



**DAIANE CÁSSIA PEREIRA ABREU**

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA  
PARA DETERMINAÇÃO DE MULTIMICOTOXINAS EM  
AMOSTRAS DE AMÊNDOAS DE CACAU POR LC-MS/MS**

**LAVRAS – MG**

**2019**

**DAIANE CÁSSIA PEREIRA ABREU**

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA PARA  
DETERMINAÇÃO DE MULTIMICOTOXINAS EM AMOSTRAS DE AMÊNDOAS  
DE CACAU POR LC-MS/MS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, área de concentração Química/Bioquímica, para a obtenção do título de Doutora.

Profa. Dra. Adelir Aparecida Saczk  
Orientadora

**LAVRAS - MG  
2019**

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca  
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Abreu, Daiane Cássia Pereira.

Desenvolvimento e validação de metodologia para  
determinação de multomicotoxinas em amostras de amêndoas de  
cacau por LC-MS/MS : - / Daiane Cássia Pereira Abreu. - 2019.  
115 p.

Orientador(a): Adelir Aparecida Saczk.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2019.  
Bibliografia.

1. Determinação de multomicotoxinas. 2. Desenvolvimento de  
método analítico. 3. Análise por LC-MS/MS. I. Saczk, Adelir  
Aparecida. II. Título.

**DAIANE CÁSSIA PEREIRA ABREU**

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA PARA  
DETERMINAÇÃO DE MULTIMICOTOXINAS EM AMOSTRAS DE AMÊNDOAS  
DE CACAU POR LC-MS/MS**

**DEVELOPMENT AND VALIDATION OF METHODOLOGY FOR  
DETERMINATION OF MULTIMYCOTOXINS IN SAMPLES OF COCOA  
ALMONES BY LC-MS/MS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, área de concentração Química/Bioquímica, para a obtenção do título de Doutora.

APROVADA em 28 de fevereiro de 2019.

Dr. Rodinei Augusti	UFMG
Dr. Fabiano Aurélio da Silva Oliveira	IMA
Dr. Marcio Pozzobon Pedroso	DQI/UFLA
Dra. Fabiana da Silva Felix	DQI/UFLA

Profa. Dra. Adelir Aparecida Saczk  
Orientadora

**LAVRAS - MG**

**2019**

*Á Deus, meu refúgio e minha fortaleza.*

*Aos meus pais, Manoel e Luzia, pelo amor incondicional e por se doarem inteiros e renunciarem a seus sonhos, para que, muitas vezes, pudessem realizar os meus.*

*Ao meu namorado, Bruno, pelo companheirismo e incentivo.*

*À minha irmã, Thaciane, pelo exemplo de força e superação.*

*Aos meus avôs e minhas avós (in memoria), pelo exemplo de vida e pela sabedoria incansável.*

*A todas as pessoas que influenciaram, direta e indiretamente, para que eu pudesse chegar aonde cheguei.*

*Dedico*

## AGRADECIMENTOS

À Deus, por me proporcionar inúmeras bênçãos, mesmo não sendo merecedora.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) e ao Departamento de Química (DQI), pela oportunidade de realizar o doutorado.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Ao CNPq, FAPEMIG e CAPES pelo auxílio financeiro para o desenvolvimento do projeto.

Ao Laboratório de Controle de Qualidade e Segurança Alimentar (LACQSA-BH), Laboratório Nacional Agropecuário de Minas Gerais (LANAGRO-MG), por ter fornecido subsídios para que o projeto pudesse ser realizado, aos coordenadores Eugenia e Fernando e toda a equipe, por toda sabedoria, instruções e apoio.

À minha orientadora, Adelir, pela orientação, por ter depositando confiança no meu trabalho e projeto, e por ter contribuído com o meu crescimento profissional e pessoal.

Ao fiscal do Instituto Mineiro de Agropecuária, Fabiano, pelos ensinamentos.

À professora Jaqueline, por ter influência na escolha do projeto, ter me apresentado ao LACQSA e incentivado a sempre fazer meu melhor.

Às pessoas que conheci nesta etapa e que me trataram com carinho, seja no trabalho, nas aulas e nas atividades fora do laboratório, especialmente para aquelas com quem construí um vínculo de amizade. Obrigada!

Aos amigos do Laboratório de Analítica e Eletroanalítica (LAE) da UFLA, mesmo distante sempre me apoiaram, principalmente ao Matheus.

Aos amigos que fiz nessa etapa, Leila, Laurence, Thalita, Fabiano, Luiz, Lucas, Ana, Mateus, Pedro, Stan, Tati, muito obrigada por terem feito dessa caminhada menos árdua.

Aos professores doutores membros da banca, Adelir, Fabiano, Rodinei, Marcio e Fabiana, pela disponibilidade de avaliação do trabalho.

Aos professores que contribuíram para a minha formação acadêmica, seja na graduação, na Universidade Federal de São João Del Rei, ou na pós-graduação, na Universidade Federal de Lavras.

Aos meus pais, familiares, amigos e namorado, que, mesmo longe, oraram por mim, me incentivaram, proporcionaram paz e segurança.

À todos, os meus sinceros agradecimentos. Sem vocês esta tese não teria sido realizada.

*"Cada pessoa deve trabalhar para seu aperfeiçoamento e, ao mesmo tempo, participar da responsabilidade coletiva por toda a humanidade" (Marie Curie)*

## RESUMO GERAL

O cultivo e comercialização das amêndoas de cacau e seus derivados apresenta um importante papel econômico-social para o Brasil devido a sua exportação e consumo interno. A qualidade do produto final está, em grande parte, atrelada aos microrganismos presentes no produto durante o processo de fermentação, que são essenciais para as características sensoriais. Entretanto, a presença de microrganismos indesejados como fungos toxigênicos, pode comprometer a segurança alimentar dos consumidores devido à síntese de micotoxinas. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi desenvolver, validar e aplicar uma metodologia analítica para a determinação de multimicotoxinas em cacau. O método desenvolvido empregou a extração líquido-líquido com partição por adição de sal e etapa de congelamento com subsequente análise por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas sequencial (LC-MS/MS). A extração desenvolvida e otimizada foi baseada nas técnicas de extração QuEChERS e *dilute and shoot* modificadas com o objetivo de reduzir os co-extrativos do extrato final e possibilitar uma extração eficiente sem etapa de *clean up* para 42 micotoxinas. O desempenho do método proposto foi avaliado para 34 micotoxinas em cacau, os resultados obtidos foram discutidos com base nas diretrizes/orientações nacionais e internacionais estabelecidos para contaminantes em alimentos, dentre eles: SANTE/12089/2016, SANTE/11813/2017, a decisão 2002/657/CE, o regulamento 401/2006/CE e o Manual da garantia da qualidade analítica. As recuperações e precisão foram dadas como adequadas, com exceção das micotoxinas ionizadas com o aduto amônio ( $\text{NH}_4^+$ ), E-cristinina e  $\beta$ -ZOL que apresentaram maior variação nos resultados, possivelmente devido à competição dos íons  $\text{Na}^+$  pela ionização da molécula. Esse resultado refletiu diretamente na incerteza de medição dessas micotoxinas, uma vez que, a precisão e o fator de correção da recuperação foram os fatores que apresentam maior impacto na incerteza do método. A reprodutibilidade do método foi avaliada para ocratoxina (OTA) empregando amostras de ensaios de proficiência, na qual z-score entre  $\pm 2$  foi considerado satisfatório. O limite de quantificação de cada micotoxina foi determinado por fortificação em níveis obtidos teoricamente, que variaram de 1,0 a 75  $\mu\text{g kg}^{-1}$ . O estudo de co-ocorrência para 34 micotoxinas foi realizado em 135 amostras de amêndoas secas de cacau. Os resultados indicaram que 42% das amostras apresentaram níveis quantificáveis para as micotoxinas: aflatoxinas (AFB1, AFB2 e AFG1), OTA, citrinina (CIT), ácido ciclopiazônico (CA), ácido tenuazônico (TA), paxilina (PAX), esterigmatocistina (STG), zearalenona (ZON) e fumonisina B2 (FB2). Das amostras contaminadas, 18% apresentaram co-ocorrência entre duas e seis micotoxinas, possibilitando a potencialização da toxicidade e efeitos sinérgicos no organismo do consumidor. Além disso, até o momento não existem legislações internacionais com limites máximo tolerado para micotoxinas em cacau, portanto, o presente estudo de ocorrência é importante para compor futuras discussões para regulamentação do mesmo.

**Palavras-chave:** Micotoxinas. Segurança dos alimentos. Co-ocorrência. Espectrometria de massas. Cromatografia líquida.



## GENERAL ABSTRACT

The cultivation and commercialization of cocoa beans and their derivatives show an important economic and social role for Brazil due to its export and domestic consumption. The quality of the final product is largely tied to the microorganisms present in the product during the fermentation process, which are essential for the sensorial characteristics. However, the presence of undesirable microorganisms as toxigenic fungi may compromise the food safety of consumers due to the synthesis of mycotoxins. Therefore, the objective of this work was to develop, validate and apply an analytical methodology for the determination of multimycotoxins in cocoa. The developed method employed liquid-liquid extraction with addition of salt and freezing step with subsequent liquid chromatography analysis coupled with sequential mass spectrometry (LC-MS/MS). The extraction and optimization was based on the extraction techniques QuEChERS and dilute and shoot, the aim of the modification was to reduce the co-extractives of the final extract and to enable an efficient extraction without a clean up step for 42 mycotoxins. The performance of the proposed method was evaluated for 34 mycotoxins in cocoa, the results obtained were discussed based on the national and international guidelines established for contaminants in food, among them: SANTE/12089/2016, SANTE/11813/2017, the decision 2002/657/EC, Regulation 401/2006/EC and the Manual de garantia da qualidade analítica. The recoveries and precision were given as appropriate, except for the ionic mycotoxins with the ammonium adduct ( $\text{NH}_4^+$ ), E-cristinine and  $\beta$ -ZOL, which presented greater variation in the results, possibly due to the competition of  $\text{Na}^+$  ions by the ionization of the molecule. This result directly reflected the measurement uncertainty of these mycotoxins, since the accuracy and correction factor of the recovery were the factors that presented the greatest impact on the uncertainty of the method. The reproducibility of the method was evaluated for ochratoxin A (OTA) using samples of proficiency tests, in which z-score between  $\pm 2$  was considered satisfactory. The limit of quantification of each mycotoxin was determined by fortification at levels theoretically obtained, ranging from 1.0 to 75  $\mu\text{g kg}^{-1}$ . The co-occurrence study for 34 mycotoxins was carried out on 135 samples of dried cocoa beans. The results indicated that 42% of the samples had quantifiable levels for mycotoxins: aflatoxins (AFB1, AFB2 and AFG1), OTA, citrinin (CIT), cyclopiazonic acid (CA), tenuazonic acid (TA), paxilin (PAX), esterigmatocistin (STG), zearalenone (ZON), and fumonisin B2 (FB2). Of the contaminated samples, 18% presented co-occurrence between two and six mycotoxins, allowing the potentiation of toxicity and synergistic effects in the body of the consumer. In addition, to date there are no international legislation with maximum tolerated limits for mycotoxins in cocoa, so the present case study is important to compose future discussions to regulate the same.

**Keywords:** Mycotoxins. Food safety. Co-occurrence. Mass spectrometry. Liquid chromatography.

## SUMÁRIO

	PRIMEIRA PARTE.....	9
1	INTRODUÇÃO.....	10
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	12
2.1	Cacau .....	12
2.2	Micotoxinas .....	13
2.2.1	Aflatoxinas.....	15
2.2.2	Ocratoxinas .....	15
2.2.3	Zearalenona e seus metabólitos .....	16
2.2.4	Fumonisinias.....	17
2.2.5	Tricotecenos.....	18
2.2.6	Alcaloides de ergot .....	18
2.2.7	Alternaria .....	19
2.2.8	Citreoviridina.....	20
2.2.9	Citrinina .....	20
2.2.10	Outras micotoxinas .....	21
2.3	Legislação para ocorrência de micotoxinas em cacau .....	22
2.4	Toxicidade das micotoxinas.....	23
2.5	Determinação de multomicotoxinas .....	23
2.5.1	Preparo de amostra .....	25
2.5.1.1	QuEChERS.....	24
2.5.1.2	<i>Dilute and shoot</i> .....	30
2.5.2	LC-MS/MS .....	35
2.6	Validação do método analítico .....	37
2.6.1	Curva analítica e Linearidade .....	38
2.6.2	Seletividade e efeito de matriz.....	38
2.6.3	Limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ), Limite de Decisão (CC $\alpha$ ) e Capacidade de Detecção (CC $\beta$ ).....	40
2.6.4	Estudos de veracidade, repetibilidade e precisão intermediária .....	39
2.6.5	Estudo de robustez.....	43
2.6.6	Estudo de incerteza de medição.....	43
2.6.7	Ensaio de proficiência.....	10
	REFERÊNCIAS .....	44
	SEGUNDA PARTE – ARTIGOS .....	52
	ARTIGO 1 - Desenvolvimento de metodologia para determinação de multomicotoxinas em cacau por LC-MS/MS.....	52
	ARTIGO 2 - Validação, análise de incerteza e determinação de 34 micotoxinas em amêndoas de cacau por LC-MS/MS.....	77
	ARTIGO 3 - Estudo de co-ocorrência de micotoxinas em amêndoas de cacau do Brasil.....	96

## PRIMEIRA PARTE

### 1 INTRODUÇÃO

A segurança de alimentos é um assunto de extrema importância e representa uma área de pesquisa em constante desenvolvimento, devido aos contaminantes naturais e/ou sintéticos que os alimentos podem ser expostos. Dentre os contaminantes de origem natural, as micotoxinas tem recebido enfoque por afetarem grande parte das *commodities* agrícolas, serem estáveis, resistentes à decomposição e, dependendo da exposição, apresentarem perigo à saúde humana e animal (VAN PAMEL et al., 2011). As micotoxinas são produzidas como metabólitos secundários por diversas espécies de fungos toxigênicos. Fatores como temperatura, umidade e danos ocasionados por insetos durante o plantio, transporte e estocagem dos alimentos podem propiciar a ocorrência dos fungos e, conseqüentemente, a contaminação por micotoxinas (LIAO et al., 2013).

Baseado na classificação dos compostos, mais de 400 micotoxinas são conhecidas hoje, sendo as aflatoxinas (AFs), ocratoxinas (OTs), zearalenona (ZON) e os tricotecenos, as toxinas mais amplamente estudadas, devido à sua ocorrência frequente nos alimentos e de seus efeitos severos na saúde humana e animal (EDIAGE et al., 2011). Estima-se que 25% dos produtos agrícolas do mundo estejam contaminados com essas substâncias. Os principais alimentos afetados pelas micotoxinas são os cereais, nozes, frutas secas, café, cacau, pimentas, ervilhas secas, feijão e frutas, especialmente maçã e uva, sendo também encontradas nos produtos à base desses alimentos (CHANNIAH; MAIER, 2011). Algumas amêndoas (frutas oleaginosas), como o cacau, são muito susceptíveis ao ataque de fungos devido às condições de produção com elevada umidade (florestas), transporte e armazenamento em condições deficientes, com grande probabilidade de produção de micotoxina (BULLERMAN; BIANCHINI, 2007).

Considerando a predominância das micotoxinas em alimentos, ração animal e sua elevada toxicidade, vários regulamentos foram colocados em vigor para controlar os níveis de contaminação. As regulamentações baseiam-se na avaliação de risco (perigo e exposição) e nos níveis alcançáveis pela agricultura em diferentes gêneros alimentícios. A avaliação de risco do consumo de micotoxinas e seu monitoramento devem ser realizados por métodos analíticos validados com implementação da garantia de qualidade analítica (MALACHOVA et al., 2014a). Até o presente momento não foram definidos limites máximos tolerados (LMT) para ocorrência de micotoxinas em cacau e em seus derivados no Regulamento da Comissão Europeia (CE) n.º 1881/2006 (CE, 2006c). No Brasil, os LMT de AFs totais e ocratoxina A

(OTA) para cacau e produtos de cacau foram fixados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) na Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) n.º7, de 18 de fevereiro de 2011. Os limites definidos de OTA e AFs são  $10 \mu\text{g kg}^{-1}$  para amêndoas de cacau e  $5 \mu\text{g kg}^{-1}$  para produtos de cacau e chocolate (Brasil, 2011).

De acordo com a *AOAC INTERNATIONAL* os métodos oficiais descritos para a determinação de micotoxinas consistem nas técnicas de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), cromatografia em camada delgada (TLC) e ensaio de imunossorvente ligado a enzimas (ELISA). Para as etapas de extração e purificação, os métodos oficiais empregados são extração em fase sólida (SPE) ou colunas de imunoafinidade (IAC) (AOAC, 2012). Apesar de muito usuais com respostas com alta precisão os métodos apresentam alguns inconvenientes, como análise individual dos grupos de micotoxinas, que representa um significativo gasto de tempo, recursos humanos e reagentes.

A tendência em substituição de procedimentos clássicos por técnicas analíticas modernas como a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas sequencial (*Liquid chromatography tandem-mass spectrometry*, LC-MS/MS) tem impulsionado e permitido a ampliação dos escopos analíticos. Diferentes métodos têm sido propostos, a fim de aperfeiçoar e propor alternativas às extrações convencionalmente empregadas ampliando a aplicabilidade da LC-MS/MS (MALACHOVA et al., 2018b). Nesse sentido, os métodos de extração QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe) e o *dilute and shoot* (diluir e injetar) são atraentes em substituição aos procedimentos clássicos de preparo de amostras devido ao baixo consumo de solventes tóxicos, simplicidade, rapidez e apreciável taxas de recuperação, além de obter análises cromatográficas livres ou com menor efeito matriz (MALACHOVA et al., 2018b).

Os métodos de preparo de amostra QuEChERS e *dilute and shoot* tem sido amplamente empregados para determinação de micotoxinas (DA SILVA et al., 2019; GEARY et al., 2016; MALACHOVA et al., 2014a; PIZZUTTI et al., 2014b; SHARMILI et al., 2016; SULLYOK et al., 2006a). No entanto, a aplicação dessas técnicas de extração, sem etapa de *clean up*, em amostras com alto teor de gordura e pigmentos, muitas vezes, apresenta um desafio devido aos altos níveis de co-extrativos que podem afetar negativamente, não apenas a extração e a eficiência cromatográfica, mas também a instrumentação (CHAMKASEM et al., 2013). Por outro lado, etapas de *clean up* podem reduzir a recuperação de algumas micotoxinas dependendo do adsorvente empregado. Por esse motivo, modificações nos preparos de amostra citados devem ser propostas a fim de obter um extrato com menor teor de co-extrativos da matriz sem ocasionar perdas na extração.

Nesta perspectiva o objetivo deste trabalho foi desenvolver uma metodologia para determinação de multomicotoxinas em cacau empregando LC-MS/MS sem a necessidade da etapa de *clean up*. Em seguida, validar o método desenvolvido seguindo as principais normativas nacionais e internacionais de qualidade e monitorar a ocorrência e co-ocorrência de micotoxinas em cacau produzido no Brasil.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Cacau

O cacauero é uma espécie arbórea tropical denominada como *Theobroma cacao L.*, que significa “cacau, manjar dos deuses”. Acredita-se que o cacauero seja originário do Amazonas e outras áreas tropicais das Américas do Sul e Central. O seu fruto, cacau, nome também designado às sementes, pode ser obtido de duas espécies, o Criollo e o Forastero ou do híbrido de ambas, o Trinitário (Figura 1). Essas espécies de cacaueros apresentam distinções em suas características como produtividade, formato do fruto, susceptibilidade/resistência a doenças, tempo de fermentação, dentre outras variações no processamento da matéria prima (COPETTI et al., 2014d).

Figura 1 - Frutos de cacau das espécies Criollo, Forastero e Trinitário.



Fonte: adaptado de FERREIRA et al., 2014.

O cacau da espécie Criollo foi a mais produzida mundialmente. Devido a susceptibilidade á doenças, foi substituída pela espécie Forastero por apresentar maior produtividade e resistência às enfermidades, representando 70% da produção. A espécie Trinitário representa 25% da produção (FERREIRA et al. 2014). O cacau da espécie Forastero foi introduzida no continente Africano no final do século XIX e hoje domina a produção mundial com 72,5% do total. Na América foi estimada uma produção de 763

toneladas de grãos de cacau, equivalente a 18% da produção mundial, com uma participação de 5,43% da produção brasileira (ICCO, 2017). A cacauicultura brasileira está distribuída nos estados da Bahia, Espírito Santo, Mato Grosso, Pará, Rondônia e Amazonas (CEPLAC).

As etapas do processamento do cacau até o armazenamento estão ilustradas na Figura 2. Os frutos são abertos e os grãos de cacau são armazenados em caixas de madeira para a fermentação natural e, após o tempo de fermentação, processo que confere aromas característicos do chocolate, os grãos são transferidos para plataformas de secagem até reduzir o teor de umidade (COPETTI et al., 2011b; COPETTI et al., 2014d; VOIGT, 2013). O cacau seco é ensacado e armazenado para a comercialização e, posterior produção de chocolates, dentre outros derivados de cacau.

Figura 2 - Etapas do processamento do cacau.



Fonte: (COPETTI et al., 2014d).

Durante o processamento da matéria prima do chocolate, em especial nas etapas de fermentação, secagem ao sol e armazenamento, pode ocorrer o desenvolvimento de fungos filamentosos. Os fungos podem ocasionar deterioração nos grãos, influenciando diretamente na qualidade sensorial do produto final, além do impacto econômico, também apresenta a possibilidade de formação de micotoxinas (COPETTI et al., 2011b; MISHRA et al., 2016).

## 2.2 Micotoxinas

As micotoxinas são metabólitos oriundos de fungos filamentosos que apresentam estruturas de baixo peso molecular e elevada toxicidade tanto para animais quanto para seres

humanos (BENNETT; KLICH, 2003). Os fungos produtores de micotoxinas podem ser encontrados em uma grande variedade de produtos agrícolas, podendo germinar, crescer e produzir toxinas durante o cultivo, processamento, transporte e/ou estocagem do alimento (PITT et al., 2012). Há grande variedade de parâmetros que influenciam o crescimento dos fungos e a produção de micotoxinas nas etapas de pré e pós-colheita, porém, os principais são a temperatura e a umidade (LIAO et al., 2013).

Grande parte dos fungos produtores de toxinas pertence aos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Claviceps* e *Alternaria* (KOPPEN et al., 2010; ZACHARIASOVA et al., 2014). Fungos do gênero *Aspergillus* apresentam maior índice de ocorrência em regiões tropicais, devido às condições climáticas favoráveis (alta temperatura e elevada umidade). O gênero *Penicillium* reúne fungos que proliferam em uma ampla faixa de temperatura, se distribuindo por áreas subtropicais e temperadas, com maior incidência de contaminação dos alimentos na etapa de pós-colheita. O gênero *Fusarium* possui espécies capazes de se desenvolver em condições ambientais diversas o que o torna um fitopatógeno importante (TORRE-HERNÁNDEZ et al., 2014). As espécies de *Alternaria* são fungos amplamente distribuídos no solo como componentes normais de sua microflora e ocorrem em regiões úmidas e semiáridas, infectando plantas em crescimento no campo (EFSA, 2011a). As espécies de *Claviceps* originam-se de regiões tropicais e colonizam espécies de gramíneas pertencentes à subfamília *Panicoideae*, incluindo cereais como, o milho, sorgo, cana-de-açúcar e vários painços (EFSA, 2012d).

A diversidade de condições favoráveis para o desenvolvimento dos fungos dificulta o controle de micotoxinas. A sua ocorrência no campo não pode ser eliminada, mas pode ser minimizada pela aplicação de boas práticas agrícolas como, melhoramento das técnicas de colheita e armazenamento, controles de insetos, limpeza e aplicação de agentes antifúngicos (BENNETT; KLICH, 2003). Vale ressaltar também que, a presença de fungo no alimento não indica necessariamente a presença da toxina, visto que, as condições ideais para formação de fungos podem não ser as mesmas para a produção de micotoxinas. No mesmo sentido, a ausência de sinais visíveis da colonização de fungos também não implica na inexistência de micotoxinas. Elas são capazes de persistir nos alimentos mesmo após a eliminação do microrganismo produtor pelos processos usuais de industrialização e embalagem, devido à sua grande estabilidade química (TANIWAKI; IAMANAKA; SILVA, 2013).

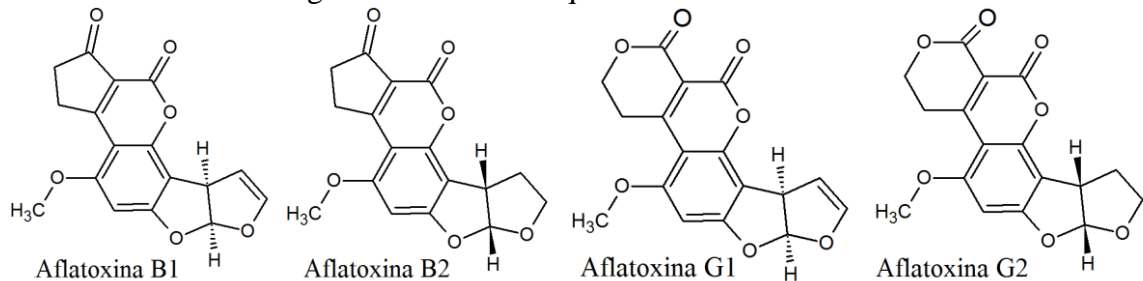
Mais de 400 substâncias são reconhecidas como micotoxinas, compreendendo uma ampla variedade de estruturas químicas (SULYOK et al., 2006a; BHAT; RAI; KARIM, 2010; PITT et al., 2012). A lista das substâncias-alvo mais importantes incluem as AFs, OTs,

fumonisin (FBs), tricotecenos, patulina (PAT) e ZON e seus metabólitos. Existem muitas outras micotoxinas toxicologicamente importantes, porém menos estudadas, como os alcaloides de ergot, enniatinas (ENs), toxinas alternaria, moniliformina (MON), citrinina (CIT), beauvericina (BEA), ácido ciclopiazônico (CA), roquefortina C (ROQ C), ácido micofenólico (MA), verruculogem (VER), citreoviridina (CTV), dentre outras (PEREIRA et al., 2014). As micotoxinas podem ser agrupadas em função de suas estruturas e fungos genitores. A seguir são descritos os metabólitos secundários avaliados no presente trabalho, que inclui as principais micotoxinas, considerando as toxicidades e ocorrências.

### 2.2.1 Aflatoxinas

O grupo das AFs é mais frequentemente produzido por fungos do gênero *Aspergillus*: *A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. nomius* e *A. pseudotamarii* (ITO et al., 2001). Deste gênero, os fungos *A. flavus* e o *A. parasiticus* apresentam maior impacto econômico, por serem responsáveis pela produção de AFs nas sementes de milho em desenvolvimento, além de amendoim, algodão, amêndoa, pistache, nozes e castanha do Brasil. Além disso, são capazes de contaminar praticamente todos os substratos armazenados de forma inadequada (DESJARDINS et al., 2003; MAZIERO; BERSOT, 2010). Dentre as principais toxinas do grupo das AFs estão a aflatoxina B1 (AFB1) e aflatoxina G1 (AFG1), que por transformação produzem aflatoxina B2 (AFB2) e aflatoxina G2 (AFG2) (DESJARDINS et al., 2003). Essas toxinas são nomeadas de acordo com sua fluorescência sob luz UV (B = *blue* e G = *green*) ou ainda produtos de metabolização são designados pela letra M (DESJARDINS et al., 2003). Na Figura 3 estão apresentadas as estruturas das AFs em estudo nesse trabalho.

Figura 3 - Estruturas químicas das aflatoxinas.



Fonte: adaptado de SULYOK et al., 2007b.

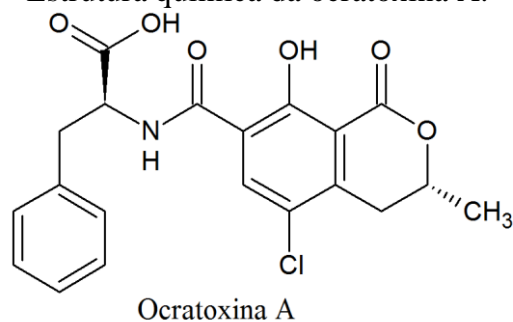
### 2.2.2 Ocratoxinas

As OTs são produzidas em grande parte pelos fungos *Aspergillus verrucosum*, *Aspergillus ochraceus* e *Penicillium* e compõem um grupo de grande relevância na



segurança de alimentos (COPETTI et al., 2010a; COPETTI et al., 2011b; COPETTI et al., 2012c, DESJARDINS et al., 2003). A estimativa da contribuição de cada classe de alimentos para a exposição de adultos à OTs foi divulgada, em relatório, pela união europeia: 44% de cereais, 15% outros alimentos, 10% de vinho, 9% de café, 7% de cerveja, 5% de cacau, 4% de frutas secas, 3% de carne e 3% especiarias (CE, 2002a). A presença de OTs em carnes, leites e ovos se deve a alta afinidade com as proteínas, particularmente a albumina sérica, que promove a bio-acumulação nos órgãos dos animais, levando ao transporte da contaminação (DUARTE; LINO; PENA, 2012). A OTA (Figura 4) é considerada o membro mais tóxico da família, além disso, outras OTs ou seus metabólitos e, em particular, misturas de OTs ou combinações com outras micotoxinas também podem representar sérias ameaças à saúde humana e animal (HEUSSNER; BINGLE, 2015).

Figura 4 - Estrutura química da ocratoxina A.

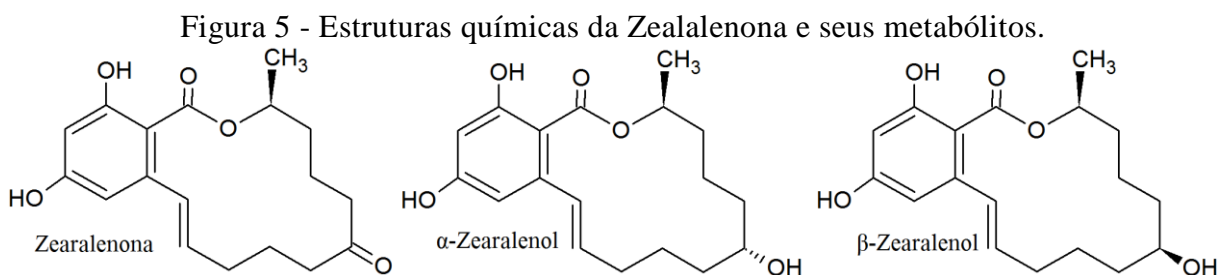


Fonte: adaptado de SULLYOK et al., 2007b.

### 2.2.3 Zearalenona e seus metabólitos

ZON é uma micotoxina biossintetizada por várias espécies de *Fusarium* incluindo *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. cerealis*, *F. equiseti*, *F. crookwellense* e *F. semitectum*, que são contaminantes regulares das culturas de cereais (ALMEIDA et al., 2012). Os efeitos críticos desta micotoxina resultam de sua atividade estrogênica. Devido a isso, uma ingestão diária tolerável (TDI) de 0,25  $\mu\text{g kg}^{-1}$  de ZON por massa corpórea foi definido pela Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (*European Food Safety Authority*, EFSA) (EFSA, 2011b). Formas modificadas de ZON também ocorrem nos alimentos, incluindo os metabólitos:  $\alpha$ -zearalenol ( $\alpha$ -ZOL),  $\beta$ -zearalenol ( $\beta$ -ZOL),  $\alpha$ -zearalanol ( $\alpha$ -ZAL),  $\beta$ -zearalanol ( $\beta$ -ZAL), zearalanona (ZAN), dentre outras micotoxinas obtidas por conjugação (KNUTSEN et al., 2017a). Vale ressaltar que, não só a micotoxina em si, mas também seus metabólitos podem contribuir para a toxicidade, uma vez que, a forma modificada da micotoxina compreende todos os metabólitos da molécula parental,

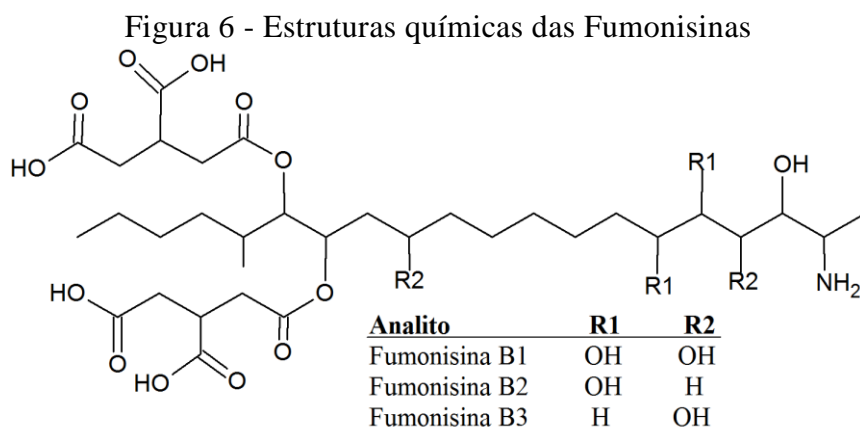
tornando de suma importância o monitoramento destes (EFSA, 2016e). Na Figura 5 estão apresentadas a ZON e seus metabólitos  $\alpha$ -ZOL e  $\beta$ -ZOL.



Fonte: adaptado de SULYOK et al., 2007b.

## 2.2.4 Fumonisinás

As FBs são micotoxinas produzidas principalmente por *Fusarium verticillioides* e *Fusarium proliferatum*, ocorrem predominantemente em grãos de cereais, especialmente em milho. As fumonisinás FB1, FB2 e FB3 (Figura 6) são as formas mais comuns de FBs em alimentos, apresentando também potencial tóxico semelhante (KNUTSEN et al., 2018b). Os efeitos tóxicos da ingestão de FBs por humanos ainda não foram bem elucidados, entretanto, esta apresenta uma provável ligação com o câncer de esôfago. A agência internacional para pesquisa em câncer avaliou o risco de câncer por FBs para humanos e classificou-as como grupo 2B (provavelmente carcinogênico). Ao contrário das micotoxinas mais conhecidas, que são solúveis em solventes orgânicos, as FBs apresentam maior afinidade com a fase aquosa, o que as torna difíceis de estudar. O histórico desses metabólitos secundário faz com que pesquisadores acreditem haver muitos outros produtos ocultos, tóxicos, que ainda não foram descobertos por causa de sua natureza hidrofílica (BENNETT; KLICH, 2003).

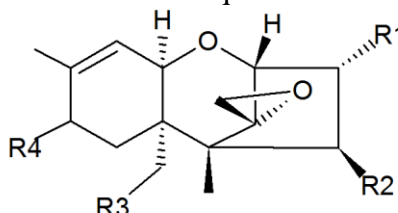


Fonte: adaptado de SULYOK et al., 2007b.

### 2.2.5 Tricotecenos

Os tricotecenos constituem uma família de mais de sessenta metabólitos produzidos por vários gêneros de fungos incluindo *Fusarium*, *Myrothecium*, *Phomopsis*, *Stachybotrys*, *Trichoderma*, *Trichothecium* e outros. São regularmente encontrados em cevada, aveia, centeio e trigo, sendo considerados os mais importantes patógenos em vegetais no Japão. Estas micotoxinas atuam como inibidores extremamente potentes da síntese de proteínas eucarióticas e causam uma ampla gama de sintomas gastrointestinais, dermatológicos e neurológicos. Os tricotecenos apresentam em sua estrutura um 12,13-epoxitricoteno em comum e são classificados como macrocíclicos ou não-macrocíclicos. Os não-macrocíclicos podem ser subclassificados em dois grupos: tipo A, que incluem a toxina T-2 (T-2), toxina HT-2 (HT-2), neosolaniol (NEO), diacetoxiscirpenol (DAS), dentre outras, e o tipo B, que inclui fusarenona-x (FUS-X), nivalenol (NIV) e desoxinivalenol (DON) (BENNETT; KLICH, 2003). Na Figura 7 estão apresentadas as estruturas químicas dos tricotecenos estudados no presente trabalho.

Figura 7 - Estruturas químicas dos tricotecenos



The figure shows the chemical structure of a trichothecene core. It consists of a bicyclic system with a 12,13-epoxide ring. The structure is substituted with four groups: R1, R2, R3, and R4. R1 is at the C-1 position, R2 is at the C-2 position, R3 is at the C-3 position, and R4 is at the C-4 position. The stereochemistry is indicated with wedges and dashes.

<b>Analito</b>	<b>R1</b>	<b>R2</b>	<b>R3</b>	<b>R4</b>
15-acetoxiscirpenol	OH	OH	Oac	H
Diacetoxiscirpenol	OH	Oac	Oac	H
Toxina HT-2	OH	OH	Oac	OCOi-Bu
Toxina T-2	OH	Oac	Oac	OCOi-Bu
iso T2	OH*	Oac*	Oac	OCOi-Bu
acetil T2	Oac	Oac	Oac	OCOi-Bu

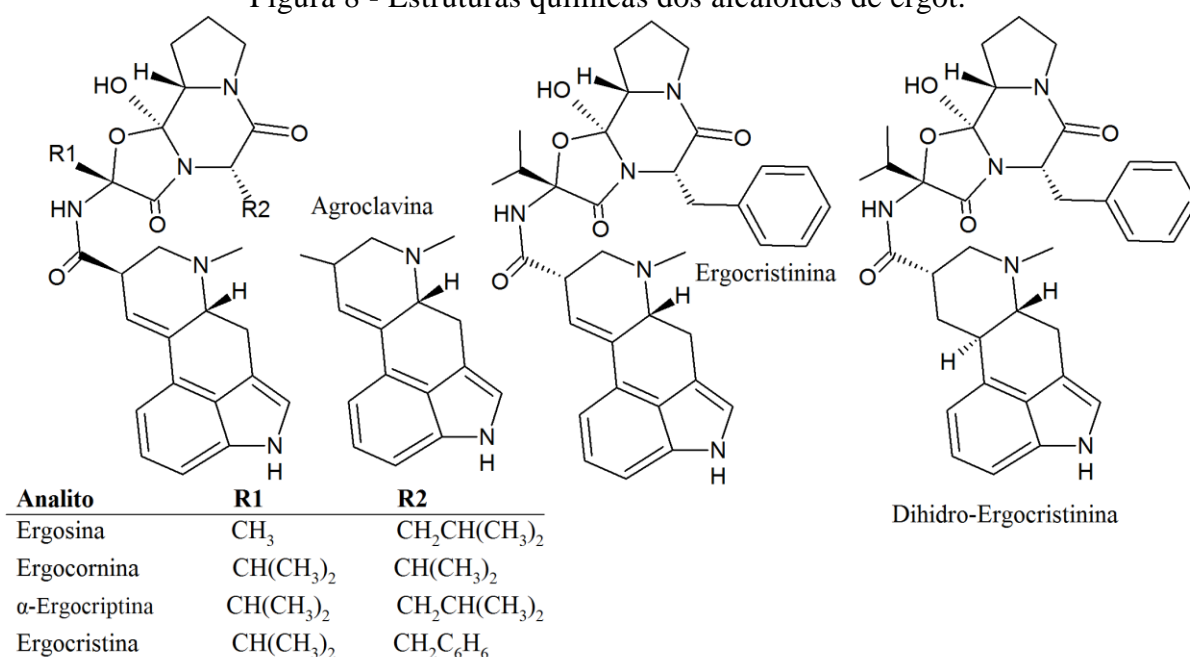
Fonte: adaptado de SULYOK et al., 2007b.

### 2.2.6 Alcaloides de ergot

A análise dos alcaloides de ergot é de importância considerável por serem encontrados em muitas situações diferentes, afetando os seres humanos e os animais. Esses compostos são produzidos por espécies de *Claviceps*, patógenos comuns em várias espécies de gramíneas. Em humanos o ergotismo ou “fogo de Santo Antônio”, nome da doença causada pelos alcaloides de ergot é proveniente, em grande parte, da ingestão de cereais infectados, consumidos geralmente na forma de pães (EFSA, 2012d).

Recentemente, na consolidação do Regulamento (CE) n.º 1881/2006 da Comissão Europeia (CE, 2006c) níveis máximos toleráveis de alcaloides do ergot foram considerados para cereais e seus subprodutos. A EFSA recomenda o monitoramento das principais toxinas produzidas por *Claviceps purpurea* (ergometrina, ergotamina, ergosina, ergocristina, ergocriptina, ergocornina) juntamente com seus epímeros correspondentes e também dihidroergosina e agroclavina de *C. africana* e *C. fusiformis* (EFSA, 2012d). Em geral, os alcaloides de ergot consistem em sistemas de anéis tetracíclicos ergolina do ácido lisérgico (Figura 8).

Figura 8 - Estruturas químicas dos alcaloides de ergot.

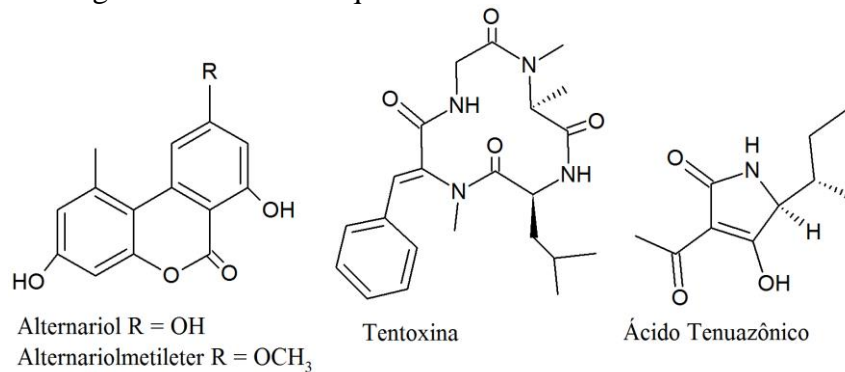


Fonte: adaptado de FERMENTEK.

