

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**MÉTODO MULTIRRESÍDUO PARA DETERMINAÇÃO
DE MICOTOXINAS EM VINHO POR UPLC-MS/MS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Laís Weber Righi

**Santa Maria, RS, Brasil
2013**

MÉTODO MULTIRRESÍDUO PARA DETERMINAÇÃO DE MICOTOXINAS EM VINHO POR UPLC-MS/MS

Laís Weber Righi

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-graduação em Química, Área de Concentração em Química Analítica, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Química**

Orientadora: Prof^a Dr^a Ionara Regina Pizzutti

Santa Maria, RS, Brasil

2013

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Naturais e Exatas
Programa de Pós-Graduação em Química**

**A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado**

**MÉTODO MULTIRRESÍDUO PARA DETERMINAÇÃO DE
MICOTOXINAS EM VINHO POR UPLC-MS/MS**

**Elaborada por
Laís Weber Righi**

**como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Química**

COMISSÃO EXAMINADORA:

**Prof^a Dr^a Ionara Regina Pizzutti
(Orientadora)**
Universidade Federal de Santa Maria

Prof^a Dr^a Valquíria Aparecida Polisel Jabor
Universidade de São Paulo

Dr Luciano Gebler
Embrapa Uva e Vinho

Santa Maria, 08 de janeiro de 2013.

Obrigada meu querido Deus por todas as oportunidades de crescimento que me ofereceu. Nem todas foram fáceis de compreender e enfrentar, mas todas, sem exceção, me fizeram um pouco melhor.

Ofereço este trabalho aos meus pais, Gilberto e Nilza, e a minha irmã Angela. Vocês são o grande alicerce da minha felicidade. Agradeço a oportunidade que Deus me deu de compartilhar essa existência com vocês.

Obrigada por todo apoio, amor e ensinamentos. Todas as vitórias são para e por vocês!

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais, Gilberto e Nilza, pela presença tão amável e atenta na minha vida; pela amizade, suporte, ensinamentos e por todo o amor e dedicação que me oferecem sempre. Em cada gesto meu existe muito de vocês e não existem palavras que dimensionem o amor e a gratidão que sinto por tudo que fazem por mim. Vocês são maravilhosos!

À minha irmã Angela: minha melhor amiga, minha ouvinte/conselheira e meu grande suporte. Tua amizade, incentivo, presença e carinho são essenciais na minha vida. O laço que nos une transcende o âmbito familiar e nossa sintonia é algo que não é possível expressar em palavras. Obrigada por tudo, de todo coração!

A Prof^a Dr^a Ionara Regina Pizzutti, minha orientadora nesse trabalho e em toda minha trajetória acadêmica. Que felicidade poder desenvolver trabalhos com pessoas que confiamos e admiramos! Agradeço as oportunidades de crescimento e aprendizado; os ensinamentos, muito além do âmbito do laboratório, em nossas tantas conversas sobre a vida; a confiança e a amizade que sempre me dedicou. És mais que uma simples professora, és uma amiga, e agradeço a oportunidade de termos nos encontrado nessa jornada.

A Prof^a Dr^a Carmem Dickow Cardoso, minha coorientadora e amiga. Obrigada pela amizade sempre atenta, pelo carinho e pelos tantos momentos que compartilhamos juntas. Obrigada também pela tua contribuição nesse trabalho e também em tantos outros momentos profissionais que tu te fez presente, confiando na minha capacidade e me fazendo acreditar que era possível realizar todos meus objetivos. Você e a Sofia são verdadeiramente especiais para mim.

A Prof^a Dr^a Rochele Cassanta Rossi pela participação no exame de qualificação e pelas sugestões de melhoria para este trabalho.

A Prof^a Dr^a Valquiria Polisel Jabor, pela participação no exame de qualificação e na banca de defesa contribuindo com muita dedicação para a melhoria deste trabalho. Ao professor Dr. Luciano Gleber pela participação na banca de defesa e pelas contribuições para o trabalho.

Ao Dr. André de Kok pela oportunidade de desenvolver esse trabalho no NVWA. Agradeço também pelos diversos momentos felizes que compartilhamos no período de estadia na Holanda.

Ao Dr. Martien Spanjer pelo apoio na jornada em solo Holandês, amizade, ensinamentos e pela enorme contribuição com muitos materiais utilizados de referência nessa dissertação. És um grande amigo para mim.

Aos demais colegas de laboratório e amigos conquistados no período em Amsterdã, que foram essenciais para o sucesso deste trabalho, agradeço profundamente pelas excelentes lembranças e pelo aprendizado compartilhado. Em especial, agradeço a Bárbara e a minha amiga Graciele, por terem partilhado comigo desse período com apoio emocional e intelectual para confecção deste trabalho.

Aos meus colegas e amigos do laboratório CEPARC, todos que conheci e convivi desde de 2007, agradeço pela amizade e tantos momentos felizes compartilhados. Esse trabalho tem um pouco do aprendizado adquirido com cada um de vocês.

Aos meus grandes amigos Jonatan, Wagner, Karla, Suelem e Estefânia, muito obrigada por tudo. Compartilho com vocês essa conquista que foi impulsionada pelo apoio de cada um de vocês no decorrer dessa trajetória. Agradeço também as minhas amigas de longa data Débora, Regina, Aline e Priscila por estarem ao meu lado sempre.

Aos queridos amigos santa-marienses e agora também meio porto alegrenses Felipe, Isabel e Juliana, obrigada pela companhia e amizade.

Agradeço ao Vitor pelo apoio na conclusão deste trabalho e por todas as palavras de incentivo e confiança. Obrigada pelo carinho.

Aos amigos e colegas da Braskem, agradeço o incentivo para finalização do trabalho.

Por fim, agradeço a todas as pessoas que de forma direta ou indireta fizeram parte desse caminho e que contribuíram para conclusão de mais essa etapa da minha vida.

*“Somos o que repetidamente fazemos.
Excelência, portanto não é um feito e sim um
hábito.”*

(Aristóteles)

“Há um tempo em que é preciso abandonar as roupas usadas, que já tem a forma do nosso corpo e esquecer os caminhos que nos levam sempre aos mesmos lugares.

É o tempo da travessia; e se não ousarmos fazê-la, teremos ficado, para sempre, à margem de nós mesmos.”

(Fernando Teixeira de Andrade)

“Faça o que puder, com o que tiver, onde estiver.”

(Theodore Roosevelt)

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Química
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

MÉTODO MULTIRRESÍDUO PARA DETERMINAÇÃO DE MICOTOXINAS EM VINHO POR UPLC-MS/MS

Autora: Laís Weber Righi
Orientadora: Prof^a Dr^a Ionara Regina Pizzutti
Data e Local da Defesa: Santa Maria, 08 de janeiro de 2013.

Um método rápido usando cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a espectrometria de massas (UPLC-MS/MS) foi implementado e otimizado para proporcionar a determinação completa de 36 micotoxinas em amostras de vinhos. A extração foi realizada com acetonitrila, aplicando o método QuEChERS (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe*; em português: Rápido, Fácil, Barato, Efetivo, Robusto e Seguro) modificado. Tradicionalmente, o método QuEChERS é muito conhecido na determinação de múltiplos pesticidas em uma grande variedade de matrizes de frutas e vegetais e por essa razão recebeu a distinção de método oficial da AOAC (*Association of Official Agricultural Chemists*) (LEHOTAY *et al.*, 2005; BANERJEE *et al.*, 2009). Normalmente, as determinações de micotoxinas são realizadas por cromatografia líquida após purificação em coluna de imunoafinidade ou testes ELISA, porém, essas técnicas possuem a desvantagem de envolver a determinação individual dos analitos (SPANJER *et al.*, 2008; CUNHA *et al.*, 2009). O objetivo deste estudo foi otimizar e empregar o método QuEChERS no procedimento de extração para determinação de micotoxinas em amostras de vinho.

Durante o estudo, foram realizados experimentos de otimização para melhorar a recuperação e estabilidade dos analitos. Além da avaliação do volume da amostra de vinho tinto a ser empregado, foi estudado o efeito do pH, realizado pela adição de uma etapa de tamponamento com formiato de amônio e ácido fórmico. Esse método envolveu uma etapa de purificação do extrato por dSPE, avaliando o uso de vários adsorventes. As micotoxinas foram analisadas por UPLC-MS/MS, usando ionização por eletronebulização no modo positivo. As soluções padrão de micotoxinas foram preparadas e classificadas em três diferentes grupos, com faixas

de concentração diferentes. O estudo de recuperação foi realizado em três diferentes níveis de fortificação, com seis replicatas (n=6) em cada concentração. Outros parâmetros avaliados da validação foram linearidade (r^2) das curvas analíticas, exatidão (% de recuperação), limites de detecção e de quantificação do método (LOQ e LOD, respectivamente), precisão (RSD%) e efeito matriz (%), determinados individualmente para cada micotoxina. Das 36 micotoxinas analisadas por UPLC-MS/MS (ESI+), 35 apresentaram recuperação percentual entre 70-120% e 88% apresentaram RSD \leq 20% no menor nível de fortificação estudado (Grupo I = 1, Grupo II = 50 e Grupo III = 10 $\mu\text{g kg}^{-1}$). O LOQ do método para 86% das micotoxinas foi o nível mais baixo estudado. O efeito matriz observado foi inferior a $\pm 20\%$ para 75% das micotoxinas. Este método foi aplicado satisfatoriamente na análise de 56 amostras de vinho tinto adquiridos na cidade de Amsterdã (Holanda), provenientes de diversos países.

