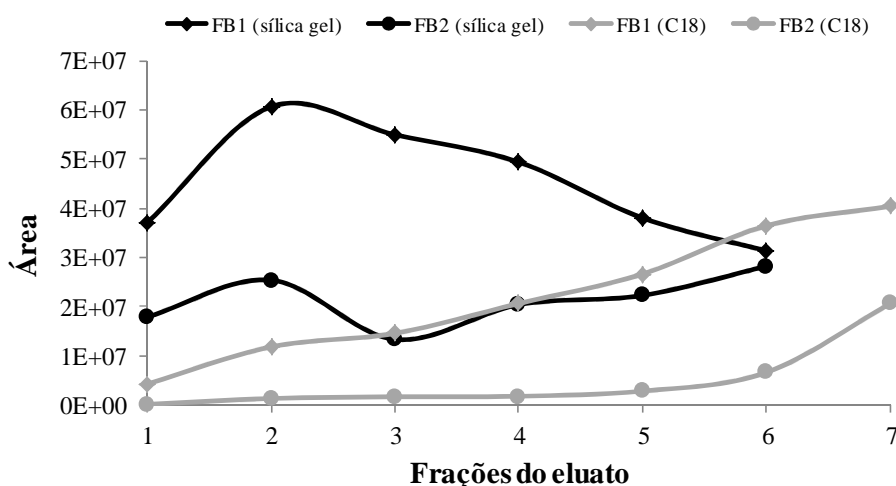


Figura 10. Perfil de extração das fumonisinas B1 e B2 em função das frações de volume da fase extratora.

4.3 Avaliação da composição da solução extratora

Realizou-se um planejamento fatorial 3^2 , a fim de verificar a influência do solvente orgânico e do solvente aquoso na extração das fumonisinas (Tabela 13). Os resultados monitorados foram as áreas de FB1 e FB2. Verificou-se que as maiores áreas para FB1 foram obtidas nos ensaios 6 e 9, ou seja, em pH 9 com ACN ou THF (Figura 11). Para FB2, no ensaio 9 obteve-se a maior área (Figura 11). Experimentalmente, verificou-se que a utilização de solventes mais apolares (ACN e THF) concomitantemente com o dispersante sílica gel, propiciou uma melhor extração das fumonisinas, indicando a ocorrência de uma interação de caráter apolar entre a sílica gel, a matriz do milho e as fumonisinas. As interações com a sílica gel em geral são devido aos grupos silanóis polares presentes na superfície desse material, contudo é preciso lembrar que na MSPD os interferentes da matriz podem alterar completamente as características dessas interações, fazendo que as interações analito-dispersante sejam governadas por um regime analito-interferente-dispersante. Essa característica da MSPD e da composição complexa do

milho pode ser a responsável pela maior extração das fumonisinas com solventes apolares em um dispersante polar como a sílica gel. O pKa da sílica gel encontra-se em torno de 6 (BAKER, 1995) e a faixa de pKa para as fumonisinas FB1 e FB2 é de 3,5 e 9,3. Portanto, em pH = 9, tanto os grupos silanóis da sílica gel quanto as fumonisinas possuem uma carga líquida negativa e espera-se que ocorra alguma repulsão eletrostática favorecendo a eluição das fumonisinas neste pH. Além disso, as fumonisinas podem sofrer hidrólise nos grupos éster em presença de metanol (GELDERBLOM et al., 1992; VISCONTI et al., 1994), o que pode justificar as baixas respostas obtidas para esse solvente.

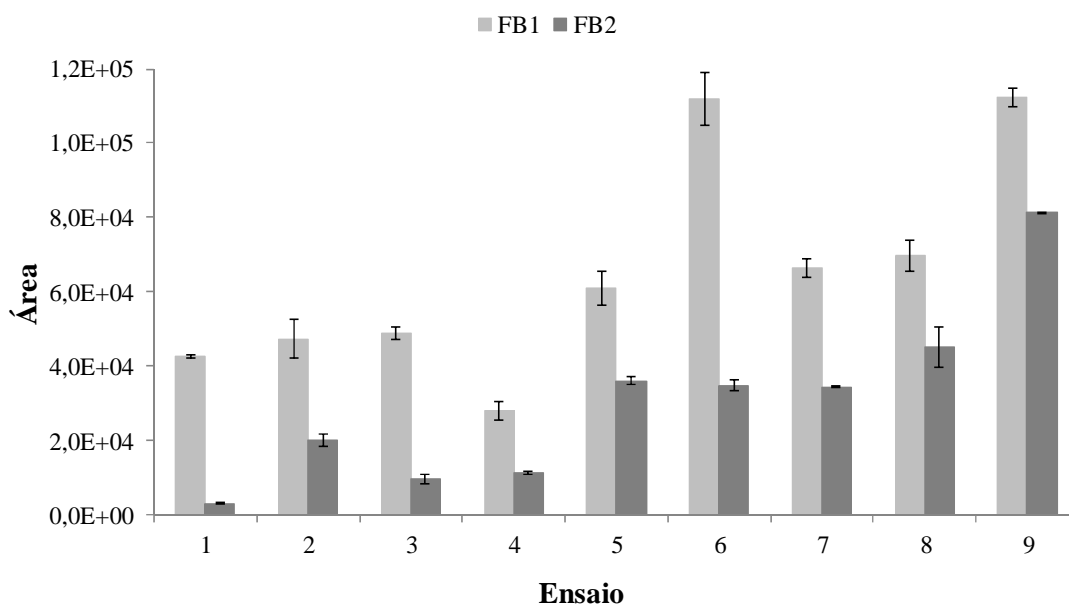


Figura 11. Resultados das extrações das fumonisinas B1 e B2 obtidos no planejamento fatorial 32 para avaliação da composição da solução extratora (n=2).

A Tabela 21 apresenta os coeficientes dos modelos ajustados pelo método dos mínimos quadrados, bem como os respectivos erros padrão e intervalos de confiança. Pode-se verificar que apenas o termo quadrático do solvente orgânico (b_{11}) não foi significativo em 95% de confiança, para ambas as fumonisinas. Portanto, os fatores solvente orgânico e solvente aquoso são significativos para a extração das fumonisinas do milho por MSPD. Em função das maiores áreas terem sido obtidas nos ensaios 6 e 9, o pH 9 foi selecionado e novos experimentos foram realizados com ACN e THF.

Tabela 21. Resultados estatísticos para os modelos obtidos a partir do planejamento fatorial 3²

Fumonisina	Coeficiente	Erro puro	Intervalo de confiança		F _{raj}	% de variação explicada	
			-95%	+95%			
FB1	b ₀	60883	4120	51562	70205	3,06	80,20
	b ₁	18292	2257	13087	23496		
	b ₂	22717	2257	17512	27921		
	b ₁₁	-2375	3909	-11389	6639		
	b ₂₂	9150	3909	136	18164		
	b ₁₂	9913	2764	3538	16287		
FB2	b ₀	30546	2158	25664	35429	2,70	92,44
	b ₁	21272	1182	18546	23998		
	b ₂	12849	1182	10123	15575		
	b ₁₁	4756	2048	34	9477		
	b ₂₂	-4569	2048	-9291	152		
	b ₁₂	10047	1448	6708	13385		

(1) solvente orgânico; (2) solvente aquoso; $F_{(0,05;3;9)} = 3,86$.

4.4 Avaliação da influência do campo elétrico na extração das fumonisinas

Uma vez que as fumonisinas e a sílica gel estão ionizadas em pH 9, realizou-se um conjunto de experimentos (Tabela 14) a fim de verificar se a aplicação de campo elétrico favoreceria a extração das fumonisinas por MSPD.

Com base nos resultados (Figura 12), verificou-se experimentalmente que a aplicação de campo elétrico diminuiu a extração das fumonisinas, independente da polaridade utilizada. Um esquema dos vetores: fluxo induzido por pressão (P), mobilidade eletroosmótica (v_{FEO}) e mobilidade eletroforética das fumonisinas (v_{FB}), que estavam atuando na separação, considerando o pH 9, é apresentado na Figura 12. Em função dos resultados (Figura 12), suspeita-se que a magnitude da mobilidade eletroosmótica (ensaios 3 e 6) foi ligeiramente superior a da mobilidade eletroforética das fumonisinas (ensaios 2 e 5). Com base nesta hipótese, esperava-se que as maiores áreas fossem obtidas nos ensaios 3 e 6, pois haveria uma contribuição positiva da mobilidade eletroosmótica no sentido da eluição. Entretanto, isso não foi comprovado experimentalmente. Verificando os gráficos de corrente elétrica e também pela inspeção da

temperatura do cartucho por contato manual, verificou-se que em vários momentos os cartuchos apresentaram um sobreaquecimento durante a aplicação de campo elétrico, o que muito provavelmente pode ter causado a formação de caminhos preferenciais e, conseqüentemente, a diminuição da eficiência da extração. Assim, optou-se por não utilizar a aplicação de campo elétrico nos estudos posteriores.

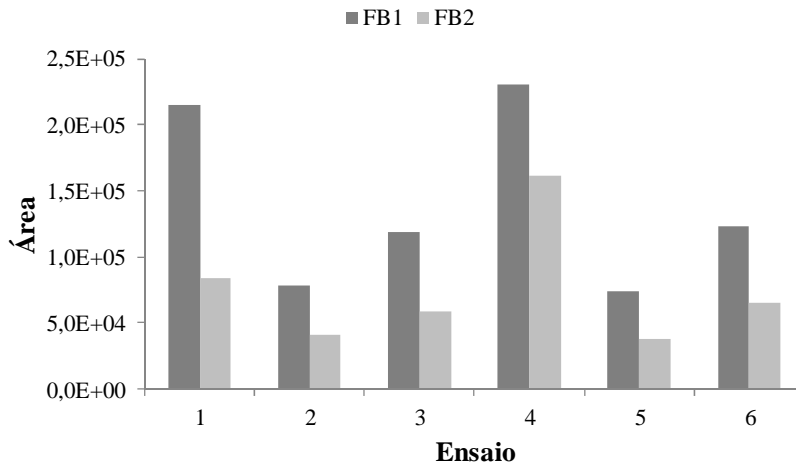


Figura 12. Resultados obtidos nos ensaios para avaliação da influência do campo elétrico na extração das fumonisinas.

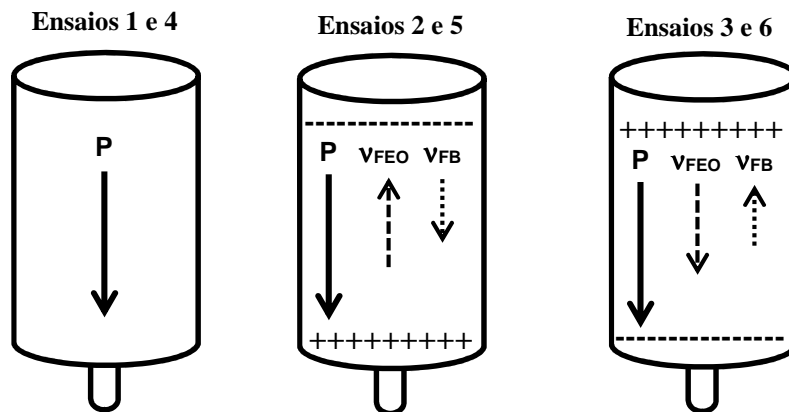


Figura 13. Esquema representando a ação dos vetores: fluxo induzido por pressão (P), mobilidade eletrosmótica (vFEO) e mobilidade eletroforética das fumonisinas (vFB), na extração das fumonisinas por MSPD assistida por campo elétrico.

4.5 Seleção das variáveis significativas para a extração das fumonisinas

Realizou-se um planejamento fracionário 2^{4-1} para verificar se as variáveis: concentração do tampão, volume da solução extratora, solvente orgânico utilizado na solução extratora e proporção de tampão:solvente orgânico, são relevantes para a extração das fumonisinas do milho por MSPD (Tabela 15).