### 2.2.7 Alternaria

As micotoxinas alternaria são produzidas por espécies do gênero *Alternaria*, principais fungos contaminantes em trigo, sorgo e cevada, e também relatado em oleaginosas, sementes de girassol, tomate, maçã, frutas cítricas, azeitonas e legumes. Mais de 70 fitotoxinas produzidas por espécies de *Alternaria* são descritas, porém, uma pequena proporção é caracterizada como micotoxinas para humanos e animais. Sendo as mais frequentes, por induzir efeitos prejudiciais em animais, o alternariol (AOH), alternariol-metil-éter (AME), ácido tenuazônico (TA) e tentoxina (TEN). As estruturas químicas dessas micotoxinas estão apresentadas na Figura 9 (EFSA, 2011a).

Figura 9 - Estruturas químicas das micotoxinas alternaria.

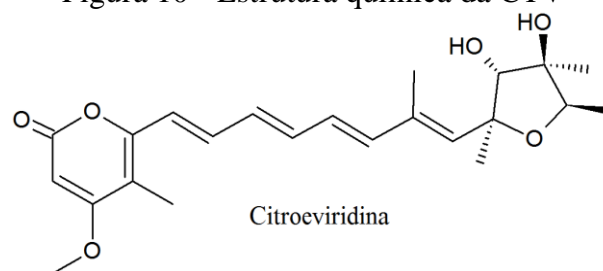


Fonte: adaptado de FERMENTEK.

### 2.2.8 Citreoviridina

A CTV é um metabólito secundário tóxico produzido por *P. citreonigrum*, *P. ochrasalmoneum* e *P. pulvillorum*, ocorre frequentemente em arroz e milho e, é considerada uma micotoxina neurotóxica. A CTV interfere no metabolismo dos tecidos nervosos e musculares, competindo com a absorção da vitamina B1 pelas células desses tecidos, causando deficiência da vitamina. Tal deficiência de vitamina B1 deu origem ao surto de beribéri no Japão e nos países asiáticos, atribuído ao consumo de arroz mofado e amarelo (ALMEIDA et al., 2012). A Figura 10 ilustra a estrutura química da molécula de CTV.

Figura 10 - Estrutura química da CTV



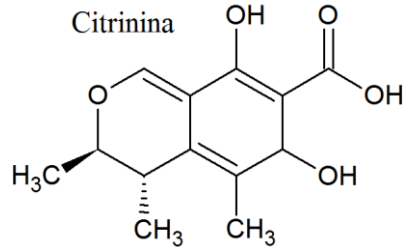
Fonte: adaptado de FERMENTEK.

### 2.2.9 Citrinina

A CIT (Figura 11) é produzida por várias espécies de fungos dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Monascus*, podendo contaminar grãos em geral, feijão, frutas, suco de frutas, ervas e especiarias, e também produtos lácteos estragados. A micotoxina CIT pode apresentar efeitos nefrotóxicos a indivíduos que a consumirem, portanto, a EFSA recomenda o consumo máximo da substância por dia de 0,2  $\mu\text{g kg}^{-1}$  por massa corporal,

mas ressalta que ainda são necessários muitos estudos a cerca da genotoxicidade e carcinogenicidade da CIT (EFSA, 2012c).

Figura 11 - Estrutura química das CIT.

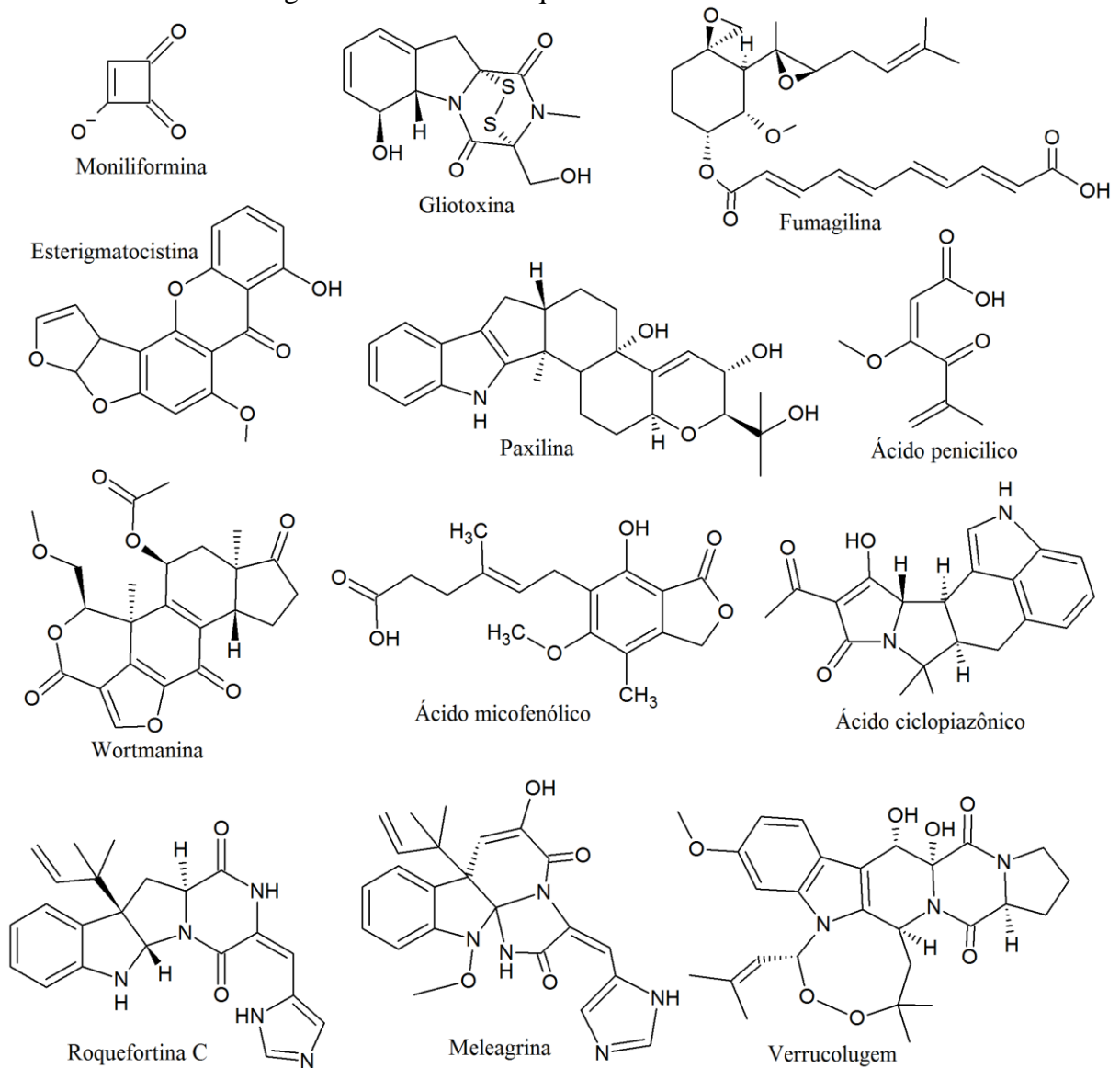


Fonte: adaptado de FERMENTEK.

### 2.2.10 Outras micotoxinas

Uma grande variedade de metabólitos fungicos são conhecidos e amplamente estudados. Outros são produzidos por fungos raramente encontrados em alimentos e ração animal ou apresentam concentrações baixas, não apresentando malefícios a saúde (SULYOK et al., 2006a; BHAT; RAI; KARIM, 2010; PITT et al., 2012). Portanto, poucos trabalhos relacionados ao risco dessas micotoxinas para humanos e/ou animais são decorrentes na literatura (MALACHOVA et al., 2014a). Apesar disso, o monitoramento das micotoxinas de menor ocorrência nos alimentos e rações deve ser enfatizado, devido a possíveis efeitos sinérgicos e aditivos às demais toxinas (EFSA, 2012c). Na Figura 12 estão apresentadas as estruturas químicas das demais micotoxinas avaliadas no trabalho.

Figura 12 - Estruturas químicas das micotoxinas.



Fonte: adaptado de FERMENTEK.

### 2.3 Legislação para ocorrência de micotoxinas em cacau

Os dados de ocorrência de micotoxinas nos alimentos são extremamente importantes para determinar o risco tanto para humanos como para animais (PEREIRA et al., 2014). As avaliações de risco do consumo de micotoxinas em alimentos são realizadas pela comissão do *Codex Alimentarius* (órgão intergovernamental de definição de normas para alimentos), que estabelece níveis máximos do contaminante nos alimentos ou fornece outras recomendações de gestão de risco para controlar ou prevenir a presença de micotoxinas (CODEX ALIMENTARIUS 1995a, 2011b).

No Brasil, a Resolução - RDC n.º7 de 18 de fevereiro de 2011, emitida pela ANVISA, estabelece os LMT para contaminação por 11 micotoxinas em diversas matrizes

de alimentos (BRASIL, 2011b). As micotoxinas consideradas mais importantes do ponto de vista de saúde pública e com LMT em vigor pela legislação nacional são as AFs (AFB1, AFB2, AFG1, AFG2) e aflatoxina M1 (AFM1), OTA, PAT, FB1 e FB2, DON e ZON (BRASIL, 2011b). Para o cacau, as AFs e OTA são as únicas com LMT estabelecidos na legislação (Tabela 1).

Tabela 1 - Limites máximos toleráveis para micotoxinas em cacau.

Micotoxinas	Alimentos	LMT ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )
Aflatoxinas B1, B2, G1, G2	Amêndoas de cacau	10
	Produtos de cacau e chocolate	5
Ocratoxina A	Produtos de cacau e chocolate	5
	Amêndoas de cacau	10

Fonte: Brasil (2011b).

Para o mesmo fim, a União Europeia, por meio do Regulamento (CE) n.º 1881/2006, fixou os teores máximos para 13 micotoxinas em diversas matrizes alimentares (CE, 2006c). Além das micotoxinas citadas na legislação brasileira, também são definidos LMT para as toxinas T-2 e HT-2. Outras micotoxinas como CIT e alcaloide de ergot foram inseridas no documento de consolidação do Regulamento (CE) n.º 1881/2006. Apesar de todos os esforços para definir níveis seguros para o consumo dos alimentos, até o presente momento, não foram definidos LMT por órgãos internacionais para ocorrência de micotoxinas em amêndoas de cacau e em seus subprodutos (CODEX ALIMENTARIUS, 1995a, 2011b). De acordo com o documento de debate (*Documento de debate sobre la ocratoxina a en el cacao*) publicado pelo *Codex Alimentarius* é possível salientar a grande preocupação com a ocorrência de OTA nas amêndoas de cacau, sendo fortemente recomendado seu monitoramento (CODEX ALIMENTARIUS, 2011b). Além da OTA, poucos trabalhos na literatura reportam a ocorrência das demais micotoxinas em cacau (KOESUKWIWAT et al., 2014; SANCHEZ-HERVAS et al., 2008).

#### 2.4 Toxicidade das micotoxinas

A Organização Mundial da Saúde (OMS) é o órgão responsável por monitorar os alimentos destinados ao consumo humano, garantindo a segurança dos alimentos para o consumidor. Segundo esta organização, o produto final deve estar isento ou se apresentar em conformidade com limites para a contaminação, seja ela biológica, química ou física (SPISSO; NÓBREGA; MARQUES, 2009). Nesse sentido, as micotoxinas são alvo de muitos



estudos, uma vez que estão entre os contaminantes de alimentos de maior relevância para a saúde humana (DESPHANDE, 2002, p. 8; KOTSONIS; BURDOCK, 2008).

O quadro tóxico varia de acordo com a micotoxina e a quantidade consumida, sendo caracterizada por estar relacionada à alimentação ou absorção pela pele. As micotoxicoses (processo patológico resultante da ingestão ou contato com micotoxinas) não são contagiosas ou infecciosas e são sempre causadas pelas toxinas produzidas por fungos (YENI et al., 2015; HUSSEIN; BRASEL, 2001). O número de pessoas afetadas por micotoxicoses é desconhecido, embora se acredite que o número total afetado seja menor que o número de infecções bacterianas, protozoárias e virais (BENNETT; KLICH 2003). As micotoxicoses podem se manifestar de forma aguda ou crônica dependendo da substância e quantidade consumida. O quadro clínico agudo pode incluir sinais e sintomas como hemorragias, hepatite, nefrite, necrose de mucosas digestivas e morte (CARVALHO, 1995, p. 27). A micotoxicose crônica pode agir fragilizando o sistema imunológico humano, desta forma, a atuação nociva destas toxinas pode ser mascarada pela ação agressiva de doenças infecciosas oportunistas (DESJARDINS et al., 2003).

O efeito tóxico das micotoxinas no organismo pode ser carcinogênico (AFB1, OTA e FB1), estrogênico (ZON), neurotóxico (FB1), nefrotóxico (OTs, CIT, oosporeína), dermonecrótico (tricotecenos) ou imunossupressor (AFB1, OTA e T-2) (SIDDOO-ATWAL; ATWAL, 2012). A exposição simultânea às micotoxinas é uma questão importante a ser investigada, por possibilitar à potencialização de seus efeitos tóxicos sobre o organismo susceptível (EFSA, 2012c).

## **2.5 Determinação de multomicotoxinas**

O risco para a saúde devido a efeitos aditivos e sinérgicos causado pelas micotoxinas resultou na busca por métodos multianalíticos para o monitoramento simultâneo de diferentes classes de micotoxinas. Nesta perspectiva, métodos mais universais, seletivos e sensíveis são requeridos, o que explica a crescente aplicabilidade da LC-MS/MS para a análise de micotoxinas (MALACHOVA et al., 2014a; SULTYOK et al., 2006a). Apesar da alta seletividade instrumental, o desenvolvimento de método de multomicotoxinas é dificultado pela diversidade química dos analitos, necessitando de uma preparação previa adequada da amostra (QUEIROZ et al., 2001).

### 2.5.1 Preparo de amostra

Um dos grandes desafios na análise multitoxinas é desenvolver um método com uma etapa de extração e purificação simples e rápida para diferentes tipos de matrizes. Devido a isso, o uso de limpeza mínima e inespecífica (se necessário) deve ser adotado para evitar a discriminação de alguns analitos durante o processamento da preparação da amostra (MOL et al., 2008; SULYOK et al., 2006a). Sendo assim, métodos como o *dilute and shoot*, empregando injeção direta de extratos diluídos sem nenhum *clean up* se tornaram uma tendência no preparo de amostras para análise por LC-MS/MS. No entanto, os efeitos de matriz podem limitar o potencial da técnica instrumental, podendo ser necessário um preparo da amostra mais elaborado para se obter uma fração do analito com menor número de interferentes. Nesta perspectiva, abordagens empregando QuEChERS com limpeza mínima vem sendo propostas para análise de multianalitos (ANNUNZIATA et al., 2017; AZAIEZ et al., 2014; CHAMKASEM et al., 2013).

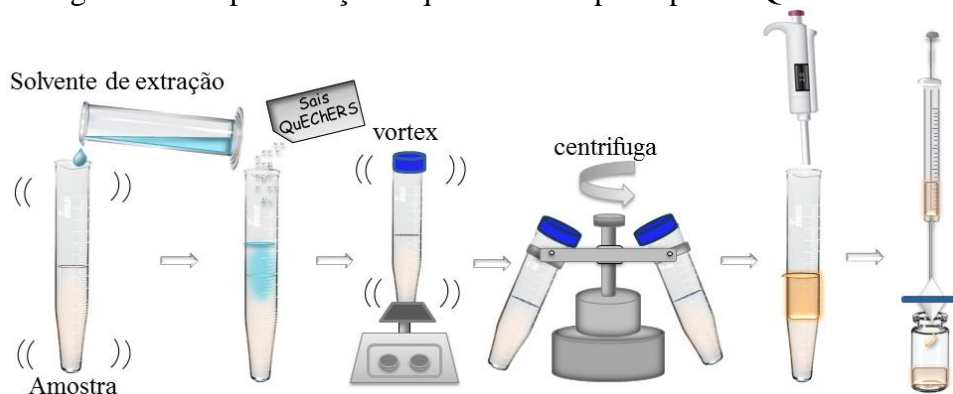
Neste trabalho foi proposto modificações no método de extração líquido-líquido baseando-se nos preparos de amostra *dilute and shoot* e QuEChERS, visto que, as etapas mais críticas na quantificação de multianalitos são a extração e o *clean up*. Estes fatores podem apresentar influencia direta na veracidade e precisão do método analítico, sendo as maiores fontes de incerteza de medição.

#### 2.5.1.1 QuEChERS

O método de preparo de amostras QuEChERS foi introduzido em 2003 por Anastassiades e colaboradores com o intuito de extrair resíduos de pesticidas em alimentos. QuEChERS foi idealizado para gerar extratos que pudessem ser analisados por cromatografia em fase líquida e/ou cromatografia em fase gasosa acopladas à espectrometria de massas sequencial (LC-MS/MS e GC-MS/MS, respectivamente) (ANASTASSIADES et al., 2003).

O principio da técnica (Figura 13) consiste na extração dos compostos de interesse com acetonitrila (ACN), no qual, a adição dos sais sulfato de magnésio ( $MgSO_4$ ) e cloreto de sódio (NaCl) proporciona maior partição do analito entre as fases do sistema. Após atingir o equilíbrio de partição, as fases são separadas por centrifugação e o sobrenadante é recolhido. A segunda parte do processo de preparo de amostra consiste na limpeza do extrato (se necessário) por extração em fase sólida dispersiva (*Dispersive Solid Phase Extraction*, D-SPE) para reduzir os interferentes antes de ser submetido ao instrumento analítico (ARROYO-MANZANARES et al., 2013a).

Figura 13 - Representação esquemática do princípio do QuEChERS.



Fonte: Do autor (2019).

A ACN é o solvente mais comumente empregado em QuEChERS por proporcionar a extração de uma ampla faixa de analitos com diferentes polaridades e não causar interferências nos métodos cromatográficos. Além disso, possibilita a redução de co-extrativos lipofílicos provenientes da amostra, como por exemplo, ceras, gorduras e pigmentos (MAŠTOVSKÁ; LEHOTAY, 2004).

Os sais são responsáveis por promover o efeito *salting out*, diminuindo a solubilidade dos compostos mais polares na fase aquosa, alcançando maior eficiência de extração do analito. Além disso, a adição de sal diminui a quantidade de água na fase orgânica e vice-versa, melhorando a repetibilidade da extração (PIZZUTTI et al., 2007a; PRESTES et al., 2009). A escolha de sais secantes como o  $MgSO_4$  se deve a maior capacidade de remover água quando comparado a outros sais (ANASTASSIADES et al., 2003).

Modificações do método QuEChERS vem sendo propostas a fim de melhorar a recuperação e possibilitar a extração de uma gama maior de compostos presentes na matriz. Assim, modificações no pH por adição de solução tampão, mudança de temperatura e adição de adsorventes na etapa de limpeza (D-SPE) podem promover a maior eficiência analítica (PRESTES et al., 2009). Na Tabela 2 estão apresentados alguns trabalhos empregando QuEChERS com análise subsequente por LC-MS/MS para análise de micotoxinas em diferentes matrizes de alimentos.

Tabela 2 - Trabalhos reportados na literatura para análise de micotoxinas por QuEChERS. (continua)

Matriz	Micotoxina	Amostra e solvente de extração	Sal	Limpeza	Ref.
<b>Cevada, sopa de cevada e cerveja</b>	DON, 3AcDON, 15AcDON, NIV, FUS-X, NEO, DAS, T-2, HT-2, FB1, FB2, FB3, STG, OTA, AFB1, AFB2, AFG1, AFG2, ZON, BEA, ENA, ENA1, ENB e ENB1	Aplicou QuEChERS só para a cerveja. 10 mL de amostra e 5 mL de ACN	4 g MgSO <sub>4</sub> e 1 g NaCl	900 mg MgSO <sub>4</sub> e 300 mg C18	(JUAN et al., 2017)
<b>Alimentação animal</b>	56 micotoxinas	2 g de matriz, 10 mL de água (H <sub>2</sub> O) com 2% de ácido fórmico (FA) e 10 mL de ACN	4 g MgSO <sub>4</sub> e 1 g NaCl	0,1 g C18 e 0,3 g MgSO <sub>4</sub>	(ZACHARIASO VA et al., 2014)
<b>Pseudocereais e Cereais</b>	OTA, AFB1, AFB2, AFG1, AFG2, FB1, FB2, NIV, DON, FUS-X, T-2, HT-2, STG, CIT e ZON	2 g de amostra, 8 mL de H <sub>2</sub> O e 10 mL de ACN com 5% de FA	4 g MgSO <sub>4</sub> , 1 g NaCl, 1 g citrato de sódio e 0,5 g hidrogeno citrato disódio	-	(ARROYO-MANZANARES et al., 2014b)
<b>ovos</b>	AFB1, AFB2, AFG1, AFG2, AFM1, AFM2, DON, 3-AcDON, 15-AcDON, DON-1, ZON, a-ZOL, b-ZOL.	1 mL de amostra, 4 mL de H <sub>2</sub> O, 5 mL de ACN com 1% ácido fosfórico	2 g MgSO <sub>4</sub> e 0,5 g NaCl	-	(ZHU et al., 2015)
<b>Lanches a base de coco e amendoim</b>	AFB1, AFB2, AFG1, AFG2, OTA, STER, α-ZOL, ZON, NIV, DON, 3-AcDON, 15-AcDON, FUS-X, NEO, DAS, FB1, FB2, BEA, T-2, HT-2, AFM1, DON-1, FB3	2 g de amostra, 10 mL de H <sub>2</sub> O com 1% de FA e 10mL de ACN	4 g MgSO <sub>4</sub> e 1 g NaCl	-	(RUBERT et al., 2013)
<b>Arroz, trigo e cevada</b>	OTA, FB1, FB2, DON, CIT, FUS-X, T-2, TH-2, STG e ZON	2 g de amostra, 8 mL de NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 30 mM (pH 7.1) e 10 mL de ACN com 5% de FA	4 g MgSO <sub>4</sub> , 1 g NaCl, 1 g citrato de sódio, 0,5 g hidrogeno citrato disódio	-	(ARROYO-MANZANARES et al., 2015c)
<b>Cevada e amostra de malte</b>	DON, NIV, T-2 e HT-2, FB1, FB2, FB3, OTA, AFB1, AFB2, AFG1, AFG2, ZON, BEA, ENA, ENA1, ENB e ENB1	5 g de amostra, 10 mL de H <sub>2</sub> O com 0.1% FA e 10 mL ACN	4 g MgSO <sub>4</sub> , 1 g NaCl	-	(BOLECHOVÁ et al., 2015)
<b>Radix Paeoniae Alba (erva medicinal do oriente)</b>	OTA, T2, HT-2, NEO, DAS, DON, 3-ADON, 15-ADON, FUS-X, NIV, CA, PA, FB1, FB2, ZON, AFB1, AFG1, AFB2 e AFG2	1 g de amostra, 5 mL de tampão de fosfato (PBS) e 2,5 mL de ACN com 5% de FA.	2 g MgSO <sub>4</sub> , 0,5 g NaCl, 0,5 g citrato de sódio e 0.25 g hidrogeno citrato disódio	150 mg C18 e 150 mg de MgSO <sub>4</sub>	(XING et al., 2016)
<b>Manteiga de gergelim</b>	NEO, DAS, DON, FUS-X, DON-1, 3-AcDON, 15-AcDON, AFB1, AFB2, AFG1, AFG2, AFM1, AFM2, T-2, HT-2, GLT, FUM, FB1, FB2, FB3, STG, VER, OTA, ZON, MA	2,5 g de amostra 1º 20 mL de ACN (80:20, v/v) com 0.1% de FA. 2º ao resíduo adicionou-se 5 mL de	4 g MgSO <sub>4</sub> , 1 g NaCl, 1 g citrato de sódio, 0,5 g hidrogeno citrato disódio	20 mL de hexano, 150 mg C18 e 900 mg MgSO <sub>4</sub>	(LIU, Y. et al., 2014)

Tabela 2 - Trabalhos reportados na literatura para análise de micotoxinas por QuEChERS. (continua)

Matriz	Micotoxina	Amostra e solvente de extração	Sal	Limpeza	Ref.
	e PAX	ACN (20:80, v/v) com 0,1% de FA.			
Cereais	DON, 3-AcDON, 15-AcDON, FUS-X, DAS, GLT, FB1, FB2, FB3, ZON, OTA, VCG, SMC, T-2, HT-2, NEO, ENNA, ENNA1, ENNB, ENNB1, BEA, AFB1, AFB2, AFG1 e AFG2	Não fala quantidade de matriz, ACN (80:20, v/v) com 0.1% de FA	Kit QuEChERS	Coluna C18	(SUN et al., 2016)
Óleo vegetal	DON, ZON, OTA, AFB1, AFB2, AFG1 e AFG2	3 g de amostra e 10 mL de ACN	-	200 mg de d-SPE e 100 mg de MgSO <sub>4</sub> . Seco e reconstituído com 1 mL MeOH (50%)	(SHARMILI et al., 2016)
Romã (frutas e sucos)	AOH, AME e TEN	2 g ou 2 mL de amostra, 10 mL de ACN com 1% de ácido acético (HAc) e 7,5 mL de H <sub>2</sub> O fria	5 g MgSO <sub>4</sub> e 1 g NaCl	0,2 g de PSA e 0,6 g de MgSO <sub>4</sub>	(MYRESIOTIS et al., 2015)
Mingau de milho feito em várias épocas de produção	AFB1, AFB2, AFG1, AFG2, FB1, FB2, DON, OTA e ZON	Não descreve	Não descreve	Não descreve	(GEARY et al., 2016)
Especiarias (pimenta)	FB1, FB2, STG, OTA e CIT	Não descreve	Não descreve	Não descreve	(JACXSENS et al., 2016)
Silagem de milho	FUT C, ENN B, AOH, AME, CIT, NIV, DON, GLI, MA, CA, OTA, PAT, ROQ C, T-2, TEA, ZON, MEV, PEN A, STE, FB1 e FB2	10 g de amostra congelada por N <sub>2</sub> líquido, 5 mL de H <sub>2</sub> O, 10 mL ACN com 1% HAc e 1,67 g de tri-hidrato de acetato de sódio	4,0 g de MgSO <sub>4</sub>	-	(RASMUSSEN et al., 2010)
Ovos	CIT, AFB1, AFB2, AFG1, AFG, ENNA, ENNA1, ENNB1, OTA	2 g de amostra, 10 mL de MeOH: H <sub>2</sub> O (80:20, v/v) com 1% de HAC	4 g MgSO <sub>4</sub> e 1 g NaCl	-	(FRENICH et al., 2011)
Milho	FB1 e FB2	2 g de amostra e 20 mL de MeOH: H <sub>2</sub> O (3:1, v/v)	-	25 mg de PSA, descartou sobrenadante, reconstituiu com MeOH 1% de FA e H <sub>2</sub> O	(YANG ;WU 2012)
Café	OTA, FB2, FB4, e FB6	2,0 g de amostra, 40 mL de ACN:	4 g MgSO <sub>4</sub> e 1 g NaCl	-	(NIELSEN et al.,

Tabela 2 - Trabalhos reportados na literatura para análise de micotoxinas por QuEChERS. (continua)

Matriz	Micotoxina	Amostra e solvente de extração	Sal	Limpeza	Ref.
		H <sub>2</sub> O:FA (49: 49: 2, v/v/v)			2015)
<b>Planta medicinal Angelica</b>	AFB1, AFB2, AFG1, AFG2, OTA, FB1, FB2 e ZON	1 g de amostra, 4 mL de PBS, 2,5 mL de ACN com 5% FA	2 g de MgSO <sub>4</sub> , 0,5 g de NaCl, 0,5 g de citrato trissódico, 0,25 g de citrato de sódio	-	(LIU, Q. et al., 2015)
<b>Milho</b>	AFB1, AFB2, AFG1, AFG2, OTA, DON, FB1, FB2, toxinas HT-2 e T-2 e ZON	1 g de amostra, 2 mL de H <sub>2</sub> O com 0.1% de HAc e 2 mL de ACN com 0.1% de HAc	1,6 g MgSO <sub>4</sub> e 0,4 g NaCl	Seco e reconstituiu com solvente da fase móvel	(KAMALA et al., 2015)
<b>Tortilha com farinha de mostarda</b>	PAT	10 g de amostra e 10 mL de ACN	4 g MgSO <sub>4</sub> e 1 g NaCl	400 mg de PSA, 400 mg de C18 e 1200 mg MgSO <sub>4</sub> . 2° para 1mL coletado adicionou-se 10 mL de H <sub>2</sub> O com 5% FA (v/v). Evaporou e reconstruiu	(SALADINO et al., 2016)
<b>Cereais, cacau, óleo, especiarias, fórmulas para bebês, café e nozes.</b>	AFB1, AFB2, AFG1, AFG2, OTA, DON, FB1, FB2, toxinas HT-2 e T-2, ZON, NIV, 3-AcDON e 15-AcDON No cacau só analisaram AFLA e OTA	2 ou 5 g de amostra, 10 mL de H <sub>2</sub> O e 10 mL ACN com 0,5% de HAc	4 g MgSO <sub>4</sub> e 1 g NaCl	5 mL de hexano 2° fez o processo de IAC para AFLA e OTA	(DESMARCHELIER et al., 2014)
<b>Vinho</b>	AFB1, AFB2, AFG1, AFG2, OTA, DON, FB1, FB2, FB3, DAS, toxinas HT-2 e T-2, 3-AcDON e 15-AcDON, FUS-X, NIV, CIT, ZAN, α-ZAL, β-ZAL, ZON, α-ZEL, ROQ C, STG, CA, PA, MA, AME, AOH, MEV, Ergocornina, Ergocristinina, Ergocriptina, Ergonovina, Ergosina e Ergotamina	5 g de amostra, 5 g de H <sub>2</sub> O, 10 mL de ACN com 1% de HAc	4 g MgSO <sub>4</sub>	450 mg MgSO <sub>4</sub>	(PIZZUTTI et al., 2014b)
<b>Frutas secas</b>	AFB1, AFB2, AFG1, AFG2, FB1, FB2, FB3, HT-2, T-2, OTA, ENA, ENA1, ENB, ENB1; BEA; DAS	5 g de amostra, MeOH:ACN (10:22,5 mL) e 0,5mL de HAc	7,5 g MgSO <sub>4</sub> e 3 g NaCl	-	(AZAIEZ et al., 2014)
<b>Produtos à base de frutas</b>	PAT	10 g de amostra e 10 mL de ACN	4 g MgSO <sub>4</sub> e 1 g NaCl	coluna MycoSep 228 SPE, evaporou o	(VACLAVIKOV

Tabela 2 - Trabalhos reportados na literatura para análise de micotoxinas por QuEChERS (conclusão)

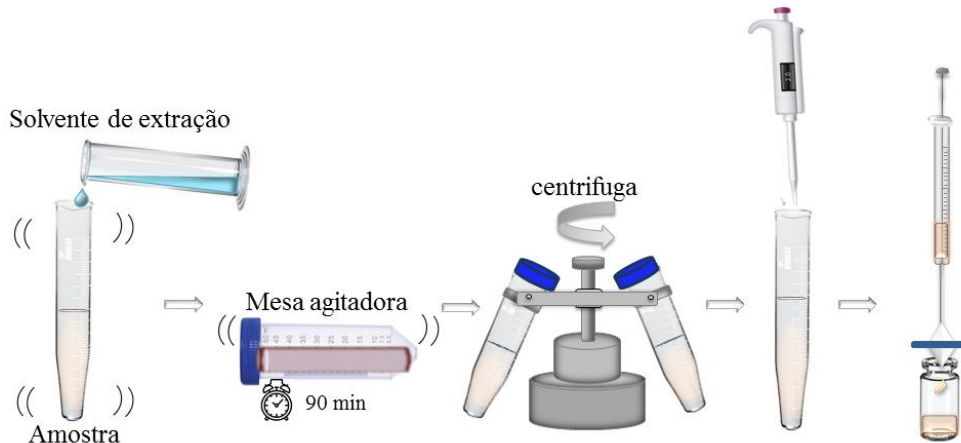
Matriz	Micotoxina	Amostra e solvente de extração	Sal	Limpeza	Ref.
				extrato e reconstituiu com 50% MeOH	A et al., 2015)
Leite	AFM1	10 mL de amostra, 1 mL de Na <sub>2</sub> EDTA 1 mol L <sup>-1</sup> e 10 mL de ACN com 1% de HAc	4 g MgSO <sub>4</sub> , 1 g NaAc	8 mL ACN, 200 mg de MgSO <sub>4</sub> , 67 mg de PSA e 180 mg de C18. Secou e reconstitui com fase móvel, passou por IAC	(MICHLIG et al., 2015)
Derivados de cereais	AFB1, AFB2, AFG1, AFG2, T-2, HT-2, FB1, FB2	2 g de amostra, 10 mL de H <sub>2</sub> O com 0,1% de FA e 10 mL ACN	4 g MgSO <sub>4</sub> , 1 g NaCl	Evaporou e reconstruiu com MeOH 50%	(ANNUNZIATA et al., 2017)
Óleo vegetal	$\alpha$ -ZAL, ZEN, DON, $\beta$ -ZAL, $\beta$ -ZOL, $\alpha$ -ZOL, OTA, T2, 3-Ac-DON, 15-Ac-DON, AFB1, AFB2, AFG2, AFM1, AFM2	1 g de amostra, 2 mL de H <sub>2</sub> O, 8 mL de ACN	4 g Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 1 g NaCl	8 mL de extrato: C18, PSA e Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> (100, 150 e 200 mg)	(ZHAO et al., 2017)

Legenda: 3-acetil-desoxinivalenol (3-AcDON), 15-acetil-desoxinivalenol (15-AcDON), Deepoxideosinivalenol (DON-1), Nivalenol (NIV), Fumonisinas B3, B4 e B6 (FB3, FB4 e FB6), Esterigmatocistina (STG, STER, STE ou SMC), Beauvericina (BEA), Enniatins (ENA, ENA1, ENB e ENB1), Fumagilina (FUM), Ácido micofenólico (MA), Paxilina (PAX), Verruculogem (VCG ou VER), Fumitremorgina C (FUT C), Gliotoxina (GLI ou GLT) Mevinolina (MEV), Ácido penicílico (PA), Penitrem A (PEN A).

### 2.5.1.2 *Dilute and shoot*

O método baseado em *dilute and shoot* é considerado pioneiro no campo de determinação de multomicotoxinas. Foi descrito pela primeira vez para determinação de 39 micotoxinas em trigo e milho por Sulyok e colaboradores (2006), e até o momento, o método foi expandido e validado para 295 micotoxinas em diferentes matrizes (MALACHOVA et al., 2018b; SULYOK et al., 2006a). A abordagem *dilute and shoot* consiste na diluição e injeção do extrato bruto, sem qualquer limpeza, conforme representado na Figura 14. Neste processo a diluição da amostra é realizada pela adição do solvente de extração, em seguida, a mistura passa por uma agitação para favorecer a migração dos analitos da matriz para a fase extratora, esta é então centrifugada, uma alíquota do sobrenadante é recolhida e filtrada para posterior análise.

Figura 14 - Representação esquemática do princípio do *dilute and shoot*.



Fonte: Do autor (2019).

A solução extratora mais difundida na literatura pelos primeiros métodos multitoxinas foi a ACN/H<sub>2</sub>O (84/16 v/v) (MOL et al., 2008). Em estudos posteriores, modificações a esta solução foram propostas como, a variação da proporção de ACN/H<sub>2</sub>O, substituição da acetonitrila por outros solventes e acidificação da fase extratora, obtendo-se melhor desempenho para algumas micotoxinas (ABDALLAH et al., 2017b; BARTHEL et al., 2018, DA SILVA et al., 2019). Observa-se que, misturas de água com maior proporção de MeOH ou ACN (>75%) são apropriadas para a extração da maior parte das toxinas. Porém Varga e colaboradores (2013) verificaram que para as FBs, recuperações melhores foram alcançadas quando a proporção de água e/ou acidificação foi aumentada. Mol e colaboradores (2008) desenvolveram um método de extração genérico para pesticidas, toxinas e drogas veterinárias e concluíram que a mistura ACN/H<sub>2</sub>O produziu menor efeito de matriz e apresentou melhores



recuperações das substâncias quando comparado com MeOH/H<sub>2</sub>O. Na Tabela 3 estão apresentados trabalhos empregando *dilute and shoot* para análise de micotoxinas em diferentes matrizes de alimentos.

Tabela 3 - Trabalhos reportados na literatura para análise de micotoxinas por *dilute and shoot*. (continua)

<b>Matriz</b>	<b>Micotoxina</b>	<b>Extração</b>	<b>Ref.</b>
<b>Milho</b>	39 micotoxinas	0,5 g de amostra, 2 mL ACN/H <sub>2</sub> O/HAc (79:20:1, v/v/v), 90 min de agitação, centrifugou e diluiu 1:1 com ACN/H <sub>2</sub> O/HAc (20:79:1, v/v/v).	(SULYOK et al., 2006a)
<b>Alimentos domiciliares mofados</b>	87 micotoxinas	Descrito por (SULYOK et al., 2006a)	(SULYOK et al., 2007b)
<b>Milho, mel, leite, ovo e carne</b>	Pesticidas, micotoxinas e toxinas vegetais	2,5 g de amostra, 10 mL de ACN/H <sub>2</sub> O (86:14 v/v), agitou 60 min, centrifugou e diluiu 1:1 H <sub>2</sub> O com 1% HAc	(MOL et al., 2008)
<b>Alimentos mofados de domicílios: pão, frutas, legumes, queijos, nozes e geleia.</b>	87 micotoxinas (semi-quantitativo) + 19 micotoxinas	Descrito por (SULYOK et al., 2006a). Proporção de amostra:solvente de extração 3:16.	(SULYOK et al., 2010c)
<b>Matrizes internas: poeira do laboratório, mofo em prédios unidos, dentre outras</b>	186 micotoxinas	0,05 g de amostra, 400 µL ACN/H <sub>2</sub> O/HAc (79:20:1, v/v/v), 90 min de agitação, centrifugou e diluiu 1:1 com ACN/H <sub>2</sub> O/HAc (20:79:1, v/v/v).	(VISHWANATH et al., 2009)
<b>Purê de maçã para bebês, avelãs, milho e pimenta verde</b>	295 micotoxinas	Descrito por (SULYOK et al., 2006a). Para rotina se emprega 5 g de amostra para 20 mL de solvente de extração	(MALACHOVA et al., 2014a)
<b>Ração animal e milho</b>	115 micotoxinas	5g de amostra, 20 mL de ACN/H <sub>2</sub> O/HAc (79:20:1, v/v/v), 90 min de agitação, diluiu 1:1 com ACN/H <sub>2</sub> O/HAc (20:79:1, v/v/v)	(ABDALLAH et al., 2017b)
<b>Cana de açúcar e caldo de cana</b>	Multimicotoxinas	Caldo de cana: 2 mL de amostra, 2 mL de ACN/H <sub>2</sub> O/HAc (79:20:1, v/v/v), Caldo de cana: Centrifugou, diluiu 1:1 com ACN/H <sub>2</sub> O/HAc (20:79:1, v/v/v) Cana de açúcar: 2,5g de amostra seca, 40 mL de ACN/H <sub>2</sub> O/HAc (79:20:1, v/v/v), Cana de açúcar: 90 min de agitação, diluiu 1:1 com ACN/H <sub>2</sub> O/HAc (20:79:1, v/v/v).	(ABDALLAH et al., 2016a)
<b>Milho</b>	MON	25g de amostra, 100 mL ACN/H <sub>2</sub> O (50:50, v/v) , 3 min no	(BARTHEL et al.,

Tabela 3 - Trabalhos reportados na literatura para análise de micotoxinas por *dilute and shoot*. ( conclusão)

<b>Matriz</b>	<b>Micotoxina</b>	<b>Extração</b>	<b>Ref.</b>
		ultra turrax, centrifugou, diluiu 1:10 ACN, filtrou 0,22 µm PTFE.	(2018)
<b>Arroz</b>	AFB1, AFB2, AFG1, AFG2, CTV, OTA, FB1, FB2, DON, ZON e pesticidas.	5 g mL de amostra, 10 mL de ACN/H <sub>2</sub> O/HAc (78:20:2, v/v/v), agitação por 1 min no vórtex e 90 min no shaker, centrifugou e filtrou com filtro 0,22 µm.	(DA SILVA et al., 2019)
<b>Urina humana</b>	DON, DON-3-GlcA, T-2, HT-2, HT-2-4-GlcA, FB1, AFB1, AFB2, AFG1, AFG2, AFM1, OTA, ZON, ZAN, α-ZOL, β-ZOL, OTα, EnB, DH-CIT, ZEA-14-GlcA, ZAN-14-GlcA, β-ZEL e α/β-ZEL-14-GlcA	Centrifugou a amostra, sobrenadante diluído com 900 µL ACN/H <sub>2</sub> O/FA (94/5/1, v/v/v).	(GERDING et al., 2015)
<b>Avelãs, amendoins e pistaches</b>	191 micotoxinas	Descrito por (SULYOK et al., 2006a). Usou 5 g de amostra e 20 mL de solvente de extração	(VARGA et al., 2013)

Legenda: HT-2-toxin-4-glucuronide (HT-2-4-GlcA), dihydrocitrinone (DH-CIT), ácido conjugado 14-O-glucuronico (ZEA-14-GlcA, ZAN-14-GlcA, β-ZEL, α/β-ZEL-14-GlcA)

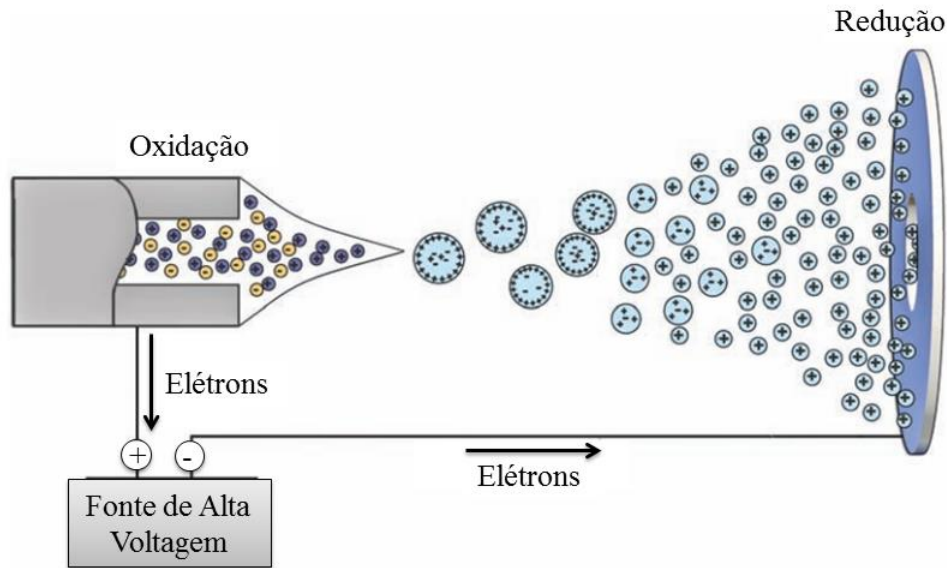
### 2.5.2 LC-MS/MS

A LC-MS/MS é um dos métodos mais eficientes e amplamente utilizados em pesquisas com aplicação em diversos campos da química, bioquímica e medicina (KRUIVE et al., 2015; SHIPKOVA; VALBUENA, 2016). Sua utilização está relacionada com a seletividade da técnica cromatográfica associada à alta sensibilidade, informação estrutural e a seletividade adicional da espectrometria de massas, o que confere a técnica LC-MS/MS a capacidade de determinar compostos de diferentes matrizes em níveis de traços (WEBB et al., 2004; MALDANER; LANÇAS, 2009, p. 35).