ABSTRACT

Master Dissertation
Post Graduate Program in Chemistry
Federal University of Santa Maria, RS, Brazil

MULTIRESIDUE METHOD FOR THE UPLC-MS/MS ANALYSIS OF MYCOTOXINS IN WINE

Author: Laís Weber Righi
Advisor: Prof^a Dr^a Ionara Regina Pizzutti
Santa Maria, January 8th, 2013

A fast multimethod using liquid chromatography tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) was implemented and optimized to yield a complete determination of 36 mycotoxins in wine samples. Extraction was performed with acetonitrile, applying modified QuEChERS method (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe). Traditionally, QuEChERS method is well known in pesticides determination in a variety of matrices and due this has received the distinction of an AOAC (*Association of Official Agricultural Chemists*) official method for multiple pesticides in fruits and vegetables (LEHOTAY *et al.*, 2005; BANERJEE *et al.*, 2009). Usually mycotoxins analysis are carried out by liquid chromatography after immunoaffinity column clean-up or by enzyme-linked immunosorbent assay tests, but all these methods normally involve determination of a single compounds only (SPANJER *et al.*, 2008; CUNHA *et al.*, 2009). This study aimed to apply modified QuEChERS method as extraction procedure for mycotoxins determination in wine samples.

During this study, were performed optimization experiments to improve recovery results and analites stability. Besides the evaluation of the proper volume of wine samples to be applied, tests were performed to test pH effect by using an additional buffering step with ammonium formate/ formic acid. Normally this method apply a dispersive clean-up with sorbents to clean-up sample extract. This procedure followed a dSPE clean-up with various sorbents where mycotoxins were analyzed on UPLC-MS/MS system, using electrospray ionization in positive mode. Mycotoxins standards stock solutions were prepared and classified in three different groups, with different range of concentration. Recovery studies were performed by analyzing samples in three spiked levels, with six (n=6) replicates in each concentration. Other

validation parameters evaluated were linearity (r^2) of calibration curves, accuracy (recovery %), instrument limits of detection and method limits of quantification (LOD and LOQ), precision (RSD%) and matrix effects (%) were determined for each individual mycotoxin. From 36 mycotoxins analyzed by UPLC-MS/MS (ESI+), 35 showed average recoveries between 70-120% and 88% an RSD \leq 20%, at the lowest spiked level (Group I = 1, Group II = 50 e Group III = 10 $\mu\text{g kg}^{-1}$). The method LOQ for 86% mycotoxins was the lowest level studied. The observed matrix effect was lower than $\pm 20\%$ for 75% of mycotoxins. This procedure was applied successfully also in a survey of 56 red wine samples purchased in the city of Amsterdam (The Netherlands) from many different countries.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Mapa da produção de vinho no Brasil. (Enciclopédia do vinho, 2012).....	39
Figura 2 – Esquema da seqüência do método QuEChERS. (DA SILVA, 2011)	56
Figura 3 – Interface do tipo ESI, operando no modo positivo, onde os íons formados são conduzidos para o analisador de massas (Adaptado de LANÇAS, 2009).....	60
Figura 4 – Interface do tipo APCI para LC-MS (Adaptado de Agilent Technologies).....	61
Figura 5 – Interface do tipo APPI para LC-MS (Adaptado de Agilent Technologies).....	62
Figura 6 – Principais características dos modos de ionização a pressão atmosférica, empregadas em LC-MS (Adaptado de LANÇAS, 2009).....	63
Figura 7 – Representação da trajetória dos íons em um analisador de massa do tipo Quadrupolo (Adaptado de EARL (Electronic Analytical Reference Library)).....	65
Figura 8 – Representação de um analisador de massas do tipo triplo quadrupolo (Adaptado de EARL (Electronic Analytical Reference Library)).	66
Figura 9 – Esquema de funcionamento do ITD, em (a) os íons estão aprisionados e em (b) os íons com as razões m/z selecionadas são ejetados e analisado (Adaptado de MARCH, 1997).	68
Figura 10 – Desenho esquemático de um detector do tipo TOF simples (Adaptado de EARL (Electronic Analytical Reference Library)).	69
Figura 11 – Esquema do experimento avaliando a proporção vinho/água, fortificando todas as micotoxinas em um nível de concentração e procedendo a extração com acetonitrila acidificada.....	86
Figura 12 – (A) Esquema dos experimentos estudados com etapa de tamponamento com ácido fórmico e formiato de amônio e (B) com purificação aplicando os adsorventes C18, Oasis HBL [®] , Nexus [®] , ChloroFiltr [®] , carbono grafitizado e misturas entre eles.	88
Figura 13 – (A) Esquema do experimento sem o aplicação da etapa de tamponamento, apenas usando acetonitrila acidificada com ácido acético e (B) etapa de secagem extra e aplicação de dSPE com C18, Florisil, carbono grafitizado, ChloroFiltr [®] e misturas entre eles.	89

Figura 14 – Representação esquemática do procedimento de validação do multimétodo para análise de 36 micotoxinas em vinho, utilizando o método QuEChERS modificado, seguido de análise por UPLC-MS/MS.	94
Figura 15 – Efeito matriz (%) observado nas análises de cada micotoxina avaliando diferentes proporções do volume entre vinho e água durante o procedimento de extração.....	98
Figura 16 – (A) Micotoxinas em diferentes faixas de recuperação percentual e (B) efeito matriz observado com a aplicação dos adsorventes CF, C18, Absolut Nexus [®] , Oasis HBL [®] , CG e misturas entre eles, considerando extração em meio tamponado com ácido fórmico e formiato de amônio. (continua)	102
Figura 17 - (A) Número de micotoxinas em cada uma das faixas de recuperação percentual e (B) efeito matriz observado com tamponamento (ácido fórmico e formiato de amônio) e sem tamponamento (apenas acidificação do meio com ácido acético 1%) seguido de purificação com CF.....	106
Figura 18 – (A) Micotoxinas em diferentes faixas de recuperação percentual e (B) efeito matriz observado com a aplicação dos adsorventes C18, Florisil, CF, CG e misturas entre eles, considerando extração em meio acidificado com ácido acético 1%. (continua)	107
Figura 19 – Faixas de valores de coeficientes de determinação (r^2) obtidos através das curvas analíticas em solvente e em extrato da matriz.	110
Figura 20 – Curva analítica preparada a partir das soluções analíticas das micotoxinas (a) Esterigmatocisteína e (b) Fumonisina B1, em solvente orgânico e extrato da matriz.....	114
Figura 21 – Cromatograma obtido para Ocratoxina A para (a) transição de quantificação e (b) de confirmação, por UPLC-MS/MS, na concentração de 2 ng mL ⁻¹ , em solvente (1) e em extrato da matriz.....	119

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Relação em ordem decrescente dos vinte maiores países produtores de vinho no mundo.....	36
Tabela 2 – Alcalóides do Ergot.....	51
Tabela 3 – Fornecedores dos padrões sólidos de micotoxinas, solventes utilizados no preparo das soluções estoque e concentrações das micotoxinas nas soluções estoques e nas soluções misturas.....	80
Tabela 4 – Concentração final das micotoxinas nas soluções das curvas analíticas e níveis de fortificação aplicados para o estudo de recuperação.....	81
Tabela 5 – Condições de análise definidas para as micotoxinas empregando UPLC-MS/MS, no modo de ionização ESI positivo em amostras de vinho tinto.	84
Tabela 6 – Coeficiente angular (a), coeficiente linear (b), coeficiente de determinação (r^2) e faixa linear de trabalho obtidos pela análise cromatográfica das soluções analíticas (Concentrações vide Apêndice 2) preparadas em solvente orgânico e no extrato da matriz, para cada uma das micotoxinas estudadas.....	111
Tabela 7 – Percentual do efeito matriz observado na faixa de concentração estudada nas curvas analíticas.	115
Tabela 8 – Percentual do efeito matriz obtido através do cálculo a partir da inclinação da curva analítica obtida em solvente orgânico e em extrato da matriz.	117
Tabela 9 – LOD estimado do método (LOD _m) e instrumento (LOD _i) e LOQ estimado do método (LOQ _m) e instrumento (LOQ _i) para as soluções de micotoxinas preparadas em solvente orgânico obtidos pelos estudos de linearidade e LOQ real do método obtido através dos estudos de recuperação.	121
Tabela 10 – LOD estimado do método (LOD _m) e instrumento (LOD _i) e LOQ estimado do método (LOQ _m) e instrumento (LOQ _i) para as soluções de micotoxinas preparadas em extrato da matriz obtidos pelos estudos de linearidade e LOQ real do método obtido através dos estudos de recuperação.	122

Tabela 11 – Média dos percentuais de recuperação e RSD% dos extratos das amostra de vinho tinto fortificados nos 3 níveis estudados (Concentrações vide Apêndice 3).	124
--	-----

LISTA DE ABREVIATURAS

α -ZAL - Micotoxina α -Zearalanol

α -ZEL - Micotoxina α -Zearalenol

β -ZAL - Micotoxina β -Zearalanol

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

API – Ionização sob pressão atmosférica, do idioma inglês *Atmospheric Pressure Ionization*

APPI - Ionização por Fótons a Pressão Atmosférica, do idioma inglês *Atmospheric Pressure Photon Ionization*

APCI - Ionização Química a Pressão Atmosférica, do idioma inglês *Atmospheric Pressure Chemical Ionization*

ATA – Alequia tóxica alimentar

CC – Corrente contínua

CCD – Cromatografia em camada delgada

CF – Adsorvente ChloroFiltr[®]

CG – Adsorvente Carbono grafitizado

CI – Ionização química, do idioma inglês *Chemical Ionization*

CPA - Micotoxina Ácido Ciclopiazônico

DAS – Micotoxina Diacetoxiscirpenol

dSPE – Extração dispersiva em fase sólida, do idioma inglês *Dispersive Solid Phase Extraction*

DON – Micotoxina Deoxinivalenol

ECD – Detector por captura de elétrons, do idioma inglês *Electron Capture Detector*

EI – Ionização por elétrons, do idioma inglês *Electron Ionization*

ELISA – Ensaio imunoenzimático, do idioma inglês *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*