A maior área para FB1 e FB2 foi obtida no ensaio 6 (Figura 14) que utilizou eluição com 6 mL da mistura 40 mmol L^{-1} de tampão formiato de amônio e THF, na proporção de 30:70 (v/v). Para verificar quais fatores afetaram significativamente a extração, calcularam-se os efeitos e, posteriormente, plotou-se um gráfico normal dos efeitos (Figura 15). Como o planejamento fracionário 2^{4-1} é de resolução quatro, os efeitos principais estão confundidos com interações de terceira ordem e as interações de segunda ordem estão confundidas entre si. Analisando o gráfico normal dos efeitos (Figura 15), pode-se verificar que todos os efeitos principais foram significativos, pois não houve uma distribuição linear dos efeitos em torno do ponto 0,0. Apesar de todos os fatores serem significativos, resolveu-se fixar um fator a fim de simplificar o planejamento de otimização, pois num planejamento fatorial 3^4 são necessários 81 ensaios. Assim, selecionou-se THF como solvente orgânico, pois o THF foi utilizado no ensaio 6, e já vinha fornecendo maiores áreas, principalmente para FB2, em todos os planejamentos fatoriais realizados anteriormente.

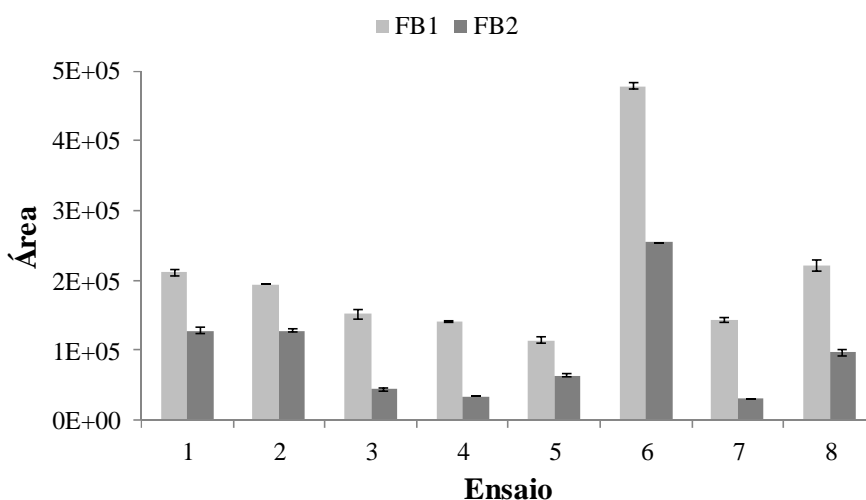


Figura 14. Resultados obtidos no planejamento fracionário 2^{4-1} para seleção das variáveis significativas para a extração das fumonisinas (n=2).

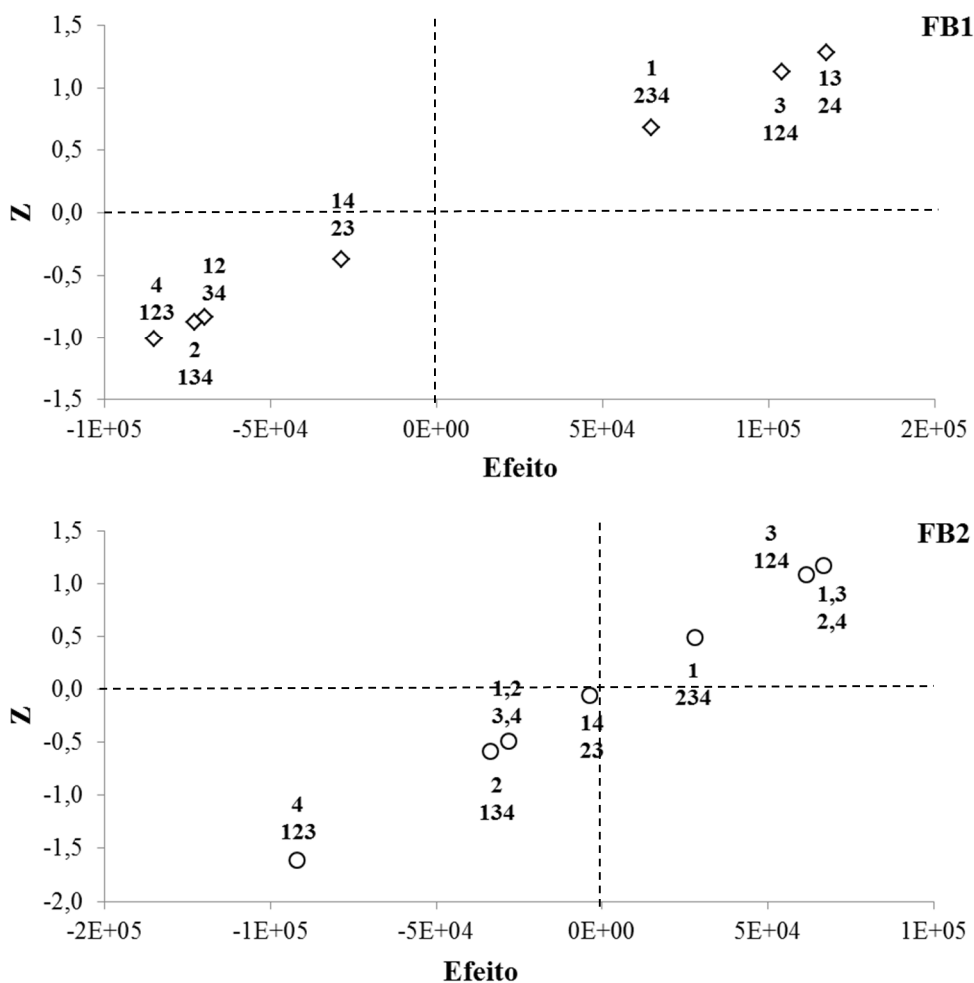


Figura 15. Gráfico normal dos efeitos do planejamento fracionário 2^{4-1} para a extração das fumonisinas.

4.6 Otimização da extração das fumonisinas por MSPD

Após a verificação de que fatores: concentração do tampão, volume de eluição e proporção tampão:THF, são relevantes para extração das fumonisinas em milho por MSPD, realizou-se um planejamento fatorial Box-Behnken para otimização do procedimento de extração (Tabela 16).

O planejamento fatorial Box-Behnken é um planejamento fatorial fracionário que avalia 3 fatores em 3 níveis (-1, 0, 1), caracterizado por remover pontos dos níveis extremos de um planejamento fatorial completo 3^3 . Assim, o número de experimentos é reduzido de 27 para 13.

Analisando os resultados das áreas para a FB1 e a FB2 (Figura 16), verificou-se que a maior eficiência de extração das fumonisinas foi obtida com o aumento da concentração do tampão formiato de amônio (ensaio 4), sugerindo uma predominância de interações iônicas entre

essas micotoxinas e a matriz e/ou a sílica gel. Já o aumento do teor de THF não influenciou significativamente a extração, mostrando que as interações hidrofóbicas presentes no material disperso já foram suficientemente quebradas com 20% do solvente orgânico. O aumento da eficiência de extração das fumonisinas foi proporcional ao aumento do volume de eluição, dentro da faixa avaliada, demonstrando um comportamento esperado para cromatografia.

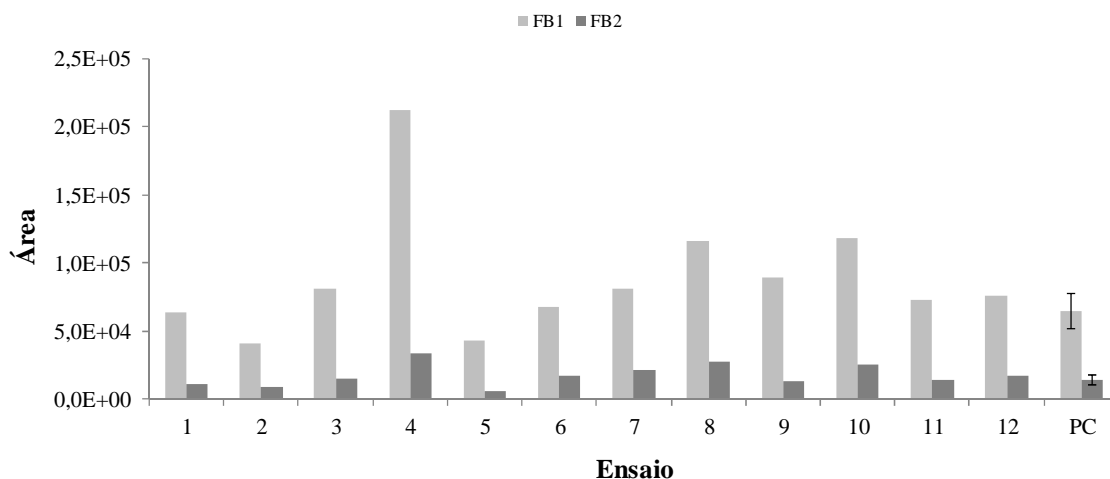


Figura 16. Resultados obtidos no planejamento fatorial Box-Behnken ($n_{PC} = 3$) para a extração das fumonisinas.

Para a avaliação estatística da influência dos fatores: concentração do tampão, volume de eluição e proporção THF:tampão, ajustou-se um modelo estatístico, pelo método dos mínimos quadrados, com as áreas de FB1 e FB2 (Tabela 22). Verificou-se que, tanto para FB1 quanto para FB2, a concentração do tampão, o volume de eluição e a interação entre esses dois fatores foram significativas. Variações na proporção THF:tampão não produziu efeito significativo na extração. Os modelos explicaram 74 e 78% para FB1 e FB2, respectivamente, e não apresentaram falta de ajuste com 95% de confiança.

Uma vez que os modelos não apresentaram falta de ajuste, construíram-se superfícies de resposta para avaliar graficamente a influência dos fatores estudados na extração de FB1 e FB2 (Figura 17). Analisando as superfícies A, C, E e F, verificou-se claramente que a proporção THF:tampão não influenciou significativamente na extração, pois neste eixo a superfície apresentou variações bem sutis. Nas superfícies B, C, E e F, observou-se que o aumento na concentração do tampão formiato de amônio favoreceu a extração de FB1 e FB2. Nas superfícies A, B, D e E, verificou-se que o volume de eluição influencia a extração, mas com menor intensidade que a concentração do tampão formiato de amônio. Assim, definiu-se a condição

ótima de extração como: eluição com 8 mL de solução 30:70 (v/v) de THF:50 mmol L⁻¹ de tampão formiato de amônio (pH 9).

O método MSPD desenvolvido por Rubert et al. para extração de micotoxinas em farinhas de cereais, consiste na dispersão de 1g de amostra com 1g de sílica modificada com C18. Depois a mistura homogeneizada é empacotada em coluna de vidro e a eluição é feita com 20 mL de uma mistura de acetonitrila:metanol (1:1 v/v) com 1 mmol L⁻¹ de formiato de amônio e sob leve vácuo (Rupert et al., 2011). Posteriormente o método proposto por Rubert et al. foi aplicado para diferentes análises. (Rubert et al., 2012a; Rubert et al., 2012b; Rubert et al., 2012c; Serrano et al., 2012; Blesa et al., 2014). Ye et al. propôs um método similar onde a eluição foi realizada com 10 mL de uma solução de ácido fórmico (10 mmol L⁻¹) em metanol (Ye et al., 2013).

Portanto, pode-se destacar as seguintes vantagens do método otimizado neste trabalho: o uso da sílica gel como dispersante, já que esta custa em torno de cinco vezes menos que a sílica gel modificada com C18; o uso de um volume menor de solventes orgânicos, pois utilizou-se 30% de solvente orgânico na extração, ao passo que Rubert et al. e Ye et al. utilizaram 100% de solventes orgânicos. Além disso, utilizou-se um volume menor dos solventes de eluição que diminuiu ainda mais o uso de solventes orgânicos, gerando assim menos resíduos tóxicos e favorecendo uma eluição mais rápida.