Na interface entre o cromatografo e o espectrômetro de massas, adaptações que não comprometam a integridade do analito são requeridas. Logo, diferentes interfaces têm sido desenvolvidas e disponibilizadas no mercado, sendo estas, muitas vezes também responsáveis pela ionização dos analitos (fontes de ionização). Alguns exemplos de fontes de ionização são: ionização por eletrospray (*electrospray ionization* - ESI), ionização química à pressão atmosférica (*atmospheric pressure chemical ionization* - APCI) e a fotoionização à pressão atmosférica (*atmospheric pressure photoionization* - APPI) (CHIARADIA et al., 2008). A ESI tem sido a técnica mais utilizada quando a cromatografia em fase líquida está acoplada à espectrometria de massas (LANÇAS, 2009, p. 35; KRUIVE et al., 2015).

A ESI ocorre quando um solvente volátil contendo o analito é projetado de um tubo capilar de aço inoxidável, submetido a um potencial da ordem de kV à pressão atmosférica. Este processo resulta na formação de um aerossol na ponta do capilar com pequenas gotas de superfície carregada conforme esquematizado na Figura 15 (cone de Taylor). Essas gotas vão sofrendo dessolvatação conforme passam pela região entre a ponta do capilar e o contra eletrodo (entrada do espectrômetro de massa à pressão atmosférica). A dessolvatação é resultante da evaporação do solvente pela ação do gás nebulizador, usualmente N<sub>2</sub> (com auxílio de aquecimento para facilitar a evaporação), que diminui o tamanho das gotas e, conseqüentemente, aumenta a repulsão eletrostática entre as cargas. Neste ponto, a gotícula sofre fissão ou explosão coulômbica, e várias gotículas menores são formadas a partir da principal. Essas gotas menores sofrerão o mesmo processo, ocasionando na ejeção dos íons para a fase gasosa (KOSTIAINEN; KAUPPILA, 2009; LANÇAS, 2009, p. 35).

Figura 15 – Esquema do processo de dessolvatação na ESI.



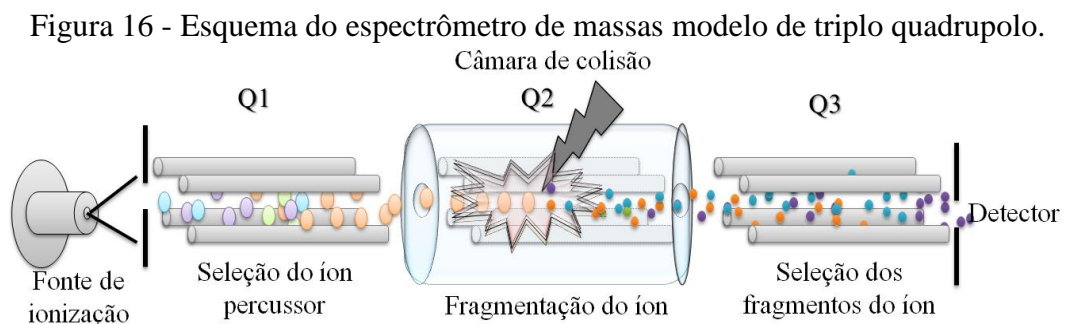
Fonte: Lanças, 2009, p.35.

A energia utilizada na ESI não é suficiente para gerar fragmentações na molécula, sendo frequentemente geradas moléculas protonadas ( $[M+H]^{n+}$ ) para analitos contendo sítios básicos como aminas ou álcoois, ou desprotonadas ( $[M-H]^{-}$ ), geradas frequentemente para moléculas ácidas, como ácidos carboxílicos e fenóis. Também podem ser formados adutos de sódio, amônio, potássio, cloreto, nitrato ou acetato, dependendo do solvente usado e das características inerentes da fonte de ionização por eletrospray (BOŽOVIĆ; KULASINGAM, 2013; KRUIVE et al., 2015).

Com o aumento da voltagem do cone na fonte de ESI é possível se produzir informações estruturais com fragmentação, porém os espectros gerados são de difícil interpretação. Dessa forma, a melhor opção para obter informações estruturais é o uso de espectrometria de massas sequencial ou espectrometria de massas em tandem (MS/MS). A MS/MS possibilita, além da elucidação estrutural, o aumento na detectabilidade e resolução do espectrômetro com a redução de interferência espectral de compostos presentes na matriz (CHIARADIA et al, 2008). Um exemplo de analisadores de massas sequencial é o triplo quadrupolo (QqQ), composto por dois quadrupolos de transmissão montados em série, entre estes há um quadrupolo que funciona como câmara de colisão (BOŽOVIĆ; KULASINGAM, 2013).

No instrumento do tipo QqQ (Figura 16), o primeiro quadrupolo é usado para separar o íon de interesse que chegará ao segundo quadrupolo. Um quadrupolo é constituído de quatro hastes posicionadas em pares, onde hastes opostas são conectadas eletricamente, sendo aplicada entre elas, uma voltagem fora de fase. Desta forma aplicando-se uma voltagem

específica, onde íons com diferentes  $m/z$  apresentarão trajetórias distintas e os íons de interesse serão direcionados para o quadrupolo seguinte (LANÇAS, 2009, p. 35; KRUIVE et al., 2015). No segundo quadrupolo, denominado câmara de colisão, não ocorre separação de íons, mas a fragmentação do íon precursor selecionado no primeiro quadrupolo por meio da dissociação induzida por colisão empregando um gás inerte com elevada energia. Os fragmentos gerados na câmara de colisão serão conduzidos ao terceiro quadrupolo, o qual é responsável pela seleção dos fragmentos do íon precursor de acordo com a razão massa carga ( $m/z$ ) selecionada. O monitoramento de vários íons precursores é chamado de monitoramento de reações múltiplas (MRM) ou monitoramento de reações selecionadas (*selected reaction monitoring*, SRM) (LANÇAS, 2009, p. 35; BOŽOVIĆ; KULASINGAM, 2013).



Fonte: Do autor (2019).

## 2.6 Validação de métodos analíticos

A validação de um método analítico é um processo necessário para garantir sua confiabilidade na determinação de compostos. Para isso, um conjunto de verificações deve ser realizado, desejando-se resultados cientificamente coerentes e que atendam às exigências das agências regulamentadoras. No Brasil o Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO) é o órgão credenciado para avaliar a competência destes ensaios (INMETRO, 2011a; BRASIL, 2011c).

Dentre os guias internacionais de validação pode-se citar o EURACHEM (EURACHEM, 2014) e o regulamento da comissão europeia 401/2006 (CE, 2006b) destinado ao controle do teor de micotoxinas em alimentos. Além desses regulamentos, para ensaios por espectrometria de massas são apresentados níveis de desempenho mínimo pela Diretiva 2002/657 (CE, 2002a), sugerindo as avaliações necessárias para identificação e quantificação das espécies em estudo. Recentemente, o documento SANTE/12089/2016 foi divulgado sugerindo parâmetros de identificação para validação de micotoxinas em alimentos e rações (SANTE, 2017a). O documento de orientação para os procedimentos de controle de qualidade

analítica e métodos de validação para resíduos de pesticidas e análise em alimentos e rações (SANTE, 2018b) vem sendo amplamente empregado na validação de micotoxinas (AZAIEZ et al., 2014; MALACHOVA et al., 2014a; PIZZUTTI et al., 2014b; XING et al., 2016).

A validação de método consiste no processo de obtenção das características de desempenho e limitações de um procedimento analítico. Também devem ser avaliadas as incertezas da medição associadas ao resultado, de maneira a obter um método analítico adequado (RAMBLA-ALEGRE et al., 2012). As principais figuras de mérito frequentemente avaliadas são a seletividade, o efeito de matriz, curva analítica (linearidade), exatidão, recuperação, repetibilidade, reprodutibilidade, limite de decisão ( $CC\alpha$ ), capacidade de detecção ( $CC\beta$ ), os limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ), robustez e incerteza de medição (INMETRO, 2012b; UE, 2002a).

### **2.6.1 Curva analítica e Linearidade**

A curva analítica é um parâmetro quantitativo que indica a relação entre o sinal do equipamento e a concentração conhecida do analito, proveniente do padrão. A faixa linear de trabalho da curva analítica é o intervalo entre os níveis inferior e superior de concentração do analito no qual é demonstrado ser possível a determinação com a precisão, veracidade e linearidade exigida sob as condições especificadas para o ensaio. A curva analítica deve ser, preferencialmente, retilínea, ajustada aos dados, pelos métodos dos mínimos quadrados ordinário (MMQO) ou ponderado (MMQP) conforme a resposta seja homocedástica ou heterocedástica, respectivamente. A curva deve contemplar, no mínimo, cinco níveis, incluindo se possível o valor do limite de referência. A linearidade pode ser verificada pela equação da regressão linear e a qualidade do ajuste deve ser verificada empregando a ferramenta estatística mais adequada (BRASIL, 2011c). As curvas analíticas também podem ser empregadas para estimar os limites de decisão, detecção e quantificação e a capacidade de detecção.

### **2.6.2 Seletividade e efeito de matriz**

A seletividade é a capacidade do procedimento analítico de discriminar entre a substância a analisar e substâncias análogas (isômeros, metabólitos, produtos de degradação, substâncias endógenas, componentes da matriz, isóbaros e componentes que possam gerar interferência poliatômica, entre outras) (BRASIL, 2011c).

Técnicas instrumentais como LC-MS/MS apresentam alta seletividade, relacionada com o poder de resolução do instrumento. Quanto maior for a resolução fornecida pelo

instrumento, maior é a seletividade para a identificação inequívoca (BRASIL, 2011c). Apesar da elevada seletividade da técnica LC-MS/MS, o efeito matriz tem representado ainda um grande desafio no desenvolvimento de métodos multianalíticos confiáveis (MALACHOVA et al., 2014a). Efeito matriz é um estudo de seletividade que objetiva averiguar possíveis interferências causadas pelas diversas substâncias que compõem a matriz amostral. Em que, a presença de componentes da matriz pode afetar a ionização dos compostos alvo, reduzindo ou aumentando a resposta em comparação com os padrões em solvente (FRENICH et al., 2011).

Os mecanismos envolvidos nos efeitos de matriz ainda não foram totalmente elucidados. Uma das teorias propostas para explicar os efeitos da matriz é a possível desprotonação e neutralização das moléculas alvo, reduzindo a formação de íons do analito, devido à coeluição de compostos interferentes, especialmente compostos básicos. Outra teoria considera que, compostos menos voláteis podem afetar a eficiência da formação de gotículas reduzindo a capacidade dessas em se converterem em íons na fase gasosa. Além disso, os efeitos da matriz também podem ser causados por compostos interferentes de alta viscosidade que podem aumentar a tensão superficial das gotículas carregadas, reduzindo assim a eficiência da evaporação de gotículas (VAN EECKHAUT et al., 2009).

A melhor abordagem para superar os problemas de quantificação relacionados aos efeitos da matriz descritos é a utilização de padrões internos isotopicamente marcados. Como os padrões não estão presentes em amostras e apresentam propriedades químicas idênticas aos analitos, podem ser adicionados no processo de extração para corrigir tanto as perdas durante a preparação da amostra como para supressão ou ampliação do sinal pelo efeito matriz. Nem sempre a utilização de padrões isotópicos é viável por apresentar elevado custo e baixa disponibilidade (DESMARCHELIER et al., 2014; MALACHOVA et al., 2014a). A alternativa mais adequada e preferida por muitos autores para compensar o efeito matriz é empregar curva analítica matrizada nos procedimentos de validação e aplicação do método em amostras reais para a quantificação das toxinas (ANNUNZIATA et al., 2017; da SILVA et al., 2019; DANKYI et al., 2015; ZHAO et al., 2017; ZHU et al., 2015; SULYOK et al., 2006a). O critério adotado para determinação do efeito matriz é a comparação entre as curvas relativas ao analito em solvente e na amostra fortificada com o analito (MALACHOVA et al., 2014a). Como o efeito matriz é praticamente impossível de se eliminar em análises de multianalitos, pode-se assumir a existência de efeito de matriz, excluindo a necessidade de condução de experimentos para averiguar sua existência, devendo assim, serem adotadas curvas analíticas preparadas no extrato da matriz em estudo (BRASIL, 2011c).



### **2.6.3 Limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ), Limite de Decisão (CC $\alpha$ ) e Capacidade de Detecção (CC $\beta$ )**

O CC $\alpha$  e a CC $\beta$  são parâmetros que medem o desempenho do procedimento analítico, levando em consideração o desvio padrão dos ensaios de precisão intermediária no nível de interesse (nível em que se toma alguma decisão) (Brasil, 2011c). O CC $\alpha$  é definido como o limite acima do qual pode ser concluído com uma probabilidade de erro  $\alpha$  que uma amostra não é compatível. Ou seja, a probabilidade de a amostra testada estar isenta do analito, mesmo que uma medida tenha sido obtida (falso positivo). A CC $\beta$  é definida como o menor conteúdo da substância que pode ser detectado, identificado e/ou quantificado em uma amostra com erro  $\beta$ . Erro  $\beta$  significa a probabilidade da amostra testada estar verdadeiramente contaminada, mesmo que a resposta obtida seja negativa para presença do analito (falso negativo) (CE, 2002a).

O LOD é definido como teor mais baixo de uma substância que pode ser detectado, não necessariamente quantificado, salientando que uma leitura abaixo do LOD não indica a ausência do analito. A definição do LOQ é a menor concentração ou teor que pode ser quantificada com a maior incerteza aceitável (critérios de veracidade e precisão aceitáveis), desde que a relação sinal/ruído seja superior a seis ou dez ( $S/R \geq 6$  ou  $10$ ) (Brasil, 2011c).

Diferentes abordagens podem ser aplicadas para a estimativa de LOD e LOQ, como o cálculo da variabilidade de sinais em branco ou experimentos de calibração. A seleção do procedimento para estimativa desses limites depende principalmente de requisitos legais, bem como disponibilidade de amostras em branco, aparência de “ruído” em cromatogramas e sua aplicabilidade para cálculos, ou a praticidade de experimentos de calibração (WENZL et al., 2016). Para métodos que estimam de forma matemática o LOQ, este valor determinado deve ser confirmado em termos de precisão, veracidade e incerteza, conforme requisito específico para o nível de quantificação, utilizando materiais de referência ou matrizes brancas fortificadas com padrão (BRASIL, 2011c).

### **2.6.4 Estudos de veracidade, repetibilidade e precisão intermediária**

A determinação da veracidade deve ser feita por intermédio de ensaios de recuperação do método, obtida pela razão entre a média de valores medidos e um valor de referência. A veracidade está inversamente relacionada ao erro sistemático ou à correção ou ao fator de correção. A determinação da recuperação tem por objetivo corrigir o resultado da análise dos erros sistemáticos oriundos dos efeitos de extração como diluições ou pré-concentração,

derivatizações, secagens, *clean up*, dentre outras etapas (BRASIL, 2011c). O número de ensaios e as faixas de recuperação e precisão para avaliação do desempenho do método variam de um guia para outro de acordo com o tipo de contaminante (pesticidas, micotoxinas, drogas veterinárias, dentre outros) e o nível de contaminação (RIBANI et al., 2004). De acordo com recomendações do Manual da garantia da qualidade analítica (2011), devem ser avaliados no mínimo três níveis, atendendo preferencialmente a 0,5; 1,0 e 1,5 vezes o limite de referência para cada toxina. Para cada nível, a análise deve ser realizada em, no mínimo, seis replicatas (BRASIL, 2011c).

A repetibilidade representa a precisão, dada pelo coeficiente de variação das medições realizadas em um mesmo dia, utilizando o mesmo instrumento analítico e com o experimento sendo executado por um mesmo analista. A combinação da repetição do estudo de repetibilidade com operadores diferentes ou em momentos e condições ambientais diferentes, compõe a precisão intermediária. Assim, a precisão intermediária é calculada por meio do coeficiente de variação utilizando o conjunto de dados de repetibilidade (BRASIL, 2011c).

Até o presente momento, não foram estabelecidas diretrizes ou orientações para a validação de métodos analíticos para a determinação de múltiplas micotoxinas (MALACHOVA et al., 2018b). Os guias frequentemente adotados para avaliação da recuperação e precisão de métodos para determinação de micotoxinas em alimentos são o regulamento 401/2006 (CE, 2006b) e a decisão 2002/657 da comissão, que apesar de não ser específica para micotoxinas é muito usual (CE, 2002a). A faixa de recuperação, repetibilidade e precisão intermediária sugeridas no regulamento 401/2006 estão apresentadas na Tabela 4.

Tabela 4 - Critérios de desempenho dos procedimentos analíticos para determinação de micotoxinas em produtos de origem vegetal e leite.

Micotoxina	Nível ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	Recuperação (%)	RSD <sub>r</sub>	RSD <sub>R</sub>
Aflatoxinas B1, B2, G1, G2	<1	50 – 120	0,66 x RSD <sub>R</sub>	Recomendado: valor derivado da equação de Horwitz. Máximo: 2 vezes o valor derivado da equação de Horwitz
	1 – 10	70 – 110		
	>10	80 – 110		
	0,01 – 0,05	60 – 120		
Aflatoxina M1	>0,05	70 – 110		
Citrinina	Todos	70 – 120		
Citireoviridina*	<5	60 – 130	< 40	< 50
	>5	65 – 110	< 25	< 40
Desoxinivalenol	>100 - <500	60 – 110	< 20	< 40
	>500	70 – 120	< 20	< 40
	<500	60 – 120	< 30	< 60
Fumonisinias B1 e B2	>500	70 – 110	< 20	< 30
	<1	50 – 120	< 40	< 60
Ocratoxina A	1 – 10	70 – 110	< 20	< 30
	<20	50 – 120	< 30	< 40
Patulina	20 – 50	70 – 105	< 20	< 30
	>50	75 – 105	< 15	< 25
Zearalenona	<50	60 – 120	< 40	< 50
	>50	70 – 120	< 25	< 40
Toxinas T-2 e HT-2	15-250	60-130	< 30	< 50
	>250	60-130	< 25	< 40

Legenda: RSD<sub>r</sub> = desvio padrão relativo, calculado a partir dos resultados obtidos em condições de repetibilidade. RSD<sub>R</sub> = desvio-padrão relativo, calculado a partir dos resultados obtidos em condições de precisão intermediária.

Fonte: Diretiva CE 401/2006 (EU, 2006b), \*Manual de garantia da qualidade analítica (BRASIL, 2011c).

O Manual de garantia da qualidade analítica segue a diretiva da comissão europeia 401/2006 e acrescenta que as micotoxinas para as quais não existam critérios de aceitabilidade estabelecidos recomenda-se que elas sejam determinadas levando-se em consideração a similaridade do procedimento analítico e faixa de contaminação, podendo ainda esses critérios serem determinados durante os procedimentos de validação. Recuperação menor que a estabelecida, porém consistente com os dados de precisão e, a causa para tal desempenho bem estabelecida, poderá ser aceitável desde que devidamente justificada. Entretanto, um procedimento analítico mais exato deve ser usado, se praticável (BRASIL, 2011c).

Na decisão 2002/657 da Comissão Europeia para análise de multiresíduos e contaminantes orgânicos (em matrizes de origem animal), são adotadas faixas de recuperação aceitáveis de acordo com a concentração do analito ( $\leq 1,0 \mu\text{g kg}^{-1}$  de 50-120%,  $1,0-10,0 \mu\text{g kg}^{-1}$  de 70-110% e  $\geq 10,0 \mu\text{g kg}^{-1}$  de 80-110%). A precisão intermediária não deve exceder o coeficiente de variação (CV) calculado por meio da equação de Horwitz:  $CV = 2^{(1 - 0,5 \log C)}$  onde C é a concentração ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )  $\times 10^{-9}$ , para conversão para grama por grama ( $\text{g g}^{-1}$ ) (CE, 2002a).

As micotoxinas apresentam uma grande variedade de estruturas, se assemelhando a análise de pesticidas. Por isso, muitos pesquisadores tem adotado o guia SANTE de pesticidas no procedimento de validação para multimicotoxinas (KOESUKWIWAT et al., 2014; MALACHOVA et al., 2014a; WALORCZYK 2014). No SANTE foi fixada uma única faixa de recuperação (70-120%) e RSD ( $\leq 20\%$ ) para todas as concentrações dos analitos, o que torna a avaliação dos resultados mais simples. Além disso, neste guia também são aceitas recuperações baixas desde que consistente e devidamente justificadas (SANTE, 2018b).

### **2.6.5 Estudo de robustez**

A robustez de um método está relacionada à sensibilidade que este apresenta frente à pequenas variações. Um método é dito robusto quando se revela insensível a pequenas variações que possam ocorrer quando em execução. Durante o processo de desenvolvimento e otimização, a influência da variação de alguns parâmetros no resultado final é verificada. Estes parâmetros, uma vez ajustados e definidos dentro de uma faixa de variação aceitável, não serão mais modificados nas etapas subsequentes de validação do método e, posteriormente, na execução do método na rotina. Dessa forma, a robustez do método será evidenciada por uma série histórica de controle intralaboratorial, participação em programas interlaboratoriais e dados de precisão intermediária a partir de análises de rotina (BRASIL, 2011c).

### **2.6.6 Estudo de incerteza de medição**

A incerteza (precisão) e a tendência (veracidade) constituem os dois parâmetros metrológicos e de qualidade mais importantes de um resultado de medição, permitindo a comparabilidade e a avaliação da conformidade do resultado de medição em relação às normas, limites legais ou contratuais ou valores de referência. A incerteza final do resultado de uma medição, obtida pela combinação das incertezas, é chamada de incerteza padrão combinada ( $u_c$ ). As principais fontes de incerteza de medição são: amostragem, precisão intermediária, correção de recuperação, curva analítica, medidas de massa da amostra, volume de extração e correção de diluição (BRASIL, 2011c).

Duas metodologias para estimar a incerteza de medição são descritas: *Bottom-Up* e *Top-Down*. Ambas as abordagens consistem na combinação das incertezas por meio da lei de propagação das incertezas. A diferença entre essas duas metodologias está no grau de detalhamento e aprofundamento do cálculo e no sentido lógico desse cálculo. Para a estimativa da incerteza quatro etapas são requeridas para o cálculo: especificar o mensurando,

identificar as fontes de incerteza, quantificar as incertezas e calcular a incerteza combinada (BRASIL, 2011c).

### 2.6.7 Ensaio de proficiência

O ensaio de proficiência (EP) é um procedimento eficaz para garantia da qualidade e verificação do desempenho em laboratórios de análises químicas, garantindo que a validação laboratorial e os procedimentos dentro do laboratório estejam funcionando satisfatoriamente (MALACHOVA et al., 2018b). O EP propicia aos laboratórios participantes a identificação de problemas relacionados com a sistemática de ensaios, possibilitando a tomada de ações corretivas e/ou preventivas. Este também é uma ferramenta de monitoramento do desempenho contínuo dos laboratórios, além de aumentar a confiança nos resultados das medições dos laboratórios participantes (DE GIROLAMO et al., 2017). O estudo deve ser realizado de acordo com o guia ISO 43-1 e 43-2 e pode ser usado para avaliar a reprodutibilidade dos métodos (CE, 2002a).

## REFERÊNCIAS

ABDALLAH, M. F. et al. Mycotoxin Contamination in Sugarcane Grass and Juice: First Report on Detection of Multiple Mycotoxins and Exposure Assessment for Aflatoxins B(1) and G(1) in Humans. **Toxins (Basel)**, v.8, 2016a.

ABDALLAH, M. F. et al. Occurrence of multiple mycotoxins and other fungal metabolites in animal feed and maize samples from Egypt using LC-MS/MS. **Journal Science Food Agriculture**, v.97, p.4419-4428, 2017b.

ALMEIDA, M. I. et al. Co-occurrence of aflatoxins B(1), B(2), G(1) and G(2), ochratoxin A, zearalenone, deoxynivalenol, and citreoviridin in rice in Brazil. **Food Additives & Contaminants: Part A: Chemistry, Analysis, Control, Exposure & Risk Assessment**, v.29, p.694-703, 2012.

ANASTASSIADES, M. et al. Fast and Easy Multiresidue Method Employing Acetonitrile Extraction/Partitioning and “Dispersive Solid-Phase Extraction” for the Determination of Pesticide Residues in Produce. **Journal of AOAC International**, v.86, p.412-431, 2003.

ANNUNZIATA, L. et al. Simultaneous determination of aflatoxins, T-2 and HT-2 toxins, and fumonisins in cereal-derived products by QuEChERS extraction coupled with LC-MS/MS. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v.409, p.5143-5155, 2017.

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

ARROYO-MANZANARES, N. et al. 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. **Journal of Chromatography A**, v.1282, p.11-19, 2013a.

ARROYO-MANZANARES, N. et al. Simple methodology for the determination of mycotoxins in pseudocereals, spelt and rice. **Food Control**, v.36, p.94-101, 2014b.

ARROYO-MANZANARES, N. et al. Simple and efficient methodology to determine mycotoxins in cereal syrups. **Food Chemistry**, v.177, p.274-279, 2015c.

AZAIEZ, I. et al. Multi-mycotoxins Analysis in Dried Fruit by LC/MS/MS and a Modified QuEChERS Procedure. **Food Analytical Methods**, v.7, p.935-945, 2014.

BARTHEL, J. et al. A rapid LC-MS/MS method for the determination of moniliformin and occurrence of this mycotoxin in maize products from the Bavarian market. **Mycotoxin Research**, v.34, p.9-13, 2018.

BENNETT, J. W.; KLICH, M. **Mycotoxins**. Clinical microbiology reviews, v.16, p.497–516, 2003.

BHAT, R.; RAI, V. R.; KARIM, A. A. Mycotoxins – Present status and future concerns. Comprehensive Reviews. **Food Science and Food Safety**, v. 9, p. 57-81, 2010.

BOLECHOVÁ, M. et al. Determination of seventeen mycotoxins in barley and malt in the Czech Republic. **Food Control**, v.47, p.108-113, 2015.

BOŽOVIĆ, A.; KULASINGAM, V. Quantitative mass spectrometry-based assay development and validation: From small molecules to proteins. **Clinical Biochemistry**, v. 46, p. 444-455, 2013.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RE n.º 899, de 29 de maio de 2003. **Guia para métodos analíticos e bioanalíticos**. Brasília, 2003a. Série 1, 15 p.

BRASIL, Agência nacional de vigilância sanitária ANVISA. **Resolução RDC n.º 7, de 18 de fevereiro de 2011**. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, 2011b, p.72.

BRASIL, Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento MAPA. **Manual de garantia da qualidade analítica**, Secretaria de Defesa Agropecuária, Brasília: MAPA/ACS, 2011c.

BULLERMAN, L. B.; BIANCHINI, A. Stability of mycotoxins during food processing. **International Journal of Food Microbiology**, v. 119, n. 1, p. 140–146, 2007.

CAO, X. et al. Quantitative determination of carcinogenic mycotoxins in human and animal biological matrices and animal-derived foods using multi-mycotoxin and analyte-specific high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometric methods. **Journal of Chromatography B**, v.1073, p.191-200, 2018.

CARVALHO, E. C. Q. Micotoxinas em alimentos: implicações na saúde humana e animal. Revista Brasileira de Ciência Veterinária, v. 2, p. 27-31. 1995.

CEPLAC, Comissão executiva do plano de lavoura cacaueteira. Disponível em: [http://www.ceplac.gov.br/radar/mercado\\_cacau.htm](http://www.ceplac.gov.br/radar/mercado_cacau.htm). Acessado 23 dez. 2018.

CHAMKASEM, N. et al. Analysis of 136 pesticides in avocado using a modified QuEChERS method with LC-MS/MS and GC-MS/MS. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.61, p.2315-2329, 2013.

- CHANNIAH, L.; MAIER, D. E. Best stored maize management practices for the prevention of mycotoxin contamination. **In Mycotoxin reduction in grain chains**, p. 78, 2014.
- CHIARADIA, M. C.; COLLINS C. H.; JARDIM, I. C. S. F. O estado da arte da cromatografia associada a espectrometria de massas acoplada a espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos em alimentos. **Química Nova**, v.31, n.3, p.623-636, 2008.
- CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION. **General standard for contaminants and toxins in food and feed**, CXS 193-1995a, alterado em 2018.
- CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION. **Documento de debate sobre la ocratoxina a en el cacao**. Programa conjunto FAO/OMS sobre normas alimentarias comité del codex sobre contaminantes de los alimentos, 2011b. Disponível em: [http://www.fao.org/tempref/codex/Meetings/CCCCF/cccf5/cf05\\_12s.pdf](http://www.fao.org/tempref/codex/Meetings/CCCCF/cccf5/cf05_12s.pdf). Acesso em: 20 out. 2018.
- COMISSÃO EUROPEIA (CE). n.º 657/2002. COMMISSION DECISION of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results. Official Journal of the European Communities, v.L 221, p.8-35, 2002a.
- COMISSÃO EUROPEIA (CE). n.º 401/2006. Laying down the methods of sampling and analysis for the official control of the levels of mycotoxins in foodstuffs. Official Journal of the European Communities, v.L70, p.12-34, 2006b.
- COMISSÃO EUROPEIA (CE). Regulamento CE n.º 1881/2006 da comissão de 19 de Dezembro de 2006 que fixa os teores máximos de certos contaminantes presentes nos géneros alimentícios. Jornal Oficial da União Europeia. 2006c
- COPETTI, M. V. et al. Ochratoxigenic fungi and ochratoxin A in cocoa during farm processing. **International Journal of Food Microbiology**, v.143, p.67-70, 2010a.
- COPETTI, M. V. et al. Mycobiota of cocoa: from farm to chocolate. **Food Microbiology**, v.28, p.1499-1504, 2011b.
- COPETTI, M. V. et al. Co-occurrence of ochratoxin a and aflatoxins in chocolate marketed in Brazil. **Food Control**, v.26, p.36-41, 2012c.
- COPETTI, M. V. et al. Fungi and mycotoxins in cocoa: from farm to chocolate. **International Journal of Food Microbiology**, v.178, p.13-20, 2014d.
- COULOMBE, R. A.; Aflatoxins, **Mycotoxins and phytoalexins**, EDS. SHARMA, R.P.; SALUNKHE, D.K. Boca Raton, p. 103-143, 1991.
- da SILVA, L. P. et al. Development and validation of a multianalyte method for quantification of mycotoxins and pesticides in rice using a simple dilute and shoot procedure and UHPLC-MS/MS. **Food Chemistry**, v.270, p.420-427, 2019.
- DANKYI, E. et al. Application of the QuEChERS procedure and LC-MS/MS for the assessment of neonicotinoid insecticide residues in cocoa beans and shells. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.44, p.149-157, 2015.

DE GIROLAMO, A. et al. Performance evaluation of LC-MS/MS methods for multimycotoxin determination in maize and wheat by means of international Proficiency Testing. **Trends Analyt Chem**, v. 86, p. 222-234, 2017.

DESMARCHELIER, A. et al. Combining the quick, easy, cheap, effective, rugged and safe approach and clean-up by immunoaffinity column for the analysis of 15 mycotoxins by isotope dilution liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v.1337, p.75-84, 2014.

DESPHANDE, S. S. The Science of Toxicology, **Handbook of Food Toxicology**, p. 8-16, 2002.

DUARTE, S., LINO, C. M.; PENA, A. Food safety implications of ochratoxin A in animal-derived food products. **The Veterinary Journal**, v. 192, p. 286-292, 2012.

EDIAGE, E.N. et al. A validated multianalyte LC-MS/MS method for quantification of 25 mycotoxins in cassava flour, peanut cake and maize samples. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, p. 5173-5180, 2011.

EFSA, European food safety authority. **Scientific Opinion on the risks for animal and public health related to the presence of Alternaria toxins in feed and food**. EFSA Journal, v.9, p.2407, 2011a.

EFSA, European food safety authority. **Scientific Opinion on the risks for public health related to the presence of zearalenone in food**. EFSA Journal, v.9, p.2197, 2011b.

EFSA, European food safety authority. **Scientific Opinion on the risks for public and animal health related to the presence of citrinin in food and feed**. EFSA Journal, v.10, p.2605, 2012c.

EFSA, European food safety authority. **Scientific Opinion on Ergot alkaloids in food and feed**. EFSA Journal, v.10, 2012d.

EFSA, European food safety authority. **Appropriateness to set a group health-based guidance value for zearalenone and its modified forms**. EFSA Journal, v.14, 2016e.

EURACHEM. **The Fitness for Purpose of Analytical Methods**, ed. 2. 2014. <[www.eurachem.org](http://www.eurachem.org)>. acessado em 10 jan. 2019.

FAO. RELATÓRIO FINAL. Conferencia Regional FAO/OMS sobre Inocuidade dos Alimentos em África. 2005. Harare, Zimbábue. ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS PARA AGRICULTURA E A ALIMENTAÇÃO, Roma, FAO, 2006.

FERMENTEK Ltd, Jerusalem, Israel. Disponível em: <http://www.fermentek.com/> Acessado em: 23 jun. 2017.

FERREIRA, A. C. R. et al. **Guia de beneficiamento de cacau de qualidade**. Bahia, Instituto Cabruca, 2014.

FRENICH, A. G. et al. Multi-mycotoxin analysis in eggs using a QuEChERS-based extraction procedure and ultra-high-pressure liquid chromatography coupled to triple quadrupole mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v.1218, p.4349-4356, 2011.



GEARY, P. A. et al. Determination of multi-mycotoxin occurrence in maize based porridges from selected regions of Tanzania by liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS), a longitudinal study. **Food Control**, v.68, p.337-343, 2016.

GERDING, J. et al. A comparative study of the human urinary mycotoxin excretion patterns in Bangladesh, Germany, and Haiti using a rapid and sensitive LC-MS/MS approach. **Mycotoxin Research**, v.31, p.127-136, 2015.

GRAY, A. **The World Cocoa Market Outlook**, LMC International, 2001, 29 p.

HUSSEIN, S.H.; BRASEL, J.M. Toxicity, metabolism and impact of mycotoxins on human and animals. **Toxicology**, v. 167, n. 2, p. 101-134, 2001.

ICCO, International Cocoa Organization, **Annual Report 2014/2015**, 2017. Disponível em: [https://www.icco.org/about-us/international-cocoa-agreements/cat\\_view/1-annual-report.html](https://www.icco.org/about-us/international-cocoa-agreements/cat_view/1-annual-report.html). Acessado em: 20 nov. 2018.

INMETRO, Instituto Nacional de Metrologia. **Orientação de métodos de ensaios químicos DOQ-CGCRE-008**. Rio de Janeiro, 2011a. 35 p.

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

ITO, Y. et al. *Aspergillus pseudotamarii*, a new aflatoxin producing species in *Aspergillus* section Flavi. **Mycological Research**, v. 105, n. 2, p. 233-239, 2001.

JACXSENS, L. et al. Risk Assessment of Mycotoxins and Predictive Mycology in Sri Lankan Spices: Chilli and Pepper. **Procedia Food Science**, v.6, p.326-330, 2016.

JUAN, C. et al. Multi-mycotoxin determination in barley and derived products from Tunisia and estimation of their dietary intake. **Food and Chemical Toxicology**, v.103, p.148-156, 2017.

KAMALA, A. et al. Multiple mycotoxin co-occurrence in maize grown in three agro-ecological zones of Tanzania. **Food Control**, v.54, p.208-215, 2015.

KNUTSEN, H. K. et al. Risks for animal health related to the presence of zearalenone and its modified forms in feed. **EFSA Journal**, v.15, 2017a.

KNUTSEN, H. K. et al. Risks for animal health related to the presence of fumonisins, their modified forms and hidden forms in feed. **EFSA Journal**, v.16, 2018b.

KOESUKWIWAT, U. et al. Evaluation of a modified QuEChERS method for analysis of mycotoxins in rice. **Food Chemistry**, v.153, p.44-51, 2014.

KOPPEN, R. et al. Determination of mycotoxins in foods: current state of analytical methods and limitations. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.86, p.1595-1612, 2010.

KOSTIAINEN, R.; KAUPPILA, T. J. Effect of eluent on the ionization process in liquid chromatography–mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v.1216, p.685-699, 2009.

KOTSONIS, F. N.; BURDOCK, G. A. **Food Toxicology**. In: KLAASSEN, C. D. (Ed.). Casarett and Doull's Toxicology – The basic science of poisons. 7. ed. New York: Mc- Graw-Hill Medical Publishing Division, 2008 p., 1191–1236.

KRUVE, A. et al. Tutorial review on validation of liquid chromatography-mass spectrometry methods: Part I. **Analytica Chimica Acta**, v. 870, p. 29-44, 2015.

LANÇAS, F. M. A cromatografia líquida moderna e a espectrometria de massas: finalmente “compatíveis”. **Scientia chromatographica**, v. 1, n. 2, p. 35-61, 2009.

LIAO, C. D. et al. Multi-mycotoxin analysis of finished grain and nut products using high-performance liquid chromatography-triple-quadrupole mass spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, p. 4771–4782, 2013.

LIU, Q. et al. Multi-class mycotoxins analysis in *Angelica sinensis* by ultra fast liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v.988, p.175-181, 2015.

LIU, Y. et al. Modified QuEChERS method combined with ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry for the simultaneous determination of 26 mycotoxins in sesame butter. **Journal of Chromatography B**, v.970, p.68-76, 2014.

MALACHOVA, A. et al. Optimization and validation of a quantitative liquid chromatography-tandem mass spectrometric method covering 295 bacterial and fungal metabolites including all regulated mycotoxins in four model food matrices. **Journal of Chromatography A**, v.1362, p.145-156, 2014a.

MALACHOVA, A. et al. Advanced LC-MS-based methods to study the co-occurrence and metabolization of multiple mycotoxins in cereals and cereal-based food. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v.410, p.801-825, 2018b.

MAŠTOVSKÁ, K.; LEHOTAY, S. J. Evaluation of common organic solvents for gas chromatographic analysis and stability of multiclass pesticide residues. **Journal of Chromatography A**, v. 259, p. 1040, 2004.

MAZIERO, M. T.; BERSOT, L. S. Micotoxinas em alimentos produzidos no Brasil. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v. 12, n. 1, p. 89-99, 2010.

MICHLIG, N. et al. Multiclass Compatible Sample Preparation for UHPLC–MS/MS Determination of Aflatoxin M1 in Raw Milk. **Chromatographia**, v.79, p.1091-1100, 2015.

MISHRA, R. K. et al. Sensitive quantitation of Ochratoxin A in cocoa beans using differential pulse voltammetry based aptasensor. **Food Chemistry**, v.192, p.799-804, 2016.

MOL, H. G. J. et al. Toward a Generic Extraction Method for Simultaneous Determination of Pesticides, Mycotoxins, Plant Toxins, and Veterinary Drugs in Feed and Food Matrixes. **Analytical Chemistry**, v.80, p.9450–9459, 2008.