ESI – Ionização por eletronebulização, do idioma inglês *Electrospray Ionization*

UE – União Européia

EUA – Estados Unidos da América

FAO – Organização do Alimento e Agricultura, do idioma inglês *Food and Agriculture Organization*

FID – Detector por ionização em chama, do idioma inglês *Flame Ion Detector*

GC- Cromatografia gasosa, do idioma inglês *Gas Chromatography*

IARC – Agência Internacional para pesquisa sobre o câncer, do idioma inglês *International Agency For Research On Cancer*

INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial

ITD – Detector por armadilha de íons, do idioma inglês *Ion Trap Detector*

LC – Cromatografia Líquida, do idioma inglês *Liquid Chromatography*

LLE – Extração líquido-líquido, do idioma inglês *Liquid-Liquid Extraction*

LMR – Limite máximo de resíduo

LOD – Limite de detecção, do idioma inglês *Limit of Detection*

LODm - Limite de detecção do método

LODi - Limite de detecção do instrumento

LOQ – Limite de quantificação, do idioma inglês *Limit of Quantitation*

LOQm – Limite de quantificação do método

LOQi – Limite de quantificação do instrumento

LPME - Microextração em fase líquida, do idioma inglês *Liquid Phase Micro Extraction*

m/z – Razão massa/carga, do idioma inglês *Mass to Charge Ratio*

MRM – Monitoramento de reações múltiplas, do idioma inglês *Multiple Reaction Monitoring*

MS – Espectrometria de massas, do idioma inglês *Mass Spectrometry*

MS/MS – Espectrometria de massas em série, do idioma inglês *Tandem Mass Spectrometry*

n.d. – Não detectado

NIV – Micotoxina Nivalenol

NCI – Ionização química no modo negativo, do idioma inglês *Negative Chemical Ionization*

n.q. – Não quantificado

PEG – Polietilenoglicol

PCI – Ionização química no modo positivo, do idioma inglês *Positive Chemical Ionization*

PFTE – Politetrafluoretileno

pH – Potencial hidrogenoiônico

P.I.I. – Padrão interno do instrumento

P.I.P.– Padrão interno do procedimento

QuEChERS – *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*. Em português: Rápido, fácil, econômico, efetivo, robusto e seguro.

r^2 - Coeficiente de determinação

Rf - Radiofrequência

RSD – Desvio padrão relativo, do idioma inglês *Relative Standard Deviation*

SANCO – Saúde dos Consumidores (Direção Geral de Saúde dos Consumidores da Comissão Europeia), do idioma francês *Santé et Consommateur*.

SIM – Monitoramento de íon selecionado, do idioma inglês *Select Ion Monitoring*

SPE – Extração em fase sólida, do idioma inglês *Solid Phase Extraction*

SPME – Micro extração em fase sólida, do idioma inglês *Solid Phase Micro Extraction*

TOF – Detector por tempo de voo, do idioma inglês *Time of Fly*

t_R – Tempo de retenção

UPLC – Cromatografia líquida de ultra eficiência, do idioma inglês *Ultra Performance Liquid Chromatography*

UPLC-MS – Cromatografia Líquida de ultra eficiência acoplada a Espectrometria de Massas, do idioma inglês *Ultra Performance Liquid Chromatography- Mass Spectrometry*

UV - Ultravioleta

UV-Vis – Ultravioleta/visível

NVWA – Autoridade em segurança alimentar e do consumidor, do idioma Holandês, *Nederlandse Voedsel en Warenautoriteit*.

ZEN – Micotoxina Zearalenona

ZAN – Micotoxina Zearalanona

LISTA DE APÊNDICES

APÊNDICE 1 – Estrutura química, fórmula molecular e massa molecular de cada uma das micotoxinas estudadas.	135
APÊNDICE 2 – Determinação da linearidade das curvas analíticas.	141
APÊNDICE 3 – Avaliação da exatidão do método analítico.	142

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	27
1.1 Objetivos.....	29
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	30
2.1 A videira e a uva	30
2.1.1 Estrutura do cacho de uva e propriedades adicionadas ao vinho	30
2.1.1.1 Caule	30
2.1.1.2 Pele	31
2.1.1.3 Leveduras	31
2.1.1.4 Polpa	32
2.1.1.5 Sementes	32
2.2 Vinho.....	33
2.2.1 Histórico	33
2.2.3 Produção mundial	35
2.2.4 Vinhos no Brasil	36
2.2.4.1 História do vinho no Brasil	36
2.2.4.2 Produção de vinho no Brasil.....	38
2.3 Micotoxinas.....	41
2.3.1 Histórico	43
2.3.2 Modos de exposição e efeitos gerais observados.....	44
2.3.3 Principais gêneros de fungos micotoxigênicos.....	45
2.3.4 Principais micotoxinas.....	46
2.3.4.1 Aflatoxinas	46
2.3.4.2 Ocratoxina	47
2.3.4.3 Tricotecenos	48
2.3.4.4 Fumonisinias	49
2.3.4.5. Zearalenona (ZEN)	49
2.3.4.6. Ácido Penicílico	50
2.3.4.7. Citrinina	50
2.3.4.8. Roquefortina e Ácido Micofenólico	50
2.3.4.9 Ergocalcólides	51

2.3.4.10	Ácido Ciclopiazônico (CPA)	52
2.3.4.11	Esterigmatocistina	52
2.3.4.12	Altenariol	53
2.4	Determinação de micotoxinas	53
2.4.1	Métodos de extração de micotoxinas	54
2.4.2	Técnicas de determinação de micotoxinas	56
2.4.2.1	Cromatografia líquida	57
2.4.2.1.1	Espectrometria de massas	58
2.4.2.2	Determinação de micotoxinas por cromatografia líquida	69
2.4.2.2.1	Determinação de micotoxinas por cromatografia líquida acoplada a detectores convencionais	69
2.4.2.2.2	Determinação de micotoxinas por cromatografia líquida acoplada espectrometria de massas	70
2.5	Validação de métodos analíticos	71
2.5.1	Linearidade e curva analítica	72
2.5.2	Seletividade	72
2.5.3	Limites de detecção e de quantificação	73
2.5.4	Exatidão	73
2.5.5	Precisão	74
3	MATERIAIS E MÉTODOS	76
3.1	Instrumentação	76
3.2	Materiais	77
3.3	Gases, solventes e reagentes	77
3.4	Micotoxinas selecionadas	78
3.5	Preparo das soluções analíticas	78
3.6	Avaliação e armazenamento das amostras branco	82
3.7	Desenvolvimento, otimização e validação do método multirresíduo	82
3.7.1	Condições cromatográficas	82
3.7.2	Seleção do padrão interno	85
3.7.3	Análise da pureza dos solventes, reagentes e água	85

3.7.4 Experimentos para otimização do procedimento de extração e purificação.....	85
3.7.4.1 Estudo do volume da matriz (amostra de vinho tinto).....	86
3.7.4.2 Purificação do extrato e tamponamento do meio reacional.....	87
3.7.5 Validação do método.....	90
3.7.5.1 Curva analítica e linearidade.....	90
3.7.5.2 Avaliação do efeito matriz.....	90
3.7.5.2 Limite de detecção e limite de quantificação.....	91
3.7.5.3 Procedimento de fortificação e recuperação.....	92
3.8 Aplicação do método desenvolvido e validado.....	94
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	95
4.1 Padrões internos selecionados.....	95
4.2 Análise da pureza dos solventes, reagentes e água.....	95
4.3 Experimentos de otimização.....	95
4.3.1 Quantidade de amostra.....	95
4.3.2 Purificação do extrato e tamponamento do meio.....	99
4.3.2.1 Tamponamento do meio com ácido fórmico e formiato de amônio e purificação com adsorventes C18, Oasis HLB [®] , Absolut Nexus [®] , Carbono Grafitizado (CG) e ChloroFiltr [®] (CF).	99
4.3.2.2 Acidificação do meio com ácido acético e purificação com adsorventes C18, Carbono Grafitizado (CG), Florisil e ChloroFiltr [®] (CF).	104
4.4 Validação do método.....	109
4.4.1 Curva analítica e linearidade.....	109
4.4.2 Efeito Matriz.....	113
4.4.3 Limite de detecção e limite de quantificação.....	119
4.4.4 Fortificação e Recuperação.....	123
4.4.5 Aplicação do método desenvolvido e validado.....	125
5 CONCLUSÕES.....	126
6 REFERÊNCIAS.....	128
APÊNDICE 1.....	135

APÊNDICE 2 – Determinação da linearidade das curvas analíticas. 141

APÊNDICE 3 – Avaliação da exatidão do método analítico..... 142

1 INTRODUÇÃO

A contaminação de alimentos pelo uso intencional de produtos químicos, como pesticidas, bifenilas policloradas ou medicamentos veterinários, é uma preocupação de saúde pública mundial e um assunto amplamente discutido. No entanto, a contaminação dos alimentos devido a substâncias tóxicas naturais, como micotoxinas, também pode comprometer a segurança dos alimentos e prejudicar a saúde de seres humanos e dos animais (GONZÁLEZ *et al.*, 2010).

As micotoxinas são metabólitos secundários tóxicos naturais produzidos por diversas espécies de fungos filamentosos, tais como *Fusarium*, *Aspergillus* e *Penicillium* (GONZÁLEZ *et al.*, 2010; CAST, 2003).

Segundo NELSON & COX (2002) os metabólitos secundários são compostos orgânicos que não estão diretamente envolvidos nos processos de crescimento, desenvolvimento e reprodução dos organismos e ao contrário dos metabólitos primários, sua ausência não resulta na morte imediata dos mesmos. A longo prazo, em alguns casos, a sua ausência pode afetar a sobrevivência, fecundidade e estética do organismo. Os metabólitos secundários têm, frequentemente, um papel importante na defesa dos vegetais contra a herbivoria e outras defesas inter-espécies.