Tabela 22. Resultados estatísticos para os modelos obtidos a partir do planejamento Box- Behnken 3³

Fumonisina	Coeficientes	Erro Padrão	Intervalo de confiança		F _{faj}	% de variação explicada	
			-95%	95%			
FB1	b ₀	64317	7441	32298	96335	12,01	74,33
	b ₁	21225	4557	1618	40832		
	b ₂	27563	4557	7955	47170		
	b ₃	3513	4557	-16095	23120		
	b ₁₁	11454	6707	-17407	40315		
	b ₂₂	23604	6707	-5257	52465		
	b ₃₃	1179	6707	-27682	30040		
	b ₁₂	38425	6444	10696	66154		
	b ₁₃	2600	6444	-25129	30329		
	b ₂₃	-6550	6444	-34279	21179		
FB2	b ₀	14167	1139	9265	19069	13,58	78,33
	b ₁	4186	698	1184	7187		
	b ₂	5715	698	2713	8717		
	b ₃	2301	698	-701	5302		
	b ₁₁	1839	1027	-2580	6257		
	b ₂₂	1115	1027	-3304	5533		
	b ₃₃	1994	1027	-2425	6412		
	b ₁₂	5080	987	835	9325		
	b ₁₃	-1101	987	-5346	3144		
	b ₂₃	-2325	987	-6570	1920		

(1) Concentração do tampão formiato de amônio; (2) Volume de eluição; (3) porporção de THF:tampão; F_(0,05;3;2) = 19,16.

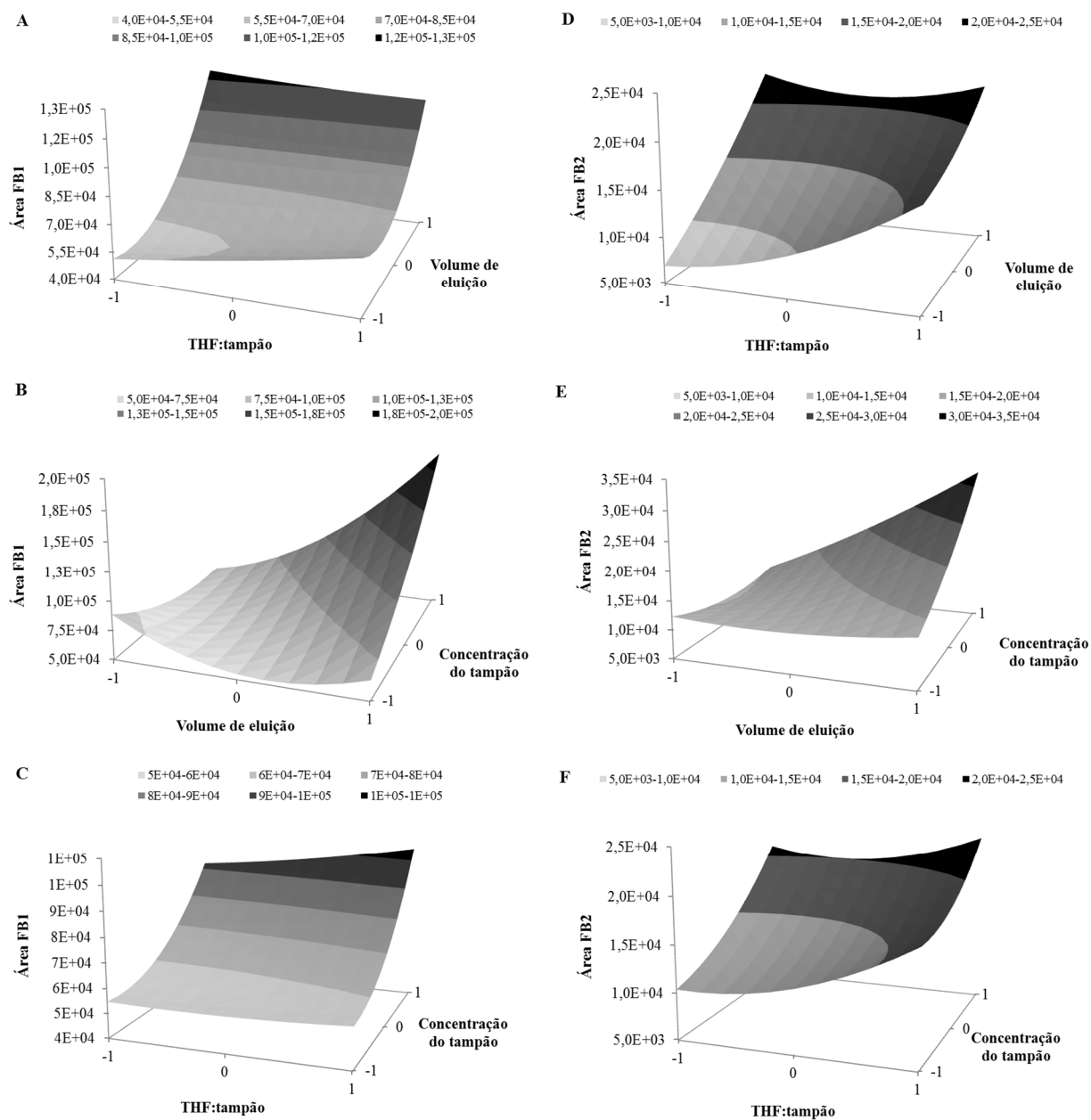


Figura 17. Superfícies de respostas construídas com as áreas de FB1 e FB2 obtidas do planejamento fatorial Box-Behnken 3^3 .

4.7 Validação

4.7.1 Avaliação do efeito de matriz

O estudo do efeito de matriz foi realizado comparando-se as inclinações de curvas analíticas de padrões em solvente com as curvas analíticas preparadas com extrato de milho, milho de pipoca, canjica, canjiquinha e salgadinho à base de milho (Figura 18). Todas as curvas

foram construídas nos mesmos níveis de concentração. A avaliação estatística foi feita inicialmente comparando-se as variâncias das inclinações de cada curva matrizada com a curva analítica em solvente através do teste F . Como as variâncias foram homogêneas ($F_{calculado} < F_{(0,05;2;2)}$), aplicou-se o teste t não pareado com variância agrupada para comparação das inclinações de cada curva matrizada com a curva analítica em solvente. Os valores de $t_{calculado}$ foram maiores que $t_{(0,05; 40)}$ evidenciando a influência da matriz no sinal das fumonisinas (Tabela 23). Portanto, curvas matrizadas devem ser utilizadas na quantificação dessas fumonisinas pelo método otimizado.

Nota-se também que os valores de inclinação para todas as curvas matrizadas foram maiores que o valor de inclinação para a curva em solvente, tanto para FB1 quanto para FB2 (Tabela 23). Tal característica evidencia um efeito de matriz positivo, fato que não é muito usual. Em vários casos a presença dos componentes da matriz suprime a ionização do analito deixando este com uma resposta instrumental mais baixa e conseqüente diminuição da inclinação em curvas matrizadas. Neste caso específico, suspeita de uma interação forte entre fumonisinas e a superfície interna dos frascos de vidro na curva em solvente. Essa interação pode ter diminuído a concentração efetiva de fumonisinas em solução e conseqüente menor resposta instrumental, ao passo que nas curvas matrizadas, os componentes da matriz competiam com as fumonisinas os sítios ativos da superfície interna dos frascos de vidro, deixando assim as fumonisinas mais disponíveis em solução e conseqüentemente com maiores respostas instrumentais.

Após a verificação do efeito de matriz, realizou-se a validação do método com a amostra de milho, e posteriormente realizou-se uma expansão do escopo do método validado para as demais matrizes.

A Tabela 23 apresenta os valores de $t_{calculado}$. O MMQP foi empregado na regressão de todas as curvas analíticas, uma vez que, apenas a amostra de canjica apresentou variâncias homogêneas ($F_{calculado} < F_{(0,05;2;2)}$). O inverso da variância foi utilizado como ponderador.

Tabela 23. Comparação estatística das curvas analíticas para FB1 e FB2 em solvente e em diferentes matrizes

FB1							
Matriz	teste F	b ₀	s (b ₀)	b ₁	s (b ₁)	R ²	teste t
Solvente	1319	1471	962	10053	169	0,999223	-
Milho	137	53850	3476	12104	300	0,999515	27
Canjica	11	12970	2779	11447	119	0,998031	31
Canjiquinha	123	27059	1770	11901	208	0,999970	32
Milho de pipoca	12	44026	10863	11689	693	0,988199	19
Salgadinho à base de milho	3052	686	171	11595	118	0,999998	8
FB2							
Matriz	teste F	b ₀	s (b ₀)	b ₁	s (b ₁)	R ²	teste t
Solvente	3151	4305	681	20927	277	0,998615	-
Milho	62	38302	4142	25626	584	0,998476	33
Canjica	14	3090	1280	24948	218	0,999934	52
Canjiquinha	184	15467	1017	25436	286	0,999979	52
Milho de pipoca	26	22708	5042	25167	846	0,999858	22
Salgadinho à base de milho	3052	693	171	25534	259	0,999998	56

$F_{(0,05; 2; 2)} = 19$; b₀: intercepto; b₁: inclinação; s (b₀): desvio padrão do intercepto; s (b₁): desvio padrão da inclinação; $t_{(0,05; 19)} = 2,17$.

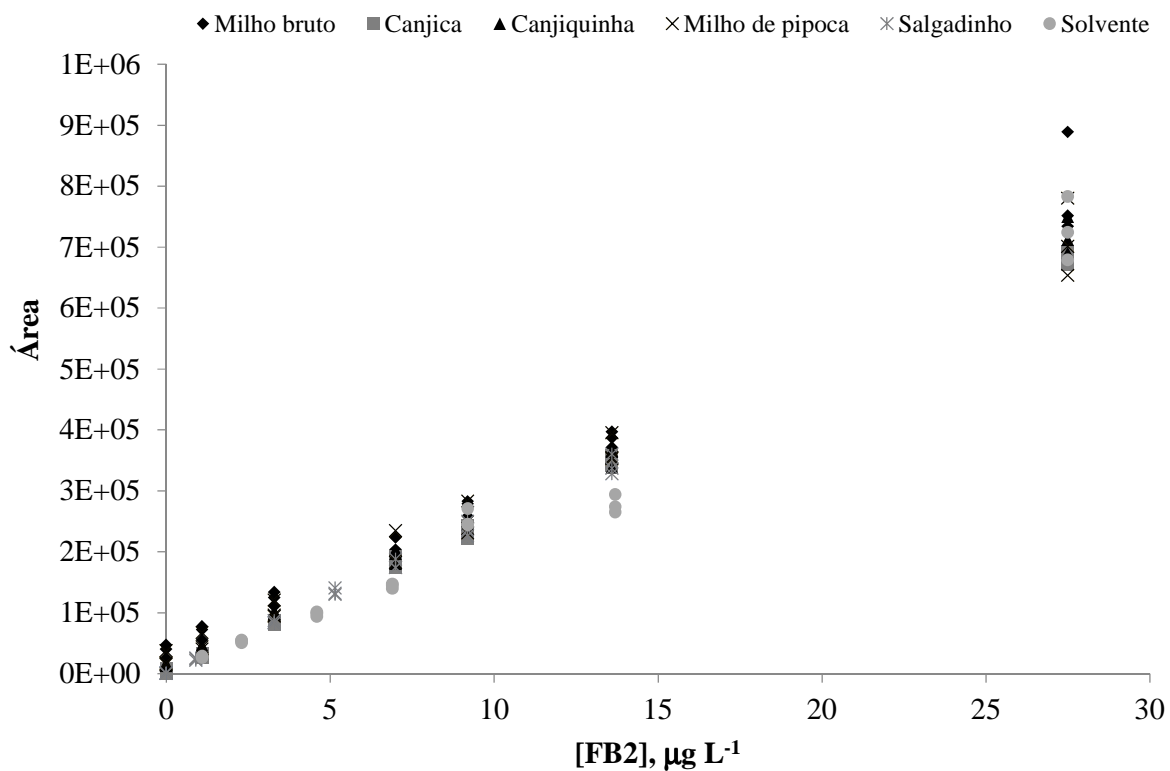
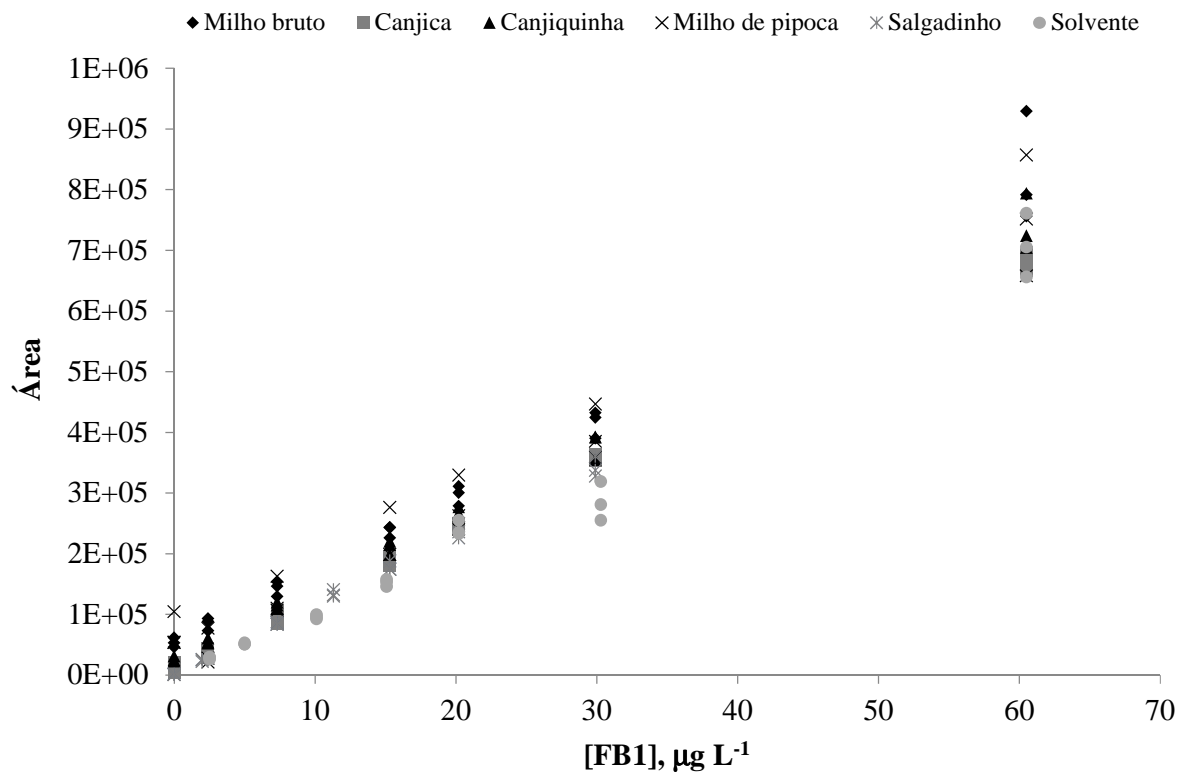