MYRESIOTIS, C. K. et al. Determination of mycotoxins in pomegranate fruits and juices using a QuEChERS-based method. **Food Chemistry**, v.182, p.81-88, 2015.

NIELSEN, K. F. et al. UHPLC-MS/MS determination of ochratoxin A and fumonisins in coffee using QuEChERS extraction combined with mixed-mode SPE purification. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.63, p.1029-1034, 2015.

- PEREIRA, V. L. et al. Mycotoxins in cereals and related foodstuffs: A review on occurrence and recent methods of analysis. **Trends in Food Science & Technology**, v.36, p.96-136, 2014.
- PITT, J. I. et al. **Improving public health through mycotoxin control**. Lyon - France: International Agency for Research on Cancer, 2012.
- PIZZUTTI, I. R. et al. Method validation for the analysis of 169 pesticides in soya grain, without clean up, by liquid chromatography–tandem mass spectrometry using positive and negative electrospray ionization. **Journal of Chromatography A**, v. 1142, p. 123, 2007a.
- PIZZUTTI, I. R. et al. 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, 2014b.
- PRESTES, O. D. et al. QuEChERS – Um método moderno de preparo de amostra para determinação multirresíduo de pesticidas em alimentos por métodos cromatográficos acoplados à espectrometria de massas. **Química Nova**, v. 32, n. 6, p. 1620-1634, 2009.
- QUEIROZ, M. E. C. et al. Comparison between solid-phase extraction methods for the chromatographic determination of organophosphorus pesticides in water. **Journal Environmental Science Health**, New York, v. 36, n. 5, p. 517-527, 2001.
- RAMBLA-ALEGRE, M. et al. Is it really necessary to validate an analytical method or not? That is the question. **Journal of Chromatography A**, v. 1232, p. 101-9. 2012.
- RASMUSSEN, R. R. et al. Multi-mycotoxin analysis of maize silage by LC-MS/MS. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v.397, p.765-776, 2010.
- RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, p. 771-780, 2004.
- RUBERT, J. et al. A survey of mycotoxins in random street-vended snacks from Lagos, Nigeria, using QuEChERS-HPLC-MS/MS. **Food Control**, v.32, p.673-677, 2013.
- SALADINO, F. et al. Bioactive compounds from mustard flours for the control of patulin production in wheat tortillas. **LWT - Food Science and Technology**, v.66, p.101-107, 2016.
- SANCHEZ-HERVAS, M. et al. Mycobiota and mycotoxin producing fungi from cocoa beans. **International Journal of Food Microbiology**, v.125, p.336-340, 2008.
- SANTE. European commission directorate-general for health and food safety SANTE/12089/2016. **Guidance document on identification of mycotoxins in food and feed**, 2017a.
- SANTE. European commission directorate-general for health and food safety SANTE/11813/2017. **Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticides residues analysis in food and feed**, 2018b.
- SHARMILI, K. et al. Development, optimization and validation of QuEChERS based liquid chromatography tandem mass spectrometry method for determination of multimycotoxin in vegetable oil. **Food Control**, v.70, p.152-160, 2016.

SHIPKOVA, M.; VALBUENA, H. Liquid chromatography tandem mass spectrometry for therapeutic drug monitoring of immunosuppressive drugs: Achievements, lessons and open issues. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 84, p. 23–33, 2016.

SIDDOO-ATWAL, C.; ATWAL, A. S. A Possible Role for Honey Bee Products in the Detoxification of Mycotoxins. **I International symposium on mycotoxins in nuts and dried fruits**, Série de livros: Acta Horticulturae, v. 963, p. 237-245, 2012.

SPISSO, B. F.; NÓBREGA, A. W.; MARQUES, M. A. S. Resíduos e contaminantes químicos em alimentos de origem animal no Brasil: histórico, legislação e atuação da vigilância sanitária e demais sistemas regulatórios. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 14, p. 2091-2106, 2009.

SULYOK, M. et al. Development and validation of a liquid chromatography/tandem mass spectrometric method for the determination of 39 mycotoxins in wheat and maize. **Rapid communications in mass spectrometry**, v.20, p.2649-2659, 2006a.

SULYOK, M. et al. A liquid chromatography/tandem mass spectrometric multi-mycotoxin method for the quantification of 87 analytes and its application to semi-quantitative screening of moldy food samples. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v.389, p.1505-1523, 2007b.

SULYOK, M. et al. Application of an LC–MS/MS based multi-mycotoxin method for the semi-quantitative determination of mycotoxins occurring in different types of food infected by moulds. **Food Chemistry**, v.119, p.408-416, 2010c.

SUN, J. et al. QuEChERS Purification Combined with Ultrahigh-Performance Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry for Simultaneous Quantification of 25 Mycotoxins in Cereals. **Toxins (Basel)**, v.8, 2016.

TANIWAKI, M. H.; IAMANAKA, B. T.; SILVA, N. **Fungos deterioradores de alimentos: Ocorrência e detecção**. Campinas - São Paulo: Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL), 2013.

TORRE-HERNÁNDEZ, E. M. et al. Fumonisin - Síntesis y función en la interacción *Fusarium verticillioides*-maíz. **Tip**, v.17, p.77-91, 2014.

VACLAVIKOVA, M. et al. Monitoring survey of patulin in a variety of fruit-based products using a sensitive UHPLC–MS/MS analytical procedure. **Food Control**, v.47, p.577-584, 2015.

VAN EECKHAUT, A. et al. Validation of bioanalytical LC–MS/MS assays: Evaluation of matrix effects. **Journal of Chromatography B**, v. 877, p. 2198-2207, 2009.

VAN PAMEL, E. et al. Ultrahigh-performance liquid chromatographic-tandem mass spectrometric multimycotoxin method for quantitating 26 mycotoxins in maize silage. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.59, p.9747-9755, 2011.

VARGA, E. et al. Development and validation of a (semi-)quantitative UHPLC-MS/MS method for the determination of 191 mycotoxins and other fungal metabolites in almonds, hazelnuts, peanuts and pistachios. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v.405, p.5087-5104, 2013.

VISHWANATH, V. et al. Simultaneous determination of 186 fungal and bacterial metabolites in indoor matrices by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v.395, p.1355-1372, 2009.

VOIGT, J. **Chocolate and cocoa aroma**. In: Watson, R.R., Preedy, V.R., Zibadi, S. (Eds.), *Chocolate in Health and Nutrition*. Humana Press, London, 2013, 89–101 p.

WALORCZYK, S. Validation and use of a QuEChERS-based gas chromatographic-tandem mass spectrometric method for multiresidue pesticide analysis in blackcurrants including studies of matrix effects and estimation of measurement uncertainty. **Talanta**, v.120, p.106-113, 2014.

WEBB, K. et al. Methodology for accurate mass measurement of small molecules. Best practice guide. **LGC Limited**, Tddington, p. 1-8, 2004.

WENZL, T. et al. **Guidance Document on the Estimation of LOD and LOQ for Measurements in the Field of Contaminants in Feed and Food**. Publications Office of the European Union, 2016.

XING, Y. et al. Simultaneous qualitative and quantitative analysis of 21 mycotoxins in Radix Paeoniae Alba by ultra-high performance liquid chromatography quadrupole linear ion trap mass spectrometry and QuEChERS for sample preparation. **Journal of Chromatography B**, v.1031, p.202-213, 2016.

YANG, Q. F. ;WU, Y. L. Fast Determination of Fumonisin B1 and B2 in Corn Using a Modified QuEChERS Method and LC–MS–MS. **Chromatographia**, v.75, p.1075-1080, 2012.

YENI, F. et al. Most Common Foodborne Pathogens and Mycotoxins on Fresh Produce: A Review of Recent Outbreaks. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 56, n. 9, p. 1532-44, 2015.

ZACHARIASOVA, M. et al. Occurrence of multiple mycotoxins in European feedingstuffs, assessment of dietary intake by farm animals. **Animal Feed Science and Technology**, v.193, p.124-140, 2014.

ZHAO, H. et al. Determination of 16 mycotoxins in vegetable oils using a QuEChERS method combined with high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Food additives & contaminants: part a**, v.34, p.255-264, 2017.

ZHU, R. et al. A simple sample pretreatment method for multi-mycotoxin determination in eggs by liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v.1417, p.1-7, 2015.

**SEGUNDA PARTE – ARTIGOS****ARTIGO 1****DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA PARA DETERMINAÇÃO DE  
MULTIMICOTOXINAS EM CACAU POR LC-MS/MS**

Daiane Cássia Pereira Abreu<sup>1</sup>, Fabiano Aurélio da Silva Oliveira<sup>2</sup>, Eugenia Azevedo Vargas<sup>2</sup>,  
Fernando Diniz Madureira<sup>2</sup>, Lucas Pinto da Silva<sup>2</sup>, Adelir Aparecida Saczk<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Química, Universidade Federal de Lavras, 37200-000 Lavras - MG, Brasil

<sup>2</sup>Laboratório de Controle de Qualidade e Segurança Alimentar (LACQSA-BH), Laboratório Nacional Agropecuário de Minas Gerais (LANAGRO-MG), 30380-090 Belo Horizonte – MG.

\*Corresponding author. Tel: +55 35 38291876, fax: +55 35 38291812

*E-mail:* adelir@ufla.br (SACZK, A. A.)

ORCID: 0000-0003-3241-389X

**Resumo** Neste trabalho foi proposto um método de extração baseado em *dilute and shoot* e QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe) para a determinação simultânea de 42 micotoxinas em amostras de amêndoas secas de cacau. A metodologia de extração desenvolvida teve como objetivo a redução dos co-extrativos da matriz e uma extração eficiente sem etapa de *clean up*, com subsequente análise por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas sequencial (LC-MS/MS). Para obter as melhores condições de extração, foram realizados testes gravimétricos, otimização das condições de extração por meio de planejamento fatorial completo ( $3^3$ ) e avaliação de tempo de extração. Considerando a faixa de recuperação de 70-120%, quatro das micotoxinas avaliadas (acetil T-2, ácido tenuazônico, wortmanina e zearalenona) apresentaram valores fora da faixa em um dos níveis de fortificação. O desvio padrão relativo (RSD%) das micotoxinas foi menor que 20% e os limites de quantificação variaram de 1 a 33  $\mu\text{g kg}^{-1}$ . A modificação dos métodos de extração possibilitou a obtenção de um método para análise simultânea de multimicotoxinas atendendo aos limites de aflatoxinas e ocratoxina definidos na legislação brasileira para amêndoas de cacau.

**Palavras-chave:** Preparo de amostra; Amêndoas de cacau; Micotoxinas; Segurança alimentar; Espectrometria de massas; LC-MS/MS.

## Introdução

O cacau é uma cultura importante por ser matéria-prima para a fabricação do chocolate e ingrediente em muitos alimentos, como biscoitos, alimentos infantis, bolos, doces e sorvetes [1]. O cultivo ocorre principalmente em países de clima tropical como África Ocidental, Ásia, Américas Central e do Sul [2]. As etapas do processamento do cacau compreendido em fermentação, secagem e armazenamento das amêndoas de cacau nesses países, incluindo o Brasil, não são estritamente controladas, portanto, os grãos ficam suscetíveis à deterioração por fungos [3]. Além de causar alteração deteriorante das propriedades sensoriais, a presença de fungos filamentosos é motivo de preocupação devido à possibilidade de formação de micotoxinas [4]. Em uma pesquisa recente sobre contaminação em alimentos, mais de 80% das amostras estavam contaminadas com pelo menos uma micotoxina e 45% continham mais de um metabólito secundário de fungos [5]. Entre os metabólitos secundários, as aflatoxinas e a ocratoxina A são de especial interesse, dada ocorrência relatadas em cacau e sua toxicidade [6, 7], sendo, as únicas micotoxinas com limite máximo tolerado estabelecido para amêndoas de cacau na legislação brasileira [8]. Entretanto, a determinação de co-ocorrência de outras micotoxinas é importante devido a efeitos adversos à saúde, o que pode levar a um efeito aditivo, sinérgico ou efeitos tóxicos antagonistas [9].

Os métodos oficiais descritos para determinação de micotoxinas consistem nas técnicas de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com sistema de detecção por ultravioleta (UV), arranjo de diodos (DAD) e detecção de fluorescência (FD), cromatografia em camada delgada (TLC) e também ensaio de imunossorvente ligado a enzimas (ELISA) [10]. Para as etapas de extração e purificação, os métodos oficiais empregados são extração em fase sólida (SPE) ou colunas de imunoafinidade (IAC) [10, 11], sendo que estes métodos limitam à análises individuais ou de pequenos grupos de micotoxinas.

Com o intuito de ampliar o número de micotoxinas analisadas em uma única extração, métodos multitoxinas vêm sendo implementados [9]. Nestes, o acoplamento da cromatografia líquida à

espectrometria de massas sequencial (LC-MS/MS) apresenta papel fundamental na ampliação dos espectros analíticos [12]. Graças à seletividade da detecção por MS/MS no modo de monitoramento de reação múltipla (MRM), tornou-se possível uma preparação mínima da amostra usando métodos simples, sem ou com *clean up* mínimo [13, 12].

Em particular, os preparos de amostra por QuEChERS e *dilute and shoot* tem sido amplamente empregados na área de micotoxinas [14-19]. Essa expansão se deve à ampla cobertura de micotoxinas com propriedades físico-químicas distintas em diferentes matrizes [11, 17, 20]. A aplicação dessas técnicas de extração em matrizes com alto teor de gordura e pigmentos, muitas vezes, apresenta um desafio devido aos altos níveis de co-extrativos que podem afetar negativamente não apenas a extração e a eficiência cromatográfica, mas também a instrumentação [21].

Nesse sentido, o objetivo do trabalho foi desenvolver uma metodologia de extração para determinação de multimicotoxinas em amêndoas de cacau. O intuito do método proposto foi à redução do teor de co-extrativos da matriz sem empregar etapa de *clean up*, minimizando o impacto causado por esses no sistema instrumental (LC-MS/MS) e obter uma extração eficiente para as micotoxinas avaliadas.

## **Materiais e Métodos**

### **Reagentes e soluções**

Cloreto de sódio p.a (NaCl, 99%) da Nuclear (São Paulo, Brasil), acetonitrila (ACN), metanol (MeOH) e ácido fórmico (HFA) grau HPLC da J. T. Baker (Xalostoc, México), ácido acético (HAc) da Sigma Aldrich (Steinheim, Alemanha) e formiato de amônio (NH<sub>4</sub>FA, 95%) da Riedel-de Haen (Seelze, Alemanha). Água ultrapura foi obtida do sistema Milli Q (Millipore, Bedford, EUA).

As soluções estoques das micotoxinas foram preparadas em ACN, com exceção das fumonisinas (1:1 ACN/H<sub>2</sub>O v/v) e da gliotoxina (5:1 ACN/MeOH v/v). A partir dessas soluções foram preparadas duas soluções de trabalho (pools), levando em consideração o volume e concentração disponível de solução e os limites máximos tolerados definidos nas legislações para alimentos e, quando não disponíveis, limites esperados atribuídos por similaridade de grupos ou propriedades físico-químicas. Pool 1: ácido micofenólico, ácido penicílico, ácido tenuazônico, aflatoxinas B1, B2, G1 e G2, alternariol, alternariol-metil-éter, esterigmatocistina, fumagilina, fumonisina B2, fumonisina B3, meleagrina, moliformina, ocratoxina A, paxilina, roquefortina C, tentoxina, verruculogem e wortamina (Grupo I), alfa-ergocriptina, dihidroergocristinina, ergocornina, ergocristina, ergocristinina e ergosina (Grupo II), agroclavina-I (Grupo III), citreoviridina A (Grupo IV). Pool 2: acetil T-2, 15-acetoxiciscirpenol, ácido ciclopiazônico, alfa-zearalenol, beta-zearalenol, diacetoxiciscirpenol, gliotoxina, toxina HT-2, iso T-2 e toxina T-2 (Grupo V), zearalenona (Grupo VI), fumonisina B1 (Grupo VII) e citrinina (Grupo VIII). As soluções estoque e os pools foram armazenados em freezer a -20 °C. Os padrões de referência foram adquiridos pela Sigma Aldrich (Zwijndrecht, Países Baixos),



Biopure (Tulln, Áustria), Acros (Geel, Bélgica), Fermentek Biotechnology (Jerusalém, Israel) e Iris Biotech GmbH (Marktredwitz, Alemanha).

As concentrações utilizadas nos ensaios de otimização do método foram: Grupo I ( $50 \mu\text{g kg}^{-1}$ ), Grupo II ( $75 \mu\text{g kg}^{-1}$ ), Grupo III ( $100 \mu\text{g kg}^{-1}$ ), Grupo IV ( $150 \mu\text{g kg}^{-1}$ ), Grupo V ( $300 \mu\text{g kg}^{-1}$ ), Grupo VI ( $600 \mu\text{g kg}^{-1}$ ), Grupo VII ( $2500 \mu\text{g kg}^{-1}$ ), Grupo VIII ( $3000 \mu\text{g kg}^{-1}$ ).

### **Instrumentação**

As análises foram realizadas em um cromatógrafo UHPLC Agilent, 1290 infinity (Santa Clara, USA) acoplado a um espectrômetro de massas QTRAP 6500 (AB Sciex, Toronto, Canadá). A análise cromatográfica foi realizada empregando uma coluna cromatográfica de fase reversa da Waters Corporation, modelo ACQUITY UPLC BEH C18 (Millford, Massachusetts, USA) com dimensões  $100 \text{ mm} \times 2,1 \text{ mm} \times 1,7 \mu\text{m}$  e pré-coluna do mesmo modelo com as dimensões de  $2,1 \text{ mm} \times 5 \text{ mm}$ . A composição do gradiente de eluição utilizado foi: fase A: solução aquosa com 0,1% de ácido fórmico,  $5 \text{ mmol L}^{-1}$  de formiato de amônio e 2% de metanol e fase B: ACN com 0,1% de ácido fórmico. O gradiente otimizado utilizou fluxo constante de  $0,40 \text{ mL min}^{-1}$ , iniciando em 99% da fase A e mantido por 1,3 min, sendo que, em 1,7 min passou para 70% de A. De 1,7 a 7,4 min reduziu linearmente até 35%, e em 7,8 min retomou a condição inicial do método até 8,5 min. O volume de injeção foi de  $5,0 \mu\text{L}$ , a temperatura da coluna foi mantida a  $40 \text{ }^\circ\text{C}$  e do auto-amostrador  $10 \text{ }^\circ\text{C}$ .

Os parâmetros otimizados da fonte de íons do espectrômetro de massas foram: voltagem do spray de íons de  $\pm 4500 \text{ V}$ ; pressão do gás nebulizador 45 psi e gás auxiliar 45 psi, ambos constituídos de ar “zero grade air”, temperatura da *probe*  $500 \text{ }^\circ\text{C}$  e gás de interface 40 psi. A pressão do gás de colisão (nitrogênio) foi atribuída como *Medium*.

As análises foram realizadas no modo MRM com fonte de ionização electrospray nos modos positivo e negativo, duas transições foram selecionadas para cada micotoxina, uma quantificadora e uma para confirmação. Na Tabela 1 estão apresentados o tempo de retenção das micotoxinas, o(s) precursor(es) e os íons produtos monitorados com seus respectivos potenciais de dessolvatação, energia de colisão e potenciais de exclusão da célula de colisão. No Anexo I está descrito o processo de otimização das condições instrumentais para as micotoxinas.

**Tabela 1** Parâmetros de MRM para as micotoxinas analisadas e seus respectivos tempos de retenção

Micotoxinas	TR (min)	Íon precursor (m/z)	Potencial de dessolvatação (V)	Íon produto (m/z)	Energia de colisão (eV)	Potencial da câmara de colisão (V)
15-acetoxiscirpenol	2,69	342,1 [M+H] <sup>+</sup>	56	265,2/247,1	11/15	10/10
Acetil T2	5,9	526,2 [M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	86	287,0/245,0	21/21	12/30
Ácido ciclopiazônico	5,61	337,1 [M+H] <sup>+</sup>	71	196,1/182,1	29/25	8/8
Ácido micofenólico	4,01	321,0 [M+H] <sup>+</sup>	46	207,0/159,1	27/43	12/14
Ácido penicílico	2,52	171,1 [M+H] <sup>+</sup>	76	125,1/82,1	15/33	8/12
Aflatoxina B1	3,2	313,0 [M+H] <sup>+</sup>	1	284,8/240,9	31/49	16/14
Aflatoxina B2	3,02	315,1 [M+H] <sup>+</sup>	126	286,8/259,1	35/39	20/14
Aflatoxina G1	3,01	328,8 [M+H] <sup>+</sup>	70	199,9/242,9	54/37	15/15
Aflatoxina G2	2,86	331,1 [M+H] <sup>+</sup>	6	312,8/188,9	33/53	16/12
Agroclavina	2,6	239,2 [M+H] <sup>+</sup>	1	183,0/208,0	23/23	8/6
α-Zearalenol	4,05	323,3 [M+H] <sup>+</sup>	11	304,9/188,9	11/27	20/16
α-ergocriptina	3,35	576,2 [M+H] <sup>+</sup>	116	268,1/223	33/43	26/22
Citrinina	3,35	251,2 [M+H] <sup>+</sup>	51	232,9/205,0	21/35	14/12
Citroeveridina A	4,52	403,1 [M+H] <sup>+</sup>	46	139,0/83,0	29/51	8/10
Diacetoxiciscirpenol	3,22	384,1 [M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	46	307,0/104,8	15/49	16/14
Dihidroergocristinina	3,51	612,3 [M+H] <sup>+</sup>	126	270,0/350,0	39/33	34/42
Ergocornina	3,1	562,2 [M+H] <sup>+</sup>	116	268,1/223,1	33/43	24/26
Ergocristina	3,47	610,3 [M+H] <sup>+</sup>	51	268,0/223,0	35/45	34/26
Ergocristinina	3,76	610,3 [M+H] <sup>+</sup>	51	592,2/304,9	21/37	54/36
Ergosina	2,91	548,3 [M+H] <sup>+</sup>	131	223,0/207,9	41/49	22/26
Esterigmatocistina	5,1	325,0 [M+H] <sup>+</sup>	61	280,9/115,0	47/83	14/14
Fumagilina	6,18	459,2 [M+H] <sup>+</sup>	86	177,1/130,9	19/33	10/14
Fumonisinina B1	3,29	722,3 [M+H] <sup>+</sup>	116	334,0/352,0	53/49	16/16
Fumonisinina B2	4,25	706,3 [M+H] <sup>+</sup>	6	336,0/318,0	49/51	18/16
Fumonisinina B3	3,85	706,3 [M+H] <sup>+</sup>	86	336,3/318,3	47/47	14/14
Gliotoxina	3,01	327,0 [M+H] <sup>+</sup>	51	263,0/245,0	13/23	32/28
Iso T2	4,8	484,1 [M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup> 467,3 [M+H] <sup>+</sup>	26/96	215,2/197,0	23/23	10/12
Meleagrina	3,06	434,1 [M+H] <sup>+</sup>	46	403,0/333,9	19/29	16/12
Ocratoxina	4,89	404,0 [M+H] <sup>+</sup>	71	238,9/358,0	31/19	16/18
Paxilina	6,96	436,3 [M+H] <sup>+</sup>	66	182,0/130,0	37/27	12/8
Roquefortina C	3,49	390,1 [M+H] <sup>+</sup>	81	193,0/322,1	33/27	8/12
Tentoxina	3,64	415,2 [M+H] <sup>+</sup>	111	312,1/256,2	25/39	12/10
Toxina HT-2	3,62	442,0 [M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	76	263,1/215,0	15/17	12/26
Toxina T-2	4,59	484,2 [M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	31	215,1/185,0	21/25	10/8
Verruculogem	5,59	512,1 [M+H] <sup>+</sup>	11	494,1/352,0	9/23	22/18
Wortmanina	3,67	446,0 [M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup> 429,0 [M+H] <sup>+</sup>	26/51	354,9/355,0	17/11	22/20
Zearalenona	4,86	319,1 [M+H] <sup>+</sup>	6	283,0/186,9	15/25	16/12
Moniliformina	0,45	96,9 [M-H] <sup>-</sup>	-5	41,0	-24	-7
Ácido Tenuazônico	3,08	195,9 [M-H] <sup>-</sup>	-90	138,8/111,8	-26/-32	-15/-11
Alternariol	3,35	256,9 [M-H] <sup>-</sup>	-125	212,9/214,9	-32/-34	-13/-11
β-zearalenol	3,62	321,0 [M-H] <sup>-</sup>	-140	259,1/277,0	-30/-34	-17/-17
Alternariol-metil-éter	4,8	270,9 [M-H] <sup>-</sup>	-95	227,9/226,9	-40/-48	-19/-21

\* íons quantificador/qualificador

**Amostras**

Foram utilizadas amostras brancas de amêndoas de cacau secas, processadas em moinho Geiger (UM25E) por 7 min à seco e 7 min após adição de água na proporção de 1:1,5 cacau/água (m/m). Nos

ensaios foram empregadas as massas de 7,5 g de cacau em pasta, equivalente a 3 g de cacau seco. Amostras naturalmente contaminadas com ocratoxina A: NAT01, NAT02 e NAT03 presentes no banco de amostras do Laboratório de Controle de Qualidade e Segurança Alimentar (LACQSA) foram empregadas nos testes para determinação do tempo de extração. As amostras foram mantidas a -15 °C até a análise.

### **Método de extração otimizado**

A tubos de centrifuga com capacidade de 50 mL contendo a pasta de cacau (7,5 g) foram adicionados 18 mL da solução extratora (7:2,5:0,5 ACN/H<sub>2</sub>O/HAc v/v/v) e a mistura foi agitada em vórtex (3000 rpm por 30 seg) para homogeneização, em seguida, foram adicionados 3 g de NaCl e o tubo foi novamente agitado em vórtex (3000 rpm por 30 seg). Após homogeneização, os tubos foram agitados por 60 min em mesa agitadora, em média 700 ciclos min<sup>-1</sup>. Em seguida, os tubos contendo os extratos foram refrigerados em freezer por 15 min à -70 °C e centrifugados por 10 min à 4000 rpm à 5 °C. Alíquotas de 1,0 mL foram recolhidas e transferidas para *vials*, com posterior análise por LC-MS/MS.

### **Avaliação de co-extrativos da matriz**

Foram empregados testes gravimétricos na triagem do método de extração com o intuito de determinar condições de extração com níveis mínimos de resíduos da matriz, sem o comprometimento da recuperação. Foram utilizados 7,5 g de pasta de cacau e 18,0 mL de ACN. Foram avaliados a influência da acidificação da fase extratora, com 1% de ácido acético e o efeito *salting out/in* pela adição de 2 g de NaCl. A etapa de congelamento do extrato foi à -70 °C por 15 min. Alíquotas de 2,5 mL do extrato de diferentes etapas do procedimento de extração (extrato bruto, pós congelamento, pós adição de sal e congelamento) foram coletadas em tubos de vidro, previamente pesados, e secas sob fluxo de N<sub>2(g)</sub> em banho aquecido à 40 °C sob agitação controlada. Após total *secura*, os frascos foram pesados e os resíduos de co-extrativos da matriz foram estimados pela diferença de massa entre o frasco contendo o resíduo do extrato com seu respectivo frasco vazio.

### **Planejamento experimental**

O planejamento fatorial completo 3<sup>3</sup> foi empregado para avaliar a influência das variáveis proporções da fase extratora ACN/H<sub>2</sub>O (v/v), quantidade de NaCl (g) e porcentagem de HAc (% v/v) na eficiência da extração e obter um método que possibilite-se uma maior gama de micotoxinas dentro da faixa de recuperação de 70-120% com desvio padrão relativo (RSD%) menor que 20% (SANTE, 2017). Na Tabela 2 está apresentada a matriz do planejamento fatorial empregada para avaliação das micotoxinas simultaneamente. Para elucidar a influência de cada parâmetro avaliado na extração, empregou-se metodologia de superfície de resposta para a ocratoxina. O software Chemoface 1.61 foi utilizado para obtenção das análises estatísticas.

**Tabela 2** Matriz do planejamento fatorial completo 3<sup>3</sup>

<b>Ensaio</b>	<b>HAc (% v/v)</b>	<b>NaCl (g)</b>	<b>ACN/H<sub>2</sub>O (v/v)</b>
1	0	1	8/2
2	1	1	8/2
3	2	1	8/2
4	0	2	8/2
5	1	2	8/2
6	2	2	8/2
7	0	3	8/2
8	1	3	8/2
9	2	3	8/2
10	0	1	7/3
11	1	1	7/3
12	2	1	7/3
13	0	2	7/3
14	1	2	7/3
15	2	2	7/3
16	0	3	7/3
17	1	3	7/3
18	2	3	7/3
19	0	1	6/4
20	1	1	6/4
21	2	1	6/4
22	0	2	6/4
23	1	2	6/4
24	2	2	6/4
25	0	3	6/4
26	1	3	6/4
27	2	3	6/4

O volume de fase extratora utilizado foi fixado em 18,0 mL de modo a permitir que fossem feitas as correções na proporção ACN/H<sub>2</sub>O para obter as três fases extratores avaliadas, considerando o volume de 4,5 mL de água presente na pasta de cacau. O cálculo das recuperações foi realizado considerando-se apenas o volume da fração orgânica da fase extratora, devido ao particionamento das fases pela adição do NaCl.

#### **Avaliação do tempo de extração**

Foram avaliados três tempos de extração, 30, 60 e 90 min na mesa agitadora (700 ciclos min<sup>-1</sup>). A extração foi realizada conforme descrito no tópico método de extração otimizado. A cada 30 min uma alíquota de 1,5 mL foi recolhida e transferida para um eppendorf. Os eppendorfs foram colocados em freezer por 15 min a -70 °C e, posteriormente, centrifugados por 5 min a 10.000 rpm. Uma fração do

extrato foi recolhida e transferida para um *vial* com subsequente análise por LC-MS/MS. As respostas foram avaliadas quanto à recuperação.

O teste foi realizado utilizando amostras fortificadas com todas as micotoxinas, para ocratoxina A empregou-se também amostras naturalmente contaminadas, por ser esta, a micotoxina de maior relevância para cacau. Os resultados das amostras naturalmente contaminadas foram comparados com aqueles obtidos pelo método convencional por HPLC/FD empregando colunas de imunoafinidade, procedimento usual de rotina do laboratório:  $7,19 \pm 2,56 \mu\text{g kg}^{-1}$  (NAT01),  $6,21 \pm 1,54 \mu\text{g kg}^{-1}$  (NAT02) e  $5,79 \pm 1,52 \mu\text{g kg}^{-1}$  (NAT03).

### **Avaliação de desempenho do método**

Simultaneamente aos ensaios de otimização do método de extração foram avaliados, em um ensaio piloto, os seguintes parâmetros de desempenho do método: linearidade, seletividade, repetibilidade, recuperação e os limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ).

A seletividade do método foi determinada por meio dos critérios de identificação: tempo de retenção ( $t_R$ ), razão de íons ( $\pm 30\%$ ) e pontos de identificação (IP) para cada analito [22]. A linearidade foi avaliada por meio da curva analítica matrizada, fortificando-se extratos brancos de cacau em oito níveis equidistantes para todas as micotoxinas e o processo foi realizado em sextuplicata. Neste estudo um valor mínimo de 0,900 para o coeficiente de determinação ( $R^2$ ) foi adotado. Após avaliação dos critérios de desempenho de identificação, para as micotoxinas que não atenderam aos critérios de identificação (qualitativos) em níveis mais baixos, estes foram retirados da curva analítica, atentando para não remover mais que três níveis (mínimo cinco níveis).

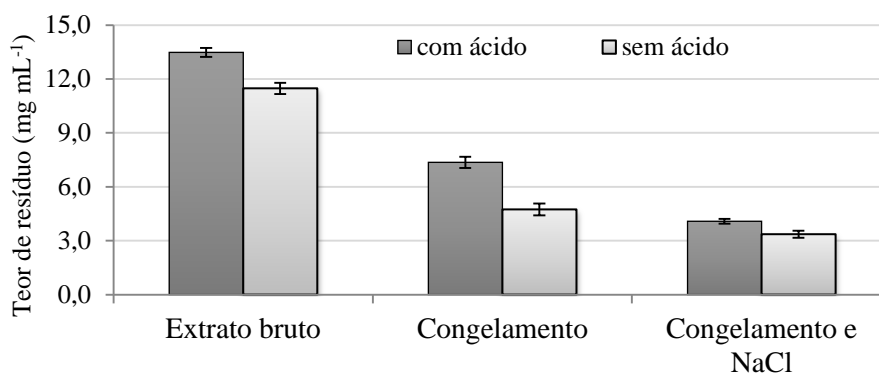
A recuperação foi estudada fortificando amostras brancas em dois níveis, processando seis amostras para cada. O nível mais alto, correspondente à concentração do segundo ponto da curva analítica e, o mais baixo, entre os dois pontos mais baixos da curva. Para as micotoxinas citreoviridina, alfa e beta-zearalenona, que tiveram seis pontos na curva analítica, a fortificação mais baixa foi realizada na concentração equivalente ao menor nível. A precisão foi avaliada sob condições de repetibilidade nos dois níveis de concentração dos estudos de recuperação realizada em sextuplicata com resposta expressa em RSD (%) [22].

Os LOD e LOQ foram estimados pela curva analítica matrizada, conforme descrito no *Guidance document on the estimation of LOD and LOQ for measurements in the field of contaminants in feed and food* (2016). No entanto, valores muito baixos foram obtidos e, diante das condições experimentais, optou-se por uma abordagem alternativa, também sugerida pelo guia, na qual, o LOD foi adotado como 1/10 do menor nível da curva e o LOQ igual a  $3,3 \times \text{LOD}$  [23].

## **Resultados e discussão**

### **Co-extrativos da matriz**

O método de extração líquido-líquido proposto, com partição por adição de sal e etapa de congelamento, foi adaptado a partir dos métodos de extração *dilute and shoot* e QuEChERS. Devido aos pigmentos e o alto teor de gordura dos grãos ( $\geq 50\%$ ), o cacau é uma matriz de alta complexidade, necessitando de um procedimento de extração eficaz e com menor quantidade de co-extrativos [2]. Inicialmente, realizou-se testes gravimétricos para determinar condições de extração que apresentassem extratos com reduzido teor de resíduos da matriz, minimizando o impacto causado por esses no sistema analítico de detecção e possibilitando a melhoria na sensibilidade como observado por Lehotay e colaboradores [24]. Na Fig. 1 estão apresentados os resultados obtidos no teste gravimétrico para as etapas avaliadas no método proposto, as respostas foram expressas em miligramas de resíduos de cacau por mililitro de extrato ( $\text{mg mL}^{-1}$ ).



**Fig. 1** Teor de resíduo de cacau (co-extrativos) para diferentes etapas do processo de extração (n=6)

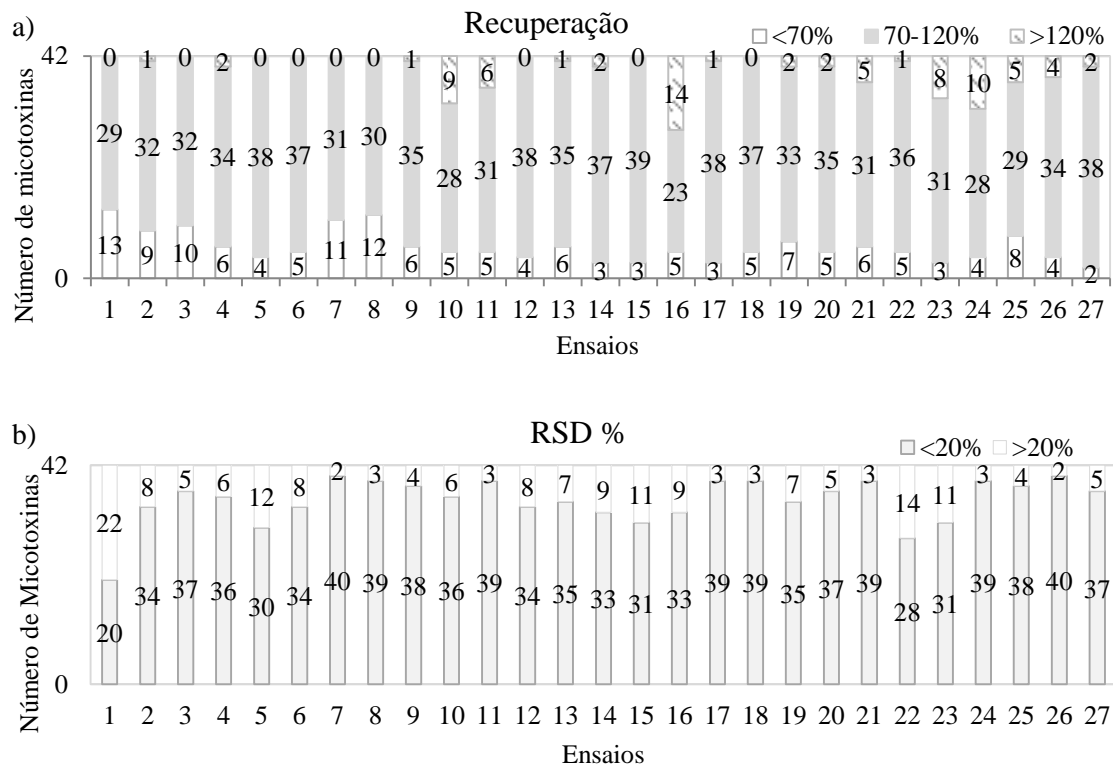
A análise dos resultados demonstrou que a etapa de congelamento pós-extração possibilitou uma redução média de 45,4 e 58,7 % de co-extrativos da matriz com e sem acidificação, respectivamente. A adição de NaCl juntamente com a etapa de congelamento, reduziu em aproximadamente  $70,2 \pm 0,7$  % a quantidade de resíduos da matriz no extrato final comparado ao extrato bruto. Com a redução da temperatura da mistura, fase extratora e amostra, a solubilidade dos polifenóis presentes no cacau diminuiu, levando à sua precipitação [25]. A redução da quantidade destes compostos de alta densidade no extrato e também das gorduras, que têm sua solubilidade reduzida, permite a obtenção de um extrato mais “limpo”. Além disso, ao se adicionar NaCl, ocorre a separação das fases aquosa e orgânica. Nesse processo os compostos hidrofílicos da matriz migram para a fase aquosa, reduzindo a quantidade de co-extrativos na fase orgânica [26].

Como pode ser observado na Fig. 1 o pH tem influência direta em todas as etapas avaliadas na extração. Li e colaboradores (2013) relatam que em pH menos ácido, os polifenóis presentes no cacau são facilmente transformados e polimerizados, ocorrendo sua precipitação, consequentemente, resultando em extratos com menor quantidade de co-extrativos. Apesar de pH maior resultar em baixos níveis de co-extrativos da matriz no extrato final, a diminuição da estabilidade de algumas micotoxinas é relatada sob tais condições, suscitando a necessidade de haver um equilíbrio entre os co-extrativos da matriz e a estabilidade do analito, por influenciar diretamente na recuperação do

composto [27]. Por esse motivo a recuperação das micotoxinas foi avaliada em diferentes níveis de acidificação.

### Planejamento experimental

Os resultados obtidos do planejamento, para as recuperações das 42 micotoxinas, estão expressos na Fig. 2, no qual se pode avaliar a quantidade de micotoxinas dentro e fora da faixa de recuperação de 70-120% (Fig. 2a) e o RSD individuais como sendo satisfatórios resultados menores que 20% (Fig. 2b).

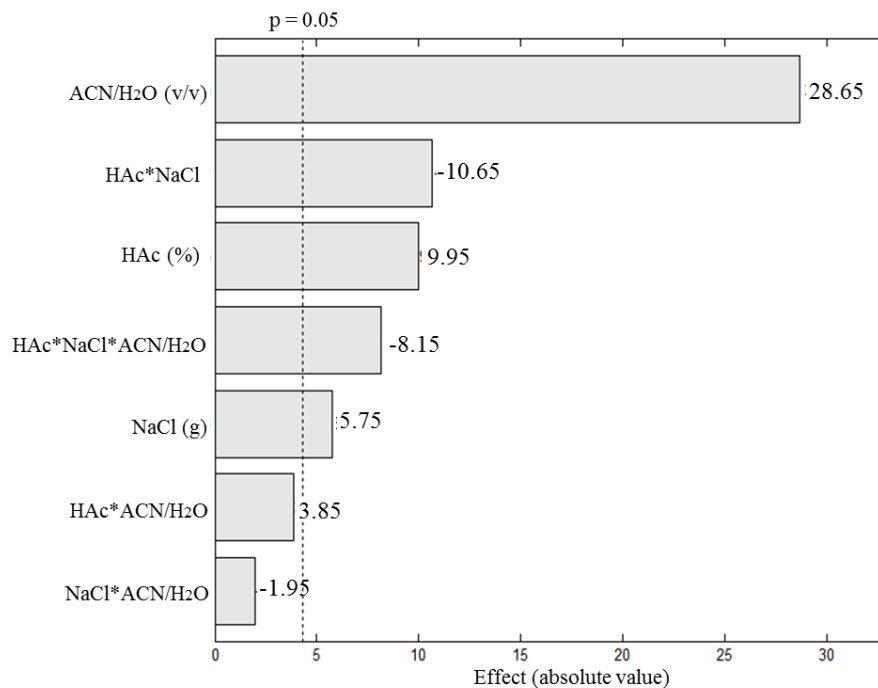


**Fig. 2** Gráfico dos resultados do planejamento experimental em a) recuperação e b) RSD para as micotoxinas avaliadas (n=9)

Analisando a Fig. 2 é possível inferir que a variação dos parâmetros no método proposto de extração, resultou entre 23 a 39 micotoxinas dentro da faixa de recuperação dada como satisfatória, das 42 avaliadas, corroborando a hipótese de que os parâmetros apresentam influencia no desempenho da extração. Requisitos como recuperação, RSD e quais micotoxinas ficaram dentro da faixa desses parâmetros de desempenho, foram avaliados para definir a melhor condição de extração. Preferencialmente, as micotoxinas contempladas nas legislações para contaminação em alimentos devem atender aos critérios de desempenho estabelecidos. Com base nesses requisitos adotou-se as condições do ensaio 27 (2% de ácido acético, 3 g de NaCl e uma proporção de 6:4), por apresentar todas as micotoxinas legisladas em estudo, dentre da faixa de recuperação e RSD recomendado e com ótimo desempenho para as demais.