Segundo estudos, mais de trezentas diferentes espécies de micotoxinas já foram descobertas, as aflatoxinas são as mais predominantes, produzidas por espécies de *Aspergillus*; ocratoxina A e patulina produzidas tanto por espécies de *Aspergillus* como por espécies de *Penicillium*; e as toxinas provenientes de fungos da espécie *Fusarium*, como o desoxinivalenol, zearalenona, T-2 e HT-2 toxinas, e fumonisinas. Estes compostos podem ser encontrados em vários alimentos como cereais, café, sucos, leite, cerveja, vinho, entre outros (GONZÁLEZ *et al.*, 2010; CAST, 2003).

Recentemente as micotoxinas têm sido consideradas como um dos fatores de risco mais importantes na dieta, inclusive superiores aos contaminantes sintéticos, toxinas de plantas, aditivos alimentares e resíduos de pesticidas. Devido aos riscos para a saúde de seres humanos e dos animais, as organizações internacionais vêm estabelecendo, de maneira cada vez mais rigorosa, limites máximos de resíduos de

micotoxinas em alimentos a fim de garantir a segurança alimentar de seus consumidores (GONZÁLEZ *et al.*, 2010).

Nesse contexto, ou seja, de alta contaminação de alimentos vegetais em sua ampla variedade devido ao uso indiscriminado de pesticidas e ao desenvolvimento de fungos produtores de micotoxinas, faz-se necessário o desenvolvimento de métodos analíticos confiáveis e precisos que permitam identificar e quantificar esses contaminantes de maneira inequívoca, a nível residual. Dessa forma, se terá segurança no cumprimento da legislação vigente tanto em nosso país quanto nos países com os quais o Brasil tem relacionamentos comerciais de alimentos (importação ou exportação).

1.1 Objetivos

O presente trabalho teve como objetivo principal o desenvolvimento e a validação de um método multirresíduo para determinação simultânea de 36 micotoxinas em amostras de vinho tinto. O procedimento de preparação das amostras envolveu a otimização e modificação do método QuEChERS - *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe* (em idioma português Rápido, fácil, econômico, efetivo, robusto e seguro).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A videira e a uva

A uva é o fruto da videira, também chamada de vinha ou parreira, a qual é uma trepadeira da família *vitaceae*, que engloba cerca de mil espécies que se encontram espalhadas pelo globo terrestre. Essas plantas são cultivadas em regiões de clima preferencialmente temperado.

A videira pertence ao tipo de plantas denominadas Fanerogâmicas (com órgãos bem diferenciados e produtores de flor), ao subtipo das Angiospermas (plantas em que o gineceu possui estigma e os óvulos estão encerrados em ovários), à classe das Dicotiledôneas (com dois cotilédones), ao grupo das Dialipétalas (com coroa com pétalas livres), subgrupo das Superovarianas (ovários súperos) e à família *vitaceae* (coroa caduca e em que o fruto é uma baga, trepadeiras e com gavinhas) (PIRES, 2010).

Esta família compreende 14 gêneros, sendo o mais conhecido, o gênero *Vitis*, originário das zonas temperadas do hemisfério norte (América, Europa e Ásia). O gênero *Vitis* está dividido em dois subgêneros: *Euvitis* e *Muscadinia*, ambos utilizados na produção de vinhos (SILVA, 2004).

2.1.1 Estrutura do cacho de uva e propriedades adicionadas ao vinho

A uva colhida é composta por caule, pele, leveduras, polpa e sementes. Cada uma dessas partes que participam do processo de fermentação conferem ao vinho, obtido no final do processo, características muito específicas.

2.1.1.1 Caule

O caule contém taninos que podem conferir um sabor amargo ao vinho. Em determinado caso, o enólogo pode retirá-lo completamente antes de proceder o esmagamento das uvas. Alternativamente, os caules, ou uma pequena parte deles, é mantido durante o processo de fermentação, o que pode aumentar o tanino do

vinho tinto, conferindo uma característica extra no sabor e tornando-o mais encorpado (GRAINGER & TATTERSALL, 2005).

2.1.1.2 Pele

A pele da uva contém corantes, compostos de aroma, sabor e taninos. A camada exterior de cera com a sua tonalidade esbranquiçada é chamada flor. Esta parte contém leveduras e bactérias naturalmente presentes na estrutura da pele (GRAINGER & TATTERSALL, 2005).

Abaixo desta, encontram-se mais camadas contendo substâncias complexas chamadas polifenóis, que podem ser divididas em dois grupos:

(a) As antocianinas, presentes nas uvas pretas e flavonas, encontradas nas uvas brancas, conferem às uvas sua cor. Compostos fenólicos biflavanóides dão origem aos oxidantes, conferindo as propriedades saudáveis ao vinho (GRAINGER & TATTERSALL, 2005).

(b) Os taninos são compostos amargos que também são encontrados em caules e peles. As concentrações de tanino são mais elevadas em vinhos tintos, onde a pele das uvas é usada no processo de fermentação. Algumas variedades de uvas, como por exemplo a Gamay, apresenta concentrações de tanino muito mais baixas (GRAINGER & TATTERSALL, 2005). Essa variação nos níveis de tanino irá refletir no sabor e aroma final do vinho produzido, o qual será muito bem caracterizado por sua variedade e região de produção.

2.1.1.3 Leveduras

As leveduras são microorganismos de ocorrência natural e são essenciais no processo de fermentação das uvas. Há dois grupos básicos de leveduras presentes na pele das uvas: leveduras selvagens e leveduras de vinho (GRAINGER & TATTERSALL, 2005).

As leveduras selvagens (na maior parte do gênero *Klöckera Hanseniaspora*), precisam de oxigênio para o seu desenvolvimento. Uma vez em contato com os açúcares da uva, podem converter esses açúcares em álcool. Porém, consegue alcançar aproximadamente 4% de álcool por volume, ponto em que perdem sua atividade de conversão e morrem (GRAINGER & TATTERSALL, 2005).

As leveduras de vinho, do gênero *Saccharomyces*, assumem o processo de fermentação iniciado pelas leveduras selvagens e continuam a trabalhar na conversão dos açúcares em álcool até que todo açúcar seja consumido ou se alcance um teor alcoólico de aproximadamente 15%, ponto em que as leveduras de vinho morrem naturalmente (GRAINGER & TATTERSALL, 2005).

2.1.1.4 Polpa

A polpa contém o suco da uva. O suco da uva real é quase incolor, com raras exceções. A polpa contém água, açúcares, ácidos de frutas, proteínas e minerais (GRAINGER & TATTERSALL, 2005).

a) Açúcares: quando verdes, todas as frutas contêm uma alta concentração de ácidos e baixos níveis de açúcar. Com o amadurecimento do fruto, há alterações no equilíbrio açúcar/ácido e os níveis de açúcar sobem e a acidez diminui. Os açúcares da uva são representados principalmente por frutose e glicose. A sacarose, embora presente em folhas e tubos do floema da videira, não tem presença significativa na polpa da uva (GRAINGER & TATTERSALL, 2005).

b) Ácidos: os ácidos mais importantes encontrados nas uvas são o ácido tartárico e málico. O ácido málico está presente em maior proporção nas uvas verdes e durante o amadurecimento do fruto seu nível diminui e passa a predominar o ácido tartárico (GRAINGER & TATTERSALL, 2005).

Os ácidos têm um papel importante no vinho, conferindo o sabor refrescante. Outros ácidos presentes nas uvas, que incluem o ácido acético e o ácido cítrico, mesmo em pequenas quantidades, ajudam a estabilizar o vinho acabado, o que permite sua longevidade (GRAINGER et al, 2005).

c) Minerais: potássio, cálcio e magnésio são os principais minerais presentes nas uvas (GRAINGER & TATTERSALL, 2005).

2.1.1.5 Sementes

As sementes variam em tamanho e formato de acordo com a variedade da uva. Se esmagadas, podem conferir adstringência ao vinho, devido aos seus óleos e taninos amargos (GRAINGER & TATTERSALL, 2005).

2.2 Vinho

O vinho é, por definição, a bebida obtida da fermentação alcoólica do mosto simples de uvas sadias, frescas e maduras. (FILHO, 2010).

Durante a fermentação das uvas, microorganismos denominados leveduras convertem os açúcares que se encontram na polpa, produzindo álcool e dióxido de carbono. O produto dessa fermentação, denominado vinho, é constituído por aproximadamente de 85% a 89% de água, 10% a 14% de etanol, menos de 1% de ácidos de frutas e centenas de compostos presentes em pequenas quantidades que conferem características únicas ao aroma e sabor do vinho (SILVA, 2004).

A fermentação alcoólica do mosto de uva, algo completamente empírico no passado, tornou-se uma das mais fortes áreas da pesquisa agroindustriais e muito atraentes sob o ponto de vista econômico. Dentro deste contexto, a viticultura e a enologia estudam vários aspectos para a melhoria da produção de vinhos, que envolve desde a seleção das melhores variedades de videiras; os processos de vinificação; o uso de microorganismos para a fermentação; os cuidados para a obtenção da bebida final; a sua estabilização; o seu engarrafamento e a venda do produto final, o vinho (FILHO,2010).

2.2.1 Histórico

Constatações de historiadores em todo mundo levam a crer que o processo de vinificação é tão antigo quanto à própria civilização (CHARTERS, 2006; TNYT, 2007; JACKSON, 2008).

Assim como a sociedade encontra suas raízes na antiga Mesopotâmia, as primeiras evidências que há para o cultivo de uvas e a fermentação supervisionada de seus sucos remonta a 6000 a.C., no antigo Oriente Médio (CHARTERS, 2006; TNYT, 2007; JACKSON, 2008).