Figura 18. Curvas analíticas em solvente e matrizadas para FB1 e FB2.

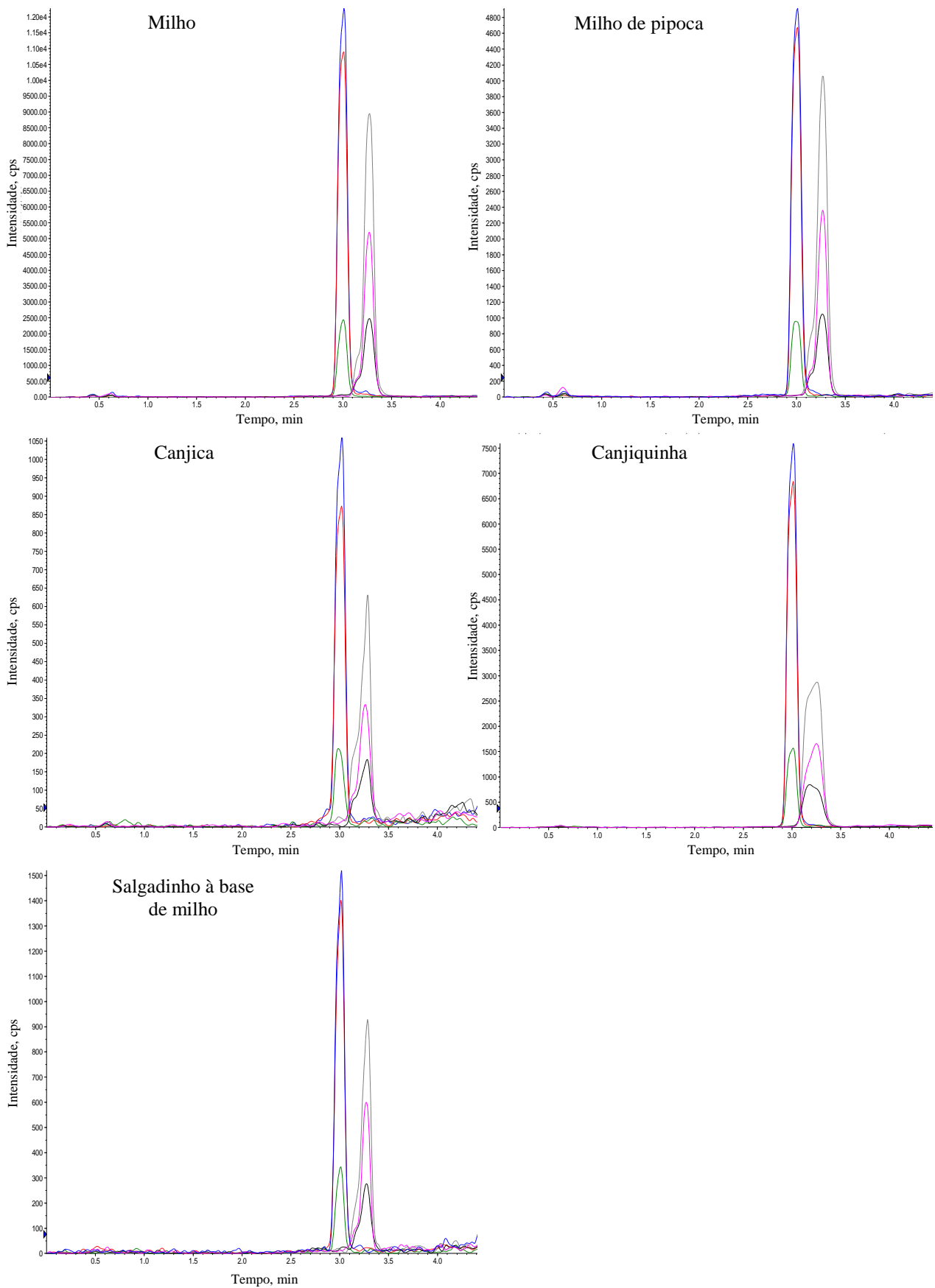


Figura 19. Cromatogramas de íons extraídos de FB1 e FB2 das diferentes matrizes analisadas (naturalmente contaminadas).

4.7.2 Faixa de trabalho e linearidade

A faixa de trabalho otimizada foi de 0,5 a 1,5 vezes o LMR, pois nesse intervalo o sinal apresentou uma relação linear com a concentração das fumonisinas B1 e B2, e esta é a faixa recomendada pela CE/1881/2006 (CE, 2006b).

Para definir o método de regressão a ser empregado, realizou-se o teste F para avaliar a homocedasticidade das variâncias das áreas obtidas para FB1 e FB2 ao longo da faixa de trabalho. O valor de F foi calculado dividindo a maior pela menor variância obtida para os 7 níveis de concentração avaliados. Em seguida, comparou-se esse valor com o valor crítico de $F_{(0,95; 2; 2)}$. Como os valores calculados de F foram maiores que o valor crítico (Tabela 24), as variâncias das áreas de FB1 e FB2 foram consideradas estatisticamente diferentes.

Uma vez que variâncias das áreas de FB1 e FB2 apresentaram um comportamento heterocedástico, o MMQP foi aplicado na regressão, utilizando a razão entre o somatório das variâncias das áreas pela variância áreas em cada nível de concentração como ponderador (Tabela 22).

Para avaliar a qualidade do ajuste linear, calculou-se r , R^2 e t_r (Brasil, 2011a). Os valores de r e R^2 foram iguais ou maiores que 0,999 e os valores de t_r foram cerca de 58 e 35 vezes maior que o valor crítico para FB1 e FB2, respectivamente (Tabela 22). Assim pôde-se concluir que o método apresentou linearidade adequada para a quantificação de FB1 e FB2 em milho.

Tabela 24. Resultados obtidos na avaliação da linearidade das curvas analíticas para FB1 e FB2

Fumonisina	F	b_0	b_1	$s(b_0)$	$s(b_1)$	R^2	t_r
FB1	71	60799	7043	5106	638	0,999	117
FB2	58	41618	14644	2945	771	0,999	146

$F_{(0,95; 2; 2)} = 19$; $t_{(0,05; 19)} = 2$; b_0 : intercepto; b_1 : inclinação; $s(b_0)$: desvio padrão do intercepto; $s(b_1)$: desvio padrão da inclinação.

A Figura 20 mostra as curvas analíticas obtidas para FB1 e FB2 com suas respectivas curvas de limite de previsão.

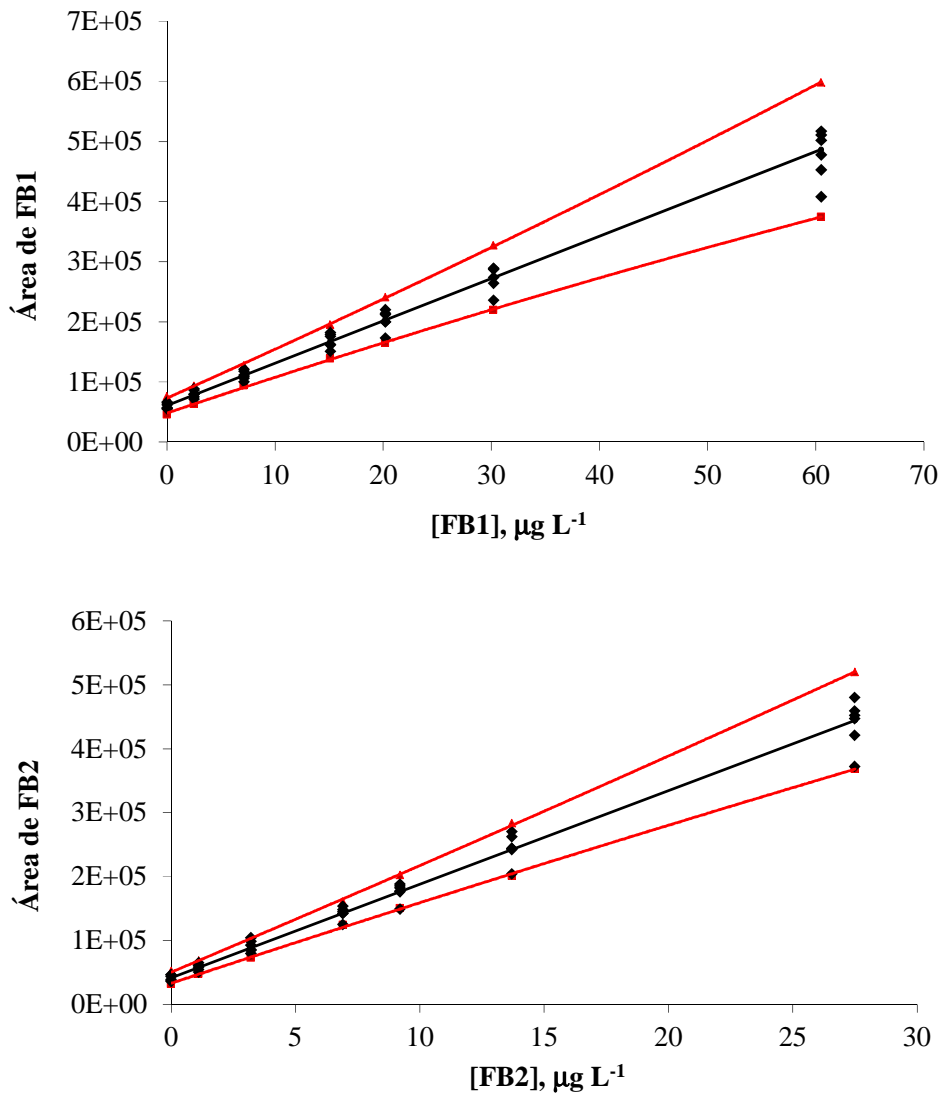


Figura 20. Curvas analíticas ajustadas pelo MMQP para FB1 e FB2 e suas respectivas curvas de limite de previsão.