Para a maioria das micotoxinas, as recuperações foram satisfatórias (70-120%) para as três proporções de ACN/H<sub>2</sub>O avaliadas. No entanto, para a extração empregando a proporção 8:2 (ensaios 1-9) as recuperações de grande parte dessas ficaram concentradas na faixa entre 70-80%, faixa essa, muito próxima ao limite aceitável. Assim, optou-se por adotar a proporção de fase extratora com uma maior fração de água a fim de obter resultados mais próximos do centro da faixa. Em geral, o melhor desempenho foi alcançado com a mistura ACN/H<sub>2</sub>O na razão 6:4 v/v.

O parâmetro quantidade de NaCl foi avaliado em quantidades em volta da saturação do sistema. De acordo com Anastassiades e colaboradores (2003) [26] quanto maior a quantidade de NaCl adicionado a extração, mais completa se torna a separação de fases e menos água permanece na fase orgânica. A fase extratora torna-se assim menos polar e, portanto, menos receptiva aos compostos polares. Logo, variando a quantidade de NaCl adicionada ao extrato, é possível controlar o intervalo de polaridade (seletividade) do passo de particionamento. Com base nessa observação a quantidade de NaCl adicionada ao sistema de extração foi avaliada, não apresentando influência direta na recuperação para a maioria das micotoxinas. No entanto, essa variável demonstrou significância para a ocratoxina, como demonstrado no Gráfico de Pareto da Fig. 3, utilizado para avaliar a influência das variáveis e suas interações.

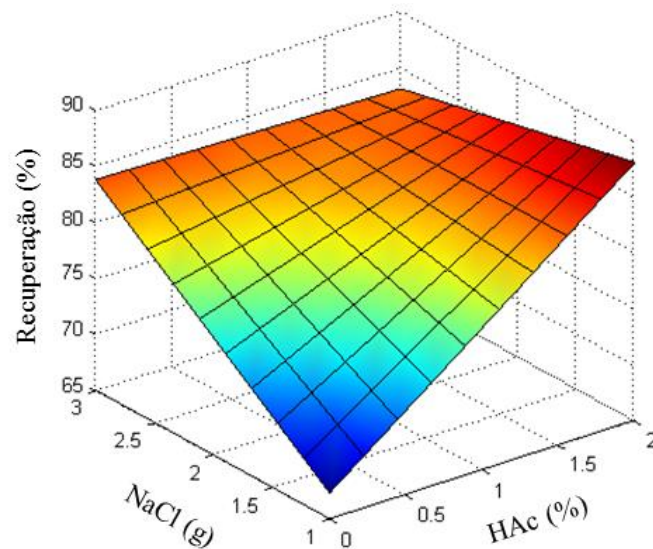


**Fig. 3** Gráfico de Pareto para visualização dos efeitos das variáveis químicas sobre a extração de ocratoxina

Analisando-se o Gráfico de Pareto foi possível inferir que todas as variáveis individuais e, as interações entre, quantidade de NaCl com acidificação e entre todas as variáveis apresentaram significância em um nível de confiança com 95%. Dentre esses, é possível observar que para ocratoxina a proporção de ACN/H<sub>2</sub>O apresentou maior influência na extração da micotoxina. O valor



positivo da barra do Gráfico de Pareto obtida para essa variável significa que, quando esta segue para seu nível máximo (maior proporção de água), resulta em um aumento da resposta, o mesmo vale para as variáveis acidificação e quantidade de NaCl. O valor negativo obtido para a interação entre as variáveis que apresentaram significância no modelo avaliado indica que estas seguem em sentido contrário no aumento da recuperação, ou seja, quando uma variável segue para seu máximo e a outra para o nível mais baixo maior será o desempenho do método. Para melhor elucidar a influência da interação entre os parâmetros quantidade de NaCl e acidificação por HAc na extração da ocratoxina utilizou-se a metodologia de superfície de respostas ajustada ao modelo de interação (Fig. 4).

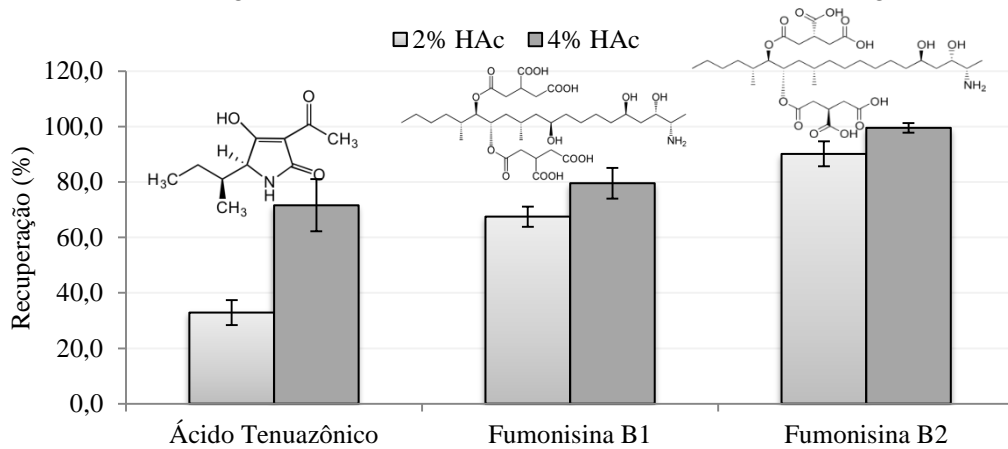


**Fig. 4** Superfície de resposta para ocratoxina obtidas para a interação entre as variáveis NaCl (g) e HAc (%)

Analisando a superfície de resposta é possível observar uma região de máximo com destaque para o aumento da acidez com menor quantidade de NaCl. Resultado este que corrobora com o apresentado no Gráfico de Pareto, para o aumento da eficiência de extração os níveis das variáveis acidificação e quantidade de NaCl devem seguir em sentido oposto. Ainda com base no Gráfico de Pareto, a avaliação individual da variável quantidade de NaCl apresentou valor positivo, indicando que quanto maior a quantidade de sal maior a recuperação de ocratoxina, que se deve a necessidade do aumento de NaCl na ausência de HAc. A interação da variável quantidade de NaCl aponta que, níveis menores associados aos maiores níveis das demais variáveis resultam em significativa melhora na recuperação. Apesar disso, quantidade máxima de NaCl também apresentou resultados satisfatórios considerando a faixa ótima (70-120%).

Como evidenciado no Gráfico de Pareto e na Superfície de resposta, a acidificação da fase extratora, apresentou forte influência no rendimento da extração para ocratoxina, bem como a proporção de água presente na fase extratora. Comparando também os resultados obtidos para as demais micotoxinas, foi possível inferir que a fase extratora com maior proporção de fase aquosa e acidificada proporcionou o melhor desempenho global. Sem acidificação ou com concentração de

HAc inferior a 2%, as fumonisinas não foram extraídas eficientemente, e recuperações baixas foram observadas especialmente para as micotoxinas ácidas, citrinina e ocratoxina. Os resultados obtidos no ensaio sugerem que, embora a proporção de água na fase extratora contribua para o aumento nas recuperações, um ligeiro aumento na quantidade de ácido na fase extratora pode levar a um ganho significativo na recuperação das micotoxinas de caráter ácido. Com isso, para garantir uma extração eficiente para essas micotoxinas, uma proporção maior de ácido deve ser empregada na extração. Assim, a condição de análise definida no planejamento experimental (ensaio 27) foi reavaliada empregando-se a quantidade de 4% de HAc. Observou-se que o aumento de ácido acético na fase extratora de 2 para 4% possibilitou uma melhora na recuperação de ácido tenuazônico e fumonisinas B1 e B2, sem afetar, significativamente, as demais micotoxinas estudadas (Fig. 5).



**Fig. 5** Recuperação das micotoxinas para o método de extração empregando 2 e 4% de ácido acético (n=6)

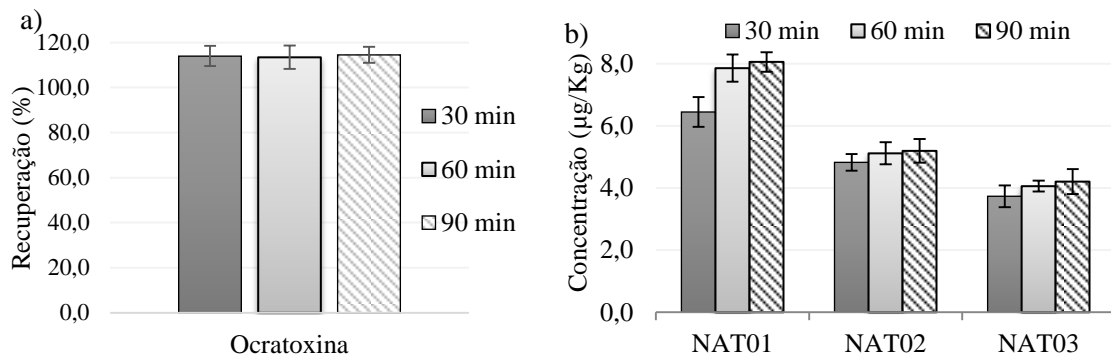
A melhoria na recuperação das micotoxinas de caráter ácido pode ser atribuída à estabilização (protonação da molécula) em suas formas neutras na fase orgânica [13]. Em pH baixo, os grupos carboxílicos das fumonisinas são protonados, levando ao enfraquecimento das interações com a matriz e, juntamente com o efeito *salting out* promovido pela adição de NaCl, favorecendo a migração dessas micotoxinas para a fase orgânica [28]. Nos ensaios observou-se que as quantidades de 1 e 2% de ácido acético são suficientes para uma recuperação satisfatória para as fumonisinas B2 e B3. Apesar das fumonisinas B2 e B3 serem estruturalmente homólogas à fumonisina B1, esta apresenta uma hidroxila a mais em sua molécula, fazendo com que a quantidade de 4% de ácido apresente maior eficiência de extração para fumonisina B1 (70-120%). O ácido tenuazônico é um ácido fraco (pKa 3,5), solúvel em metanol e clorofórmio [29], logo, pH mais baixo pode favorecer sua extração.

A moniliformina foi a única micotoxina avaliada que não atingiu os critérios adotados para avaliar a eficiência de extração. Essa é considerada um ácido forte (pKa entre 0±0,5 e 1,7) e altamente polar [30], nenhuma variação no método possibilitou melhoria na sua extração. Para essa micotoxina outra metodologia de extração deve ser proposta. Apesar das demais micotoxinas não apresentarem variação na recuperação com o aumento da concentração de ácido na extração, estas sofreram maior

supressão de sinal, que variaram entre 0,7 a 20% aumentado de 2 para 4% de HAc, dependendo da micotoxina. Efeito este que não limitou a sensibilidade do método.

### Teste tempo de extração

Diferente dos métodos empregados para pesticidas [12, 31], o tempo de extração para análise de micotoxinas é um parâmetro de relevância. Devido sua ocorrência natural, estas podem estar fortemente ligadas a matriz demandando maior tempo para uma extração eficiente. Nessa perspectiva, o tempo de extração foi avaliado tomando como base o tempo de extração proposto em trabalhos empregando *dilute and shoot* [11]. Foram avaliados os tempos de extração de 30, 60 e 90 min para amostras de cacau fortificadas e naturalmente contaminadas. Na Fig. 6 estão apresentados os resultados obtidos para ocratoxina.



**Fig. 6** Resposta para ocratoxina nos tempos de extração 30, 60 e 90 min; a) matriz acrescida de padrão, b) matrizes naturalmente contaminadas (n=3)

Todas as micotoxinas foram avaliadas nos tempos de extração propostos e não apresentaram diferenças significativas na recuperação. A Fig. 6a apresenta os resultados de recuperação obtidos para a ocratoxina, sendo um exemplo típico do comportamento observado para as toxinas de modo geral. Avaliando a Fig. 6b obtida para as amostras naturalmente contaminadas observa-se que o tempo de extração de 30 min não foi suficiente para a estabilização da quantidade de micotoxina extraída da matriz. Os tempos de agitação de 60 e 90 min mostraram-se mais eficientes na extração, quanto à quantidade, em  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , de ocratoxina extraída e não apresentaram diferenças significativas de rendimento. Por esse motivo o tempo mínimo necessário para atingir o equilíbrio na capacidade de extração pode ser adotado como 60 min. Além disso, nos testes de tempo de extração empregando amostras naturalmente contaminadas com ocratoxina, pôde-se constatar que o método proposto apresentou resultados similares aos determinados por imunoafinidade e HPLC/FD em análises de rotina do laboratório LACQSA.

**Desempenho do método**

Os resultados da avaliação de desempenho do método obtidos para as micotoxinas estudadas estão apresentados na Tabela 3. Das 42 micotoxinas utilizadas no desenvolvimento do método de extração, 34 foram avaliadas quanto ao desempenho do método quantitativo. As oito micotoxinas restantes (15-acetil-deoxinivalenol, ácido penicílico, toxina HT-2, verruculogem, moniliformina, gliotoxina, fumagilina e fumonisina B3) por indisponibilidade ou baixa concentração e/ou volume de padrão analítico para fortificação ou, ainda por não atenderem aos critérios de desempenho, foram avaliadas de forma qualitativa.

**Tabela 3** Resultados da avaliação do desempenho analítico das micotoxinas

Micotoxina	Faixa linear ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	n.º de níveis	Inclinação	Intercepto	R <sup>2</sup>	LOD ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	LOQ ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	Nível baixo			Nível alto		
								C ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	Rec (%)	RSD (%)	C ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	Rec (%)	RSD (%)
1 Acetil T-2	50-360	7	3,17E+02	7,33E+05	0,9745	5,0	16,5	75	127	17,7	300	103	9,5
2 Ácido ciclopiazônico	30-360	8	-8,97E+03	3,17E+07	0,9836	3,0	9,9	75	113	12,2	300	90	19,0
3 Ácido micofenólico	10-120	8	2,22E+04	8,21E+07	0,9923	1,0	3,3	25	114	7,7	100	106	3,1
4 Ácido tenuazônico	16,7-120	7	-3,11E+02	5,25E+05	0,9840	1,7	5,5	25	78	15,0	100	64	13,2
5 Aflatoxina B1	3,0-36	8	2,20E+03	6,09E+07	0,9897	0,30	1,0	7,5	111	6,8	30	91	8,7
6 Aflatoxina B2	3,0-36	8	-3,29E+03	3,05E+07	0,9877	0,3	1,0	7,5	83	15,9	30	81	12,8
7 Aflatoxina G1	3,0-36	8	-6,44E+02	3,73E+07	0,9847	0,3	1,0	7,5	90	7,7	30	98	12,3
8 Aflatoxina G2	3,0-36	8	5,34E+01	3,92E+07	0,9877	0,3	1,0	7,5	85	12,3	30	92	18,3
9 Agroclavina-I	10-120	8	3,97E+02	5,77E+07	0,9909	1,0	3,3	25	81	3,0	100	81	8,7
10 Alfa-ergocriptina	10-120	8	1,36E+03	1,48E+07	0,9732	1,0	3,3	25	104	7,7	100	92	10,1
11 Alfa-zearalenol	33,3-120	6	7,52E+02	5,24E+05	0,9678	5,0	16,5	34	104	13,4	100	97	6,1
12 Alternariol	10-120	8	1,73E+02	3,61E+05	0,9777	1,0	3,3	34	108	6,8	100	96	7,0
13 Alternariol-metil-éter	10-120	8	-6,93E+01	4,70E+05	0,9898	1,0	3,3	25	114	10,7	100	99	5,5
14 Beta-zearalanol	33,3-120	6	8,89E+02	5,33E+05	0,9418	5,0	16,5	34	102	12,6	100	97	8,1
15 Citreoviridina A	10-36,0	6	-3,29E+01	3,89E+06	0,9618	1,0	3,3	10,2	116	3,4	30	104	6,2
16 Citrinina	60-720	8	-4,98E+03	5,98E+07	0,9967	6,0	19,8	150	78	3,8	600	77	9,1
17 Diacetoxiciscirpenol	50-360	7	1,77E+03	1,41E+06	0,9284	5,0	16,5	75	113	15,6	300	115	18,0
18 Dihidroergocristinina	10-120	8	3,48E+03	2,35E+07	0,9840	1,0	3,3	25	108	11,1	100	104	9,3
19 Ergocornina	10-120	8	3,72E+03	1,50E+07	0,9799	1,0	3,3	25	101	8,4	100	92	4,4
20 Ergocristina	10-120	8	1,49E+02	1,48E+07	0,9778	1,0	3,3	25	117	7,8	100	105	11,7
21 Ergocristinina	10-120	8	5,77E+03	1,39E+07	0,9467	1,0	3,3	25	111	12,1	100	100	13,6
22 Ergosina	10-120	8	-3,96E+03	1,58E+07	0,9917	1,0	3,3	25	99	11,0	100	96	11,1
23 Esterigmatocistina	30-360	8	8,58E+03	7,03E+07	0,9971	3,0	9,9	75	117	6,3	300	100	3,3

Micotoxina	Faixa linear ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	n.º de níveis	Inclinação	Intercepto	R <sup>2</sup>	LOD ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	LOQ ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	Nível baixo			Nível alto			
								C ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	Rec (%)	RSD (%)	C ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	Rec (%)	RSD (%)	
24	Fumonisina B1	100-1200	8	1,31E+03	8,49E+05	0,9850	10,0	33,0	250	82	5,2	1000	78	6,3
25	Fumonisina B2	50-600	8	-1,01E+02	3,31E+06	0,9927	5,0	16,5	125	107	2,7	500	92	6,9
26	Iso-T-2	50-360	7	-5,50E+02	3,13E+05	0,9699	5,0	16,5	75	105	11,1	300	104	13,0
27	Meleagrina	10-120	8	2,00E+03	9,33E+07	0,9800	1,0	3,3	25	111	6,2	100	102	11,5
28	Ocratoxina A	3,0-36	8	1,53E+04	7,91E+07	0,9934	0,3	1,0	7,5	113	9,0	30	103	6,2
29	Paxilina	10-120	8	-9,52E+02	2,57E+06	0,9537	1,0	3,3	25	115	12,1	100	106	20,4
30	Roquefortina C	30-360	8	-3,16E+04	5,56E+07	0,9921	3,0	9,9	75	93	6,8	300	83	9,8
31	Tentoxina	10-120	8	-6,08E+03	7,03E+07	0,9947	1,0	3,3	25	113	7,7	100	100	5,7
32	Toxina T-2	30-360	8	-1,22E+03	1,61E+06	0,9833	3,0	9,9	75	116	18,8	300	109	15,7
33	Wortmanina	50-360	7	-3,95E+02	4,24E+05	0,9364	5,0	16,5	75	134	16,7	300	107	16,7
34	Zearalenona	16,7-120	7	5,92E+02	3,28E+06	0,9901	1,7	5,5	34	135	10,5	100	98	7,1

Devido à alta complexidade da matriz de cacau, assumiu-se a existência de efeito matriz e os ensaios foram conduzidos com curvas analíticas matrizadas. As curvas analíticas foram ajustadas pelo método dos mínimos quadrados ponderado relativo (MMQPR). Boa linearidade foi observada para as curvas analíticas no método multimicotoxinas ( $R^2 > 0,9364$ ).

No menor nível de fortificação, 91% dos analitos atenderam os critérios de aceitabilidade. Sendo que, no menor nível todas as micotoxinas apresentaram RSD menor que 20% e zearalenona, wortmanina e acetil T-2 apresentaram recuperação acima de 120%. No nível mais alto de fortificação todas as micotoxinas obtiveram recuperação entre 70-120%, com exceção do ácido tenuazônico (64%), que apesar da recuperação abaixo do recomendado é aceitável, por apresentar boa repetibilidade com RSD de 13,2%. De acordo com o guia SANTE (2017), recuperações fora da faixa podem ser aceitas desde que tecnicamente justificadas e não sejam inferiores a 30% [22].

Os limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) do método foram estimados de acordo com o guia de orientação sobre a estimativa de LOD e LOQ para medições no campo de contaminantes em alimentos para animais e alimentos [23]. Os valores estimados, considerando a abordagem das curvas analíticas, apresentaram limites extremamente baixos, verificando que estes não podem ser alcançados, por isso, optou-se por estabelecer o LOD como sendo dez vezes menor que o nível mais baixo da curva analítica, e o LOQ igual a 3,3 x LOD.

## **Conclusões**

A modificação proposta para as técnicas de preparo de amostras QuEChERS e *dilute and shoot* possibilitou a determinação de multimicotoxinas em amostras de cacau, eliminando a necessidade de uma etapa de *clean up*. A partição da fase extratora por adição de NaCl e a etapa de congelamento tiveram influência direta na redução dos co-extrativos da matriz no extrato final, permitindo a não execução da etapa de *clean up* que pode levar a perda de micotoxinas nos adsorventes empregados, bem como reduzir o custo da extração, uma vez que, os adsorventes em geral são os consumíveis mais caros da extração. O desempenho do método demonstrou adequada seletividade, sensibilidade, confiabilidade e repetibilidade para ser aplicado em amostras reais. As curvas analíticas matrizadas mostraram um comportamento linear para todos os compostos na faixa avaliada. O método proposto é viável para a rotina laboratorial por ser rápido e simples. Os resultados obtidos possibilitaram a aplicação do método em estudos de ampliação do escopo da metodologia para outras oleaginosas, atualmente em desenvolvimento no laboratório em paralelo com o estudo de co-ocorrência de micotoxinas em amêndoas secas de cacau.

**Agradecimentos** O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001. Os autores também agradecem ao Laboratório de Controle de Qualidade e Segurança Alimentar (LACQSA-BH), Laboratório Nacional Agropecuário de Minas Gerais (LANAGRO-MG) e Laboratório de Análise e

Eletroanalítica da Universidade Federal de Lavras (LAE-UFLA) pela cessão das instalações e equipamentos para a realização deste trabalho.

## Conformidade com padrões éticos

**Conflitos de interesse** Os autores declaram não ter conflitos de interesse.

## Referências

1. Mishra RK, Hayat A, Catanante G, Istamboulie G, Marty JL. Sensitive quantitation of Ochratoxin A in cocoa beans using differential pulse voltammetry based aptasensor. *Food chemistry*. 2016;192:799-804. doi:10.1016/j.foodchem.2015.07.080.
2. Dankyi E, Carboo D, Gordon C, Fomsgaard IS. Application of the QuEChERS procedure and LC-MS/MS for the assessment of neonicotinoid insecticide residues in cocoa beans and shells. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2015;44:149-57. doi:10.1016/j.jfca.2015.09.002.
3. Copetti MV, Iamanaka BT, Frisvad JC, Pereira JL, Taniwaki MH. Mycobiota of cocoa: from farm to chocolate. *Food microbiology*. 2011;28(8):1499-504. doi:10.1016/j.fm.2011.08.005.
4. Copetti MV, Iamanaka BT, Pitt JI, Taniwaki MH. Fungi and mycotoxins in cocoa: from farm to chocolate. *International journal of food microbiology*. 2014;178:13-20. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2014.02.023.
5. Krska R, de Nijs M, McNERNEY O, Pichler M, Gilbert J, Edwards S et al. Safe food and feed through an integrated toolbox for mycotoxin management: the MyToolBox approach. *World Mycotoxin Journal*. 2016;9(4):487-95. doi:10.3920/wmj2016.2136.
6. Copetti MV, Iamanaka BT, Pereira JL, Lemes DP, Nakano F, Taniwaki MH. Co-occurrence of ochratoxin a and aflatoxins in chocolate marketed in Brazil. *Food Control*. 2012;26(1):36-41. doi:10.1016/j.foodcont.2011.12.023.
7. Manda P, Dano DS, Kouadio JH, Diakite A, Sangare-Tigori B, Ezoulin MJ et al. Impact of industrial treatments on ochratoxin A content in artificially contaminated cocoa beans. *Food additives & contaminants Part A, Chemistry, analysis, control, exposure & risk assessment*. 2009;26(7):1081-8. doi:10.1080/02652030902894397.
8. Brasil, Agência Nacional de Vigilância Sanitária ANVISA. Resolução RDC n.º7, de 18 de fevereiro de 2011. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*. 2011(1):72.
9. Malachova A, Stranska M, Vaclavikova M, Elliott CT, Black C, Meneely J et al. Advanced LC-MS-based methods to study the co-occurrence and metabolization of multiple mycotoxins in cereals and cereal-based food. *Analytical and bioanalytical chemistry*. 2018;410(3):801-25. doi:10.1007/s00216-017-0750-7.
10. Bolechová M, Benešová K, Běláková S, Čáslavský J, Pospíchalová M, Mikulíková R. Determination of seventeen mycotoxins in barley and malt in the Czech Republic. *Food Control*. 2015;47:108-13. doi:10.1016/j.foodcont.2014.06.045.
11. Sulyok M, Krska R, Schuhmacher R. A liquid chromatography/tandem mass spectrometric multi-mycotoxin method for the quantification of 87 analytes and its application to semi-quantitative screening of moldy food samples. *Analytical and bioanalytical chemistry*. 2007;389(5):1505-23. doi:10.1007/s00216-007-1542-2.
12. Desmarchelier A, Tessiot S, Bessaire T, Racault L, Fiorese E, Urbani A et al. Combining the quick, easy, cheap, effective, rugged and safe approach and clean-up by immunoaffinity column for the analysis of 15 mycotoxins by isotope dilution liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of chromatography A*. 2014;1337:75-84. doi:10.1016/j.chroma.2014.02.025.
13. Koesukwiwat U, Sanguankaew K, Leepipatpiboon N. Evaluation of a modified QuEChERS method for analysis of mycotoxins in rice. *Food chemistry*. 2014;153:44-51. doi:10.1016/j.foodchem.2013.12.029.
14. Sulyok M, Berthiller F, Krska R, Schuhmacher R. Development and validation of a liquid chromatography/tandem mass spectrometric method for the determination of 39 mycotoxins in



- wheat and maize. *Rapid communications in mass spectrometry* : RCM. 2006;20(18):2649-59. doi:10.1002/rcm.2640.
15. Sharmili K, Jinap S, Sukor R. Development, optimization and validation of QuEChERS based liquid chromatography tandem mass spectrometry method for determination of multimycotoxin in vegetable oil. *Food Control*. 2016;70:152-60. doi:10.1016/j.foodcont.2016.04.035.
  16. Pizzutti IR, de Kok A, Scholten J, Righi LW, Cardoso CD, Rohers GN et al. Development, optimization and validation of a multimethod for the determination of 36 mycotoxins in wines by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Talanta*. 2014;129:352-63. doi:10.1016/j.talanta.2014.05.017.
  17. Malachova A, Sulyok M, Beltran E, Berthiller F, Krska R. Optimization and validation of a quantitative liquid chromatography-tandem mass spectrometric method covering 295 bacterial and fungal metabolites including all regulated mycotoxins in four model food matrices. *Journal of chromatography A*. 2014;1362:145-56. doi:10.1016/j.chroma.2014.08.037.
  18. Geary PA, Chen G, Kimanya ME, Shirima CP, Oplatowska-Stachowiak M, Elliott CT et al. Determination of multi-mycotoxin occurrence in maize based porridges from selected regions of Tanzania by liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS), a longitudinal study. *Food Control*. 2016;68:337-43. doi:10.1016/j.foodcont.2016.04.018.
  19. da Silva LP, Madureira F, de Azevedo Vargas E, Faria AF, Augusti R. Development and validation of a multianalyte method for quantification of mycotoxins and pesticides in rice using a simple dilute and shoot procedure and UHPLC-MS/MS. *Food chemistry*. 2019;270:420-7. doi:10.1016/j.foodchem.2018.07.126.
  20. Flores-Flores ME, Gonzalez-Penas E. An LC-MS/MS method for multi-mycotoxin quantification in cow milk. *Food chemistry*. 2017;218:378-85. doi:10.1016/j.foodchem.2016.09.101.
  21. Chamkasem N, Ollis LW, Harmon T, Lee S, Mercer G. Analysis of 136 pesticides in avocado using a modified QuEChERS method with LC-MS/MS and GC-MS/MS. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2013;61(10):2315-29. doi:10.1021/jf304191c.
  22. European Commission Directorate-General for Health and Food Safety SANTE/11813/2017. Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticides residues analysis in food and feed. 2018. doi:https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/plant/docs/pesticides\_mrl\_guidelines\_wrkdoc\_2017-11813.pdf.
  23. Wenzl T, Haedrich J, Schaechtele A, Robouch P, Stroka J. Guidance Document on the Estimation of LOD and LOQ for Measurements in the Field of Contaminants in Feed and Food. Publications Office of the European Union. 2016. doi:10.2787/8931.
  24. Lehotay SJ, Son KA, Kwon H, Koesukwiwat U, Fu W, Mastovska K et al. Comparison of QuEChERS sample preparation methods for the analysis of pesticide residues in fruits and vegetables. *Journal of chromatography A*. 2010;1217(16):2548-60. doi:10.1016/j.chroma.2010.01.044.
  25. Fayeulle N, Vallverdu-Queralt A, Meudec E, Hue C, Boulanger R, Cheynier V et al. Characterization of new flavan-3-ol derivatives in fermented cocoa beans. *Food chemistry*. 2018;259:207-12. doi:10.1016/j.foodchem.2018.03.133.
  26. Anastassiades M, Lehotay SJ, Štajnbaher D, Schenk FJ. Fast and Easy Multiresidue Method Employing Acetonitrile Extraction/Partitioning and "Dispersive Solid-Phase Extraction" for the Determination of Pesticide Residues in Produce. *Journal of AOAC International*. 2003;86(2):412-31.
  27. Bryla M, Waskiewicz A, Podolska G, Szymczyk K, Jedrzejczak R, Damaziak K et al. Occurrence of 26 Mycotoxins in the Grain of Cereals Cultivated in Poland. *Toxins*. 2016;8(6). doi:10.3390/toxins8060160.
  28. Azaiez 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 Analytical Methods*. 2014;7(4):935-45. doi:10.1007/s12161-013-9785-3.
  29. Lohrey L, Marschik S, Cramer B, Humpf HU. Large-scale synthesis of isotopically labeled <sup>13</sup>C<sub>2</sub>-tenuazonic acid and development of a rapid HPLC-MS/MS method for the analysis of tenuazonic acid in tomato and pepper products. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2013;61(1):114-20. doi:10.1021/jf305138k.

30. von Bargaen KW, Lohrey L, Cramer B, Humpf HU. Analysis of the Fusarium mycotoxin moniliformin in cereal samples using <sup>13</sup>C<sub>2</sub>-moniliformin and high-resolution mass spectrometry. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2012;60(14):3586-91. doi:10.1021/jf300323d.
31. Zhao H, Chen X, Shen C, Qu B. Determination of 16 mycotoxins in vegetable oils using a QuEChERS method combined with high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Food additives & contaminants Part A, Chemistry, analysis, control, exposure & risk assessment*. 2017;34(2):255-64. doi:10.1080/19440049.2016.1266096.

## ANEXO I

### Otimização LC-MS/MS

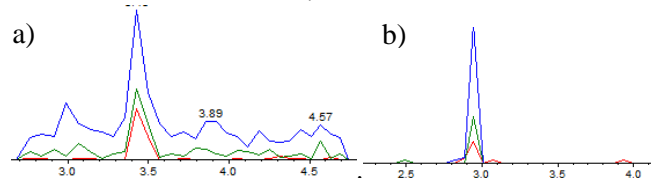
Realizou-se a otimização das condições de detecção das micotoxinas por LC-MS/MS. Os fragmentos do íon precursor foram otimizados em modo automático por infusão direta dos analitos. Os precursores foram obtidos pela formação de um aduto entre a molécula neutra com cátions (ESI+) ou ânions (ESI-) gerando íons de massa molecular do composto somada ou subtraída à massa do íon,  $[M + NH_4]^+$  ou  $[M + H]^+$ ,  $[M - H]^-$  ou  $[M + HCOO]^-$ . A partir dos fragmentos obtidos foram selecionados (por testes de sensibilidade e seletividade utilizando extratos de cacau), no mínimo, um íon precursor e dois íons produtos para cada um dos compostos estudados, sendo a transição mais intensa empregada como íon quantificador, e a segunda, como íon qualificador.

Acetonitrila (ACN), metanol (MeOH), água (H<sub>2</sub>O) e sais de formiato são comumente usados como fase móvel na análise de LC. Neste trabalho foi adotado o formiato de amônio (fase móvel A) por apresentar maior eficiência de ionização e solubilidade na presença de ACN comparado ao acetato de amônio. Alguns gradientes de eluição da fase móvel propostos em trabalhos disponíveis na literatura foram testados (Stead et al. 2014; Sulyok, Krska and Schuhmacher 2007, Arroyo-Manzanares et al. 2013, Zhu et al. 2015), porém estes não apresentaram resultados satisfatórios para as micotoxinas em estudo. Portanto, fez-se necessário a re-otimização das condições cromatográficas. A melhor resposta cromatográfica para a maioria dos compostos em estudo foi obtida pelo gradiente apresentado no Tópico Instrumentação nos materiais e métodos. Diferentes composições de fase móvel foram avaliadas quanto ao seu desempenho na separação cromatográfica e na resolução dos picos cromatográficos, sendo realizadas análises em *Full scan*.

A composição da fase A foi fixada como: solução aquosa de formiato de amônio 5 mmol L<sup>-1</sup> e 0,1% de ácido fórmico, e a fase orgânica B, foi avaliada aumentando-se a proporção (%) de MeOH na ACN em uma razão de 10, com 0,1 % de ácido fórmico. O MeOH como fase móvel apresentou picos mais bem definidos para as micotoxinas que eluem no início da corrida cromatográfica devido sua maior polaridade em comparação a ACN, o que faz com que os compostos mais polares tenham uma interação maior com a fase móvel apresentando picos mais bem resolvidos. Em contrapartida, o aumento da fração de MeOH na fase móvel retarda a eluição das micotoxinas pela coluna, ocorrendo deformação no formato dos picos que eluem no final da corrida. Depois de avaliados os cromatogramas, optou-se por empregar ACN pura como solvente orgânico da fase móvel.

O mesmo gradiente e condições cromatográficas foram empregados no teste de fluxo da fase móvel, foram avaliados os fluxos de 400 e 600  $\mu\text{L min}^{-1}$ . Como esperado, com o fluxo de 600  $\mu\text{L min}^{-1}$  a análise cromatográfica passou a ter um tempo menor, em média 0,7 min a menos comparando com o fluxo de 400  $\mu\text{L min}^{-1}$ . Em geral, os cromatogramas apresentaram perfil semelhante com exceção do HT-2. Na Figura 1 estão apresentados os cromatogramas de íons extraídos para HT-2.

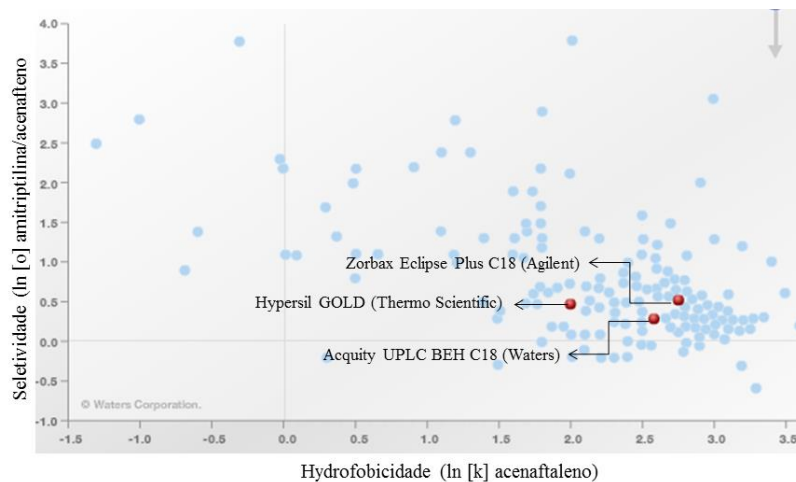
Figura 1- Cromatogramas de íons extraídos para fluxos de fase móvel de a) 400  $\mu\text{L min}^{-1}$  e b) 600  $\mu\text{L min}^{-1}$ .



Para a toxina HT-2 o fluxo de 600  $\mu\text{L mL}^{-1}$  demonstrou uma melhora significativa na linha de base e na simetria dos picos cromatográficos. No entanto, o número de pontos para formar os picos cromatográficos na análise empregando fluxo de 600  $\mu\text{g mL}^{-1}$  foi inferior ao número de pontos para as análises com fluxo de 400  $\mu\text{L min}^{-1}$  para todas as micotoxinas avaliadas, devido a isso este fluxo foi adotado para as análises subsequentes.

Três colunas cromatográficas foram avaliadas quanto ao seu desempenho, levando em consideração a simetria e resolução dos picos cromatográficos. A análise cromatográfica foi realizada empregando colunas de fase reversa: Agilent, modelo Zorbax RRHD eclipse plus com dimensões 50 x 2,1mm x 1,8 $\mu\text{m}$  (Santa Clara, USA) com pré-coluna Phenomenex (Torrance, EUA) com dimensões 30 x 4 mm x 1,8 $\mu\text{m}$ ; Waters Corporation, modelo ACQUITY UPLC BEH C18 (Millford, Massachusetts, USA) com dimensões 100 x 2,1 mm x 1,7  $\mu\text{m}$  e pré-coluna do mesmo modelo com as dimensões de 2,1 x 5 mm e Thermo Scientific, modelo Hypersil GOLD com dimensões 50 x 2,1mm x 1,9  $\mu\text{m}$  (USA). Na Figura 2 estão representadas graficamente a seletividade de todas as colunas comerciais, incluindo as empregadas nos experimentos.

Figura 2 - Gráfico contendo as colunas cromatográficas comercializadas com suas respectivas seletividades.

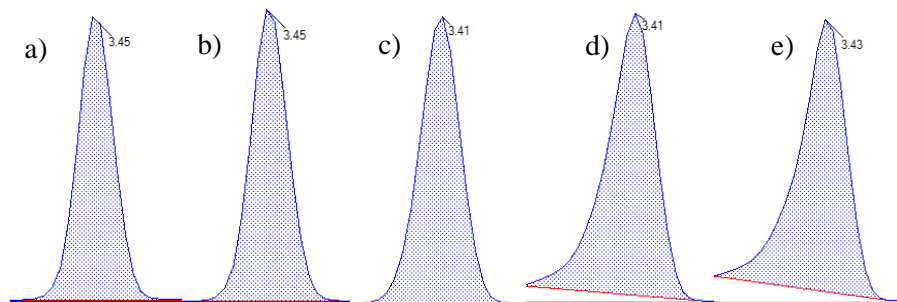


Fonte: [http://www.waters.com/waters/promotionDetail.htm?id=10048475&alias=Alias\\_selectivitychart\\_\\_CHEMISTRY&locale=pt\\_BR](http://www.waters.com/waters/promotionDetail.htm?id=10048475&alias=Alias_selectivitychart__CHEMISTRY&locale=pt_BR)

Como pode ser observado na Figura 2 existe uma grande variedade de colunas, de fase reversa, comercialmente disponíveis, as avaliadas nesse trabalho estão destacadas em vermelho. Na escala de seletividade apresentada as colunas não apresentam diferenças muito significativas, em compensação, a coluna Hypersil GOLD apresenta menor hidrofobicidade comparada às outras colunas empregadas. A separação cromatográfica foi semelhante para as colunas avaliadas, apesar da diferença de dimensões, tamanho de partículas e modificadores de sílica. Pela análise visual dos cromatogramas de íons extraídos pode-se perceber que as colunas cromatográficas apresentaram seletividade semelhante, como esperado pela observação da Figura 2. No entanto, as respostas cromatográficas mais satisfatórias para as micotoxinas em estudo foram as colunas Zorbax Eclipse Plus C18 (Agilent) e a Acquity UPLC BEH C18 (Waters), sem diferenças significativa entre ambas. Logo, chegou-se a conclusão que a coluna Acquity UPLC BEH C18 (Waters) seria a melhor opção devido a maior quantidade de colunas disponíveis no laboratório.

Os volumes de injeção avaliados foram: 2, 5, 10, 15 e 20  $\mu\text{L}$  para todas as micotoxinas, os critérios de avaliação para seleção do volume de injeção ideal foram largura, formação de calda e o formato dos picos. Na Figura 3 esta apresentado os cromatogramas para tentoxina.