Os egípcios registraram a colheita de uvas nas paredes de seus túmulos e garrafas do mesmo vinho foram enterradas com os faraós, a fim de que eles pudessem entreter os convidados em vida após a morte. O vinho também foi considerado uma bebida da elite na Grécia antiga, e foi uma peça central do

simpósio famoso, imortalizado por Platão e pelos poetas do período (CHARTERS, 2006; TNYT, 2007; JACKSON, 2008).

Mas foi durante a época romana que o vinho se tornou popular em toda a sociedade. Em cidades romanas, bares de vinho foram criados em quase todas as ruas e os romanos exportavam vinho para toda a Europa. A produção e qualidade do vinho vindo de outras regiões rivalizava-se com o de Roma, o que aquecia o comércio (CHARTERS, 2006; TNYT, 2007; JACKSON, 2008).

Após a queda de Roma, o vinho continuou a ser produzido no Império Bizantino no leste do Mediterrâneo. Espalhou-se para o leste da Ásia Central ao longo da Rota da seda (CHARTERS, 2006; TNYT, 2007; JACKSON, 2008).

A propagação do Islã em grande parte extinguiu a indústria do vinho na África do Norte e Oriente Médio. Em toda a Europa, a vinificação tornou-se o principalmente negócio de mosteiros, devido à necessidade do vinho para realização dos sacramentos cristãos. Neste período, os vinhos mais encorpados e fortes surgiram e substituíram seus antecessores, que eram mais doces (normalmente diluídos em água antes de beber) (CHARTERS, 2006; TNYT, 2007; JACKSON, 2008).

Durante o Renascimento, em virtudes do maior número de apreciadores de vinhos que demandavam por vinhos cada vez mais sofisticados, várias regiões vinícolas passaram a se desenvolver. Por volta do século XVIII o comércio do vinho aumentou, especialmente na França, a qual se tornou o *Bordeaux* produtor proeminente de vinhos finos. O desenvolvimento de diferenciados tipos de uvas em cada região levou à produção de vinhos regionais com características facilmente reconhecíveis (CHARTERS, 2006; TNYT, 2007; JACKSON, 2008).

No Novo Mundo o sucesso da primeira vinificação comercial ocorreu apenas no século XIX. Surpreendentemente, Ohio (EUA) foi a primeira região da América do Norte a cultivar uvas para produção de vinho com sucesso, mas logo foi derrubada pela maior produção de vinho na Califórnia (EUA) (CHARTERS, 2006; TNYT, 2007; JACKSON, 2008).

Nesse mesmo contexto, no Velho Mundo, a Champagne (antiga província Francesa) estava se estabelecendo como a bebida de luxo favorita e os vinhos fortificados (geralmente com conhaque), como os do Porto (provenientes da região demarcada do Douro, no norte de Portugal), foram se tornando cada vez mais populares, especialmente no Reino Unido.

Hoje, a vinificação é uma indústria global amplamente desenvolvida e encontra-se presente na maioria dos países do mundo. Máquinas que podem colher grandes áreas de dia ou de noite, aumentaram a produção, e a ciência moderna voltada à viticultura tem assegurado que o produto resultante atenda a padrões uniformes, o que em alguns casos, resulta em perdas na qualidade do sabor (CHARTERS, 2006; TNYT, 2007; JACKSON, 2008).

2.2.3 Produção mundial

Segundo dados publicados pela Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO), os cinco maiores produtores de vinho são Itália, França, Espanha, Estado Unidos e China. A Tabela 1 mostra os 20 países pioneiros na produção de vinho e os volumes produzidos em 2011. Os dados colhidos mostram uma produção mundial total de cerca de 28 milhões de toneladas de vinho, sendo que, os dez maiores países produtores são responsáveis por mais de 80% desse total. (FAO, 2011).

Tabela 1 – Relação em ordem decrescente dos vinte maiores países produtores de vinho no mundo.

Posição	País	Produção (toneladas)
1	Itália	4.994.940
2	França	4.630.800
3	Espanha	3.250.610
4	Estados Unidos	2.231.600
5	China	1.580.000
6	Argentina	1.213.550
7	Austrália	1.178.440
8	África do Sul	1.050.000
9	Chile	986.935
10	Alemanha	950
11	Romênia	610
11	Portugal	610
13	Rússia	501
14	Grécia	425
15	Brasil	340
16	Hungria	323.61
17	Áustria	235.188
18	Ucrânia	231
19	Sérvia	202.368
20	Nova Zelândia	200

FONTE: FAO, 2011

2.2.4 Vinhos no Brasil

2.2.4.1 História do vinho no Brasil

A história do vinho no Brasil iniciou-se com o próprio descobrimento, em 1500, pelo navegador português Pedro Álvares Cabral. Estudos indicam que as treze caravelas que partiram de Portugal carregavam, pelo menos, 65 mil litros de vinho para consumo dos marinheiros (Vinhos do Brasil, 2011).

As primeiras videiras foram introduzidas no Brasil por Martim Afonso de Sousa, em 1532, na capitania de São Vicente (composta por territórios dos estados de São Paulo, Rio de Janeiro e Paraná, no Brasil). As videiras, que posteriormente se espalharam por outras regiões do Brasil, eram da qualidade *Vitis vinifera* (ou

seja, adequadas para a produção de vinho), provenientes de Portugal e da Espanha (www.vinhosdobrasil.com.br).

No mesmo ano, o fundador da cidade de Santos (São Paulo, Brasil), o explorador português Brás Cubas, foi o primeiro a tentar cultivar videiras de forma mais ordenada. No entanto, da mesma forma que a tentativa precedente, não obteve muito êxito. Em parte, o insucesso da produção de vinhos deu-se pelo protecionismo comercial exercido por Portugal, tendo a corte, inclusive, proibido o cultivo de uvas, em 1789 (Vinhos do Brasil, 2011).

No Rio Grande do Sul, as primeiras videiras foram introduzidas pelos padres jesuítas ainda em 1626, posto que necessitavam do vinho para os rituais da missa católica. A introdução de videiras européias se deu com a chegada dos imigrantes alemães, que obtiveram bons resultados em solo gaúcho (Vinhos do Brasil, 2011).

A vitivicultura gaúcha teve um grande impulso a partir de 1875, com a chegada de imigrantes italianos, que aportaram com videiras trazidas principalmente da região do Vêneto (Itália) - e uma forte cultura de produção e consumo de vinhos. Apesar do sucesso inicial, as videiras finas não se adaptaram ao clima úmido tropical e foram dizimadas por doenças fúngicas. Porém, com a adoção da variedade Isabel, então cultivada pelos colonos alemães no Vale do Rio dos Sinos (Rio Grande do Sul, Brasil) e no Vale do Caí (Rio Grande do Sul, Brasil), deu-se continuidade à produção de vinhos que, embora de qualidade não definida, espalhou-se para outras regiões do país, tornando-se base do desenvolvimento da vitivicultura no Rio Grande do Sul (RS, Brasil) e em São Paulo (SP, Brasil) (Vinhos do Brasil, 2011).

Mas foi somente a partir da década de 1990 que vinhos de melhor qualidade passaram a ser produzidos no Brasil, através da profissionalização crescente e a adaptação de uvas finas (uvas do gênero *Vitis vinifera*) ao clima peculiar da Serra Gaúcha. Atualmente, a região produz vinhos de qualidade bastante satisfatória e crescente (Vinhos do Brasil, 2011).

Outra região que está em amplo desenvolvimento e a firmando-se como produtora de vinhos é a do Vale do São Francisco, situado nos estados de Pernambuco e Bahia (Brasil). A viticultura, como em todas as outras regiões nas quais se instalou, tornou-se fundamental para o desenvolvimento da região nordeste, pois devido às características climáticas desse local esta região é a única

do mundo a produzir vinhos de qualidade, provenientes de duas colheitas por ano (Vinhos do Brasil, 2011).

2.2.4.2 Produção de vinho no Brasil

Dados históricos revelam que a primeira introdução da videira no Brasil foi feita pelos colonizadores portugueses em 1532, através de Martin Afonso de Souza, na então Capitania de São Vicente, hoje Estado de São Paulo. A partir deste ponto e através de introduções posteriores, a viticultura expandiu-se para outras regiões do país, sempre com cultivares de *Vitis vinifera* procedentes de Portugal e da Espanha (MELLO *et al.*, 2002; MELLO, 2012).

As primeiras décadas do século XIX, com a importação das uvas americanas procedentes da América do Norte, foram introduzidas as doenças fúngicas que levaram a viticultura colonial à decadência. A cultivar Isabel passou a ser plantada nas diversas regiões do país, tornando-se a base para o desenvolvimento da vitivinicultura comercial nos Estados do Rio Grande do Sul e de São Paulo (MELLO *et al.*, 2002; MELLO, 2012).

Mais tarde, a partir do início do século XX, o panorama da viticultura paulista mudou significativamente com a substituição da Isabel por Niágara e Seibel. No Estado do Rio Grande do Sul, foi incentivado o cultivo de castas viníferas através de estímulos governamentais. Nesse período a atividade vitivinícola expandiu-se para outras regiões do sul e sudeste do país, sempre em zonas com período hibernal definido e com o predomínio de cultivares americanas e híbridas. Entretanto, na década de 70, com a chegada de algumas empresas multinacionais na região da Serra Gaúcha e da Fronteira Oeste (município de Santana do Livramento), verificou-se um incremento significativo da área de parreirais com cultivares *V. vinifera* (MELLO *et al.*, 2002; MELLO, 2012).

A viticultura tropical brasileira foi efetivamente desenvolvida a partir da década de 1960, com o plantio de vinhedos comerciais de uva de mesa na região do Vale do Rio São Francisco, no nordeste semi-árido brasileiro. Nos anos 70 surgiu o pólo vitícola do Norte do Estado do Paraná e na década de 1980 desenvolveram-se as regiões do Noroeste do Estado de São Paulo e de Pirapóra no Norte de Minas Gerais, todas voltadas à produção de uvas finas para consumo *in natura*. Iniciativas

mais recentes, como as verificadas nas regiões Centro-Oeste (Estados do Mato Grosso, Mato Grosso do Sul e Goiás) e Nordeste (Bahia e Ceará), permitem que se projete um aumento significativo na atividade vitivinícola nos próximos anos (MELLO *et al.*, 2002; MELLO, 2012).