4.7.3 Repetitividade, precisão intermediária e veracidade

A repetitividade foi avaliada em três níveis de concentração, que correspondem a 0,5, 1,0 e 1,5 vezes o LMR, como descrito no item 3.10.3. A precisão intermediária foi avaliada repetindo o procedimento descrito para repetitividade em três dias diferentes.

As áreas obtidas para os extratos de FB1 e FB2 supracitados foram substituídas nas respectivas curvas analíticas para determinação da concentração em $\mu\text{g L}^{-1}$, que foi convertida a

$\mu\text{g kg}^{-1}$. Com os valores das concentrações em $\mu\text{g kg}^{-1}$, calculou-se o RSD para estimar a repetitividade e a precisão intermediária (Tabelas 25 e 26).

Os valores das concentrações nos níveis 0,5, 1,0 e 1,5 vezes o LMR foram superiores a $500 \mu\text{g kg}^{-1}$, neste caso, o critério de aceitabilidade da diretiva CE/401/2006 (CE, 2006a) é que o RSD para repetitividade seja menor ou igual a 20% e para precisão intermediária menor ou igual a 30%. Todos os resultados ficaram dentro do critério.

A veracidade do método foi avaliada através da R (%), como descrito no item 3.10.3. Os valores da R (%) calculados para cada dia, nos três níveis de concentração, e os valores médios são apresentados na Tabelas 27 e 28. O critério de aceitabilidade da veracidade segundo a diretiva CE/401/2006 (CE, 2006a), para concentrações superiores a $500 \mu\text{g kg}^{-1}$, é que a R (%) fique dentro da faixa de 70-110%. Apenas o nível 0,5 vezes LMR, no segundo dia, apresentou valores de R (%) superiores a 110%. Entretanto, as recuperações médias ficaram dentro da faixa recomendada pela diretiva CE/401/2006 (CE, 2006a).

Tabela 25. Resultados obtidos na avaliação da repetitividade do método

Dia	Fração do LMR adicionada	[FB1] média ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	SD da [FB1] ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	RSD (%)	[FB2] média ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	SD da [FB2] ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	RSD (%)	[FB1+FB2] média ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	SD da [FB1+FB2] ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	RSD (%)
1°	0,5	1206	23	2	452	45	10	1658	68	4
	1,0	1859	105	6	728	91	12	2587	191	7
	1,5	2329	247	11	970	186	19	3299	433	13
2°	0,5	1364	75	6	581	54	9	1945	129	7
	1,0	1693	112	7	734	60	8	2428	170	7
	1,5	2534	92	4	1080	58	5	3614	137	4
3°	0,5	1227	37	3	509	39	8	1735	75	4
	1,0	1625	28	2	689	12	2	2314	40	2
	1,5	2153	192	9	855	22	3	3008	214	7

SD: Desvio padrão.

Tabela 26. Resultados obtidos na avaliação da precisão intermediária do método

Fração do LMR adicionada	[FB1] média ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	SD da [FB1] ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	RSD (%)	[FB2] média ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	SD da [FB2] ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	RSD (%)	[FB1+FB2] média ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	SD da [FB1+FB2] ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	RSD (%)
0,5	1253	78	6	506	65	13	1759	141	8
1,0	1726	130	8	717	59	8	2443	176	7
1,5	2362	225	10	982	140	14	3344	360	11

Tabela 27. Resultados obtidos na avaliação de veracidade do método

Dia	Níveis do LMR	[FB1] _{ad-cn} (µg kg ⁻¹)	[FB2] _{ad-cn} (µg kg ⁻¹)	[FB1+FB2] _{ad-cn} (µg kg ⁻¹)	[FB1] _{adc} (µg kg ⁻¹)	[FB2] _{adc} (µg kg ⁻¹)	[FB1+FB2] _{adc} (µg kg ⁻¹)	R _{FB1} (%)	R _{FB2} (%)	R _{FB1+FB2} (%)
1°	0,5	653	267	920	705	320	1025	93	84	90
	1,0	1306	543	1849	1312	595	1907	100	91	97
	1,5	1776	785	2560	2015	914	2929	88	86	87
2°	0,5	793	393	1186	704	320	1024	113	123	116
	1,0	1122	547	1669	1308	594	1902	86	92	88
	1,5	1962	892	2855	2016	915	2930	97	98	97
3°	0,5	707	346	1054	702	318	1020	101	109	103
	1,0	1105	527	1633	1310	595	1904	84	89	86
	1,5	1634	693	2327	2014	914	2928	81	76	80

adc: concentração adicionada calculada; ad-cn: concentração adicionada determinada experimentalmente menos a contaminação natural presente na amostra.

Tabela 28. Resumo dos resultados de recuperação para as concentrações finais em cada nível de FB1 e FB2

Níveis do LMR	[FB1] _{ad-cn} (µg kg ⁻¹)	[FB2] _{ad-cn} (µg kg ⁻¹)	[FB1+FB2] _{ad-cn} (µg kg ⁻¹)	R _{FB1} (%)	R _{FB2} (%)	R _{FB1+FB2} (%)
0,5	718	336	1053	102	105	103
1,0	1178	539	1717	90	91	90
1,5	1791	790	2581	89	86	88

4.7.4 Limite de decisão, capacidade de detecção e limites de detecção e quantificação

O $CC\alpha$ e a $CC\beta$ para FB1 e FB2 foram calculados a partir das curvas analíticas preparadas com a matriz de milho naturalmente contaminada, nos três dias, como descrito no item 3.10.2.

Os valores de $CC\alpha$, no nível de concentração zero (LD), estimados a partir da Equação 10 foram 645 µg kg⁻¹ para FB1 e 212 µg kg⁻¹ para FB2. Os valores de $CC\beta$, no nível de concentração zero (LQ), estimados a partir da Equação 11 foram 752 µg kg⁻¹ para FB1 e 247 µg kg⁻¹ para FB2.

Os valores de $CC\alpha$ e $CC\beta$ foram altos devido a elevada contaminação natural presente na amostra utilizada na construção das curvas analíticas. Se for utilizada uma amostra com baixa

contaminação natural ou uma amostra branca, tais valores diminuiriam proporcionalmente. Entretanto, os valores de $CC\alpha$ e $CC\beta$ foram inferiores ao limite máximo de fumonisina permitido em amostra de milho ($2000 \mu\text{g kg}^{-1}$), assim o método é capaz de detectar e quantificar as fumonisinas B1 e B2 abaixo do limite máximo aceitável.

4.7.5 Estimativa da incerteza de medição

As concentrações das FB1 e FB2 determinadas pela curva analítica nos níveis 0, 0,5, 1,0 e 1,5 vezes o LMR, bem como suas respectivas incertezas padrão combinadas (u_c) e limite máximo de incerteza (U_{max}) são apresentadas na Tabela 29.

Tabela 29. Concentrações das fumonisinas B1 e B2 determinadas em milho, suas incertezas combinadas e seus respectivos limite máximos de incerteza

Nível do LMR	FB1			FB2			FB1+FB2		
	[FB1]	u_c	U_{max}	[FB2]	u_c	U_{max}	[FB1+FB2]	u_c	U_{max}
NC	546	108	270	178	68	94	724	127	362
0,5	1253	186	298	506	141	116	1759	233	404
1,0	1726	260	330	717	192	139	2443	323	453
1,5	2361	372	383	982	281	172	3344	466	529

[FB] em $\mu\text{g kg}^{-1}$; u_c em $\mu\text{g kg}^{-1}$; U_{max} calculado para as concentrações obtidas nos três dias diferentes; NC: amostra naturalmente contaminada com concentrações estimadas pelo método da adição de padrão.

Analisando os resultados apresentados na Tabela 29, pôde-se verificar que apenas FB2 não atingiu completamente o critério estipulado, porem os valores de incerteza não diferiram muito de tal critério. Os demais valores de incerteza, bem como os relacionados a soma de FB1 e FB2 (valores que são referenciados nas legislações) ficaram dentro do critério estabelecido. Deve-se ressaltar que a incerteza é um dos mais importantes parâmetros metrológicos para avaliar a qualidade de um resultado, pois permite sua comparação com outros resultados e com limites legais estabelecidos (BRASIL, 2011a).

4.8 Expansão de escopo do método

Os resultados obtidos na extensão de escopo estão resumidos nas Tabelas 30, 31 e 32.

Tabela 30. Comparação estatística das curvas analíticas para FB1 e FB2 em diferentes matrizes

Matriz	FB1								
	teste F^*	b_0	$s(b_0)$	b_1	$s(b_1)$	R^2	LD	LQ	teste t^*
Canjica	4526	6610	527	12725	59	0,999941	33	39	292
Canjiquinha	2160900	23950	122	12141	831	0,9999999	100	102	29419
Milho de pipoca	625	24641	432	12995	127	0,9999997	101	107	3955
Salgadinho à base de milho	5848	1293	192	12782	202	0,9999991	7	10	2384
Matriz	FB2								
	teste F^*	b_0	$s(b_0)$	b_1	$s(b_1)$	R^2	LD	LQ	teste t^*
Canjica	2178	4547	367	28957	195	0,999983	12	16	550
Canjiquinha	9409	13000	1318	27014	542	0,999992	32	40	791
Milho de pipoca	6630	17642	649	28855	581	0,999996	34	38	1125
Salgadinho à base de milho	1661	1760	299	28618	385	0,999994	5	7	913

* F crítico para avaliação da heterocedasticidade: 161. t crítico para avaliação da linearidade: 5,05.

Pelos resultados do testes F , nota-se que todas as curvas apresentaram comportamento heterocedástico para as variâncias em seus níveis ($F_{\text{calculado}} > F_{\text{crítico}}$ em todos os testes) e por isso as regressões foram feitas seguindo o MMQP. Os coeficientes de correlação encontram-se muito próximos a unidade ($R^2 > 0,99990$ em todas as matrizes), sendo um dos indicadores de bom ajuste. O teste t executado de acordo com a Equação 8 mostrou que, em todas as curvas, a conclusão foi de linearidade atendida.

Não houve outro procedimento para avaliação da qualidade de ajuste pois a ANOVA exige homocedasticidade das variâncias (NETO et al., 2010) e o teste qui-quadrado fica comprometido com um número pequeno de replicatas em cada nível.

Os valores obtidos para LD e LQ foram estimados pela curva de calibração ($CC\alpha$ e $CC\beta$) e mostram a boa sensibilidade do método em níveis mais baixos (LQ chegou a $39 \mu\text{g kg}^{-1}$ de FB1 em canjica e $7 \mu\text{g kg}^{-1}$ para salgadinho à base de milho).