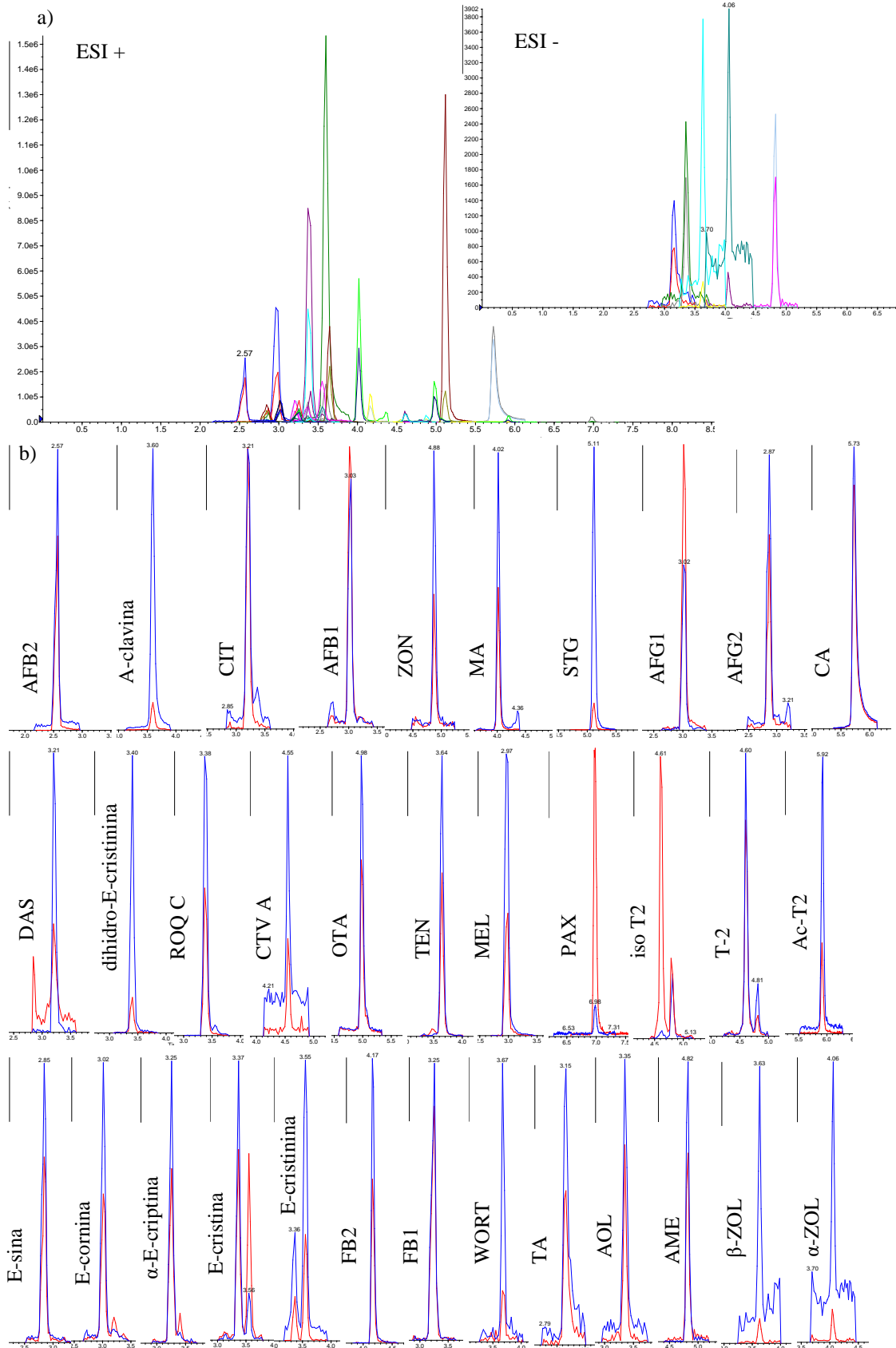
Figura 3- Avaliação dos volumes de injeção: a) 2, b) 5, c) 10, d) 15, e) 20  $\mu\text{L}$  para a tentoxina na concentração de  $0,05 \mu\text{g mL}^{-1}$ .



Analisando os cromatogramas de íons totais de cada micotoxina, observa-se que os volumes de injeção de 15 e 20  $\mu\text{L}$  influenciaram consideravelmente para o alargamento dos picos, além disso, também pode ser observada uma calda à esquerda em alguns compostos devido a maior retenção na coluna. Os cromatogramas para volumes de 2, 5 e 10  $\mu\text{L}$  apresentaram similaridade, comparando-os salienta-se que o volume de 5  $\mu\text{L}$  apresentou boa intensidade e maior reprodutibilidade dos resultados, portanto, nas análises, este foi o volume adotado.

O método LC-MS/MS desenvolvido possibilitou a análise simultânea micotoxinas em um curto período, demonstrando boa seletividade e sensibilidade. Na Figura 4 está representado o cromatograma de íons totais para as 34 micotoxinas validadas e seus respectivos cromatogramas de íons extraídos obtido para a matriz de cacau fortificada.

Figura 4- Cromatograma de a) íons totais e b) íons extraídos obtidos para matriz fortificada



AFB1, AFB2, AFG1, AFG2, OTA e CTV ( $10,2 \mu\text{g kg}^{-1}$ ); MA, TA, A-clavina,  $\alpha$ -E-criptina,  $\alpha$ -ZOL, AOL, AME,  $\beta$ -ZOL, dihidro-E-cristinina, E-cornina, E-cristina, E-cristinina, E-sina, MEL, PAX, TEN e ZON ( $34 \mu\text{g kg}^{-1}$ ); Ac-T2, CA, DAS, STG, iso-T2, ROQ C, T-2 e WORT ( $102 \mu\text{g kg}^{-1}$ ); FB2 ( $170 \mu\text{g kg}^{-1}$ ); CIT ( $204 \mu\text{g kg}^{-1}$ ); FB1 ( $340 \mu\text{g kg}^{-1}$ ).

**Referências**

- Arroyo-Manzanares, N., J. F. Huertas-Perez, L. Gamiz-Gracia & A. M. Garcia-Campana (2013) A new approach in sample treatment combined with UHPLC-MS/MS for the determination of multiclass mycotoxins in edible nuts and seeds. *Talanta*, 115, 61-7.
- Stead, S. et al. The Development of a Sensitive Multi-Residue LC-MS/MS Method for the Quantitative Determination of Mycotoxins in Animal Feedstuffs and Silage Using Xevo TQ-S. Application note. Waters Corporation, Produced in the U.S.A. 2014.
- Sulyok, M., R. Krska & R. Schuhmacher (2007) A liquid chromatography/tandem mass spectrometric multi-mycotoxin method for the quantification of 87 analytes and its application to semi-quantitative screening of moldy food samples. *Anal Bioanal Chem*, 389, 1505-23.
- Zhu, R., Z. Zhao, J. Wang, B. Bai, A. Wu, L. Yan & S. Song (2015) A simple sample pretreatment method for multi-mycotoxin determination in eggs by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A*, 1417, 1-7.

**ARTIGO 2**

Validação, análise de incerteza e determinação de 34 micotoxinas em amêndoas de cacau por LC-MS/MS

Daiane Cássia Pereira Abreu<sup>a</sup>, Eugenia Azevedo Vargas<sup>b</sup>, Fabiano Aurélio da Silva Oliveira<sup>b</sup>,  
Fernando Diniz Madureira<sup>b</sup>, Mateus Batista Gomes<sup>b</sup>, Adelir Aparecida Saczk<sup>a\*</sup>.

<sup>a</sup>Departamento de Química, Universidade Federal de Lavras, 37200-000 Lavras - MG, Brasil

<sup>b</sup>Laboratório de Controle de Qualidade e Segurança Alimentar (LACQSA-BH), Laboratório Nacional Agropecuário de Minas Gerais (LANAGRO-MG), 30380-090 Belo Horizonte – MG.

\*Corresponding author. Tel: +55 35 38291876, fax: +55 35 38291812

*E-mail:* adelir@ufla.br (SACZK, A. A.)

## Resumo

O presente manuscrito visa à validação e aplicação de uma metodologia analítica para a determinação simultânea de 34 micotoxinas em cacau. O método de extração empregado nos ensaios foi por partição líquido-líquido por adição de NaCl com etapa de congelamento seguido de quantificação via LC-MS/MS. Os resultados obtidos foram discutidos com base nas diretrizes e/ou orientações nacionais e internacionais estabelecidos para contaminantes em alimentos. As recuperações e precisão foram adequadas, com exceção das micotoxinas ionizadas com o aduto amônio ( $\text{NH}_4^+$ ), E-cristinina e  $\beta$ -ZOL. Esse resultado refletiu diretamente na incerteza de medição dessas micotoxinas, uma vez que, a precisão e o fator de correção da recuperação foram os fatores que apresentam maior impacto na incerteza do método. A verificação do efeito matriz demonstrou supressão de sinal considerável para 53% das micotoxinas avaliadas. Apesar disso, as micotoxinas apresentaram limites de quantificação relativamente baixos, entre 1 e  $75 \mu\text{g kg}^{-1}$ . A metodologia validada foi aplicada a 15 amostras de cacau coletadas em armazéns no Brasil, resultados positivos foram encontrados em todas as amostras avaliadas, sendo determinadas 9 toxinas das 34 investigadas.

**Palavras-chave:** Multimicotoxinas; segurança alimentar; preparo de amostras; figuras de mérito.

## 1. Introdução

A crescente preocupação com a saúde devido a constantes relatos de presença de micotoxinas nos alimentos e rações, fez com que diversos países colocassem em vigor regulamentos para definir e controlar níveis máximos para essas toxinas. A principal normativa internacionalmente reconhecida é o Regulamento (CE) n.º 1881/2006 da Comissão, implantado pela União Europeia. Neste documento são estabelecidos, limites máximos tolerados (LMT) para algumas micotoxinas em diferentes gêneros alimentícios, com base na avaliação de risco (CE, 2006a). Até o momento, o cacau, matriz alvo deste estudo, não apresenta LMT definidos para micotoxinas. No entanto, esforços estão sendo empreendidos para a avaliação de risco da exposição humana a estes contaminantes, sendo ainda, fortemente recomendado seu monitoramento (CODEX ALIMENTARIUS, 1995; CODEX ALIMENTARIUS 2011).

A complexidade das amostras de alimentos e as baixas concentrações nas quais os contaminantes geralmente ocorrem, exigem técnicas analíticas sensíveis, seletivas e confiáveis (Bolechová, Benešová, Běláková, Čáslavský, Pospíchalová, & Mikulíková, 2015; Sulyok, Krska, & Schuhmacher, 2007). Nesta perspectiva, o desenvolvimento da cromatografia líquida (LC) acoplada à espectrometria de massas sequencial (MS/MS) possibilita a distinção de resíduos e contaminantes de co-extrativos de diferentes matrizes (Koesukwiwat, Sanguankaew, & Leepipatpiboon, 2014).

No entanto, o efeito matriz tem representado, ainda, um grande desafio no desenvolvimento de métodos multianalíticos confiáveis (Malachova, Sulyok, Beltran, Berthiller, & Krska, 2014). Na tentativa de superar a necessidade de limpezas laboriosas e caras, etapas de limpeza com adsorventes são empregadas no processo de extração QuEChERS (Karaseva, Amelin, & Tret'yakov, 2014; Liu, Han, Lu, Wang, Han, & Wang, 2014). Porém, esses processos, muitas vezes limitam o número de analitos, uma vez que, algumas das micotoxinas-alvo podem ser passíveis de perdas no decorrer do procedimento escolhido (Sulyok, Krska, & Schuhmacher, 2010). Logo, para tentar contornar prováveis perdas do analito, a técnica de extração líquido-líquido com partição por adição de sal com



etapa de congelamento foi proposta para análise de multomicotoxinas em cacau. Devido a partição das fases aquosa e orgânica pela adição de NaCl, parte dos co-extrativos hidrofílicos da matriz migram para a fase aquosa, obtendo assim um extrato mais limpo. Além disso, a etapa de congelamento reduz a solubilidade de compostos como as gorduras, minimizando o impacto causado por estes interferentes no sistema instrumental (LC-MS/MS) (Abreu et al, 2019).

Apesar de esforços consideráveis para reduzir os efeitos da matriz, algumas abordagens devem ser adotadas para obter resultados precisos e confiáveis. Ensaio com diluição de isótopos estáveis tem sido o procedimento mais recomendado para compensar os efeitos da matriz. Porém, estes métodos apresentam elevado custo e baixa disponibilidade (Desmarchelier, Tessiot, Bessaire, Racault, Fiorese, Urbani, et al., 2014; Malachova, Sulyok, Beltran, Berthiller, & Krska, 2014). A alternativa mais viável é empregar curva analítica matrizada nos procedimentos de validação e aplicação do método em amostras reais para a quantificação das toxinas (Sulyok, Berthiller, Krska, & Schuhmacher, 2006).

A validação analítica do método é um passo obrigatório para avaliar a capacidade dos métodos desenvolvidos de fornecerem resultados precisos para sua aplicação de rotina. Os objetivos da validação também incluem avaliar os riscos relacionados à incerteza de medição associada ao resultado. A validação do método, juntamente com a estimativa da incerteza, fornece uma maneira de avaliar se um dado método analítico está em consonância com determinados requisitos legais (Rambla-Alegre, Esteve-Romero, & Carda-Broch, 2012). Nesta perspectiva, o objetivo deste trabalho foi avaliar o desempenho de um método multianalítico para determinação de micotoxinas em amostras de cacau empregando LC-MS/MS. Para isso, diferentes diretrizes (SANTE/12089/2016, SANTE/11813/2017, a decisão 2002/657/CE da comissão, o regulamento 401/2006/CE e o Manual da garantia da qualidade analítica) de avaliação de desempenho de método foram empregadas para comparação com os resultados obtidos.

## **2. Materiais e Métodos**

### *2.1 Reagentes*

Acetonitrila, metanol e ácido fórmico grau HPLC da J. T. Baker, ácido acético da Sigma Aldrich, formiato de amônio (95%) da Riedel-de Haen e cloreto de sódio p.a (99%) da Nuclear. Água ultrapura ( $>18\text{M}\Omega\text{ cm}^{-1}$  resistividade) foi purificada utilizando um sistema Milli-Q<sup>®</sup> (Millipore, Bedford, EUA). Os padrões de aflatoxinas B1, B2, G1 e G2 (AFB1, AFB2, AFG1 e AFG2), ocratoxina A (OTA), citreoviridina A (CTV), ácido micofenólico (MA), ácido tenuazônico (TA), agroclavina-I (A-clavina), alfa-ergocriptina ( $\alpha$ -E-criptina), alfa-zearalenol ( $\alpha$ -ZOL), alternariol (AOH), alternariol-metil-éter (AME), beta-zearalenol ( $\beta$ -ZOL), dihidroergocristinina (dihidro-E-cristinina), ergocornina (E-cornina), ergocristina (E-cristina), ergocristinina (E-cristinina), ergosina (E-sina), meleagrina (MEL), paxilina (PAX), tentoxina (TEM), zearalenona (ZON), acetil T-2 (ac-T2), ácido ciclopiazônico (CA), diacetoxiciscirpenol (DAS), esterigmatocistina (STG), iso T-2 (iso-T2), toxina T-2 (T-2) e

roquefortina C (ROQ C), fumonisina B2 (FB2), citrinina (CIT), wortmanina (WORT) e fumonisina B1 (FB1) foram adquiridos pela Sigma Aldrich (Zwijndrecht, Países Baixos), Biopure (Tulln, Áustria), Acros (Geel, Bélgica), Fermentek Biotechnology (Jerusalém, Israel) e Iris Biotech GmbH (Marktredwitz, Alemanha).

## 2.2 Soluções padrão

Os padrões de micotoxinas foram preparados e diluídos em acetonitrila, com exceção das fumonisinas que foram preparadas na proporção 1:1 v/v acetonitrila/água. As micotoxinas foram agrupadas em duas soluções de trabalho, uma contendo todas as micotoxinas com exceção da ROQ C e WORT, que foram agrupadas em uma segunda solução de trabalho devido ao baixo volume e concentração da solução estoque. Na Tabela S1 dos materiais suplementares estão apresentadas as concentrações da solução estoque e de trabalho para cada micotoxina. Todas as soluções preparadas foram armazenadas em frasco âmbar a uma temperatura de -20 °C.

## 2.3 Amostras

Na validação, amostras brancas foram empregadas nos ensaios. Após a validação o método foi aplicado na análise de quinze amostras de amêndoas secas de cacau coletados no estado da Bahia (Brasil) no ano de 2018, para avaliação de ocorrência das micotoxinas em estudo. Nos ensaios 7,5 g de cacau em pasta (1:1,5 m/m cacau/água), equivalente a 3 g de cacau, foram empregados. Para o preparo da pasta as amêndoas de cacau foram processadas em um moinho Geiger (UM25E) 7 min à seco e por 7 min com água. As amostras foram armazenadas a -15 °C até o processo de extração.

## 2.4 Instrumentação e condições LC-MS/MS

As análises cromatográficas foram realizadas utilizando um UHPLC Agilent 1290 infinity (Santa Clara, USA) equipado com coluna de fase reversa da Waters Corporation, modelo ACQUITY UPLC BEH C18 (Millford, Massachusetts, USA) com dimensões 100 x 2,1 mm x 1,7 µm e pré-coluna do mesmo modelo com as dimensões de 2,1 x 5 mm. O detector empregado foi um espectrômetro de massas modelo QTRAP 6500 (AB Sciex, Toronto, Canada). Os parâmetros gerais cromatográficos e espectrométricos das 34 micotoxinas validadas nesse trabalho são descritos em Abreu et al (2019). As análises foram realizadas no modo *Multiple Reaction Monitoring* (MRM) com fonte de ionização electrospray nos modos positivo e negativo e duas transições foram selecionadas para cada micotoxina, uma quantificadora e uma para confirmação. Os dados gerados foram tratados no software MultiQuant™. Na Tabela S2 nos materiais suplementares estão apresentados os tempos de retenção cromatográfico das micotoxinas, o(s) precursor(es) e os íons dos produtos monitorados, com seus respectivos potenciais de dessolvatação, da câmara de colisão e energia de colisão.

## 2.5 Método de extração

O método empregado baseia-se na extração líquido-líquido com partição por adição de sal com etapa de congelamento descrito por Abreu et al., 2019. Em 7,5 g de pasta de cacau previamente pesada em tubos de centrifuga com capacidade de 50,0 mL, foram adicionados 18,0 mL da solução extratora na proporção de 7:2,5:0,5 acetonitrila/água/ácido acético (v/v/v). A mistura foi então agitada em vórtex a 3000 rpm por 30 seg. Foram adicionados 3 g do sal NaCl e o tubo foi novamente agitado por 30 seg para total homogeneização. Em seguida, os tubos foram agitados por 60 min em mesa agitadora ( $700 \text{ ciclos min}^{-1}$ ) e após esse período, os tubos contendo os extratos foram refrigerados em freezer por 15 min à  $-70 \text{ }^\circ\text{C}$  e centrifugados por 10 min à 4000 rpm e  $5 \text{ }^\circ\text{C}$ .

Alíquotas de 600  $\mu\text{L}$  do extrato foram recolhidas, transferidas para *vials* e diluídas com 300  $\mu\text{L}$  de acetonitrila.

## 2.6 Parâmetros analíticos para a validação do método

Os guias de validação SANTE/12089/2016, SANTE/11813/2017 (SANTE, 2017; 2018), a decisão 2002/657/CE da comissão (CE, 2002), o regulamento 401/2006/CE (CE, 2006b) e o Manual da garantia da qualidade analítica (Brasil, 2011) foram utilizados como diretrizes e critérios para avaliar o desempenho do método analítico validado. As figuras de mérito avaliadas foram: seletividade, linearidade, repetibilidade, precisão intermediária (reprodutibilidade intralaboratorial), limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ), limite de decisão ( $CC\alpha$ ), capacidade de detecção ( $CC\beta$ ) e incerteza de medição.

Para avaliar a linearidade das curvas analítica, foram realizadas extrações da matriz isenta de padrão ( $n=6$ ) conforme descrito (tópico 2.5 método de extração) em três dias distintos por dois analistas diferentes. Os extratos de cacau foram fortificados e diluídos com extrato branco para obtenção de oito níveis de concentração. As concentrações relativas ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) para os níveis de fortificação foram 3,3, 5,6, 11,1, 16,7, 22,2, 27,8, 33,3 e 40,0 vezes (valores considerando a conversão de  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) a concentração da micotoxina na solução de trabalho, conforme mostrado na Tabela S1. No cálculo das concentrações, o volume de extrator considerado foi o volume de acetonitrila (13,5 mL) devido a separação de fases. A regressão foi realizada pelo método dos mínimos quadrados ponderados relativo (MMQPR) usando o inverso da variância como fator de ponderação. Este procedimento foi adotado devido ao comportamento heterocedástico da resposta instrumental. Os coeficientes de determinação ( $R^2$ ) e o intervalo linear para cada micotoxina foi determinado.

O efeito de matriz (ME) para cada micotoxina foi estimado para verificar a influência dos compostos co-extraídos da matriz sobre o aumento ou diminuição da resposta do analito. O cálculo do ME foi dado pela diferença da inclinação (b), obtida a partir da curva analítica com correspondência

de matriz e da curva analítica de padrões baseada em solvente, dividida pela inclinação da curva analítica de padrões baseada em solvente, ou seja:  $ME (\%) = 100 * (b_{matriz} - b_{solvente}) / b_{solvente}$ .

A precisão nas condições de repetibilidade, avaliada pelo desvio padrão relativo (RSD%), foi conduzida em um único dia (avaliada para cada analista), no qual, amostras brancas de cacau foram fortificadas com as soluções de trabalho em sextuplicata. Os níveis de fortificação adotados nesses ensaios foram a mesma concentração do segundo maior nível da curva, 0,5 e 0,25 vezes essa concentração. Um ponto adicional foi inserido entre os dois menores níveis de fortificação, procedimento necessário para garantir no mínimo três níveis de fortificação para cada micotoxina caso o nível mais baixo de fortificação não apresente o mínimo de desempenho requerido e seja necessário excluí-lo. A precisão intermediária foi avaliada a partir dos resultados de três dias de ensaio, realizados por dois analistas, sendo os dois primeiros dias de validação realizados por um analista e o terceiro dia realizado pelo segundo analista. A repetibilidade e a precisão intermediária foram calculadas e os RSD foram comparados com os dados obtidos usando a equação de Horwitz, conforme critérios de aceitação especificados na Decisão 2002/657/CE da Comissão e no Regulamento 401/2006/CE. A partir das respostas instrumentais (áreas) obtidas nos ensaios de precisão, calculou-se a recuperação aparente do método. Os resultados foram convertidos em concentração pela equação de regressão da curva analítica e a recuperação foi obtida pela razão entre a concentração calculada e a concentração esperada. O teste de Grubbs foi aplicado para identificar *outliers* nas respostas obtidas.

O LOQ adotado foi estimado conforme descrito no *Guidance Document on the Estimation of LOD and LOQ for Measurements in the Field of Contaminants in Feed and Food* (2016). O LOD foi adotado como 1/10 do menor nível da curva para cada micotoxina e o LOQ igual a 3,3 x LOD (Wenzl, Haedrich, Schaechtele, Robouch, & Stroka, 2016). Os limites de quantificação estimados foram verificados em termos de precisão, veracidade e incerteza por fortificação de matriz branca (n = 6) (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento do Brasil, 2015).

Até o momento não foram definidos LMT para micotoxinas em cacau, portanto, para obtenção do CC $\alpha$  e CC $\beta$  a concentração empregada nos cálculos foi a mesma determinada para o LOQ. Esta concentração foi adotada por representar o nível com o mínimo de desempenho requerido definido para o método. As fórmulas adotadas nos cálculos do CC $\alpha$  e CC $\beta$  estão apresentadas nas equações (1) e (2).

$$CC\alpha = C_{LOQ} + 2,33 \text{ sd} \quad (1)$$

$$CC\beta = CC\alpha + 1,64 \text{ sd} \quad (2)$$

em que:  $C_{LOQ}$ , é a concentração determinada no LOQ; sd, é o desvio padrão do analito no LOQ. Estes parâmetros foram definidos com base na decisão 2002/657/CE da comissão.

A metodologia *Bottom-Up* foi selecionada para determinação dos cálculos de incerteza de medição para as micotoxinas por ser preconizada por diversas instituições internacionais e nacionais de padronização, além de ser indicada pela EURACHEM (EURACHEM, 2014; INMETRO, 2003,

ISO-GUM, 1995, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento do Brasil, 2015). Inicialmente foram definidas as principais fontes de incerteza relativas ao método, como apresentado na equação do mensurado (equação 3) as principais contribuições foram inerentes da curva analítica, pesagem da amostra, volume da solução de extração, os fatores de correção para recuperação, diluição e reprodutibilidade.

$$C = \frac{(A-a) V_{\text{extração}}}{b M_{\text{amostra}}} FC_{\text{rec}} FC_{\text{dil}} + C_{\text{prec}} \quad (3)$$

em que: C, concentração ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ); A, área do pico cromatográfico; a, intercepto da curva analítica; b, inclinação da curva analítica;  $V_{\text{extração}}$ , volume da solução extrativa (mL);  $M_{\text{amostra}}$ , massa da amostra (kg);  $FC_{\text{rec}}$ , fator de correção da recuperação;  $FC_{\text{dil}}$ , fator de correção da diluição;  $C_{\text{repro}}$ , correção da precisão intermediária.

Cada contribuição de incerteza foi expressa como desvio padrão com base em dados experimentais ou no julgamento científico usando distribuições selecionadas a priori. Através da combinação apropriada das variâncias, foi calculada a incerteza padrão combinada e, esta foi corrigida pelos coeficientes de sensibilidade obtidos pelas derivadas da equação do mensurado apresentadas nas equações (4) a (10) (da Silva, Madureira, de Azevedo Vargas, Faria, & Augusti, 2019).

$$\frac{\partial C}{\partial A} = \frac{\partial C}{\partial a} = \frac{1}{b} \frac{V_{\text{extração}}}{M_{\text{amostra}}} FC_{\text{rec}} FC_{\text{dil}} \quad (4)$$

$$\frac{\partial C}{\partial b} = \frac{-(A-a)}{b^2} \frac{V_{\text{extração}}}{M_{\text{amostra}}} FC_{\text{rec}} FC_{\text{dil}} \quad (5)$$

$$\frac{\partial C}{\partial V_{\text{extração}}} = \frac{(A-a)}{b} \frac{1}{M_{\text{amostra}}} FC_{\text{rec}} FC_{\text{dil}} \quad (6)$$

$$\frac{\partial C}{\partial M_{\text{amostra}}} = \frac{-(A-a)}{b} \frac{V_{\text{extração}}}{M_{\text{amostra}}^2} FC_{\text{rec}} FC_{\text{dil}} \quad (7)$$

$$\frac{\partial C}{\partial FC_{\text{rec}}} = \frac{(A-a)}{b} \frac{V_{\text{extração}}}{M_{\text{amostra}}} FC_{\text{dil}} \quad (8)$$

$$\frac{\partial C}{\partial FC_{\text{dil}}} = \frac{(A-a)}{b} \frac{V_{\text{extração}}}{M_{\text{amostra}}^2} FC_{\text{rec}} \quad (9)$$

$$\frac{\partial C}{\partial C_{\text{repro}}} = 1 \quad (10)$$

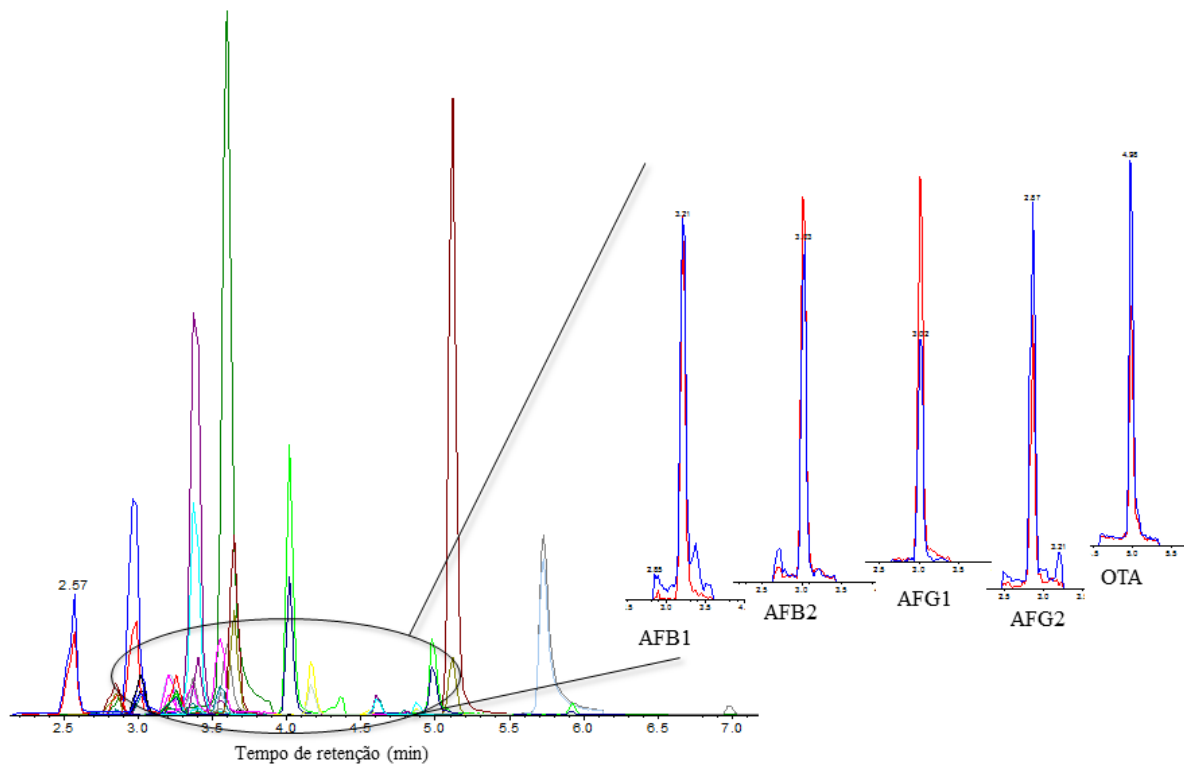
Obtida a incerteza padrão combinada geral ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ), determinou-se a incerteza expandida (U) utilizando um fator de abrangência (k). Em todos os casos, usou-se o valor de  $k = 2$  correspondente ao estabelecimento do nível de confiança de aproximadamente 95% (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento do Brasil, 2015).

### 3. Resultados e discussão

#### 3.1. Otimização instrumental e procedimento de extração para multimicotoxinas em cacau

O método instrumental e o procedimento de extração das micotoxinas em cacau foram descritos por Abreu e colaboradores (2019). O equipamento LC-MS/MS possibilitou a análise simultânea de

multimicotoxinas em um curto período de análise, demonstrando boa seletividade e sensibilidade do método. Além disso, um procedimento de extração, etapa fundamental no procedimento de determinação de compostos em matrizes mais complexas como alimentos, foi proposto com o intuito de reduzir os co-extrativos da matriz possibilitando uma detecção adequada. Empregou-se no método o particionamento da fase orgânica e aquosa por adição de sal com etapa de congelamento, proporcionando uma fase extratora com teor reduzido de interferentes da matriz sem empregar etapas de *clean up*. Na Fig. 1 está representado o cromatograma de íons totais e algumas micotoxinas extraídas obtido para a matriz de cacau fortificada.



**Fig. 1.** Cromatograma de íons totais obtido para matriz de cacau fortificada com as micotoxinas avaliadas e os cromatogramas de íons extraídos das aflatoxinas e OTA ( $7,5 \mu\text{g kg}^{-1}$ )

Pelo cromatograma de íons totais apresentado na Fig 1 é possível observar a coeluição dos picos cromatográficos referente as micotoxinas em estudo, o que torna difícil distinção das mesmas. Apesar disso, a espectrometria de massas sequencial no modo MRM possibilitou boa seletividade e sensibilidade do método proposto como pode ser observado nos cromatogramas de íons extraídos representados pelas aflatoxinas e OTA.

### 3.2. Desempenho do método

Até o momento, não foram estabelecidas diretrizes ou orientações para a validação de métodos analíticos específicos para a determinação de múltiplas micotoxinas. As únicas orientações descritas seguem a Decisão 2002/657/CE da Comissão, que descreve alguns requisitos e recomendações para o

método de validação, porém, essas recomendações muitas vezes não são totalmente aplicáveis os métodos multimicotoxinas. Por esse motivo, o desempenho do método analítico e a interpretação dos resultados foram avaliados e discutidos com base nos guias de validação e recomendações analíticas SANTE/12089/2016, SANTE/11813/2017 (SANTE, 2016; 2017), a decisão 2002/657/CE da comissão (CE, 2002), o regulamento 401/2006/CE (CE, 2006a) e o Manual da garantia da qualidade (Brasil, 2011) com o intuito de obter uma abordagem mais aceitável para o método validado.

### *3.2.1 Critérios de desempenho de identificação qualitativa*

Os critérios de desempenho de identificação das micotoxinas foram abordados de acordo com as normas 2002/657/CE e o SANTE/12089/2016 da União Europeia. O número de pontos de identificação (IP) das micotoxinas para a técnica de LC-MS/MS para obtenção do desempenho mínimos requeridos foram 4 (1 íon precursor e 2 íons produtos) ou 5 (2 íons precursores e 1 íon produto), selecionados de acordo com as respostas instrumentais (CE, 2002). Outros critérios de identificação adotados foram: tempo de retenção ( $t_R$ ) do analito no extrato da amostra correspondente ao da média dos padrões de calibração medidos na mesma sequência, com uma tolerância de  $\pm 0,2$  min ou  $\pm 50\%$  da largura do pico a meia altura (o que for maior); formatos dos picos cromatográficos dos íons quantificador e qualificador semelhantes e sobreposição um ao outro; a intensidade dos íons monitorados aceitável foi com sinal/ruído  $\geq 3:1$  e a razão iônica (respostas em áreas do íons qualificador dividida pelo quantificador) dentro de  $\pm 30\%$  (relativo) obtido a partir das médias na mesma sequência (SANTE, 2016). A avaliação qualitativa foi monitorada durante toda validação quantitativa e nas aplicações em amostras reais. As condições foram avaliadas no software do instrumento com exceção das razões iônicas que foram determinadas em planilhas de Excel<sup>TM</sup> desenvolvidas, internamente, para tratamento dos dados de validação.

### *3.2.2 Linearidade e efeitos matriciais*

Na Tabela 1 estão apresentadas as faixas de concentração avaliadas usando de 6 a 8 pontos de calibração combinados com a matriz. No qual, 62% dos analitos forneceram valores de regressão linear média com  $R^2 > 0,98$ , na faixa entre 0,95-0,98 foram 29% e 9% das micotoxinas apresentaram  $R^2$  entre 0,90-0,95 no intervalo de trabalho avaliados. Valores estes comparáveis ao trabalho reportado por Pizzutti e colaboradores (2014) para determinação de multimicotoxinas em vinho. Os efeitos de matriz estimados para as micotoxinas também foram reportados.

**Tabela 1**

Faixa linear de trabalho para cada micotoxina e seus relativos efeitos matriz

Micotoxina	Faixa linear ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	R <sup>2</sup>	ME(%)	Micotoxina	Faixa linear ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	R <sup>2</sup>	ME(%)
<b>Ac-T2</b>	50-360 (7)	0,9669	-53,2	<b>dihidro-E-cristinina</b>	10-120 (8)	0,9820	-25,4
<b>CA</b>	30-360 (8)	0,9873	13,8	<b>E-cornina</b>	10-120 (8)	0,9806	-37,3
<b>MA</b>	10-120 (8)	0,9921	-28,1	<b>E-cristina</b>	10-120 (8)	0,9810	2,7
<b>TA</b>	16,7-120 (7)	0,9623	8,2	<b>E-cristinina</b>	10-120 (8)	0,9513	-30,8
<b>AFB1</b>	3,0-36 (8)	0,9830	-43,9	<b>E-sina</b>	10-120 (8)	0,9845	-50,9
<b>AFB2</b>	3,0-36 (8)	0,9861	-50,4	<b>STG</b>	30-360 (8)	0,9957	-5,2
<b>AFG1</b>	3,0-36 (8)	0,9881	-51,2	<b>FB1</b>	100-1200 (8)	0,9815	-
<b>AFG2</b>	3,0-36 (8)	0,9871	-69,2	<b>FB2</b>	50-600 (8)	0,9911	-
<b>A-clavina</b>	10-120 (8)	0,9895	-41,7	<b>iso-T2</b>	50-360 (7)	0,9664	-8,0
<b><math>\alpha</math>-E-criptina</b>	10-120 (8)	0,9741	-40,2	<b>MEL</b>	10-120 (8)	0,9851	-26,7
<b><math>\alpha</math>-ZOL</b>	33-120 (6)	0,9525	11,3	<b>OTA</b>	3,0-36 (8)	0,9926	-6,2
<b>AOH</b>	16,7-120 (7)	0,9598	-7,5	<b>PAX</b>	10-120 (8)	0,9752	-24,1
<b>AME</b>	10-120 (8)	0,9894	2,7	<b>ROQ C</b>	30-360 (8)	0,9884	-8,4
<b><math>\beta</math>-ZOL</b>	33-120 (6)	0,9350	-17,5	<b>TEM</b>	10-120 (8)	0,9897	-25,7
<b>CTV</b>	10-36 (6)	0,9508	-5,4	<b>T-2</b>	30-360 (8)	0,9657	20,7
<b>CIT</b>	60-720 (8)	0,9948	-37,8	<b>WORT</b>	50-360 (7)	0,9159	6,5
<b>DAS</b>	50-360 (7)	0,9436	-22,4	<b>ZON</b>	16,7-120 (7)	0,9826	-2,5

O efeito de matriz geralmente observado nos sistemas LC-MS/MS é causado por componentes interferentes da matriz no extrato, eluindo no mesmo tempo de retenção que o analito e, portanto, competindo durante o processo de ionização na fonte de íons (Pizzutti, de Kok, Scholten, Righi, Cardoso, Rohers, et al., 2014). O efeito matricial pode ser positivo ou negativo, ou seja, os íons formados podem ter o sinal cromatográfico aumentado ou o mais frequente, diminuído, devido à supressão de íons. Como observado no teste, 75,5% das amostras avaliadas apresentaram efeito de supressão de sinal e 5,9% (FB1 e FB2) não foram avaliadas. O efeito matriz foi observado principalmente para as micotoxinas eluentes nos tempos entre 2,6 e 3,35 min, com exceção das micotoxinas TA e AOH, ionizadas no modo negativo. Nenhuma das micotoxinas avaliadas no modo negativo da fonte ESI apresentou efeito matriz significativo (considerando uma faixa de  $\pm 20\%$ ) devido a menor interferência da matriz neste modo de ionização. A verificação do efeito matriz empregando o método de extração proposto demonstrou efeito considerável para 53% das micotoxinas avaliadas. Por esse motivo a curva analítica matrizada foi adotada para reportar os resultados quantitativos.

### 3.2.3 Recuperação e Precisão do método para as micotoxinas

Os guias adotados para avaliação da recuperação e precisão do método foram: SANTE/11813/2017 (SANTE, 2017), a decisão 2002/657/CE da comissão (CE, 2002) e o regulamento 401/2006/CE (CE, 2006b). A partir dos resultados obtidos, constatou-se que SANTE (2017) foi o que melhor atendeu a avaliação de desempenho de recuperação e precisão do método multimicotoxinas. Por esse motivo seus critérios foram adotados para a análise de recuperação e



precisão do método. As micotoxinas que não atenderam aos critérios de desempenho os resultados foram comparados ao regulamento da 401/2006/CE para uma decisão final. Os resultados de recuperação, repetibilidade e precisão intermediária estão apresentados na Tabela 2.