A vitivinicultura é uma atividade importante para a sustentabilidade da pequena propriedade no Brasil. Nos últimos anos, tem se tornado importante, também, na geração de emprego em grandes empreendimentos, que produzem uvas de mesa e uvas para processamento. A Figura 1 traz um panorama da distribuição da produção de vinhos no Brasil (MELLO *et al.*, 2002; MELLO, 2012).



Figura 1 – Mapa da produção de vinho no Brasil. (Enciclopédia do vinho, 2012)

No Rio Grande do Sul (RS, Brasil) concentra-se mais de 90% da produção vinícola do país e é onde se encontram as melhores vinícolas brasileiras. A maior parte destas vinícolas está localizada na Serra Gaúcha região de montanha ao

nordeste do estado, destacando-se as cidades de Bento Gonçalves, Garibaldi e Caxias do Sul, seguidas por Flores da Cunha, Farroupilha e Canela. Essa região representa a maior região vitícola do país, com 50.646 hectares de vinhedos, segundo dados de 2011 da Embrapa Uva e Vinho. O restante é produzido em Erechim, no noroeste do estado; Jaguari, no sudoeste; Viamão e São Jerônimo, no centro-leste; Bagé, Dom Pedrito, Pinheiro Machado e Santana do Livramento, no extremo sul (Enciclopédia do vinho, 2012).

A agroindústria do vinho nacional, centrada no Rio Grande do Sul, assumiu historicamente a liderança da produção e abastecimento da demanda do mercado interno brasileiro. Mais recentemente, especialmente a partir da década de 70, começaram a ocorrer investimentos com a implantação e/ou modernização das vinícolas (setor industrial), motivados por um mercado interno com potencial para produtos de melhor qualidade (vinhos finos) e de maior preço (MELLO *et al.*, 2002; MELLO, 2012).

O nível tecnológico utilizado no processo de elaboração dos vinhos finos pelo setor agroindustrial nacional é comparável àqueles existente nos países de vitivinicultura avançada, enquanto que na elaboração de vinhos de consumo corrente nem sempre se verifica essa evolução tecnológica (MELLO *et al.*, 2002; MELLO, 2012).

Como consequência dessa realidade, os vinhos finos nacionais têm apresentado uma grande evolução qualitativa, reconhecida nacional e até internacionalmente, haja visto o bom desempenho de algumas vinícolas brasileiras em concursos internacionais de vinhos, enquanto que com os vinhos de consumo corrente, independentemente das características e do menor potencial enológico da matéria-prima utilizada, o mesmo não se tem verificado. Para estes últimos, há necessidade de maiores investimentos em tecnologia de produção, tanto no campo como na agroindústria (MELLO *et al.*, 2002; MELLO, 2012).

Ainda na região sul, em Santa Catarina, a vitivinicultura apresenta expressão econômica principalmente na Região do Vale do Rio do Peixe, a viticultura desta região ocupa uma área de 5.000 ha. No Paraná, a viticultura está concentrada na Região Norte do estado (MELLO *et al.*, 2002; MELLO, 2012).

No Estado de São Paulo, destacam-se dois pólos vitícolas: um na Região Noroeste (Regional Agrícola de Jales), e outro na Região Leste (Regionais Agrícolas de Campinas, Itapetininga e Sorocaba). No Estado de Minas Gerais também se

destacam dois pólos produtores, um ao sul composto pelos municípios de Caldas, Andradas e Santa Rita de Caldas e outro ao norte, no município de Pirapóra (MELLO *et al.*, 2002; MELLO, 2012).

A Região do Vale do São Francisco, situada no trópico semi-árido brasileiro, trata-se da principal região vitícola tropical do Brasil, que segundo dados de 2011 da Embrapa Uva e Vinho, possui cerca de 9.700 hectares de vinhedos distribuídos nos Estados de Pernambuco e Bahia. Essa região representa uma importante região produtora de vinhos finos e de qualidade no Brasil (MELLO *et al.*, 2002; MELLO, 2012).

2.3 Micotoxinas

O termo micotoxinas é composto pela palavra grega *mikes*, que significa fungo e da palavra latina *toxicum*, que significa veneno. As micotoxinas são definidas como metabólitos secundários tóxicos produzidos sob condições ambientais adequadas por fungos filamentosos, principalmente *Aspergillus spp.*, *Penicillium spp.* e *Fusarium spp.* (JESTOI, 2008).

Por centenas de anos têm-se observado as diferentes alterações que ocorrem no sabor e na qualidade dos alimentos devido ao crescimento de fungos. Algumas dessas transformações são desejáveis e mesmo necessárias a alguns alimentos. Todavia, em muitos casos, os fungos podem causar transformações indesejáveis aos alimentos, produzindo sabores e odores desagradáveis. A decomposição que ocorre nos alimentos *in natura* e produtos alimentícios nem sempre se caracteriza apenas a nível organoléptico, mas pode, eventualmente, acarretar consequências danosas e prejudiciais à saúde do homem e dos animais (SCUSSEL, 1998).

Estes fungos se multiplicam no alimentos quando as condições são favoráveis. A temperatura, a umidade ambiente e as características intrínsecas dos alimentos (nutrientes, acidez, presença de conservantes antimicrobianos, entre outras) são os principais fatores que controlam o desenvolvimento de fungos e a produção de micotoxinas nos alimentos (FRANCO & COZZOLINO, 2010).

Essas toxinas figuram entre os contaminantes mais comuns de muitos grãos e alimentos processados, podendo adicionar ao alimento uma ampla gama de características tóxicas, incluindo carcinogenicidade, neurotoxicidade, bem como a

toxicidade reprodutiva e do desenvolvimento. Por estas razões, as micotoxinas representam um risco à saúde dos seres humanos e animais (JESTOI, 2008). O estudo das micotoxinas incluindo a sua detecção, biossíntese e toxicologia aliadas ao estudo sobre a epidemiologia e controle dos fungos que as produzem são de fundamental importância para manutenção de um abastecimento seguro de alimentos a população (CAST, 2003).

O número total de micotoxinas existentes ainda não é estimado precisamente, mas acredita-se que existem milhares de metabólitos potencialmente tóxicos dos fungos, sendo que alguns desses têm influência comprovada no desenvolvimento de doenças (CAST, 2003). Porém, é difícil estimar o número real deles que estão envolvidos na ocorrência de micotoxicoses devido à diversidade de seus efeitos tóxicos tanto em humanos quanto em animais (JESTOI, 2008).

A diversidade química das micotoxinas já conhecidas representa uma das maiores dificuldades para o desenvolvimento das técnicas de análises. Muitos dos métodos existentes apresentam de algumas limitações, tais como altos limites de detecção e baixa recuperação ou ainda problemas relacionados à repetibilidade nos resultados das análises (JESTOI, 2008).

Além disso, conhecer a ocorrência e distribuição de toxinas em alimentos e rações animais é importante porque a exposição a agentes bioativos desconhecidos pode ser um importante fator de confusão nas tentativas para explicar a etiologia da doenças crônicas em animais e seres humanos (CAST, 2003).

Qualquer avaliação de riscos dos efeitos crônicos das micotoxinas no homem e nos animais necessita de métodos analíticos com detectabilidade suficiente que permita determinação de baixas concentrações de micotoxinas em amostras de alimentos e rações animais. Além disso, os níveis máximos tolerados das micotoxinas que vem sendo impostos pela legislação europeia aumentam a necessidade do desenvolvimento de novos métodos e otimização daqueles já existentes, uma vez que, resultados não confiáveis de um determinado laboratório podem acarretar problemas graves de segurança do alimento e, como consequência, impedimentos das exportações (JESTOI, 2008).

Técnicas de detecção altamente seletivas, tais como a espectrometria de massas (MS), permitem a detecção e identificação de concentrações extremamente baixas de micotoxinas. Além disso, permitem que, métodos para a determinação de

diversas micotoxinas sejam realizados simultaneamente, economizando tempo, custos e na melhor avaliação da co-ocorrência de micotoxinas (JESTOI, 2008).

2.3.1 Histórico

A micotoxicologia moderna avançou muito nos últimos 50 anos, com a descoberta das aflatoxinas, em meados de 1960. Desde aquela época, inúmeras outras micotoxinas foram descobertas, e posteriormente associadas a causas de intoxicações (micotoxicoses). Porém, a história envolvida no desenvolvimento do estudo tão abrangente que se tem hoje a respeito das micotoxinas começou muito antes. (CAST, 2003; JESTOI, 2008).

No final de 1800 até meados de 1900, o conceito de "metabolismo secundário" dos fungos e outros microorganismos começou a ganhar aceitação no meio científico. Neste mesmo período, passou-se a considerar que estes metabólitos não faziam parte dos componentes do corpo do organismo, mas sim, eram geralmente elaborados no "meio" em que o organismo crescia. O conceito de antibiose foi também construído no início dos anos de 1900, tornando possível a descoberta de fungos "antibióticos" (CAST, 2003).

Nesse mesmo contexto, surgiram as primeiras pesquisas que reconheciam que os "metabólitos secundários" de alguns fungos poderiam ser importantes fontes de doenças em animais e seres humanos (CAST, 2003; GOLAN & PASTER, 2008).