Tabela 31. Resultados de precisão em termos de RSD% de repetibilidade e da veracidade em termos dos fatores de recuperação (R%) para as matrizes avaliadas na extensão de escopo

Amostra de milho de pipoca						
Nível do LMR	FB1		FB2		FB1+FB2	
	RSD%	R%	RSD%	R%	RSD%	R%
0,5	9	109	12	93	10	104
1,0	7	113	6	98	7	109
1,5	11	118	9	103	10	113
Amostra de canjiquinha						
Nível do LMR	FB1		FB2		FB1+FB2	
	RSD%	R%	RSD%	R%	RSD%	R%
0,5	-	92	-	75	-	87
1,0	4	103	2	93	2	100
1,5	8	110	8	93	8	105
Amostra de canjica						
Nível do LMR	FB1		FB2		FB1+FB2	
	RSD%	R%	RSD%	R%	RSD%	R%
0,5	16	97	19	76	17	91
1,0	9	90	14	67	10	83
1,5	8	88	18	67	10	82
Amostra de salgadinho à base de milho						
Fração do nível de referência	FB1		FB2		FB1+FB2	
	RSD%	R%	RSD%	R%	RSD%	R%
0,5	44	94	55	74	47	88
1,0	1	76	4	59	1	71
1,5	47	63	50	50	48	59

Em termos de precisão em condições de repetibilidade, todas as matrizes exceto salgadinho à base de milho, apresentaram precisão dentro do critério do Regulamento CE/401/2006 (Tabela 31) em todos os níveis (RSD < 20%, exceto para salgadinho à base de milho). Durante o processo de eluição das fumonisinas na matriz de salgadinho à base de milho houve problemas de entupimento dos cartucho e eluição muito demorada pois a matriz mostrou-se muito higroscópica e compactou-se muito no interior do cartucho, mesmo não se aplicando

vácuo na etapa de construção dos cartuchos. Acredita-se que este empecilho impactou na baixa repetibilidade para essa matriz.

Já em termos de veracidade, obtiveram-se alguns pontos levemente fora do critério (recuperações entre 60 a 120% para amostras com menos de $500 \mu\text{g kg}^{-1}$ e entre 70 a 110% para concentrações acima de $500 \mu\text{g kg}^{-1}$ para FB1 ou FB2) para milho de pipoca, canjica e salgadinho à base de milho (Tabela 31). Além do problema mencionada para as amostras de salgadinho à base de milho, o número de replicatas para as demais amostras foi pequeno (2 amostras por nível) e os valores médios mostrados na Tabela 31 podem ter sido mal estimados. De qualquer forma, mesmo com um número reduzido de experimentos, houve uma boa concordância dos resultados obtidos com os critérios do Regulamento CE/401/2006.

Em relação a estimativa da incerteza, a Tabela 32 mostra que somente algumas incertezas padrão combinadas no nível de contaminação natural das amostras (NC) foram superiores ao máximo estipulado. Neste nível, FB2 não atendeu o critério para milho de pipoca e canjiquinha, ao passo que FB1 foi insatisfatório somente para canjica. Como a amostra de salgadinho à base de milho apresentou problemas de repetibilidade, esperava-se que esta amostra não fosse se adequar aos critérios de incerteza. De fato isso ocorreu para a maioria dos níveis avaliados.

A questão mais importante é que no parâmetro de decisão, que consiste na soma das duas fumonisinas, as amostras de milho de pipoca, canjica e canjiquinha atenderam bem ao critério, assim como a amostra de milho.

Tabela 32. Resultados de incerteza padrão combinada e seus respectivos critérios (U_{\max}) para FB1, FB2 e soma destas nas matrizes avaliadas na extensão de escopo.

Amostra de milho de pipoca									
Nível do LMR	FB1			FB2			FB1+FB2		
	[FB1]	u_c	U_{\max}	[FB2]	u_c	U_{\max}	[FB1+FB2]	u_c	U_{\max}
NC	282	65	130	113	73	51	394	98	180
0,5	1050	151	367	410	132	175	1459	201	510
1,0	1765	275	614	694	228	269	2459	357	854
1,5	2664	416	924	1054	325	366	3718	528	1290
Amostra de canjiquinha									
Nível do LMR	FB1			FB2			FB1+FB2		
	[FB1]	u_c	U_{\max}	[FB2]	u_c	U_{\max}	[FB1+FB2]	u_c	U_{\max}
NC	333	134	150	83	48	39	416	142	189
0,5	980	182	383	324	110	138	1304	212	456
1,0	1681	260	584	637	189	247	2318	321	806
1,5	2548	577	884	928	372	360	3476	687	1206
Amostra de canjica									
Nível do LMR	FB1			FB2			FB1+FB2		
	[FB1]	u_c	U_{\max}	[FB2]	u_c	U_{\max}	[FB1+FB2]	u_c	U_{\max}
NC	57	35	29	17	8	9	73	36	38
0,5	745	148	289	261	97	111	1006	177	349
1,0	1235	181	428	411	153	175	1647	237	571
1,5	1832	258	635	629	241	244	2462	353	853
Amostra de salgadinho à base de milho									
Fração do nível de referência	FB1			FB2			FB1+FB2		
	[FB1]	u_c	U_{\max}	[FB2]	u_c	U_{\max}	[FB1+FB2]	u_c	U_{\max}
NC	16	22	8	7	7	4	23	23	12
0,5	348	159	148	126	79	53	474	178	201
1,0	515	65	199	180	61	77	695	89	269
1,5	656	315	254	237	140	100	892	344	346

5 CONCLUSÃO

Neste trabalho foi desenvolvido e validado um método para determinação de FB1 e FB2 em milho empregando a MSPD para extração e purificação, o uso da MSPD traz como vantagens: a eliminação de etapas prévias de solubilização dos analitos, sendo necessária apenas a moagem dos grãos; o uso de uma massa reduzida de amostra (1 g), frente aos demais métodos; o uso de volume reduzido de solventes orgânicos; a realização da extração e purificação em uma única etapa. A técnica HPLC-MS/MS tem sido amplamente descrita na literatura para monitoramento de micotoxinas, e neste trabalho, também foi empregada para a quantificação das fumonisinas B1 e B2. O uso da HPLC-MS/MS permitiu a identificação com elevada confiabilidade de FB1 e FB2, utilizando uma ampla faixa de trabalho, com linearidade adequada e elevada sensibilidade.

A otimização do procedimento de extração e purificação foi realizada por meio de planejamentos de experimentos, sendo utilizados os planejamentos fatoriais fracionário, completo e o planejamento Box-Behnken. A otimização multivariada permitiu a obtenção de dados de forma concisa e organizada, o que facilitou a definição da sequência de experimentos e da condição ótima.

O método validado forneceu R^2 maiores que 0,999 e valores de t_r superiores ao valor crítico, indicando que o ajuste linear das curvas analíticas foi adequado. A precisão foi avaliada através da repetitividade e da precisão intermediária, ambas em três níveis de concentração. O maior valor do $RSD_{\text{intra-dia}}$ foi 19% para FB2 e do $RSD_{\text{inter-dia}}$ foi 14% também para FB2. A veracidade foi avaliada através da R (%) em três níveis de concentração. Os valores médios de R (%) ficaram na faixa de 81-113% para FB1 e 76-123% para FB2. O valor do $CC\alpha/LD$ foi de 645 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para FB1 e 212 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para FB2. O valor da $CC\beta/LQ$ foi de 752 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para FB1 e 247 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para FB2. Os valores de $CC\alpha/LD$ e $CC\beta/LQ$ foram considerados adequados para determinação dessas fumonisinas em milho, uma vez que o LMR para FB1+FB2 é 2000 $\mu\text{g kg}^{-1}$. A incerteza de medição também foi estimada, considerando as fontes advindas da curva analítica e de cada etapa do preparo de amostra. A maior parte dos valores de u_c apresentam conformidade com a legislação, pois mantiveram uma concordância com o limite máximo de incerteza permitido U_{max} .

Em relação à extensão de escopo, pode-se dizer que as amostras de milho de pipoca, canjica e canjiquinha apresentaram um bom desempenho em termos dos parâmetros de validação avaliados. A amostra de salgadinho à base milho não obteve desempenho favorável e acredita-se que os problemas experimentais com esse tipo de amostra impactaram muito nos resultados finais. Cabe um trabalho de avaliação mais rigoroso para se obter confiabilidade nos resultados com essa amostra.

REFERÊNCIAS

2002/657/EC: Commission Decision of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results, 2002.

ABIA, W. A.; WARTH, B.; SULYOK, M.; KRŠKA, R.; TCHANA, A. N.; NJOBEH, P. B.; DUTTON, M. F.; MOUNDIPA, P. F. Determination of multi-mycotoxin occurrence in cereals, nuts and their products in Cameroon by liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). *Food Control*, v. 31, p. 438-453, 2013.

ANUKUL, N.; VANGNAI, K.; MAHAKARNCHANAKUL, W. Significance of regulation limits in mycotoxin contamination in Asia and risk management programs at the national level. *J. Food Drug Anal.*, v. 21, p. 227-241, 2013.

ARROYO-MANZANARES, N.; GARCÍA-CAMPANA, A. M.; GÁMIZ-GRACIA, L. Multiclass mycotoxin analysis in *Silybum marianum* by ultra-high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry using a procedure based on QuEChERS and dispersive liquid–liquid microextraction. *J. Chromatogr. A*, v. 1282, p. 11– 19, 2013a.

ARROYO-MANZANARES, N.; HUERTAS-PÉREZ, J. F.; GÁMIZ-GRACIA, L.; GARCÍA-CAMPAÑA, A. M. A new approach in sample treatment combined with UHPLC-MS/MS for the determination of multiclass mycotoxins in edible nuts and seeds. *Talanta*, v. 115, p. 61–67, 2013b.

ARROYO-MANZANARES, N.; HUERTAS-PÉREZ, J. F.; GÁMIZ-GRACIA, L.; GARCÍA-CAMPAÑA, A. M. Simple and efficient methodology to determine mycotoxins in cereal syrups. *Food Chem.*, v. 177, p. 274–279, 2015.

ARROYO-MANZANARES, N.; HUERTAS-PÉREZ, J. F.; GARCÍA-CAMPAÑA, A. M.; GÁMIZ-GRACIA, L. Simple methodology for the determination of mycotoxins in pseudocereals, spelt and rice. *Food Control*, v. 36, p. 94-101, 2014.

AZAIÉZ, I.; GIUSTI, F.; SAGRATINI, G.; MAÑES, J.; FERNÁNDEZ-FRANZÓN, M. Multi-mycotoxins Analysis in Dried Fruit by LC-MS/MS and a Modified QuEChERS Procedure. *Food Anal. Methods*, v. 7, p. 935–945, 2014.

BAKER, D. R. *Capillary Electrophoresis*. John Wiley & Sons, Inc. p. 26, 1995.

BARKER, S. A. Matrix solid phase dispersion (MSPD). *J. Biochem. Biophys. Methods*, v. 70, p. 151–162, 2007.

BARKER, S. A. Matrix solid-phase dispersion. *J. Chromatogr. A*, v. 885, p. 115–127, 2000.

BARKER, S. A.; LONG, A. R.; SHORT, C. R. Isolation of drug residues from tissues by solid phase dispersion. *J. Chromatogr.*, v. 475, p. 353-361, 1989.

BELOGLAZOVA, N.V.; SPERANSKAYA, E.S.; WU, A.; WANG, Z.; SANDERS, M.; GOFTMAN, V.V.; ZHANG, D.; GORYACHEVA, I.YU.; DE SAEGER, S. Novel multiplex fluorescent immunoassays based on quantum dot nanolabels for mycotoxins determination. *Biosens. Bioelectron.*, v. 62, p. 59–65, 2014.

BELTRÁN, E.; IBÁÑEZ, M.; PORTOLÉS, T.; RIPOLLÉS, C.; SANCHO, J. V.; YUSÀ, V.; MARÍN, S.; HERNÁNDEZ, F. Development of sensitive and rapid analytical methodology for food analysis of 18 mycotoxins included in a total diet study. *Anal. Chim. Acta*, v. 783, p. 39–48, 2013.

BENTO, L. F.; CANEPPELE, M. A. B.; ALBUQUERQUE, M. C. F.; KOBAYASTI, L.; CANEPPELE, C.; ANDRADE, P. J. Ocorrência de fungos e aflatoxinas em grãos de milho. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, v. 71, n. 1, p. 44-49, 2012.

BIOMIN. Biomin's mycotoxin survey report 2014. Disponível em: <<http://www.biomin.net/en/biomin-mycotoxin-survey-2014/>>. Acesso em 10 de julho de 2015.

BLACKWELL, B. A.; EDWARDS, O. E.; APSIMON, J. W.; FRUCHIER, A. Relative Configuration of the C-10 to C-16 Fragment of Fumonisin B1. *Tetrahedron Lett.*, v. 36, n. 12, p. 1973-1976, 1995.