**Tabela 2**

Desempenho do método avaliado por recuperação, repetibilidade ( $RSD_r$ ) e precisão intermediária ( $RSD_R$ ) para as micotoxinas

Micotoxina	(4 níveis/2 operadores/3 dias)																
	Fortificação ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )				Recuperação* (%)				$RSD_r$ (%) n=6				$RSD_R$ (%) n=18				
Ac-T2	75	102	150	300	119	108	111	103	2,4	12,7	10,1	10,8	15,1	15,4	12,3	22,0	
CA	75	102	150	300	103	102	98	91	9,3	8,6	10,4	7,4	12,6	14,4	11,7	18,9	
MA	25	34	50	100	106	107	103	100	5,9	5,0	9,4	7,7	10,3	6,1	7,9	12,9	
TA	-	34	50	100	-	78	70	64	-	13,4	28,4	17,5	-	13,1	19,3	14,7	
AFB1	7,5	10,2	15	30	98	100	96	87	6,5	8,6	13,7	8,1	18,4	11,3	10,3	11,4	
AFB2	7,5	10,2	15	30	85	85	85	81	7,8	4,7	11,1	5,9	14,8	13,6	14,7	12,0	
AFG1	7,5	10,2	15	30	96	94	90	92	7,7	5,2	12,8	11,4	10,9	9,0	14,7	13,6	
AFG2	7,5	10,2	15	30	88	90	88	90	5,8	9,1	6,4	2,8	10,9	20,1	17,8	14,5	
A-clavina	25	34	50	100	80	86	88	84	3,8	10,4	8,2	8,1	12,5	12,9	14,0	15,3	
$\alpha$ -E-cristina	25	34	50	100	102	95	93	89	7,2	7,9	10,5	9,8	7,9	8,8	10,8	18,0	
$\alpha$ -ZOL	-	34	50	100	-	110	103	97	-	13,6	11,9	10,3	-	14,1	11,7	13,1	
AOH	-	34	50	100	-	104	103	95	-	10,7	13,4	18,4	-	9,5	13,7	15,9	
AME	25	34	50	100	112	110	105	98	7,1	5,2	8,8	4,6	9,7	6,6	8,1	12,7	
$\beta$ -ZOL	-	34	50	100	-	102	109	92	-	26,7	12,4	13,4	-	19,2	15,1	10,4	
CTV	-	10,2	15	30	-	115	106	103	-	14,3	10,0	11,3	-	9,9	9,8	13,9	
CIT	150	204	300	600	79	80	77	75	4,7	2,0	7,3	5,2	8,4	7,5	9,9	11,7	
DAS	75	102	150	300	105	108	112	108	28,5	16,8	8,9	14,1	22,0	15,7	12,0	22,9	
dihidro-E-cristina	25	34	50	100	105	105	103	98	4,5	4,5	9,7	9,4	7,6	6,1	8,7	12,2	
E-cornina	25	34	50	100	111	108	106	101	9,4	7,8	15,2	3,8	10,0	11,4	10,9	13,4	
E-cristina	25	34	50	100	108	106	101	100	12,8	8,2	10,8	7,7	11,2	11,5	13,6	21,3	
E-cristina	25	34	50	100	104	107	110	96	18,4	21,2	24,1	15,0	16,8	18,9	20,6	22,2	
E-sina	25	34	50	100	96	97	100	97	8,0	7,9	7,8	7,9	9,5	13,6	12,9	13,9	
STG	75	102	150	300	109	107	104	97	3,6	2,9	8,1	7,4	7,9	3,8	6,5	13,7	
FB1	250	340	500	1000	81	75	78	73	8,8	4,8	6,0	5,3	8,6	8,7	12,7	15,8	
FB2	125	170	250	500	100	97	93	89	3,9	4,1	4,1	9,0	6,6	4,9	5,3	13,9	
iso-T2	75	102	150	300	107	102	106	103	15,2	15,5	6,4	17,0	15,8	12,4	15,3	17,6	
MEL	25	34	50	100	103	100	108	98	3,3	7,6	12,0	5,6	10,1	10,7	11,7	19,2	
OTA	7,5	10,2	15	30	108	102	103	99	5,7	2,2	10,4	10,1	8,9	3,1	7,1	14,4	
PAX	25	34	50	100	109	100	103	96	4,1	13,6	6,7	7,7	9,0	15,3	11,6	19,0	
ROQ C	75	102	150	300	88	87	86	86	2,1	4,9	8,2	6,7	7,7	7,0	11,1	8,1	
TEN	25	34	50	100	108	105	104	99	5,1	5,6	6,9	4,1	8,8	5,8	8,2	12,3	
T-2	75	102	150	300	110	105	118	109	14,2	18,0	8,4	16,4	17,4	13,4	23,0	21,9	
WORT	75	102	150	300	114	106	114	111	11,7	16,5	17,3	13,8	21,1	17,9	13,5	16,9	
ZON	-	34	50	100	-	122	111	99	-	19,3	16,1	11,1	-	17,8	13,8	14,1	

\*Recuperação média de todos os dias de análise (n=18)

Como é possível verificar na Tabela 2, para seis micotoxinas (TA, AOH,  $\alpha$ ZOL,  $\beta$ ZOL, CTV e ZON) não foram apresentados os resultados de desempenho para o nível mais baixo, por não terem atendido os critérios de desempenho de identificação e/ou veracidade e precisão adequada. Considerando a faixa de recuperação de 70-120 % foi possível destacar valores insatisfatórios para ZON e TA. A ZON apresentou recuperação 122 % para o menor nível de fortificação avaliado, com RSD próximo a 20%. O resultado obtido de recuperação e precisão para ZON indicaram uma forte tendência do aumento da recuperação da micotoxina com alto desvio para níveis mais baixos, como também relatado em outros trabalhos (Malachova, Sulyok, Beltran, Berthiller, & Krska, 2014). O TA apresentou recuperação global relativamente baixa entre 64 e 78%. Esta variação é inerente de perdas durante o processo de extração, com possíveis perdas devido ao pH de extração. A repetibilidade do método foi relativamente alta no dia descrito, com um dos níveis na ordem de 28%. No entanto, o valor não prejudicou a precisão intermediária que apresentou  $RSD_R$  menor que 20%. Já o  $\beta$ -ZOL apresentou um valor de repetibilidade de 26,7%, porém não afetou a precisão intermediária.

Das micotoxinas de alcaloides de ergot avaliadas, apenas a E-cristinina (epímero da E-cristina) apresentou resultados fora do esperado, provavelmente devido ao processo de epimerização, que ainda não é muito bem compreendido. As micotoxinas DAS, iso-T2, ac-T2, T2 e WORT apresentaram em um ou mais níveis de fortificação repetibilidade e/ou precisão intermediária insatisfatória. Essa observação pode estar associada ao aduto de ionização das moléculas, o íon amônio ( $NH_4^+$ ). Moléculas neutras ionizadas com  $NH_4^+$  são mais susceptíveis a competição com íons de sódio ( $Na^+$ ), o que possivelmente ocasiona na redução na precisão dos resultados.

De acordo com o regulamento da 401/2006/CE, os critérios de desempenho, recuperação, repetibilidade e precisão intermediária aceitáveis para T2 são: para concentração entre 15 e  $250 \mu g kg^{-1}$ , recuperação de 60 a 130% com  $RSD_T \leq 30$  e  $RSD_R \leq 50$ ; para concentração acima de  $250 \mu g kg^{-1}$ , recuperação de 60 a 130% com  $RSD_T \leq 25$  e  $RSD_R \leq 40$  (CE, 2006b). O manual da garantia da qualidade analítica ainda acrescenta que os mesmos critérios de aceitabilidade podem ser considerado para as micotoxinas similares a T2, como iso-T2 e ac-T2. Comprando os resultados obtidos a estes regulamentos, as micotoxinas são passíveis de serem validadas dentro dos critérios de desempenho recomendado.

#### 3.2.4. *LOD, LOQ, C $\alpha$ e C $\beta$*

Os valores estimados de LOD e LOQ por curva analítica apresentaram limites extremamente baixos, não sendo factíveis de serem alcançados. Outra abordagem sugerida é a determinação de LOD e LOQ por adição de padrão com 20 repetições, experimentalmente o nível mais baixo deve ser determinado para cada micotoxina do pool. Como os compostos apresentam sensibilidades distintas e, conseqüentemente, níveis de quantificação diferentes, o procedimento tornasse inviável para multimicotoxinas devido ao alto custo dos padrões analíticos (Meerpoel, Vidal, di Mavungu,

Huybrechts, Tangni, Devreese, et al., 2018). O procedimento de determinação dos limites mais adequado para este trabalho foi assumindo o LOD como dez vezes menor que o nível mais baixo da curva analítica, e o LOQ referente à  $3,3 \times \text{LOD}$ . O nível determinado teoricamente para LOQ foi verificado por fortificação da matriz com o pool das micotoxinas ( $n=6$ ). Para as micotoxinas que o limite verificado não apresentou eficiência adequada para os critérios qualitativos e/ou quantitativos (veracidade e precisão) adotou-se o LOQ como o menor nível de fortificação da matriz avaliado na validação. Lembrando que, os limites estimados devem ser obrigatoriamente alcançados com confiabilidade. Os valores determinados para  $\text{CC}\alpha$  e  $\text{CC}\beta$ , com probabilidade de erros ( $\alpha$  e  $\beta$ ) inferiores a 5% para as amostras de cacau apresentar falso positivo ou falso negativo, respectivamente, de contaminação para cada micotoxina estão apresentados na Tabela 3 juntamente com LOD e LOQ.

**Tabela 3**LOD, LOQ, U, CC $\alpha$  e CC $\beta$  determinados para as 34 micotoxinas em estudo

Micotoxina	LOD ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	LOQ ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	U ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	CC $\alpha$ ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	CC $\beta$ ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )
Ac-T2	22,7	75,0	38,0	106,3	128,3
CA	3,0	10,0	4,6	14,9	18,3
MA	7,6	25,0	6,4	31,3	35,8
TA	10,3	34,0	14,2	42,1	47,8
AFB1	0,3	1,0	0,2	1,3	1,5
AFB2	0,3	1,0	0,3	1,4	1,7
AFG1	0,3	1,0	0,3	1,4	1,7
AFG2	2,3	7,5	2,67	9,2	10,4
A-clavina	1,0	25,0	0,9	30,9	35,0
$\alpha$ -E-criptina	1,0	3,3	0,5	3,9	4,3
$\alpha$ -ZOL	10,3	34,0	13,4	46,3	54,9
AOH	10,3	34,0	9,11	41,8	47,3
AME	1,0	3,3	0,4	3,8	4,2
$\beta$ -ZOL	10,3	34,0	20,63	75,6	104,9
CTV	3,0	10,0	3,15	12,7	14,6
CIT	6,0	19,8	8,4	29,6	36,5
DAS	22,7	75,0	57,7	115,4	143,8
dihidro-E-cristinina	1,0	3,3	0,6	4,0	4,4
E-cornina	1,0	3,3	0,4	3,8	4,1
E-cristina	1,0	3,3	1,0	4,5	5,3
E-cristinina	1,0	3,3	2,0	5,3	6,7
E-sina	1,0	3,3	0,9	4,4	5,2
STG	3,0	10,0	2,9	10,4	10,6
FB1	10,0	33,0	10,4	40,0	44,9
FB2	5,0	16,5	6,1	21,4	24,8
iso-T2	22,7	75,0	40,6	104,7	125,6
MEL	1,0	3,3	0,9	4,4	5,2
OTA	0,3	1,0	0,4	1,5	1,8
PAX	7,6	25,0	7,04	30,7	34,8
ROQ C	3,0	10,0	2,8	11,9	13,3
TEM	1,0	3,3	0,5	3,9	4,3
T-2	22,7	75,0	44,7	108,3	131,8
WORT	22,7	75,0	45,8	116,9	146,4
ZON	10,3	34,0	15,05	69,9	95,1

U, incerteza expandida no nível do LOQ

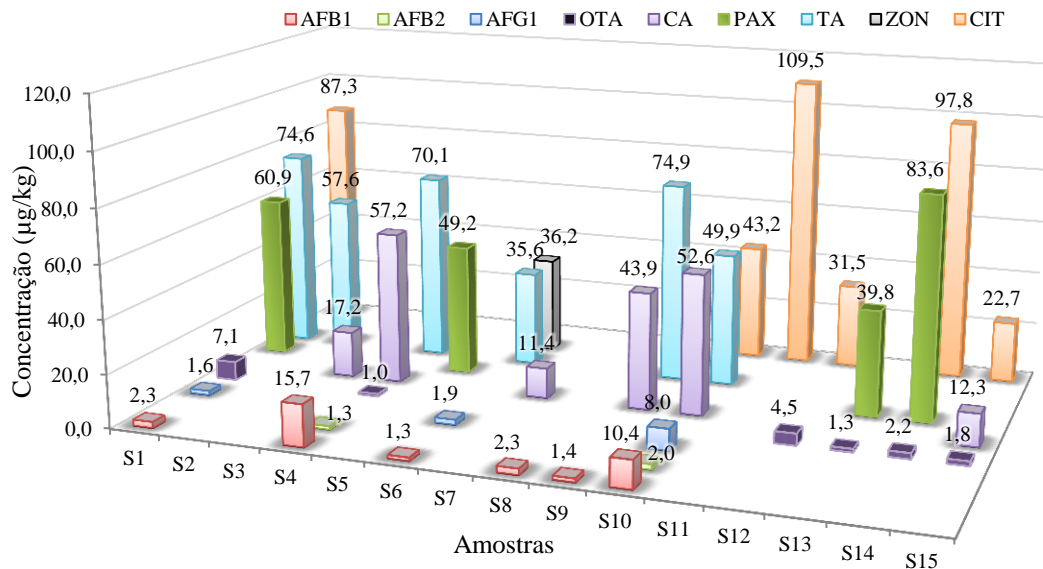
### 3.2.5. Incerteza de medição

A incerteza de medição é um importante parâmetro metrológico raramente usada na prática, embora para laboratórios analíticos prestadores de serviços que visam alcançar creditações ISO 17025 ou ISO 15189 seja um passo obrigatório. Visando uma maior confiabilidade dos resultados obtidos nesse trabalho, a incerteza de medição foi determinada durante toda a validação e aplicação do

método, conforme apresentado nos materiais suplementares (Tabela S3). Na Tabela 3 estão apresentados os resultados de incerteza expandida para o LOQ de cada micotoxina, conforme pode ser observado, as micotoxinas ionizadas no modo positivo com o aduto  $\text{NH}_4^+$  (WORT, T-2, iso T-2, DAS e Ac T-2), E-cristinina e  $\beta$ -ZOL apresentaram incertezas superiores a 50%, enquanto, as demais micotoxinas estão em conformidade com a Comissão Europeia 401/2006/CE (CE, 2006b) e o Manual de Garantia de Qualidade Analítica (Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento do Brasil, 2015). As micotoxinas que apresentaram incerteza no LOQ, em condições de precisão intermediária, acima do nível recomendado demonstraram elevados RSD e/ou variação do fator de correção da recuperação, sendo estas as fontes de incerteza com maior contribuição na resposta das micotoxinas avaliadas.

### 3.3. Estudo de ocorrência

O método validado foi aplicado em quinze amostras de amêndoas de cacau de diferentes lotes coletados em armazéns no Brasil. Como pode ser observado na Fig. 2, em todas as amostras analisadas foi relatada presença de micotoxinas em níveis quantificáveis. As micotoxinas de maior interesse em análises de cacau e em alimentos em geral são as Aflatoxinas e OTA devido a sua alta toxicidade. Neste trabalho a AFB1 e a OTA foram quantificadas em seis amostras com níveis variando entre 1,3 e 15,7  $\mu\text{g kg}^{-1}$  e 1,0 e 7,1  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , respectivamente. Das quinze amostras submetidas ao método validado, 67% apresentaram co-contaminação natural por micotoxinas, o que pode representar risco a saúde humana devido a efeitos sinérgicos pela co-exposição às toxinas (Ali, 2018; Meerpoel, et al., 2018).



**Fig. 2.** Níveis de contaminação nas amostras de cacau por micotoxinas

#### 4. Conclusões

O método de extração líquido-líquido com partição por adição de NaCl com etapa de congelamento possibilitou a análise simultânea de 34 micotoxinas. A validação demonstrou boa exatidão e precisão do método, com exceção das micotoxinas que foram ionizadas com o aduto  $\text{NH}_4^+$ , E-cristinina e  $\beta$ -ZOL, estas apresentaram maior incerteza da resposta. Os limites de detecção e quantificação determinados apresentaram valores relativamente baixos para matriz de alta complexidade como o cacau (LOQ entre 1,0 e 75  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ). O limite de decisão e a capacidade de detecção também foram determinados possibilitando a verificação da probabilidade de falso positivo ou negativo nas amostras avaliadas. O método validado oferece níveis de incerteza de medição dentro do recomendado para 27 micotoxinas, apesar disso as demais micotoxinas devem continuamente ser monitoradas. A aplicação do método foi realizada em 15 amostras de cacau coletadas no Brasil, todas as amostras analisadas apresentaram contaminação com micotoxinas. Dos 34 metabólitos investigados, 9 (AFB1, AFB2, AFG1, OTA, CA, PAX, TA, ZON e CIT) foram quantificados nas amostras de cacau. Esses resultados demonstram a necessidade do monitoramento dessas toxinas no cacau para futuramente serem estipulados LMT de micotoxinas no cacau.

#### Conflito de interesses

Os autores declaram não ter conflito de interesse.

#### Acknowledgements

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ), Coordenação de Aperfeiçoamento de Nível Superior (CAPES) e Rede Mineira de Química (RQ-MG) mantida pela Fundação de Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pelo suporte financeiro. Laboratório de Controle de Qualidade e Segurança Alimentar (LACQSA-BH), Laboratório Nacional Agropecuário de Minas Gerais (LANAGRO-MG) e Laboratório de Analítica e Eletroanalítica (LAE) pela cessão das instalações e equipamentos para a realização deste trabalho.

#### Referências

- Abreu, D. C. P., Vargas, E. A., Oliveira, F. A. S., Madureira, F. D., Pinto, P. S. & Saczk, A. A. (2019). *Dilute and shoot* e QuEChERS modificado *in house* para determinação de multomicotoxinas em cacau. Capítulo 2 da tese, *Universidade Federal de Lavras*.
- Ali, N. (2018). Co-occurrence of citrinin and ochratoxin A in rice in Asia and its implications for human health. *J Sci Food Agric*, 98(6), 2055-2059.
- Bolechová, M., Benešová, K., Běláková, S., Čáslavský, J., Pospíchalová, M., & Mikulíková, R. (2015). Determination of seventeen mycotoxins in barley and malt in the Czech Republic. *Food Control*, 47, 108-113.
- CODEX ALIMENTARIUS. (1995). General standard for contaminants and toxins in food and feed CXS 193-1995.

- CODEX ALIMENTARIUS (2011). Documento de debate sobre la ocratoxina a en el cacao (Preparado por el Grupo de trabajo por medios electrónicos, dirigido por Ghana y presidido conjuntamente por el Brasil).
- da Silva, L. P., Madureira, F., de Azevedo Vargas, E., Faria, A. F., & Augusti, R. (2019). Development and validation of a multianalyte method for quantification of mycotoxins and pesticides in rice using a simple dilute and shoot procedure and UHPLC-MS/MS. *Food Chem*, 270, 420-427.
- Desmarchelier, A., Tessiot, S., Bessaire, T., Racault, L., Fiorese, E., Urbani, A., Chan, W. C., Cheng, P., & Mottier, P. (2014). Combining the quick, easy, cheap, effective, rugged and safe approach and clean-up by immunoaffinity column for the analysis of 15 mycotoxins by isotope dilution liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A*, 1337, 75-84.
- FAO. (2016). Toxicological evaluation of certain veterinary drug residues in food.
- Karaseva, N. M., Amelin, V. G., & Tret'yakov, A. V. (2014). QuEChERS coupled to dispersive liquid-liquid microextraction for the determination of aflatoxins B1 and M1 in dairy foods by HPLC. *Journal of Analytical Chemistry*, 69(5), 461-466.
- Koesukwiwat, U., Sanguankaew, K., & Leepipatiboon, N. (2014). Evaluation of a modified QuEChERS method for analysis of mycotoxins in rice. *Food Chem*, 153, 44-51.
- Liu, Y., Han, S., Lu, M., Wang, P., Han, J., & Wang, J. (2014). Modified QuEChERS method combined with ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry for the simultaneous determination of 26 mycotoxins in sesame butter. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 970, 68-76.
- Malachova, A., Sulyok, M., Beltran, E., Berthiller, F., & Krska, R. (2014). Optimization and validation of a quantitative liquid chromatography-tandem mass spectrometric method covering 295 bacterial and fungal metabolites including all regulated mycotoxins in four model food matrices. *J Chromatogr A*, 1362, 145-156.
- Meerpoel, C., Vidal, A., di Mavungu, J. D., Huybrechts, B., Tangni, E. K., Devreese, M., Croubels, S., & De Saeger, S. (2018). Development and validation of an LC-MS/MS method for the simultaneous determination of citrinin and ochratoxin a in a variety of feed and foodstuffs. *J Chromatogr A*.
- Pizzutti, I. R., de Kok, A., Scholten, J., Righi, L. W., Cardoso, C. D., Rohers, G. N., & da Silva, R. C. (2014). Development, optimization and validation of a multimethod for the determination of 36 mycotoxins in wines by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Talanta*, 129, 352-363.
- Rambla-Alegre, M., Esteve-Romero, J., & Carda-Broch, S. (2012). Is it really necessary to validate an analytical method or not? That is the question. *J Chromatogr A*, 1232, 101-109.
- Streit, E., Schwab, C., Sulyok, M., Naehrer, K., Krska, R., & Schatzmayr, G. (2013). Multi-mycotoxin screening reveals the occurrence of 139 different secondary metabolites in feed and feed ingredients. *Toxins (Basel)*, 5(3), 504-523.
- Sulyok, M., Berthiller, F., Krska, R., & Schuhmacher, R. (2006). Development and validation of a liquid chromatography/tandem mass spectrometric method for the determination of 39 mycotoxins in wheat and maize. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 20(18), 2649-2659.
- Sulyok, M., Krska, R., & Schuhmacher, R. (2007). A liquid chromatography/tandem mass spectrometric multi-mycotoxin method for the quantification of 87 analytes and its application to semi-quantitative screening of moldy food samples. *Anal Bioanal Chem*, 389(5), 1505-1523.
- Sulyok, M., Krska, R., & Schuhmacher, R. (2010). Application of an LC-MS/MS based multi-mycotoxin method for the semi-quantitative determination of mycotoxins occurring in different types of food infected by moulds. *Food Chem*, 119(1), 408-416.
- Wenzl, T., Haedrich, J., Schaechtele, A., Robouch, P., & Stroka, J. (2016). Guidance Document on the Estimation of LOD and LOQ for Measurements in the Field of Contaminants in Feed and Food. *Publications Office of the European Union*.

**Materiais suplementares****Tabela S1.** Concentração de cada padrão de micotoxina na solução e estoque e na solução de trabalho

Micotoxina	Concentração em solução estoque ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Concentração do analito na solução de trabalho ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )
Aflatoxina B1	100	0,90
Aflatoxina B2	100	0,90
Aflatoxina G1	100	0,90
Aflatoxina G2	100	0,90
Citreoviridina A	100	0,90
Ocratoxina A	100	0,90
Ácido micofenólico	101	3,00
Ácido tenuazônico	98,2	3,00
Agroclavina	201,8	3,00
Alfa-ergocriptina	1220	3,00
Alfa-zearalanol	752,1	3,00
Alternariol	98,8	3,00
Alternariol-metil-éter	98,6	3,00
Beta-zearalanol	100	3,00
Dihidroergocristinina	200,2	3,00
Ergocornina	100,4	3,00
Ergocristina	167,7	3,00
Ergocristinina	50,2	3,00
Ergosina	173	3,00
Meleagrina	100,7	3,00
Paxilina	100	3,00
Tentoxina	102	3,00
Zearalenona	100	3,00
Acetil T2	1000	9,00
Ácido ciclopiazônico	2450	9,00
Diacetoxiciscirpenol	1268,75	9,00
Esterigmatocistina	1000	9,00
Iso-T-2	1000	9,00
Toxina T-2	1000	9,00
Roquefortina C *	100,00	9,00
Wortmanina *	100,10	9,00
Fumonisina B2	100	15,00
Citrinina	1610	18,00
Fumonisina B1	1626,7	30,00

\* Padrões agrupados na solução de trabalho dois.



**Tabela S2.** Parâmetros de MRM para as micotoxinas analisadas e seus respectivos tempos de retenção

Micotoxinas	TR <sup>a</sup> (min)	Íon precursor (m/z)	DP <sup>b</sup> (V)	Íon produto (m/z)	CE <sup>c</sup> (V)	CXP <sup>d</sup> (V)
Acetil T2	5,9	526,2 [M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	86	287,0/245,0	21/21	12/30
Ácido ciclopiazônico	5,61	337,1 [M+H] <sup>+</sup>	71	196,1/182,1	29/25	8/8
Ácido micofenólico	4,01	321,0 [M+H] <sup>+</sup>	46	207,0/159,1	27/43	12/14
Aflatoxina B1	3,2	313,0 [M+H] <sup>+</sup>	1	284,8/240,9	31/49	16/14
Aflatoxina B2	3,02	315,1 [M+H] <sup>+</sup>	126	286,8/259,1	35/39	20/14
Aflatoxina G1	3,01	328,8 [M+H] <sup>+</sup>	70	199,9/242,9	54/37	15/15
Aflatoxina G2	2,86	331,1 [M+H] <sup>+</sup>	6	312,8/188,9	33/53	16/12
Agroclavina	2,6	239,2 [M+H] <sup>+</sup>	1	183,0/208,0	23/23	8/6
Alfa-Zearalenol	4,05	323,3 [M+H] <sup>+</sup>	11	304,9/188,9	11/27	20/16
Alfa-ergocriptina	3,35	576,2 [M+H] <sup>+</sup>	116	268,1/223,0	33/43	26/22
Citrinina	3,35	251,2 [M+H] <sup>+</sup>	51	232,9/205,0	21/35	14/12
Citroeveridina A	4,52	403,1 [M+H] <sup>+</sup>	46	139,0/83,0	29/51	8/10
Diacetoxiciscirpenol	3,22	384,1 [M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	46	307,0/104,8	15/49	16/14
Dihidroergocristinina	3,51	612,3 [M+H] <sup>+</sup>	126	270,0/350,0	39/33	34/42
Ergocornina	3,1	562,2 [M+H] <sup>+</sup>	116	268,1/223,1	33/43	24/26
Ergocristina	3,47	610,3 [M+H] <sup>+</sup>	51	268,0/223,0	35/45	34/26
Ergocristinina	3,76	610,3 [M+H] <sup>+</sup>	51	592,2/304,9	21/37	54/36
Ergosina	2,91	548,3 [M+H] <sup>+</sup>	131	223,0/207,9	41/49	22/26
Esterigmatocistina	5,1	325,0 [M+H] <sup>+</sup>	61	280,9/115,0	47/83	14/14
Fumonisina B1	3,29	722,3 [M+H] <sup>+</sup>	116	334,0/352,0	53/49	16/16
Fumonisina B2	4,25	706,3 [M+H] <sup>+</sup>	6	336,0/318,0	49/51	18/16
Iso T2	4,8	484,1 [M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup> 467,3 [M+H] <sup>+</sup>	26/96	215,2/197,0	23/23	10/12
Meleagrina	3,06	434,1 [M+H] <sup>+</sup>	46	403,0/333,9	19/29	16/12
Ocratoxina	4,89	404,0 [M+H] <sup>+</sup>	71	238,9/358,0	31/19	16/18
Paxilina	6,96	436,3 [M+H] <sup>+</sup>	66	182,0/130,0	37/27	12/8
Roquefortina C	3,49	390,1 [M+H] <sup>+</sup>	81	193,0/322,1	33/27	8/12
Tentoxina	3,64	415,2 [M+H] <sup>+</sup>	111	312,1/256,2	25/39	12/10
Toxina T-2	4,59	484,2 [M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	31	215,1/185,0	21/25	10/8
Wortmanina	3,67	446,0 [M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup> 429,0 [M+H] <sup>+</sup>	26/51	354,9/355,0	17/11	22/20
Zearalenona	4,86	319,1 [M+H] <sup>+</sup>	6	283,0/186,9	15/25	16/12
Ácido Tenuazônico	3,08	195,9 [M-H] <sup>-</sup>	-90	138,8/111,8	-26/-32	-15/-11
Alternariol	3,35	256,9 [M-H] <sup>-</sup>	-125	212,9/214,9	-32/-34	-13/-11
Beta-zearalenol	3,62	321,0 [M-H] <sup>-</sup>	-140	259,1/277,0	-30/-34	-17/-17
Alternariol-metil-éter	4,8	270,9 [M-H] <sup>-</sup>	-95	227,9/226,9	-40/-48	-19/-21

<sup>a</sup> Tempo de retenção; <sup>b</sup> Potencial de dessolvatação; <sup>c</sup> Energia de colisão; <sup>d</sup> Potencial da câmara de colisão.

**ARTIGO 3****Estudo de co-ocorrência de micotoxinas em amêndoas de cacau do Brasil**

Daiane Cássia Pereira Abreu<sup>a</sup>, Eugenia Azevedo Vargas<sup>b</sup>, Fabiano Aurelio da Silva Oliveira<sup>b</sup>,  
Fernando Diniz Madureira<sup>b</sup>, Ana Paula Trovatti Uetanabaro<sup>c</sup>, Polyane Novais Pires<sup>c</sup>, Adelir Aparecida  
Saczk<sup>a</sup>.

<sup>a</sup> Departamento de Química, Universidade Federal de Lavras, 37200-000 Lavras - MG, Brasil

<sup>b</sup> Laboratório de Controle de Qualidade e Segurança Alimentar (LACQSA-BH), Laboratório Nacional Agropecuário de Minas Gerais (LANAGRO-MG), 30380-090 Belo Horizonte - MG, Brasil

<sup>c</sup> Departamento de Biologia, Universidade Estadual de Santa Cruz, 45.662-900 Ilhéus - BA, Brasil

\*Corresponding author. Tel: +55 35 38291876, fax: +55 35 38291812

*E-mail:* adelir@ufla.br (SACZK, A. A.)

## Resumo

Neste trabalho, 135 amostras de amêndoas de cacau coletadas nas Regiões Amazônica e Mata Atlântica do Brasil foram analisadas para avaliar a possível co-ocorrência de 34 micotoxinas. Os resultados indicaram que 42% das amostras de cacau apresentaram níveis quantificáveis para 11 micotoxinas: aflatoxinas (AFB1, AFB2 e AFG1), ocratoxina A (OTA), citrinina (CIT), ácido ciclopiazônico (CA), ácido tenuazônico (TA), paxilina (PAX), esterigmatocistina (STG), zearalenona (ZON) e fumonisina B2 (FB2). Das amostras, 18% apresentaram co-ocorrência com até seis micotoxinas. Não foram detectadas toxina pertencente ao grupo dos tricotecenos e alcaloides de ergot. Em geral, o estudo estatístico de contingência não mostrou diferenças significativas de incidência de micotoxinas entre as duas regiões avaliadas. Os resultados determinados de contaminação indicaram que 7 amostras apresentaram contaminação de Aflatoxinas totais e apenas uma com OTA acima do nível de  $10 \mu\text{g kg}^{-1}$ . A veracidade do método foi avaliada por ensaios de proficiência para OTA, z-score entre  $\pm 2$  foi considerado satisfatório.

**Palavras-chave:** Multimicotoxinas; Monitoramento; Ocorrência; Espectrometria de massas; LC-MS/MS.

### 1. Introdução

O cacauéiro é uma espécie arbórea tropical, originário da América Tropical, porém, seu cultivo é predominante na África (72,5%). Na América, foi estimada uma produção de 763 toneladas de grãos de cacau, equivalente a 18% da produção mundial, com uma participação de 5,43% da produção brasileira (ICCO, 2017). A cacauicultura brasileira está distribuída nos estados da Bahia, Espírito Santo, Mato Grosso, Pará, Rondônia e Amazonas. De forma geral, o processamento inicial dos frutos do cacauéiro é realizado na fazenda com etapas manuais, os frutos são abertos e os grãos de cacau são armazenados em caixas de madeira para a fermentação natural (Copetti, Iamanaka, Pitt, & Taniwaki, 2014). Após a etapa de fermentação, processo esse que confere aromas característicos do chocolate (Voigt, 2013), os grãos de cacau são transferidos para plataformas de secagem até redução do teor de umidade (Copetti, Iamanaka, Frisvad, Pereira, & Taniwaki, 2011). O cacau seco é ensacado e armazenado para a comercialização e, posterior produção de chocolates, dentre outros derivados de cacau. É importante ressaltar que durante o processamento da matéria prima do chocolate, especialmente nas etapas de fermentação, secagem ao sol e armazenamento, pode ocorrer o desenvolvimento de fungos. Os fungos filamentosos causam deterioração nos grãos, influenciando na qualidade sensorial do produto final, além disso, possibilita a formação de micotoxinas (Copetti, Iamanaka, Frisvad, Pereira, & Taniwaki, 2011; Mishra, Hayat, Catanante, Istamboulie, & Marty, 2016).

As micotoxinas são metabólitos secundários produzidos por fungos toxigênicos que comumente contaminam *commodities* agrícolas no campo ou em condições pós-colheita (Malachova, Stranska, Vaclavikova, Elliott, Black, Meneely, et al., 2018). São reportadas mais de 100.000 espécies de fungos, sendo que grande parte dos fungos produtores de toxinas com maior predominância pertencem aos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Claviceps* e *Alternaria* (Koppen, Koch, Siegel, Merkel, Maul, & Nehls, 2010; Zachariasova, Dzuman, Veprikova, Hajkova, Jiru, Vaclavikova, et al., 2014). Estes fungos podem produzir uma grande variedade de micotoxinas, exibindo uma ampla gama

de estruturas que resultam em diferentes propriedades físico-químicas e fisiológicas (Hussein & Brasel, 2001). As mais importantes em relação à sua ocorrência e toxicidade são as aflatoxinas (AFs), ocratoxinas (OTs), fumonisinas (FMs), tricotecenos (TRC), patulina (PAT) e zearalenona (ZON) e seus metabólitos. Existem muitas outras micotoxinas toxicologicamente importantes, porém menos estudadas, como os alcaloides de ergot (EA), enniatinas (ENs), toxinas alternaria, moniliformina (MON), citrinina (CIT), beauvericina (BEA), ácido ciclopiazônico (CA), roquefortina C (ROQ C), ácido micofenólico (MA), verruculogem (VER), citreoviridina (CTV), dentre outra (Pereira, Fernandes, & Cunha, 2014). As micotoxinas são contaminantes estáveis, resistentes à decomposição e, dependendo da exposição, apresentam perigo à saúde humana devido à carcinogenicidade, neurotoxicidade, imunotoxicidade e toxicidade reprodutiva (Van Pamel, Verbeken, Vlaemynck, De Boever, & Daeseleire, 2011).

Os dados de ocorrência de micotoxinas nos alimentos são extremamente importantes para determinar o risco representado pelas micotoxinas tanto para humanos como para animais (Pereira, Fernandes, & Cunha, 2014). As avaliações de risco de micotoxinas em alimentos são realizadas pelo comitê conjunto de especialistas da Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura e Organização Mundial da Saúde FAO/OMS sobre aditivos alimentares (JECFA). Estas são então empregadas pela Comissão do Codex Alimentarius (órgão intergovernamental de definição de normas para alimentos) para estabelecer níveis máximos em alimentos ou fornecer outras recomendações de gestão de risco para controlar ou prevenir a contaminação. Até o presente momento não foram definidos limites máximos tolerados (LMT) para ocorrência de micotoxinas em amêndoas de cacau e em seus subprodutos, sendo fortemente recomendado seu monitoramento (Codex Alimentarius, 1995, 2011). No Brasil, os LMT de AFs totais e ocratoxina A (OTA) para cacau e produtos de cacau foram fixados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) na Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) n.º7, de 18 de fevereiro de 2011. Os limites definidos de OTA e AFs são  $10 \mu\text{g kg}^{-1}$  para amêndoas de cacau e  $5 \mu\text{g kg}^{-1}$  para produtos de cacau e chocolate (Brasil, 2011).

De acordo com o documento de debate sobre micotoxina em cacau (Codex Alimentarius, 2011) é possível observar a grande preocupação com a ocorrência de OTA nas amêndoas de cacau. Poucos trabalhos na literatura reportam a ocorrência das demais micotoxinas (Koesukwiwat, Sanguankaew, & Leepipatpiboon, 2014; Sanchez-Hervas, Gil, Bisbal, Ramon, & Martinez-Culebras, 2008) e até o momento, não há relato de determinação simultânea de multimicotoxinas devido à alta complexidade da amostra. A tendência em substituição de procedimentos clássicos por técnicas analíticas modernas como a cromatografia líquida de ultra alta performance acoplada à espectrometria de massas sequencial (UHPLC-MS/MS), tem impulsionado e permitido a ampliação dos escopos analíticos. No entanto, preparo de amostra adequado é exigido (Malachova, et al., 2018).

Diante disso, o objetivo desse trabalho foi determinar a ocorrência de multimicotoxinas nas amêndoas de cacau das duas principais regiões produtoras do Brasil. Para isso, foi aplicado o método desenvolvido e validado no Laboratório de Controle de Qualidade e Segurança Alimentar (LACQSA).

O método de extração empregado foi por partição líquido-líquido por adição de sal e congelamento, com análise por UHPLC-MS/MS.

## 2. Materiais e Métodos

### 2.1. Reagentes e soluções

Acetonitrila (ACN), metanol (MeOH) e ácido fórmico (HF) grau HPLC da J. T. Baker, ácido acético (HAc) da Sigma Aldrich, formiato de amônio ( $\text{NH}_4\text{FA}$ , 95%) da Riedel-de Haen e cloreto de sódio p.a ( $\text{NaCl}$ , 99%) da Nuclear. Água ultrapura ( $>18\text{M}\Omega\text{ cm}^{-1}$  resistividade) foi purificada utilizando um sistema Milli-Q<sup>®</sup> (Millipore, Bedford, EUA). As micotoxinas foram divididas em grupos, de acordo com as concentrações na solução de trabalho (pool), como segue: aflatoxinas B1, B2, G1 e G2 (AFB1, AFB2, AFG1 e AFG2), ocratoxina A (OTA) e citreoviridina A (CTV) ( $0,9\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ ), MA, ácido tenuazônico (TA), agroclavina-I (A-clavina), alfa-ergocriptina ( $\alpha$ -E-criptina), alfa-zearalenol ( $\alpha$ -ZOL), alternariol (AOH), alternariol-metil-éter (AME), beta-zearalenol ( $\beta$ -ZOL), dihidroergocristinina (dihidro-E-cristinina), ergocornina (E-cornina), ergocristina (E-cristina), ergocristinina (E-cristinina), ergosina (E-sina), meleagrina (MEL), paxilina (PAX), tentoxina (TEM) e zearalenona ( $3\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ ), acetil T-2 (ac-T2), CA, diacetoxiciscirpenol (DAS), esterigmatocistina (STG), iso T-2 (iso-T2), toxina T-2 (T-2) e ROQ C ( $9\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ ), fumonisina B2 (FB2,  $15\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ ), CIT ( $18\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ ) e fumonisina B1 (FB1,  $30\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ ). Os padrões foram adquiridos pela Sigma Aldrich (Zwijndrecht, Países Baixos), Biopure (Tulln, Áustria), Acros (Geel, Bélgica), Fermentek Biotechnology (Jerusalém, Israel) e Iris Biotech GmbH (Marktredwitz, Alemanha). Todos os padrões foram preparados e diluídos em ACN, com exceção das fumonisinas que foram preparadas na proporção 1:1 ACN/ $\text{H}_2\text{O}$ . As soluções estoques e a solução de trabalho foram armazenadas à uma temperatura de  $-20\text{ }^\circ\text{C}$ .

### 2.2. Amostras

Um total de 135 amostras de amêndoas de cacau coletadas das safras entre 2015 e 2018 foram analisadas quanto à presença de micotoxinas. A amostragem foi realizada em grãos de cacau secos coletados em diferentes estados do Brasil. As amostras foram agrupadas de acordo com a região do estado onde foram coletadas (Fig. 1): Região da Mata Atlântica, Bahia (n=77) e Espírito Santo (n=9); Região Amazônica, Amazônia (n=10), Rondônia (n=8) e Pará (n=31). As amostras foram processadas em moinho Geiger (UM25E) por 7 min a seco e 7 min com água na proporção de 1:1,5 cacau/água (m/m). Nos ensaios foram empregadas as massas de 7,5 g de cacau em pasta equivalente a 3,0 g de matriz. As amostras foram acondicionadas a  $-15\text{ }^\circ\text{C}$  até a análise.



**Fig. 1.** Locais no Brasil onde as amostras de cacau foram coletadas para a análise de micotoxinas.

As amostras de ensaios de proficiência foram empregadas na verificação da exatidão do método. As amostras de cacau contaminadas com OTA foram fornecidas pelos *Progetto Trieste - Mycotoxins 2017 e 2018* do Laboratory Proficiency Testing for Food Analysis (ACCREDIA, L'ente italiano di accreditamento). As amostras GC+C1753 (2017) e GC+C1854A (2018) foram analisadas e os valores de concentração obtidos em cada ensaio de proficiência tiveram seus resultados corrigidos pela taxa de recuperação.

### 2.3. Método de extração

O método de extração empregado foi o descrito e validado por Abreu et al. (2019a). 7,5 g de pasta de cacau foram previamente pesadas em tubos de centrifuga com capacidade de 50,0 mL, onde foram adicionados 18,0 mL da solução extratora (7:2,5:0,5 ACN/H<sub>2</sub>O/HAc v/v/v). A mistura foi agitada em vórtex a 3000 rpm por 30 seg, adicionados aproximadamente 3 g do sal NaCl e o tubo foi novamente agitado em vórtex a 3000 rpm por 30 seg. Em seguida, os tubos foram agitados por 60 min em mesa agitadora, a 700 ciclos min<sup>-1</sup>. Após esse período, os tubos contendo os extratos foram refrigerados em freezer por 15 min à -70 °C e centrifugados por 10 min à 4000 rpm e 5 °C. Alíquotas de 600 µL foram recolhidas e transferidas para *vials*, a estes foram adicionado 300 µL de ACN.