A micotoxicose mais antiga reconhecida em seres humanos é o ergotismo, causada pelo fungo parasita de plantas *Claviceps purpurea*. Depois de surtos periódicos na Europa Central, a doença se tornou a epidemia da Idade Média, onde era conhecida como o fogo de Santo Antônio. Os primeiros sintomas do avanço desta doença eram alucinações e membros superiores e inferiores inchados com sensação de queimação, com subsequente necrose levando a perda do mesmo. O ergotismo nesse período foi resultado direto do consumo de produtos feitos com grãos contaminados com as micotoxinas do grupo dos ergocalcóides (CAST, 2003).

O termo micotoxina abrange um grupo relativamente grande de compostos diversos e de ocorrência natural. É incerto o número exato de metabólitos secundários tóxicos existentes. Em 1978, estudos de Turner catalogaram cerca de 1.200 metabólitos secundários produzidos por cerca de 500 espécies de fungos. Pouco tempo depois, em 1983, estudos de Turner em parceria com Alderidge

catalogaram mais cerca de 2.000 metabólitos produzidos por mais de 1.100 espécies de fungos (CAST, 2003; JESTOI, 2008).

Nesse período estimava-se que havia aproximadamente dois únicos metabólitos secundários produzidos por espécies de fungos. Porém, em 1991, Hawksworth trouxe a conhecimento da ciência dados que estimavam a existência de 69 mil espécies conhecidas de fungos, sendo que estas representavam apenas 5% do total de espécies existentes, que ele acreditava ser 1,5 milhões (CAST, 2003).

Com base no trabalho de Hawksworth e a suposição de apenas dois únicos metabólitos secundários por espécies de fungos, calcula-se que possam existir cerca de 3.000.000 tipos de metabólitos secundários. Uma estimativa mais conservadora, porém, não menos assustadora, propõe cerca de 200.000 (CAST, 2003).

2.3.2 Modos de exposição e efeitos gerais observados

A rota usual da exposição dos seres humanos às micotoxinas é através da ingestão de alimentos contaminados. Animais podem sofrer contaminação através da ingestão da ração animal ou de grãos contendo micotoxinas. No entanto, as vias dérmicas e aéreas também podem ser importantes vias de exposição tanto para seres humanos quanto para animais (CAST, 2003).

Os efeitos diretos observados pela exposição às micotoxinas podem variar de doenças agudas à crônicas onde as condições de saúde alteradas, como resultado da exposição à toxina, podem aparecer claramente apenas antes da morte (CAST, 2003).

Além disso, há outras alterações silenciosas porém igualmente perigosas, como retardo de crescimento, imunidade diminuída e diminuição da resistência às doenças. Há ainda as manifestações de doenças crônicas, evidenciadas pelo aparecimento de tumores, que podem resultar da exposição prolongada a pequenas quantidades da toxina (CAST, 2003).

O baixo nível de exposição é de grande preocupação, uma vez que quando há manifestação dos sintomas à contaminação já se processa há algum tempo, podendo ser irreversível em alguns casos. Populações que se alimentam basicamente de um tipo de grão na sua dieta, estão mais sujeitas a esse tipo de contaminação do que populações que consomem maior variedade de alimentos.

(CAST, 2003).

A exposição indireta dos humanos as micotoxinas se dá quando há consumo de alimentos como leite, ovos, produtos processados ou tecidos comestíveis contendo resíduos tóxicos persistentes (CAST, 2003).

2.3.3 Principais gêneros de fungos micotoxigênicos

A grande maioria das micotoxinas conhecidas são produzidas por três gêneros de fungos: *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium* (CAST, 2003).

O gênero *Aspergillus* encontra-se dentro de uma família grande e muito diversa de fungos que são estão distribuídos universalmente, mas que se concentram principalmente nas zona subtropical, com climas quente e temperados (CAST, 2003).

Eles geralmente são considerados como saprófitas e são importantes na reciclagem de nutrientes. Seu crescimento é favorecido em altas temperaturas e baixa atividade de água, o que permite o seu envolvimento no desenvolvimento de uma variedade de culturas (CAST, 2003).

Os membros do gênero *Penicillium* geralmente crescem e produzem micotoxinas em uma ampla gama de temperaturas, em alguns casos, limitadas ao crescimento do gênero *Aspergillus*. Os *Penicillium spp.* são mais abundantes em climas temperados. Os membros deste gênero são mais comumente associados ao armazenamento do que com a contaminação pré-colheita (CAST, 2003).

Fusarium é um dos grandes gêneros complexos, com espécies adaptadas a uma grande variedade de habitats. Estão presentes em todo o mundo e muito são importantes patógenos de plantas (CAST, 2003).

Outros dois gêneros micotoxigênicos importantes são *Claviceps* e *Stachybotrys*. O ergotismo, uma das mais antigas e conhecidas micotoxicoses, é resultado do consumo de grãos contaminados com o esclerócios de *Claviceps spp.* (CAST, 2003).

2.3.4 Principais micotoxinas

Dentre as 36 micotoxinas estudadas, algumas exercem maior importância quanto a pertinência de ocorrência e gravidade na contaminação de alimentos. O Apêndice 1 traz informações com relação a fórmula química, estrutura e peso molecular das micotoxinas estudadas.

2.3.4.1 Aflatoxinas

Por longo tempo, julgou-se que *Aspergillus flavus* fosse o único fungo produtor da aflatoxina, mas atualmente sabe-se que existem outras espécies de *Aspergillus* e até mesmo outros gêneros produtores desta toxina, tais como: *A. parasiticus* (predominante nos países tropicais), *A. Níger*, *A. oryzae*, *A. wentii*, *A.ostianum*, *A. Fumigatus* e *A. frenesii*. Do gênero *Penicillium* temos o *P. puberulum*, *P. citrinium*, *P. Variable* e *P. frequentans* (SCUSSEL,1998).

No entanto, apenas *A. flavus* e *A. parasiticus* são economicamente importantes. Estes dois fungos têm sobreposição de nichos e podem produzir aflatoxina em sementes de amendoim, milho, algodão, amêndoa e pistache. Nozes e castanha do Brasil também são amplamente contaminadas. (CAST, 2003).

As quatro principais aflatoxinas conhecidas são: B1, B2, G1 e G2. (CAST,2003). *A. parasiticus* é o produtor mais ativos das toxinas B1, B2, G1 e G2; já o *A. flavus* produz apenas B1 e G1 (SCUSSEL,1998).

O efeito tóxico causado pelas aflatoxinas pode ser de curta duração, denominado aflatoxicose aguda, ou de longa duração, conhecido como aflatoxiose crônica. As aflatoxinas estão entre os mais potentes compostos carcinogênicos, mutagênicos e teratogênicos na natureza, sendo a aflatoxina B1 listada como um carcinógeno grupo I (isto é, comprovadamente carcinogênico para humanos) pela Agência Internacional para Pesquisa sobre Câncer (IARC) e é apontada como causa primária de carcinoma hepatocelular em humanos (SCUSSEL,1998, GOLAN & PASTER, 2008).

São os mais importantes contaminantes diretos de alimentos e rações e tem sido os mais frequentemente encontrados em alimentos segundo estudos relatam no mundo inteiro (SCUSSEL,1998; CAST,2003). A quantidade de aflatoxinas em

alimentos e rações é acompanhada de perto e regulamentada na maioria dos países. Na União Europeia (UE), os níveis de aflatoxina em várias especiarias (colorau, noz-moscada, etc) são regulados com limites máximos de resíduos (LMR) de menos de 5 ng g⁻¹ para Aflatoxina B1 e 10 ng g⁻¹ para Aflatoxina total. Em amendoins, cereais e alimentos processados destinados ao consumo alimentar direto, o LRM foi fixado em 2 ng g⁻¹ para Aflatoxina B1 e 4 ng g⁻¹ para as Aflatoxinas totais (GOLAN & PASTER, 2008)

2.3.4.2 Ocratoxina

Ocratoxinas são um grupo de metabólitos estruturalmente similares produzidos por *A. ochraceus* e espécies afins, bem como por certas espécies de *Penicillium*. Quanto a estrutura química, as ocratoxinas (A, B e C) são um grupo de compostos que possuem uma β-fenilalanina ligada a uma isocumarina por ligação amida (SCUSSEL, 1998; CAST, 2003).

A micotoxina mais importante neste grupo é Ocratoxina A. Essa toxina é uma nefrotoxina, e sua contaminação está associada ao desenvolvimento de nefropatia com excessiva eliminação de urina, provocando muita sede (CAST, 2003). Também é conhecida por apresentar forte atividade teratogênica em ratos e camundongos (SCUSSEL, 1998). É encontrada principalmente em produtos processados, tais como vinho, café, cereais e cerveja (MAGAN & OLSEN, 2004).

Esta micotoxina tem sido detectada em vinho em concentrações variáveis, embora em regiões do sul da Europa e no Norte da África, concentrações mais elevadas tenham sido detectadas em amostras de vinho tinto (MAGAN & OLSEN, 2004).

Em geral, os vinhos tintos contêm maiores quantidades de ocratoxina A do que os vinhos brancos, o que indica uma clara relação entre o processo de maceração e a presença de Ocratoxina A nos mostos de uvas. Recentemente a Comissão do *Codex Alimentarius* sugeriu que 15% do consumo total de Ocratoxina A nos humanos seja devido ao consumo de vinhos (MAGAN & OLSEN, 2004).

A micotoxinas Ocratoxina A é regulamentada na EU para amostras de vinho, estabelecendo um limite máximo de 2 µg kg⁻¹ para os vinhos produzidos em colheitas a partir de 2005 (UNIÃO EUROPÉIA, 2006).

Essa micotoxina apresenta características nefrotóxicas, neurotóxicas, imunitóxicas, genotóxicas e carcinogênicas. Estudos recentes tem associado a presença de Ocratoxina a ocorrência de câncer no trato urinário, câncer de testículo e aberrações cromossômicas pela ingestão de 1 µg/kg por dia, durante 45 dias (MAGAN & OLSEN, 2004).