BLESA, J.; MOLTÓ, J.C.; AKHDARI, S.E.; MAÑES, J.; ZINEDINE, A. Simultaneous determination of Fusarium mycotoxins in wheat grain from Morocco by liquid chromatography coupled to triple quadrupole mass spectrometry. *Food Control*, v. 46, p. 1-5, 2014.

BOLECHOVÁ, M.; BENESOVÁ, K.; BELÁKOVÁ, S.; CÁSLAVSKÝ, J.; POSPÍCHALOVÁ, M.; MIKULÍKOV, R. Determination of seventeen mycotoxins in barley and malt in the Czech Republic. *Food Control*, v. 47, p. 108-113, 2015.

BOLGER, M. C.; DINOVI, M.; GAYLOR, D.; GELDEBOLM, W. C.; OLSEN, M.; PASTER, N.; RILEY, R. T.; SHEPHARD, G.; SPIJERS, G. J. A. Fumonisin. Safety evaluation of certain mycotoxin in food. International Programme on Chemical Safety World Health Organization. FAO FOOD and Nutrition Paper 74, WHO – Food Additives Series: Geneva, 2001.

BORDIN, K.; ROSIM, R. E.; NEEFF, D. V.; ROTTINGHAUS, G. E.; OLIVEIRA, C. A. F. Assessment of dietary intake of fumonisin B1 in São Paulo, Brazil. *Food Chem.*, v. 155, p. 174–178, 2014.

BORGES, K. B.; DE FIGUEIREDO, E. C.; QUEIROZ, M. E. C. Preparo de amostra para análise de compostos orgânicos. 1ª Edição, LTC, Rio de Janeiro, p. 80-87, 2015.

BOYLE, C. D.; KISHI, Y. Absolute Configuration at the Tricarballic Acid Moieties of Fumonisin B2. *Tetrahedron Lett.*, v. 36, n. 26, p. 4579-4582, 1995.

BRASIL, Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Manual de Garantia da Qualidade Analítica: Resíduos e Contaminantes em Alimentos. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Divisão de Ensaio Químicos, Coordenação-Geral de Apoio Laboratorial, 2014.

BRASIL, Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Manual de validação, verificação/confirmação de desempenho, estimativa da incerteza de medição e controle de qualidade intralaboratorial. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Secretaria de Defesa Agropecuária, Brasília, 2011a.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Tabela Brasileira de Composição de Alimentos – TACO. Campinas, 4ª edição, 2011b, p. 28.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Resolução – RDC nº 7, de 18 de fevereiro de 2011. Brasília, 2011c.

BRYŁA, M.; ROSZKO, M.; SZYMCZYK, K.; JEDRZEJCZAK, R.; OBIEDZINSKI, M. W. Fumonisin and their masked forms in maize products. *Food Control*, v. 59, p. 619-627, 2016.

BURMISTROVA, N. A.; RUSANOVA, T. YU.; YURASOV, N. A.; DE SAEGER, S.; GORYACHEVA, I. YU. Simultaneous Determination of Several Mycotoxins by Rapid Immunofiltration Assay. *J. Analytical Chemistry*, v. 69, n. 6, p. 525-534, 2014.

CAMPOS, C. D. M.; DE CAMPOS, R. P. S.; DA SILVA, J. A. F.; JESUS, D. P.; ORLANDO, R. M. Preparo de amostras assistido por campo elétrico: fundamentos, avanços, aplicações e tendências. *Quim. Nova*, v. 38, n. 8, p. 1093-1106, 2015.

CE, 2006a. Regulamento (CE) Nº 401/2006 da Comissão de 23 de Fevereiro de 2006. *Jornal Oficial da União Europeia*, p. L70/12-L70/34, 2006.

CE, 2006b. Regulamento (CE) Nº 1881/2006 da Comissão de 19 de Dezembro de 2006. *Jornal Oficial da União Europeia*, p. L364/5-L364/24, 2006.

Cigić, I. K.; Prosen, H. An Overview of Conventional and Emerging Analytical Methods for the Determination of Mycotoxins. *Int. J. Mol. Sci.*, v. 10, p. 62-115, 2009.

D'ARCO, G.; FERNÁNDEZ-FRANZÓN, M.; FONT, G.; DAMIANI, P.; MANES, J. Analysis of fumonisins B1, B2 and B3 in corn-based baby food by pressurized liquid extraction and liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, v. 1209, p.188–194, 2008.

DA COSTA, A. R.; FARONI, L. R. D'A.; DE ALENCAR, E. R.; CARVALHO, M. C. S.; FERREIRA, L. G. Qualidade de grãos de milho armazenados em silos bolsa. *Rev. Ciênc. Agron.*, v. 41, n. 2, p. 200-207, 2010.

DAWLATANA, M.; COKER, R. D.; NAGLER, M. J.; BLUNDEN, G. A Normal Phase HPTLC Method for the Quantitative Determination of Fumonisin B1 in Rice. *Chromatographia*, v. 41, p. 187-190, 1995.

DE GIROLAMO A.; LATTANZIO, V. M. T.; SCHENA, R.; VISCONTI, A.; PASCALE, M. Effect of alkaline cooking of maize on the content of fumonisins B1 and B2 and their hydrolysed forms. *Food Chem.*, v. 192, p. 1083–1089, 2016.

DUARTE, J. O.; GARCIA, J. C.; DE MIRANDA, R. A. Embrapa. Cultivo do Milho - Mercado e comercialização. Disponível em: <http://www.cnpms.embrapa.br/publicacoes/milho_7_ed/mercado.htm>. Acesso em 12 de janeiro de 2016.

DUNCAN, K.; KRUGER, S.; ZABE, N.; KOHN, B.; PRIOLI, R. Improved fluorometric and chromatographic methods for the quantification of fumonisins B1, B2 and B3. *J. Chromatogr. A*, v. 815, p. 41–47, 1998.

DUPUY, J.; LE BARS, P.; BOUDRA, H.; LE BARS, J. Thermostability of Fumonisin B1, a Mycotoxin from *Fusarium moniliforme*, in Corn. *Appl. Environ. Microb.*, v. 59, n.9, p. 2864-2867, 1993.

EDIAGE, E. N.; POUCKE, C. V.; DE SAEGER, S. A multi-analyte LC–MS/MS method for the analysis of 23 mycotoxins in different sorghum varieties: The forgotten sample matrix. *Food Chem.*, v.177, p. 397–404, 2015.

EDWARDS, O. E.; BLACKWELL, B. A.; DRIEGA, A. B.; BENSIMON, C.; APSIMON, J. W. The Absolute Stereochemistry of the Ester Functions of Fumonisin B1. *Tetrahedron Lett.*, v. 40, p. 4515-4518, 1999.

EZQUERRA, A.; VIDAL, J. C.; BONEL, L.; CASTILLO, J. R. A validated multi-channel electrochemical immunoassay for rapid fumonisin B1 determination in cereal samples. *Anal. Methods*, v. 7, p. 3742-3749, 2015.

FDA, 2001. United States Food and Drug Administration. Guidance for Industry: Fumonisin Levels in Human Foods and Animal Feeds; Final Guidance. Disponível em: <<http://www.fda.gov/food/guidanceregulation/guidancedocumentsregulatoryinformation/chemicalcontaminantsmetalsnaturaltoxinspesticides/ucm109231.htm>>. Acesso em 13 de janeiro de 2016.

FRENICH, A. G.; VIDAL, J. L. M.; ROMERO-GONZÁLEZ, R.; AGUILERA-LUIZ, M. M. Simple and high-throughput method for the multimycotoxin analysis in cereals and related foods by ultra-high performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Food Chem.*, v. 117, p. 705–712, 2009.

GALVÃO, J. C. C.; MIRANDA, G. V.; TROGELLO, E.; FRITSCHÉ-NETO, R. Sete décadas de evolução do sistema produtivo da cultura do milho. *Rev. Ceres*, v. 61, p. 819-828, 2014.

GARCÍA-MORALEJA, A.; FONT, G.; MAÑES, J.; FERRER, E. Development of a new method for the simultaneous determination of 21 mycotoxins in coffee beverages by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Food Res. Int.*, v. 72, p. 247–255, 2015a.

GARCÍA-MORALEJA, A.; FONT, G.; MANES, J.; FERRER, E. Simultaneous determination of mycotoxin in commercial coffee. *Food Control*, v. 57, p. 282-292, 2015b.

GELDERBLOM, W. C. A.; MARASAS, W. F. O.; THIEL, P. G.; VLEGGAAR, R.; CAWOOD, M. E. Fumonisin: Isolation, chemical characterization and biological effects. *Mycopathologia*, v.117, p. 11-16, 1992.

GERALDI, Q. A. C.; PEREIRA, C. N.; FRARE, M. L.; KLASSEN, T. Análise econômico-financeira de um novo processo de produção de derivados de milho. *Engevista*, v. 14, n. 2, p. 185–195, 2012.

GIACOMO, D. R.; STEFANIA, D. Z. A multivariate regression model for detection of fumonisins content in maize from near infrared spectra. *Food Chem.*, v. 141, p. 4289–4294, 2013.

HARMANGE, J.; BOYLE, C. D.; KISHI, Y. Relative and Absolute Stereochemistry of the Fumonisin B2 Backbone. *Tetrahedron Lett.*, v. 35, n. 37, p. 6819-6822, 1994.

HE, Q.; XU, Y.; WANG, D.; KANG, M.; HUANG, Z.; LI, Y. Simultaneous multiresidue determination of mycotoxins in cereal samples by polyvinylidene fluoride membrane based dot immunoassay. *Food Chem.*, v. 134, p. 507–512, 2012.

HOWARD, P. C.; CHURCHWELL, M. I.; COUCH, L. H.; MARQUES, M. M.; DOERGE, D. R. Formation of N-(carboxymethyl)fumonisin B1, following the reaction of fumonisin B1 with reducing sugars. *J. Agric. Food Chem.*, v. 46, p. 3546-3557, 1998.

ISO 11843. Capability of detection - Part 1: Terms and definitions, 1997.

ISO 11843. Capability of detection - Part 2: Methodology in the linear calibration case, 2000.

JIMENEZ, M.; MATEO, R. Determination of mycotoxins produced by *Fusarium* isolates from banana fruits by capillary gas chromatography and high performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*, v. 778, p. 363-372, 1997.

JODRA, A.; LÓPEZ, M. A.; ESCARPA, A. Disposable and reliable electrochemical magnetoimmunosensor for Fumonisin simplified determination in maize-based foodstuffs. *Biosens. Bioelectron.*, v. 64, p. 633-638, 2015.

JUNG, S.; CHOE, B.; CHOI, E.; JEONG, H.; HWANG, Y.; SHIN, G.; KIM, J. Survey of Mycotoxins in Commonly Consumed Korean Grain Products Using an LC-MS/MS Multimycotoxin Method in Combination with Immunoaffinity Clean-up. *Food Sci. Biotechnol.*, v. 24, n. 4, p. 1193-1199, 2015.

KHAYOON, W. S.; SAAD, B.; SALLEH, B.; ISMAIL, N. A.; MANAF, N. H. A.; LATIFF, A. A. A reversed phase high performance liquid chromatography method for the determination of fumonisins B1 and B2 in food and feed using monolithic column and positive confirmation by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta*, v. 679, p. 91-97, 2010.

LI, P.; ZHANG, Z.; HU, X.; ZHANG, Q. Advanced Hyphenated Chromatography-Mass Spectrometry in Mycotoxin Determination: Current Status and Prospects. *Mass Spectrometry Rev.*, v. 32, p. 420-452, 2013.

LIAO C.; WONG, J. W.; ZHANG, K.; YANG, P.; WITTENBERG, J. B.; TRUCKSESS, M. W.; HAYWARD, D. G.; LEE, N. S.; CHANG, J. S. 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.*, v. 63, p. 8314-8332, 2015.