### 2.4. Instrumentação

As análises foram realizadas em um cromatógrafo UHPLC Agilent, 1290 infinity (Santa Clara, USA) acoplado a um espectrômetro de massas QTRAP 6500 (AB Sciex, Toronto, Canada). A coluna cromatográfica de fase reversa da Waters Corporation, modelo ACQUITY UPLC BEH C18 (Millford, Massachusetts, USA) com dimensões 100 mm x 2,1 mm x 1,7 µm e pré-coluna do mesmo modelo com

as dimensões de 2,1 mm x 5 mm foram utilizadas. A composição do gradiente de eluição utilizado foi: fase A: solução aquosa com 0,1% de ácido fórmico, 5 mmol L<sup>-1</sup> de formiato de amônio e 2% de metanol e fase B: ACN com 0,1% de ácido fórmico. Foi utilizado um fluxo constante de 0,40 mL min<sup>-1</sup>, iniciando em 99% da fase A e mantido por 1,3 min, sendo que em 1,7 min este passou para 70% de A. De 1,7 a 7,4 min foi reduzido linearmente até 35% e em 7,8 min retomou a condição inicial do método até 8,5 min. O volume de injeção foi de 5 µL, a temperatura da coluna foi mantida a 40 °C e do auto-amostrador a 10 °C. Os parâmetros da fonte de íons do espectrômetro de massas foram: voltagem do spray de íons de +/- 4500 V; pressão do gás nebulizador 45 psi e gás auxiliar 45 psi, ambos constituídos de ar (“zero grade air”), temperatura da *probe* 500 °C e gás de interface 40 psi. A pressão do gás de colisão (nitrogênio) foi atribuída como *Medium*. As análises foram realizadas no modo *Multiple Reaction Monitoring* (MRM) com fonte de ionização electrospray nos modos positivo e negativo. Todos os parâmetros dependentes do analito estão apresentados na Tabela S1, anexo aos materiais suplementares (Abreu et al., 2019a).

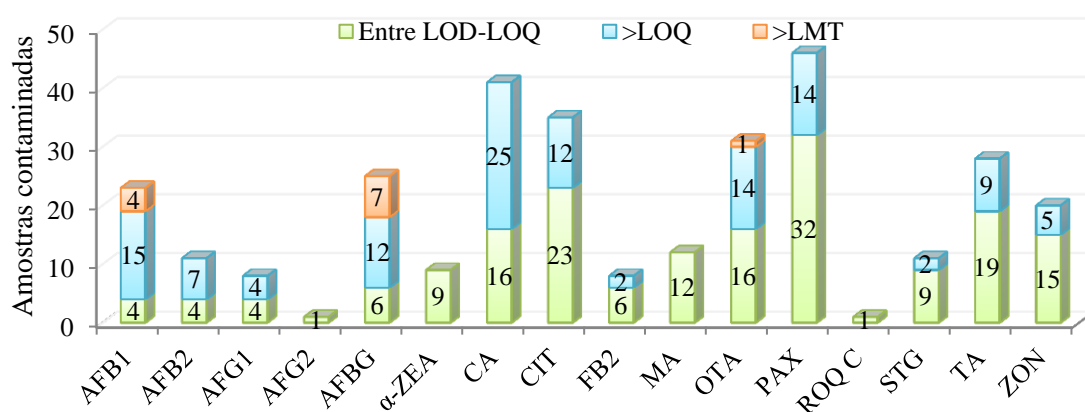
### 2.5. Estratégia de quantificação para multomicotoxinas

Curvas analíticas matrizadas foram empregadas para a quantificação dos analitos. Os parâmetros de validação do método estão apresentados na Tabela S2, anexo aos materiais suplementares (Abreu et al. 2019b). Para avaliar a recuperação e a repetibilidade do método em cada dia de análise no estudo de ocorrência, foram realizados três níveis de fortificação (em triplicata) com os volumes de 50 (alto) e 25 µL (médio) com a solução de trabalho. Para o nível do limite de quantificação (LOQ) a solução de trabalho foi diluída 10 vezes e o volume de 25 µL (baixo) foi utilizado na fortificação. As concentrações das micotoxinas determinadas nas amostras reais foram corrigidas pela recuperação (do dia) respectiva ao analito.

## 3. Resultados e discussão

### 3.1. Ocorrência natural de micotoxinas em cacau

Foram analisadas 135 amostras de cacau coletadas em diferentes regiões do Brasil para avaliação de contaminação por 34 micotoxinas. Os resultados demonstraram que um total de 15 metabólitos fúngicos secundários foram recuperados nos ensaios, 11 desses quantificáveis. Nenhuma micotoxina dos grupos alcaloides de ergot e tricotecenos foi detectada nas amostras analisadas. A partir dos dados avaliados foi possível verificar que 58% das amostras de cacau estavam isentas das micotoxinas avaliadas em níveis quantificáveis. Na Fig. 2 estão apresentadas as micotoxinas detectadas nas amêndoas de cacau. Estas estão expressas em quantidade de amostras positivas para a contaminação, subdivididas de acordo com os níveis de contaminação.



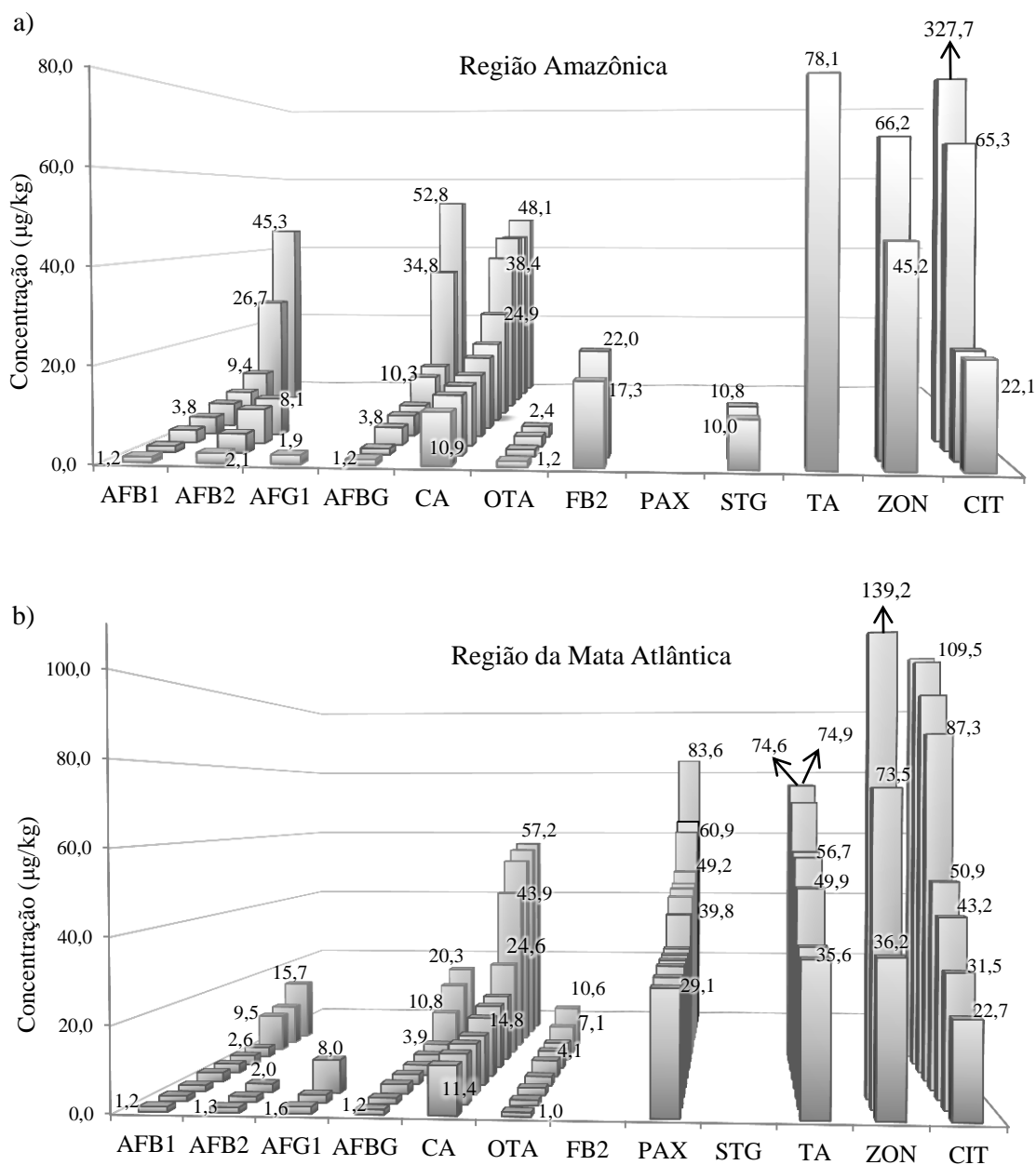
**Fig. 2.** Gráfico de barras representativo do número de amostras contaminadas por cada micotoxina detectada/quantificada nas amostras de cacau. LOD, Limite de detecção: AFB1, AFB2, AFG1 e OTA ( $0,3 \mu\text{g kg}^{-1}$ ), AFG2 ( $2,3 \mu\text{g kg}^{-1}$ ), STG e ROQ C ( $3,0 \mu\text{g kg}^{-1}$ ), FB2 ( $5,0 \mu\text{g kg}^{-1}$ ), CIT ( $6,0 \mu\text{g kg}^{-1}$ ), MA e PAX ( $7,6 \mu\text{g kg}^{-1}$ ), ZON e TA ( $10 \mu\text{g kg}^{-1}$ ); LOQ, Limite de quantificação ( $3,3 \times \text{LOD}$ ); LMT, Limite máximo tolerado (Brasil, 2011).

Analisando a Fig. 2 foi possível inferir que a micotoxina com maior predominância nas amostras de cacau é a PAX, porém, das 46 amostras que apresentaram contaminação, apenas 14 estão acima do LOQ determinado ( $25 \mu\text{g kg}^{-1}$ ). O CA apresentou 23 das 135 amostras avaliadas com contaminação em níveis maiores que  $10 \mu\text{g kg}^{-1}$ , sendo esta de maior índice de incidência nas amostras. A AFB1 e OTA são as micotoxinas legisladas em alimentos que apresentaram maior frequência de ocorrência nas amostras avaliadas. Dentre essas amostras, apenas uma apresentou violação para OTA, quatro para AFB1 e sete para AFs totais, considerando o LMT de  $10 \mu\text{g kg}^{-1}$  (Brasil, 2011). As demais micotoxinas foram quantificáveis em menos de 10% das amostras. Ressaltando que a frequência relatada das diferentes toxinas é de valor limitado para a avaliação de sua relevância, pois o *ranking* de frequência é influenciado pelas diferenças nos LOD e LOQ dos analitos.

### 3.2. Níveis de contaminação por região de coleta

A produção de cacau das duas maiores regiões produtoras do Brasil foi avaliada para determinação dos níveis de contaminação por micotoxinas. Na Região da Mata Atlântica foram coletadas 86 amostras de amêndoas de cacau e 49 na Região Amazônica. Para avaliar a significância das contaminações para cada região foi empregado o teste qui-quadrado ( $\chi^2$ ) em tabela de contingência, por onde foi avaliado a presença e ausência de micotoxinas, para se determinar possíveis divergências entre as frequências observadas. O teste demonstrou que a diferença entre as regiões não foi significativa, indicando que ambas as regiões apresentam número similar de contaminação. Apesar da contaminação entre as Regiões da Mata Atlântica e Amazônica ser independente da região, algumas micotoxinas apresentam maior predominância em uma das regiões, como pode ser observado na Fig. 3.





**Fig.3.** Níveis de contaminação para as amostras de cacau avaliadas para as Regiões: a) Amazônica (n=49) e b) Mata Atlântica (n=86).

Na região da Mata Atlântica, 14 amostras apresentaram contaminação para PAX acima do limite quantificável, enquanto na região Amazônica as amêndoas de cacau estavam isentas desta micotoxina. Em contrapartida, na região Amazônica duas micotoxinas foram detectadas nas amostras, STG e FB2, e não foram detectadas na região da Mata Atlântica, porém quantificadas em níveis baixos, próximo ao limite do método. Essas observações implicam que a microbiota se diferencia de uma região para a outra, devendo ser desenvolvido estudos para determinar as causas para o observado.

A PAX é uma das micotoxinas que induzem tremores como resposta neurológica, reportada em animais de fazenda. Em análise de produtos em domicílio, Sulyok e colaboradores (2007)

determinaram a presença de PAX em pão integral na concentração de  $46 \mu\text{g kg}^{-1}$  (Sulyok, Krska, & Schuhmacher, 2007). Em outro trabalho, os autores reportaram a presença de PAX em três amostras de pães, duas de fruta, uma de legumes, uma em nozes e em duas outras amostras não especificadas, em nível máximo de  $69 \mu\text{g kg}^{-1}$  (Sulyok, Krska, & Schuhmacher, 2010), níveis esses, próximos aos determinados para o cacau nesse trabalho, que variaram de 29 a  $83,6 \mu\text{g kg}^{-1}$ . No entanto, níveis superiores, na ordem de  $\text{mg kg}^{-1}$ , foram determinados em plantas e cevada (Bauer, Gross, Cramer, Humpf, Hamscher, & Usleber, 2018; Bauer, Gross, Cramer, Wegner, Hausmann, Hamscher, et al., 2017). A STG é produzida por várias espécies de fungos, algumas dessas, capazes de biotransformar STG em O-metilsterigmatocistina, precursor direto de AFB1 e AFG1. Conseqüentemente, as quantidades de STG são dependentes do fungo colonizador do substrato devido sua conversão em AFs (EFSA, 2013). A baixa concentração de STG determinada em duas amostras de cacau ( $\sim 10 \mu\text{g kg}^{-1}$ ) induz a possibilidade de esta ter sido convertida em subproduto.

Em 2014, CIT passou a ser contemplada no Regulamento (CE) n.º 1881/2006 da Comissão Europeia (CE, 2006). No documento foi recomendado o LMT de  $2000 \mu\text{g kg}^{-1}$  para suplementos alimentares à base de arroz fermentado com fermento vermelho, muito utilizado como conservante e corante nos alimentos asiáticos. O limite estabelecido de CIT é muito superior ao nível máximo encontrado ( $327,7 \mu\text{g kg}^{-1}$ ) na matriz de cacau coletada na Região Amazônica.

As micotoxinas alvo da grande maioria dos estudos de ocorrência são as AFs e OTA devido aos diversos efeitos conhecidos a saúde humana e animal. Em estudos realizados no Brasil por Copetti e colaboradores (2011b), 64 amostras de amêndoas de cacau estocadas e coletadas na Bahia (Região da Mata atlântica) foram avaliadas quanto a presença de AFs, no qual, 5% apresentaram contaminação, porém em níveis menores que  $0,14 \mu\text{g kg}^{-1}$  (Copetti, Iamanaka, Pereira, Fungaro, & Taniwaki, 2011). Resultados esses inferiores aos determinados neste trabalho, em que, 18,4% das 49 amostras avaliadas da Região Amazônica apresentaram contaminação por AFs em níveis que variaram entre 1,2 e  $52,8 \mu\text{g kg}^{-1}$ . Na região da Mata Atlântica 11,3% de 86 amostras tiveram níveis 1,2 e  $20,3 \mu\text{g kg}^{-1}$  para AFs totais. É importante ressaltar que a AFG2 não foi apresentada na Fig. 3 em função do seu limite de quantificação ( $7,5 \mu\text{g kg}^{-1}$ ), não por estar ausente das amostras. Os níveis mais altos de AFs foram detectados na região da Amazônia. Em contrapartida, na região da Mata Atlântica níveis maiores de OTA foram detectados. Como é possível observar na Fig. 3a, quatro amostras apresentaram OTA em níveis entre 1,2 e  $2,4 \mu\text{g kg}^{-1}$  e na Fig. 3b, nove amostras estavam contaminadas nas concentrações entre 1,0 e  $10,6 \mu\text{g kg}^{-1}$ .

A presença de FB2 em duas amostras da Região amazônica foi quantificada em níveis muito baixos, inferior ao menor nível legislado para a soma dessa toxina com FB1 em alimentos ( $>200 \mu\text{g kg}^{-1}$ ) (CE, 2006). A presença de FB1 não foi detectada nas amostras de cacau avaliadas, não implicando em sua ausência, mas sim que, o método proposto apresenta maior sensibilidade para determinação de FB2. Poucas amostras de cacau apresentaram contaminação por ZON, na região da

Mata Atlântica foram determinadas concentrações de 36,2 a 139,2  $\mu\text{g kg}^{-1}$  em três amostras contaminadas e, duas amostras, 45,2 e 66,2  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , foram quantificadas na região Amazônica. A contaminação apresentada neste trabalho é relativamente baixa comparando com os limites máximos estipulados para cereais (100  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) e milho (350  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) não processados de acordo com o Regulamento n.º 1881/2006 (EC, 2006).

As micotoxinas CA e TA também foram quantificadas nas amostras de cacau. TA pertence ao grupo das toxinas Alternarias, desde 2011 a Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (EFSA) tem monitorado sua ocorrência em alimentos (EFSA, 2011). Em documento, autores relatam a avaliação de 4.168 amostras de alimentos, 20% dessas apresentaram níveis quantificáveis de TA. O maior nível de contaminação reportado foi para castanhas (794  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ), as demais amêndoas apresentaram contaminações inferiores a 135  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , níveis esses, próximos aos determinados nesse trabalho (Arcella, Eskola, & Gómez Ruiz, 2016). Na região Amazônica apenas uma amostra apresentou contaminação por TA, com nível de 78,1  $\mu\text{g kg}^{-1}$ . Na região da Mata Atlântica níveis entre 35,6 e 74,9  $\mu\text{g kg}^{-1}$  foram determinados em 9,3% (8) das amostras. CA foi uma das micotoxina de maior ocorrência nas amêndoas de cacau em ambas as Regiões do Brasil, com 22,4% das amostras da região Amazônica contaminada e 14,0% na região da Mata Atlântica. A contaminação por CA foi similar nas regiões avaliadas, com um nível máximo de 57,2  $\mu\text{g kg}^{-1}$ .

### 3.3. *Co-ocorrência de micotoxinas nas amêndoas de cacau*

A avaliação de co-ocorrência de micotoxinas é de grande importância visto que, a maioria das misturas de micotoxinas levam a efeitos aditivos ou sinérgicos (Meerpoel, Vidal, di Mavungu, Huybrechts, Tangni, Devreese, et al., 2018). Neste trabalho, 18% das amostras de cacau apresentaram contaminação por múltiplas micotoxinas, podendo chegar até seis micotoxinas por amostra. Nos materiais suplementares (Tabela S3) estão apresentados os resultados detalhados (concentração, incerteza e co-ocorrência) obtidos para amostras positivas. Na Tabela 1 estão correlacionadas as micotoxinas que, simultaneamente, ocorreram nas amêndoas de cacau.

**Tabela 1**

Diagrama de co-ocorrência para avaliação por pares

										Contaminadas	Co-ocorrência	
										AFB1	19	15
										AFB2	7	7
										AFG1	4	4
										CA	23	12
										CIT	12	9
										FB2	2	2
										OTA	13	12
										PAX	14	5
										STG	2	0
										TA	9	7
										ZON	5	2
ZON	TA	STG	PAX	OTA	FB2	CIT	CA	AFG1	AFB2	AFB1		

Das 23 amostras que apresentaram co-ocorrência, a micotoxina com maior incidência foi AFB1 com 15 amostras contaminadas. Todas as amostras que apresentaram AFB2 e AFG1 a AFB1 estava presente, mas não necessariamente AFB2 e AFG1 co-ocorreram como pode ser observado na Tabela 1. Outro padrão de repetição observado foi entre CIT e OTA, de 12 amostras positivas para CIT, em 7 obteve-se ocorrência concomitante com OTA, similar ao observado por Meerpoel e colaboradores em 2018 em uma ampla variedade de alimentos (Meerpoel, et al., 2018). Isso se deve a alguns fungos produtores de CIT serem capazes de produzir OTA (EFSA, 2012). A co-ocorrência entre CA e AFs também tem sido relatada devido a algumas cepas de fungos da espécie *A. flavus* serem capazes de produzi-las concomitantemente (Baquiao, de Oliveira, Reis, Zorzete, Diniz Atayde, & Correa, 2013; Vaamonde, Patriarca, Fernández Pinto, Comerio, & Degrossi, 2003; Zorzete, Baquião, Atayde, Reis, Gonzalez, & Corrêa, 2013). Das amostras contaminadas com CA, 39% apresentaram contaminação por AFB1, possibilitando o aumento do potencial tóxico. Observando a Tabela 1, é possível notar diversas outras co-ocorrências entre as micotoxinas detectadas nas amostras de cacau. Nesta perspectiva, a co-contaminação natural de micotoxinas em alimentos é um assunto de pesquisa importante devido a efeitos da co-exposição na saúde humana e animal permanecem obscuros (Ali, 2018; Meerpoel, et al., 2018). A única micotoxina que não apresentou co-ocorrência com as demais foi a STG, fato este não esperado, uma vez que quantidades baixas de STG indicam que possivelmente o alimento foi colonizado por *A. flavus* e *A. parasiticus* e, conseqüentemente, por biotransformação, convertido em precursor direto para formação de AFB1 e AFG1 (EFSA, 2013).

### 3.4. Ensaio de proficiência

O ensaio de proficiência foi empregado para avaliar a capacidade do método em produzir resultados precisos e confiáveis para OTA em cacau, como etapa integrante da acreditação do método. O z-score foi calculado empregando o desvio calculado por Horwitz (Thompson, Ellison, & Wood,

2006). Os valores do z-score para OTA está apresentado na Tabela 2, valores estes dentro do limite satisfatório de  $\pm 2,0$ .

### **Tabela 2**

Recuperações e valores do z-score para OTA nas amostras de verificação obtidas dos ensaios de proficiência.

Amostra	Valor obtido ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	Recuperação (%)	Valor esperado ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	z-score
GC+C1854A	5,62	93	8,23	-1,44
GC+C1753	3,81	93	4,4	-0,60

Apesar dos ensaios de proficiência serem apenas para determinação de OTA, os ensaios foram empregados para todas as micotoxinas validadas no método multiresíduo. Níveis de CA acima do LOQ foram obtidos em ambas as amostras, GC+C1854A com  $18,56 \pm 0,64$  e GC+C1753 com  $15,57 \pm 0,68$ .

## **4. Conclusões**

Existem poucos estudos sobre a presença de micotoxinas em amêndoas de cacau com exceção das AFs e OTA. Apesar de ser fortemente recomendado pelo CODEX o monitoramento de OTA em cacau, nenhuma normativa internacional apresenta recomendações de LMT de micotoxinas para essa matriz. Até o presente momento, nenhum trabalho reportado descreve a análise simultânea de multimicotoxinas em cacau devido à alta complexidade da amostra. Nesta perspectiva, neste trabalho foi realizado o monitoramento em 135 amostras de amêndoas de cacau produzidas e estocadas em duas Regiões do Brasil: Mata Atlântica (n=86) e Amazônica (n=49). As amostras foram coletadas e avaliadas quanto a presença de 34 micotoxinas. A partir dos resultados foi possível verificar que 42% das amostras de cacau estavam contaminadas com pelo menos uma micotoxina avaliada. Dentre essas, não foi possível detectar nenhuma toxina pertencente ao grupo dos tricotecenos e alcaloides de ergot. Das amostras analisadas 18% apresentaram ocorrência concomitante com até seis micotoxinas, o que é preocupante, devido a efeitos aditivos e sinérgicos na toxicidade geral. Desta forma, devido à ocorrência simultânea de micotoxinas nas amêndoas de cacau, um contínuo monitoramento deve ser realizado. Sendo também necessário, compreender efeitos adversos da exposição humana em baixo nível por longo prazo e, posteriormente, estabelecer limites máximos tolerados.

### **Conflito de interesse**

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

### **Agradecimentos**

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ), Coordenação de Aperfeiçoamento de Nível Superior (CAPES) e Rede Mineira de Química (RQ-MG)

mantida pela Fundação de Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pelo suporte financeiro. Laboratório de Controle de Qualidade e Segurança Alimentar (LACQSA-BH), Laboratório Nacional Agropecuário de Minas Gerais (LANAGRO-MG) e Laboratório de Analítica e Eletroanalítica (LAE) pela cessão das instalações e equipamentos para a realização deste trabalho.

## Referências

- Abreu, D. C. P., Vargas, E. A., Oliveira, F. A. S., Madureira, F. D., Pinto, P. S. & Saczk, A. A. (2019a). *Dilute and shoot* e QuEChERS modificado *in house* para determinação de multimicotoxinas em cacau. Capítulo 2 da tese, *Universidade Federal de Lavras*.
- Abreu, D. C. P., Vargas, E. A., Oliveira, F. A. S., Madureira, F. D., Gomes, M. B. & Saczk, A. A. (2019b). Validação, análise de incerteza e aplicação de um método multirresíduo para 34 micotoxinas em cacau. Capítulo 3 da tese, *Universidade Federal de Lavras*.
- Ali, N. (2018). Co-occurrence of citrinin and ochratoxin A in rice in Asia and its implications for human health. *J Sci Food Agric*, 98(6), 2055-2059.
- Arcella, D., Eskola, M., & Gómez Ruiz, J. A. (2016). Dietary exposure assessment to *Alternaria* toxins in the European population. *EFSA Journal*, 14(12).
- Baquiao, A. C., de Oliveira, M. M., Reis, T. A., Zorzete, P., Diniz Atayde, D., & Correa, B. (2013). Polyphasic approach to the identification of *Aspergillus* section *Flavi* isolated from Brazil nuts. *Food Chem*, 139(1-4), 1127-1132.
- Bauer, J. I., Gross, M., Cramer, B., Humpf, H. U., Hamscher, G., & Usleber, E. (2018). Immunochemical Analysis of Paxilline and Ergot Alkaloid Mycotoxins in Grass Seeds and Plants. *J Agric Food Chem*, 66(1), 315-322.
- Bauer, J. I., Gross, M., Cramer, B., Wegner, S., Hausmann, H., Hamscher, G., & Usleber, E. (2017). Detection of the tremorgenic mycotoxin paxilline and its desoxy analog in ergot of rye and barley: a new class of mycotoxins added to an old problem. *Anal Bioanal Chem*, 409(21), 5101-5112.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RDC n.º7, de 18 de fevereiro de 2011. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 9 de março de 2011b, Seção 1, 66 p.
- Codex Alimentarius Commission, 1995. General standard for contaminants and toxins in food and feed, CXS 193-1995, Amended in 2018.
- Codex Alimentarius Commission, 2011. Documento de debate sobre la ocratoxina a en el cacao. Programa conjunto FAO/OMS sobre normas alimentarias comité del codex sobre contaminantes de los alimentos. [http://www.fao.org/tempref/codex/Meetings/CCCF/cccf5/cf05\\_12s.pdf](http://www.fao.org/tempref/codex/Meetings/CCCF/cccf5/cf05_12s.pdf) Accessed on 20/11/2018.
- Copetti, M. V., Iamanaka, B. T., Frisvad, J. C., Pereira, J. L., & Taniwaki, M. H. (2011). Mycobiota of cocoa: from farm to chocolate. *Food Microbiol*, 28(8), 1499-1504.
- Copetti, M. V., Iamanaka, B. T., Pereira, J. L., Fungaro, M. H., & Taniwaki, M. H. (2011). Aflatoxigenic fungi and aflatoxin in cocoa. *Int J Food Microbiol*, 148(2), 141-144.
- Copetti, M. V., Iamanaka, B. T., Pitt, J. I., & Taniwaki, M. H. (2014). Fungi and mycotoxins in cocoa: from farm to chocolate. *Int J Food Microbiol*, 178, 13-20.
- CE. (2006). Commission Regulation (CE) 1881/2006 of December 19th 2006 replacing Regulation (CE) 466/2001 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. Official Publications of the European Communities, L364, 5-24.
- European Food Safety Authority (EFSA). (2011). Scientific Opinion on the risks for animal and public health related to the presence of *Alternaria* toxins in feed and food. *EFSA Journal*, 9(10), 2407.
- European Food Safety Authority (EFSA). (2012). Scientific Opinion on the risks for public and animal health related to the presence of citrinin in food and feed. *EFSA Journal*, 10(3), 2605.

- European Food Safety Authority (EFSA). (2013). Scientific Opinion on the risk for public and animal health related to the presence of sterigmatocystin in food and feed. *EFSA Journal*, 11(6), 3254.
- Hussein, H. S., & Brasel, J. M. (2001). Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. *Toxicology*, 167,101-134.
- International Cocoa Organization (ICCO), 2017, Annual Report 2014/2015 [https://www.icco.org/about-us/international-cocoa-agreements/cat\\_view/1-annual-report.html](https://www.icco.org/about-us/international-cocoa-agreements/cat_view/1-annual-report.html) Accessed on 20/11/2018.
- Koesukwiwat, U., Sanguankaew, K., & Leepipatpiboon, N. (2014). Evaluation of a modified QuEChERS method for analysis of mycotoxins in rice. *Food Chem*, 153, 44-51.
- Koppen, R., Koch, M., Siegel, D., Merkel, S., Maul, R., & Nehls, I. (2010). Determination of mycotoxins in foods: current state of analytical methods and limitations. *Appl Microbiol Biotechnol*, 86(6), 1595-1612.
- Malachova, A., Stranska, M., Vaclavikova, M., Elliott, C. T., Black, C., Meneely, J., Hajslova, J., Ezekiel, C. N., Schuhmacher, R., & Krska, R. (2018). Advanced LC-MS-based methods to study the co-occurrence and metabolization of multiple mycotoxins in cereals and cereal-based food. *Anal Bioanal Chem*, 410(3), 801-825.
- Meerpoel, C., Vidal, A., di Mavungu, J. D., Huybrechts, B., Tangni, E. K., Devreese, M., Croubels, S., & De Saeger, S. (2018). Development and validation of an LC-MS/MS method for the simultaneous determination of citrinin and ochratoxin a in a variety of feed and foodstuffs. *J Chromatogr A*.
- Mishra, R. K., Hayat, A., Catanante, G., Istamboulie, G., & Marty, J. L. (2016). Sensitive quantitation of Ochratoxin A in cocoa beans using differential pulse voltammetry based aptasensor. *Food Chem*, 192, 799-804.
- Pereira, V. L., Fernandes, J. O., & Cunha, S. C. (2014). Mycotoxins in cereals and related foodstuffs: A review on occurrence and recent methods of analysis. *Trends in Food Science & Technology*, 36(2), 96-136.
- Sanchez-Hervas, M., Gil, J. V., Bisbal, F., Ramon, D., & Martinez-Culebras, P. V. (2008). Mycobiota and mycotoxin producing fungi from cocoa beans. *Int J Food Microbiol*, 125(3), 336-340.
- Sulyok, M., Krska, R., & Schuhmacher, R. (2007). A liquid chromatography/tandem mass spectrometric multi-mycotoxin method for the quantification of 87 analytes and its application to semi-quantitative screening of moldy food samples. *Anal Bioanal Chem*, 389(5), 1505-1523.
- Sulyok, M., Krska, R., & Schuhmacher, R. (2010). Application of an LC-MS/MS based multi-mycotoxin method for the semi-quantitative determination of mycotoxins occurring in different types of food infected by moulds. *Food Chem*, 119(1), 408-416.
- Thompson, M., Ellison, S. L. R., & Wood, R. (2006). The International Harmonized Protocol for the proficiency testing of analytical chemistry laboratories (IUPAC Technical Report). *Pure and Applied Chemistry*, 78(1), 145-196.
- Vaamonde, G., Patriarca, A., Fernández Pinto, V., Comerio, R., & Degrossi, C. (2003). Variability of aflatoxin and cyclopiazonic acid production by *Aspergillus section flavi* from different substrates in Argentina. *Int J Food Microbiol*, 88(1), 79-84.
- Van Pamel, E., Verbeke, A., Vlaemynck, G., De Boever, J., & Daeseleire, E. (2011). Ultrahigh-performance liquid chromatographic-tandem mass spectrometric multimycotoxin method for quantitating 26 mycotoxins in maize silage. *J Agric Food Chem*, 59(18), 9747-9755.
- Voigt, J., 2013. Chocolate and cocoa aroma. In: Watson, R.R., Preedy, V.R., Zibadi, S. (Eds.), *Chocolate in Health and Nutrition*. Humana Press, London, pp. 89–101.
- Zachariasova, M., Dzuman, Z., Veprikova, Z., Hajkova, K., Jiru, M., Vaclavikova, M., Zachariasova, A., Pospichalova, M., Florian, M., & Hajslova, J. (2014). Occurrence of multiple mycotoxins in European feedingstuffs, assessment of dietary intake by farm animals. *Animal Feed Science and Technology*, 193, 124-140.
- Zorzete, P., Baquião, A. C., Atayde, D. D., Reis, T. A., Gonçalves, E., & Corrêa, B. (2013). Mycobiota, aflatoxins and cyclopiazonic acid in stored peanut cultivars. *Food Research International*, 52(1), 380-386.

## Materiais suplementares

**Tabela S1.** Parâmetros de MRM para as micotoxinas analisadas e seus respectivos tempos de retenção

Micotoxinas	TR <sup>a</sup> (min)	Íon precursor (m/z)	DP <sup>b</sup> (V)	Íon produto (m/z)	CE <sup>c</sup> (V)	CXP <sup>d</sup> (V)
Acetil T2	5,9	526,2 [M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	86	287,0/245,0	21/21	12/30
Ácido ciclopiazônico	5,61	337,1 [M+H] <sup>+</sup>	71	196,1/182,1	29/25	8/8
Ácido micofenólico	4,01	321,0 [M+H] <sup>+</sup>	46	207,0/159,1	27/43	12/14
Aflatoxina B1	3,2	313,0 [M+H] <sup>+</sup>	1	284,8/240,9	31/49	16/14
Aflatoxina B2	3,02	315,1 [M+H] <sup>+</sup>	126	286,8/259,1	35/39	20/14
Aflatoxina G1	3,01	328,8 [M+H] <sup>+</sup>	70	199,9/242,9	54/37	15/15
Aflatoxina G2	2,86	331,1 [M+H] <sup>+</sup>	6	312,8/188,9	33/53	16/12
Agroclavina	2,6	239,2 [M+H] <sup>+</sup>	1	183,0/208,0	23/23	8/6
Alfa-Zearalenol	4,05	323,3 [M+H] <sup>+</sup>	11	304,9/188,9	11/27	20/16
Alfa-ergocriptina	3,35	576,2 [M+H] <sup>+</sup>	116	268,1/223,0	33/43	26/22
Citrinina	3,35	251,2 [M+H] <sup>+</sup>	51	232,9/205,0	21/35	14/12
Citroeveridina A	4,52	403,1 [M+H] <sup>+</sup>	46	139,0/83,0	29/51	8/10
Diacetoxiciscirpenol	3,22	384,1 [M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	46	307,0/104,8	15/49	16/14
Dihidroergocristinina	3,51	612,3 [M+H] <sup>+</sup>	126	270,0/350,0	39/33	34/42
Ergocornina	3,1	562,2 [M+H] <sup>+</sup>	116	268,1/223,1	33/43	24/26
Ergocristina	3,47	610,3 [M+H] <sup>+</sup>	51	268,0/223,0	35/45	34/26
Ergocristinina	3,76	610,3 [M+H] <sup>+</sup>	51	592,2/304,9	21/37	54/36
Ergosina	2,91	548,3 [M+H] <sup>+</sup>	131	223,0/207,9	41/49	22/26
Esterigmatocistina	5,1	325,0 [M+H] <sup>+</sup>	61	280,9/115,0	47/83	14/14
Fumonisina B1	3,29	722,3 [M+H] <sup>+</sup>	116	334,0/352,0	53/49	16/16
Fumonisina B2	4,25	706,3 [M+H] <sup>+</sup>	6	336,0/318,0	49/51	18/16
Iso T2	4,8	484,1 [M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup> 467,3 [M+H] <sup>+</sup>	26/96	215,2/197,0	23/23	10/12
Meleagrina	3,06	434,1 [M+H] <sup>+</sup>	46	403,0/333,9	19/29	16/12
Ocratoxina	4,89	404,0 [M+H] <sup>+</sup>	71	238,9/358,0	31/19	16/18
Paxilina	6,96	436,3 [M+H] <sup>+</sup>	66	182,0/130,0	37/27	12/8
Roquefortina C	3,49	390,1 [M+H] <sup>+</sup>	81	193,0/322,1	33/27	8/12
Tentoxina	3,64	415,2 [M+H] <sup>+</sup>	111	312,1/256,2	25/39	12/10
Toxina T-2	4,59	484,2 [M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	31	215,1/185,0	21/25	10/8
Wortmanina	3,67	446,0 [M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup> 429,0 [M+H] <sup>+</sup>	26/51	354,9/355,0	17/11	22/20
Zearalenona	4,86	319,1 [M+H] <sup>+</sup>	6	283,0/186,9	15/25	16/12
Ácido Tenuazônico	3,08	195,9 [M-H] <sup>-</sup>	-90	138,8/111,8	-26/-32	-15/-11
Alternariol	3,35	256,9 [M-H] <sup>-</sup>	-125	212,9/214,9	-32/-34	-13/-11
Beta-zearalenol	3,62	321,0 [M-H] <sup>-</sup>	-140	259,1/277,0	-30/-34	-17/-17
Alternariol-metil-éter	4,8	270,9 [M-H] <sup>-</sup>	-95	227,9/226,9	-40/-48	-19/-21

<sup>a</sup> Tempo de retenção; <sup>b</sup> Potencial de dessolvatação; <sup>c</sup> Energia de colisão; <sup>d</sup> Potencial da câmara de colisão.



**Tabela S2.** Desempenho do método avaliado por recuperação e precisão

Micotoxina	Validação completa em cacau (4 níveis/2 operadores/3 dias)															
	Fortificação ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )				Recuperação* (%)				RSD <sub>r</sub> (%) n=6				RSD <sub>R</sub> (%) n=24			
Ac-T2	75	102	150	300	119	108	111	103	2,4	12,7	10,1	10,8	15,1	15,4	12,3	22,0
CA	75	102	150	300	103	102	98	91	9,3	8,6	10,4	7,4	12,6	14,4	11,7	18,9
MA	25	34	50	100	106	107	103	100	5,9	5,0	9,4	7,7	10,3	6,1	7,9	12,9
TA	-	34	50	100	-	78	70	64	-	13,4	28,4	17,5	-	13,1	19,3	14,7
AFB1	7,5	10,2	15	30	98	100	96	87	6,5	8,6	13,7	8,1	18,4	11,3	10,3	11,4
AFB2	7,5	10,2	15	30	85	85	85	81	7,8	4,7	11,1	5,9	14,8	13,6	14,7	12,0
AFG1	7,5	10,2	15	30	96	94	90	92	7,7	5,2	12,8	11,4	10,9	9,0	14,7	13,6
AFG2	7,5	10,2	15	30	88	90	88	90	5,8	9,1	6,4	2,8	10,9	20,1	17,8	14,5
A-clavina	25	34	50	100	80	86	88	84	3,8	10,4	8,2	8,1	12,5	12,9	14,0	15,3
$\alpha$ -E-criptina	25	34	50	100	102	95	93	89	7,2	7,9	10,5	9,8	7,9	8,8	10,8	18,0
$\alpha$ -ZOL	-	34	50	100	-	110	103	97	-	13,6	11,9	10,3	-	14,1	11,7	13,1
AOH	-	34	50	100	-	104	103	95	-	10,7	13,4	18,4	-	9,5	13,7	15,9
AME	25	34	50	100	112	110	105	98	7,1	5,2	8,8	4,6	9,7	6,6	8,1	12,7
$\beta$ -ZOL	-	34	50	100	-	102	109	92	-	26,7	12,4	13,4	-	19,2	15,1	10,4
CTV	-	10,2	15	30	-	115	106	103	-	14,3	10,0	11,3	-	9,9	9,8	13,9
CIT	150	204	300	600	79	80	77	75	4,7	2,0	7,3	5,2	8,4	7,5	9,9	11,7
DAS	75	102	150	300	105	108	112	108	28,5	16,8	8,9	14,1	22,0	15,7	12,0	22,9
dihidro-E-cristinina	25	34	50	100	105	105	103	98	4,5	4,5	9,7	9,4	7,6	6,1	8,7	12,2
E-cornina	25	34	50	100	111	108	106	101	9,4	7,8	15,2	3,8	10,0	11,4	10,9	13,4
E-cristina	25	34	50	100	108	106	101	100	12,8	8,2	10,8	7,7	11,2	11,5	13,6	21,3
E-cristinina	25	34	50	100	104	107	110	96	18,4	21,2	24,1	15,0	16,8	18,9	20,6	22,2
E-sina	25	34	50	100	96	97	100	97	8,0	7,9	7,8	7,9	9,5	13,6	12,9	13,9
STG	75	102	150	300	109	107	104	97	3,6	2,9	8,1	7,4	7,9	3,8	6,5	13,7
FB1	250	340	500	1000	81	75	78	73	8,8	4,8	6,0	5,3	8,6	8,7	12,7	15,8
FB2	125	170	250	500	100	97	93	89	3,9	4,1	4,1	9,0	6,6	4,9	5,3	13,9
iso-T2	75	102	150	300	107	102	106	103	15,2	15,5	6,4	17,0	15,8	12,4	15,3	17,6
MEL	25	34	50	100	103	100	108	98	3,3	7,6	12,0	5,6	10,1	10,7	11,7	19,2
OTA	7,5	10,2	15	30	108	102	103	99	5,7	2,2	10,4	10,1	8,9	3,1	7,1	14,4
PAX	25	34	50	100	109	100	103	96	4,1	13,6	6,7	7,7	9,0	15,3	11,6	19,0
ROQ C	75	102	150	300	88	87	86	86	2,1	4,9	8,2	6,7	7,7	7,0	11,1	8,1
TEM	25	34	50	100	108	105	104	99	5,1	5,6	6,9	4,1	8,8	5,8	8,2	12,3
T-2	75	102	150	300	110	105	118	109	14,2	18,0	8,4	16,4	17,4	13,4	23,0	21,9
ZON	75	102	150	300	114	106	114	111	11,7	16,5	17,3	13,8	21,1	17,9	13,5	16,9

\*Recuperação média de todos os dias de análise (n=24)