LIMA JÚNIOR, A. F.; OLIVEIRA, I. P.; ROSA, S. R. A.; SILVA, A. J. S.; MORAIS, M. M. Controle De Pragas De Grãos Armazenados: Uso e Aplicação de Fosfetos. *Revista Faculdade Montes Belos*, v. 5, n. 4, p.180-184, 2012.

LING, S.; WANG, R.; GU, X.; WEN, C.; CHEN, L.; CHEN, Z.; CHEN, Q.; XIAO, S.; YANG, Y.; ZHUANG, Z.; WANG, S. Rapid detection of fumonisin B1 using a colloidal gold immunoassay strip test in corn samples. *Toxicon*, v. 108, p. 210-215, 2015.

MAJORS, R. E. Sample Prep Perspectives- Electrical Potential as a Driving Force in Sample Preparation. *LCGC North America*, v. 32, n. 1, p. 2-7, 2014.

MARAGOS, C. M.; BENNETT, G. A.; RICHARD, J. L. Analysis of fumonisin B-1 in corn by capillary electrophoresis. *Fumonisin in Food*. Springer Science + Business Media, LLC, 1996, p. 105-112.

MARAGOS, C.M. Detection of the mycotoxin fumonisin B-1 by a combination of immunofluorescence and capillary electrophoresis. *Food Agric. Immunol.*, v. 9, p. 147-157, 1997.

MIRASOLI, M.; BURAGINA, A.; DOLCI, L. S.; SIMONI, P.; ANFOSSI, L.; GIRAUDI, G.; RODA, A. Chemiluminescence-based biosensor for fumonisins quantitative detection in maize samples. *Biosens. Bioelectron.*, v. 32, p. 283– 287, 2012.

MORALES-CID, G.; CÁRDENAS, S.; SIMONET, B. M.; VALCÁRCEL, M. Sample treatments improved by electric fields. *Trends Analyt. Chem.*, v. 29, n. 2, p. 158-165, 2010.

NETO, B. B.; SCARMINIO, I.S.; BRUNS, R. E. Como Fazer Experimentos. 4ª Edição, Bookman, Porto Alegre, 2010.

NIELSEN, K. F.; NGEMELA, A. F.; JENSEN, L. B.; DE MEDEIROS, L. S.; RASMUSSEN, P. H. UHPLC-MS/MS Determination of Ochratoxin A and Fumonisins in Coffee Using QuEChERS Extraction Combined with Mixed-Mode SPE Purification. *J. Agric. Food Chem.*, v. 63, p. 1029–1034, 2015.

OLIVEIRA, A. P.; GARCIA, J. C.; DUARTE, J. O. Evolução das exportações de milho do Brasil: países de destino e estados exportadores. In: XXVIII Congresso Nacional de Milho e Sorgo. Associação Brasileira de Milho e Sorgo. Goiânia, 2010.

OLIVEIRA, M. S.; DIEL, A. C. L.; RAUBER, R. H.; FONTOURA, F. P.; MALLMANN, A.; DILKIN, P.; MALLMANN, C. A. Free and hidden fumonisins in Brazilian raw maize samples. *Food Control*, v. 53, p. 217-221, 2015.

ORLANDO, R. M.; ROHWEDDER, J. J. R.; RATH, S. Electric Field-Assisted Solid Phase Extraction: Study of Electrochromatographic Parameters with an Anionic Model Compound. *J. Braz. Chem. Soc.*, v. 26, n. 2, p. 310-318, 2015.

ORLANDO, R. M.; ROHWEDDER, J. J. R.; RATH, S. Electric Field-Assisted Solid Phase Extraction: Devices, Development and Application with a Cationic Model Compound. *Chromatographia*, v. 77, p.133–143, 2014.

OSWALD, S.; KARSUNKE, X. Y. Z.; DIETRICH, R.; MÄRTLBAUER, E.; NIESSNER, R.; KNOPP, D. Automated regenerable microarray-based immunoassay for rapid parallel quantification of mycotoxins in cereals. *Anal. Bioanal. Chem.*, v. 405, p. 6405–6415, 2013.

PAES, M. C. D. Aspectos Físicos, Químicos e Tecnológicos do Grão de Milho. Circular Técnica Nº 75. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2006.

PASCHOAL, J. A. R.; RATH, S.; AIROLDI, F. P. S.; REYES, F. G. R. Validação de métodos cromatográficos para a determinação de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos. *Quim. Nova*, v. 31, n.5, p.1190-1198, 2008.

PERUCHI, L. M. Antimicrobianos veterinários: estudos de sorção em solos e desenvolvimento e validação de métodos para a determinação em medicamentos e solos. Tese de Doutorado – UNICAMP, Campinas, 2015.

PESTKA, J. J.; AZCONAOLIVERA, J. I.; PLATTNER, R. D.; MINERVINI, F.; DOKO, M. B.; VISCONTI, A. Comparative-assessment of fumonisin in grain-based foods by ELISA, GC-MS, and HPLC. *J. Food Protect.*, v. 57, p. 169-172, 1994.

PETRARCA, M. H.; RODRIGUES, M. I.; ROSSI, E. A.; DE SYLOS, C. M. Optimisation of a sample preparation method for the determination of fumonisin B1 in rice. *Food Chem.*, v. 158, p. 270–277, 2014.

PIZZUTTI, I. R.; KOK, A.; SCHOLTEN, J.; RIGHI, L. W.; CARDOSO, C. D.; ROHERS, G. N.; DA SILVA, R. C. Development, optimization and validation of a multimethod for the determination of 36 mycotoxins in wines by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Talanta*, v. 129, p. 352–363, 2014.

POOH, G. K.; POWELI, R. G.; PLATTNER, R. D.; WEISLEDER, D. Relative Stereochemistry of Fumonisin B1 at C-2 and C-3. *Tetrahedron Lett.*, v. 35, n. 42, p. 7707-7710, 1994.

QUAN, Y.; ZHANG, Y.; WANG, S.; LEE, N.; KENNEDY, I. R. A rapid and sensitive chemiluminescence enzyme-linked immunosorbent assay for the determination of fumonisin B1 in food samples. *Anal. Chim. Acta*, v. 580, p. 1–8, 2006.

REN, Y.; ZHANG, Y.; HAN, S.; HAN, Z.; WU, Y. Simultaneous determination of fumonisins B1, B2 and B3 contaminants in maize by ultra high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta*, v. 692, p. 138–145, 2011.

RIBEIRO, F. A. L.; FERREIRA, M. M. C.; MORANO, DA SILVA, S. C.; L. R.; SCHNEIDER, R. P.; planilha de validação: uma nova ferramenta para estimar figuras de mérito na validação de métodos analíticos univariados. *Quim. Nova*, v. 31, n. 1, p. 164-171, 2008.

RUBERT, J.; SOLER, C.; MANES, J. Evaluation of matrix solid-phase dispersion (MSPD) extraction for multi-mycotoxin determination in different flours using LC–MS/MS. *Talanta*, v. 85, p. 206–215, 2011.

RUBERT, J.; SOLER, C.; MAÑES, J. Application of an HPLC–MS/MS method for mycotoxin analysis in commercial baby foods. *Food Chemistry*, v. 133 p. 176–183, 2012a.

RUBERT, J.; SOLER, C.; MAÑES, J. Occurrence of fourteen mycotoxins in tiger-nuts. *Food Control*, v. 25 p. 374–379, 2012b.

RUBERT, J.; DZUMAN, Z.; VACLAVIKOVA, M.; ZACHARIASOVA, M.; SOLER, C.; HAJLSLOVA, J. Analysis of mycotoxins in barley using ultra high liquid chromatography high resolution mass spectrometry: Comparison of efficiency and efficacy of different extraction procedures. *Talanta*, v. 99, p. 712–719, 2012c.

RUBERT, J.; SORIANO, J.; MAÑES, J.; SOLER, C. Occurrence of fumonisins in organic and conventional cereal-based products commercialized in France, Germany and Spain. *Food Chem. Toxicol.*, v. 56, p. 387–391, 2013.

SERRANO, A.B. FONT, G. RUIZ, M.J. FERRER, E. Co-occurrence and risk assessment of mycotoxins in food and diet from Mediterranean area. *Food Chemistry*, v. 135, p. 423–429, 2012.

SHEPHARD, G.S. Chromatographic determination of the fumonisin mycotoxins. *J. Chromatogr. A*, v. 815, p. 31–39, 1998.

- SILVA, L.; FERNÁNDEZ-FRANZÓN, M.; FONT, G.; PENA, A.; SILVEIRA, I.; LINO, C.; MAÑES, J. Analysis of fumonisins in corn-based food by liquid chromatography with fluorescence and mass spectrometry detectors. *Food Chem.*, v. 112, p. 1031–1037, 2009.
- SOLEIMANY, F.; JINAP, S.; FARIDAH, A.; KHATIB, A. 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*, v. 25, p. 647–653, 2012.
- SØRENSEN, L.K.; ELBÆK, T.H. Determination of mycotoxins in bovine milk by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B*, v. 820, p. 183–196, 2005.
- SZEKERES, A.; BUDAI, A.; BENCSIK, O.; NEMETH, L.; BARTOK, T.; SZECSEI, A.; MESTERHAZY, A.; VAGVOLGYI, C. Fumoinisin Measurement from Maize Samples by High-Performance Liquid Chromatography Coupled with Corona Charged Aerosol Detector. *J. Chromatogr. Sci.*, v. 52, p. 1181–1185, 2014.
- TARDIEU, D.; AUBY, A.; BLUTEAU, C.; BAILLY, J. D.; GUERRE, P. Determination of Fumoinisin B1 in animal tissues with immunoaffinity purification. *J. Chromatogr. B*, v. 870, p. 140–144, 2008.
- VISCONTI, A.; DOKO, M.B.; BOTTALICO, C.; SCHURER, B.; BOENKE, A. Stability of fumoinisins (FB1 and FB2) in solution. *Food Addit. Contam.*, v. 11, p. 427–431, 1994.
- WANG, J.; ZHOU, Y.; WANG, Q. Analysis of mycotoxin fumoinisins in corn products by high-performance liquid chromatography coupled with evaporative light scattering detection. *Food Chem.*, v. 107, p. 970–976, 2008.
- WANG, Y.; SHI, Y.; ZOU, Q.; SUN, J.; CHEN, Z.; WANG, H.; LI, S.; YAN, Y. Development of a rapid and simultaneous immunochromatographic assay for the determination of zearalenone and fumoinisin B1 in corn, wheat and feedstuff samples. *Food Control*, v. 31, p. 180–188, 2013.
- WANG, Y.; XIAO, C.; GUO, J.; YUAN, Y.; WANG, J.; LIU, L.; YUE T. Development and Application of a Method for the Analysis of 9 Mycotoxins in Maize by HPLC-MS/MS. *J. Food Sci.*, v. 78, n. 11, p. M1752– M1756, 2013.
- WASKIEWICZ, A.; BESZTERDA, M.; GOLINSKI, P. Occurrence of fumoinisins in food - An interdisciplinary approach to the problem. *Food Control*, v. 26, p. 491–499, 2012.
- WHO/IARC, 2002. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic risks to Humans. Some Traditional Herbal Medicines, Some Mycotoxins, Naphthalene and Styrene. Volume 82, 2002.
- YAMINIA, Y.; SEIDI, S.; REZAZADEH, M. Electrical field-induced extraction and separation techniques: Promising trends in analytical chemistry – A review. *Anal. Chim. Acta*, v. 814, p. 1–22, 2014.
- YE, H.; LAI, X.; LIU, C. Determination of Fumoinisin B1 and B2 in Corn Using Matrix-Phase Dispersion Coupled to High Performance Liquid Chromatography. *Asian J. Chemistry*, v. 25, n. 12, p. 6807–6810, 2013.

ZHANG, K.; WONG, J. W.; HAYWARD, D. G.; VACLAVIKOVA, M.; LIAO, C.; TRUCKSESS, M. W. Determination of Mycotoxins in Milk-Based Products and Infant Formula Using Stable Isotope Dilution Assay and Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry. *J. Agric. Food Chem.*, v. 61, p. 6265–6273, 2013.