2.3.4.3 Tricotecenos

Os tricotecenos são uma família de cerca de 150 compostos estruturalmente relacionados, produzidos por vários gêneros de fungos, entre eles, *Cephalosporium*, *Myrothecium*, *Stachybotrys*, *Trichoderma* e *Fusarium* (SCUSSEL,1998).

Esses compostos possuem a mesma estrutura química básica (sesquiterpeno), mas diferem quanto aos grupos substituintes em algumas posições (SCUSSEL,1998).

Observa-se algumas ocorrências de tricotecenos em alimentos e rações, os quais são produzidos na sua maioria por espécies *Fusarium*. Entre estas toxinas estão, desoxinivalenol (DON) (também conhecido como *Vomitoxina*), toxina T-2, nivalenol (NIV) e Fusarenona X (CAST,2003; SCUSSEL,1998).

A contaminação natural de milho e trigo com DON foi relatada em alguns estudos em diversas colheitas. Já, nos Estados Unidos, a contaminação natural de alimentos e rações por toxina T-2 raramente tem sido relatada, sendo mais comum em grãos na Europa o que tem chamado atenção para o estudo da toxicologia desta toxina (CAST, 2003).

Na micotoxicose aguda observada em animais, estas toxinas afetam os centros de produção do sangue, causando danos no sistema nervoso, no trato gastrointestinal e cardiovascular. Causam hemorragias ao redor e dentro da boca, reto, na mucosa do intestino delgado e estômago, seguindo-se de gastroenterite. (SCUSSEL,1998).

No ser humano, o evenenamento por tricotecenos foi correlacionado com uma doença chamada Alequia Tóxica Alimentar (ATA), que ocorreu na Rússia durante a Segunda Guerra Mundial (SCUSSEL,1998).

2.3.4.4 Fumonisinias

Representa um grupo de micotoxinas de crescente importância, com estrutura química básica de um diéster do ácido propano – 1,2,3 – tricarbóxico e um pentahidroxi-icosano contendo um grupamento amino primário. Há uma similaridade marcante entre as fumonisinias e a estrutura química da esfingosina (um lipídio encontrado no cérebro), o que torna a sua ação no organismo de grande interesse para a ciência (SCUSSEL,1998).

Existem atualmente 6 membros distintos do grupo das fumonisinias, porém as mais tóxicas e estudadas são a B1, B2 e B3. Elas são produzidas por fungos do gênero *Fusarium* (SCUSSEL,1998). A presença desta toxina está relacionada a alta incidência de câncer de esôfago nos seres humanos da África do Sul e da China (CAST,2003). Além disso, estudos recentes comprovaram a atividade neurotóxica, imunossupressora e a carcinogênica desta toxina, especialmente afetando órgãos como rim e fígado (MAGAN & OLSEN, 2004).

2.3.4.5. Zearalenona (ZEN)

A zearalenona é uma micotoxina estrogênica, ou seja, com ação relacionada ao controle da ovulação e ao desenvolvimento de características femininas e é derivada do ácido resorcílico (SCUSSEL,1998). Várias espécies e subespécies de fungos do gênero *Fusarium* são responsáveis pela produção de zearalenona, sendo o *Fusarium graminearum* o principal produtor e a sua produção é favorecida pela alta umidade e baixa temperatura (CAST, 2003).

Como a maioria dessas espécies também são produtoras de outras toxinas como DON e T-2, é muito difícil que apenas a zearalenona seja encontrada. A contaminação cruzada por essas toxinas ocorre naturalmente na natureza, quando essas espécies estão em contato com os grãos (SANTIN *et al.*, 2000).

Zearalenona é a micotoxina estrogênica mais estudada, mas faz parte de um grupo de no mínimo sete compostos com estrutura e propriedades farmacológicas semelhantes. Essa micotoxina quando ingerida é rapidamente absorvida sendo convertida em α -zearalenol e β -zearalenol. O α -zearalenol é, aproximadamente, três vezes mais estrogênico que o β -zearalenol. Além disso zearalenona pode converter-

se em zearalanona e produzir α -zearalanol e β -zearalanol no organismo (SANTIN *et al.*, 2000; MAGAN & OLSEN, 2004).

2.3.4.6. Ácido Penicílico

O Ácido Penicílico foi isolado em 1913 do milho infectado com *Penicillium puberulum*, porém, pode ser também produzido por outros membros do gênero *Penicillium* e *Aspergillus* (SCUSSEL, 1998).

Esta toxina possui estrutura semelhante a patulina (ambas são δ lactonas), o que explica a atividade carcinogênica já comprovada. Pode atuar também como potente agente microbiano. É uma toxina tremorgênica sendo os principais sintomas de envenenamento os tremores e as convulsões (SCUSSEL, 1998).

2.3.4.7. Citrinina

Citrinina foi um dos primeiros antibióticos a serem descobertos (por volta de 1931), porém, nunca aplicado para este fim devido a sua elevada toxicidade em mamíferos (MAGAN & OLSEN, 2004). É uma micotoxina amarela produzida por *Penicillium* e diversas espécies de *Aspergillus*, incluindo cepas *P. verrucosum*, que também são produtores de Ocratoxinas (CAST, 2003).

Essas micotoxinas ocorrem naturalmente em grãos e geralmente co-ocorrem com a Ocratoxina A em alguns cereais e bebidas (MAGAN & OLSEN, 2004)

Como a Ocratoxina A, a citrinina provoca danos nos rins a animais de laboratório, muito semelhante à nefropatia suína, podendo interagir sinergicamente com Ocratoxina A (CAST, 2003).

2.3.4.8. Roquefortina e Ácido Micofenólico

Penicillium roqueforti e *P. caseicolum* (*P. camemberti*), usado para fazer o mofo em queijos curados, foram associados a produção de diversos compostos tóxicos como o ácido micofenólico e roquefortina C (CAST, 2003; RAI & VARMA, 2010).

Roquefortina é uma das micotoxinas mais estáveis em condições ambientais. É considerada um neurotóxico e apresenta propriedades antibacterianas. Esta

micotoxina tem sido detectada frequentemente em silagem e até mesmo em amostras sem evidências visuais da presença de fungos (RAI & VARMA, 2010).

As informações a respeito dessas toxinas ainda não são claras, uma vez que não há evidências de que estão diretamente envolvidas no desenvolvimento de problemas de saúde em humanos (RAI & VARMA, 2010).

Estudos recentes informam que roquefortina C, quando inalado, apresenta absorção rápida nas vias respiratórias e é altamente tóxico (RAI & VARMA, 2010).

2.3.4.9 Ergoalcalóides

São metabolitos produzidos por várias espécies do gênero *Claviceps* (CAST,2003 e SCUSSEL,1998). Os ergoalcalóides compreendem uma série de compostos que são divididos em três grupos, conforme especificado na Tabela 2 e, em cada um deles, estão contidos os membros mais fisiologicamente ativos (SCUSSEL,1998).

Tabela 2 – Alcalóides do Ergot.

Grupo	Alcalóide
Ergometrina	Ergometrina
	Ergometrinina
Ergotamina	Ergotamina
	Ergotaminina
	Ergosina
	Ergosininina
Ergotoxina	Ergocristina
	Ergocristinina
	Ergocriptina
	Ergocriptinina
	Ergocornina
	Ergocorninina

FONTE: SCUSSEL,1998

Os membros desse grupo estão envolvidos em síndromes nervosas ou gangrenosas em humanos e animais, sendo o ergotismo uma das mais antigas micotoxicoses conhecidas apesar de sua ocorrência ter diminuído ao longo do tempo (CAST, 2003).

2.3.4.10 Ácido Ciclopiazônico (CPA)

A importância potencial do CPA como um contaminante natural de alimentos tornou-se conhecida a partir de estudos que comprovam que ele é produzido por diversos fungos comumente encontrados em commodities agrícolas ou utilizados na produção de alimentos fermentados. Estas espécies de fungos incluem *Aspergillus flavus*, *A. versicolor*, *A. tamarii*, e várias espécies de *Penicillium*, utilizados na produção de embutidos fermentados na Europa (CAST,2003).

Essa micotoxina é um alcalóide complexo que tem atividade neurotóxica e, quando ingerido, leva à severa síndrome convulsiva e pode ser fatal (SCUSSEL,1998; SAEGER, 2011).

2.3.4.11 Esterigmatocistina

A esterigmatocistina pertence ao grupo das esterigmatocistinas caracterizado pelo sistema de anel dehidrofurobenzenofurano acoplado a uma xantona. Ela é a mais estudada e tóxica do grupo e é intermediária, juntamente com os seus derivados o-metil, na síntese das aflatoxinas (SCUSSEL,1998; CAST, 2003).

Os fungos responsáveis pela produção de esterigmatocistina são *Aspergillus rugulosus*, *A. versicolor*, *A. nidulan*, *Chaetomium thielarioedum*, *C. udagawae*, *A. Chevalier*, *A. ruber* e *A. amstelodani* (SCUSSEL,1998).

A incidência dessa toxina em alimentos não é tão significativa. Alguns relatos de contaminação têm sido publicados em amostras de trigo, café, nozes, noz-pecã e queijo (SCUSSEL,1998).

O fato de estar relacionada a síntese de aflatoxinas torna seu estudo de maior interesse para a ciência. Apresenta toxicidade aguda fraca, tendo características como mutagenicidade, citotoxicidade e carcinogenicidade (SAEGER, 2011).

2.3.4.12 Altenariol

Fungos do gênero *Altenaria* são patógenos comuns de diversas culturas, infectando também produtos processados. *Altenaria alternata*, por exemplo, produz um grande número de micotoxinas que inclui, Altenariol, Altenariol Monometil éter, Alvertoxina I e Ácido Tenuazônico, que é uma classe especial de interesse na micotoxicologia. Essas toxinas mostraram-se carcinogênicas para ratos e mutagênicas em muitos testes *in vitro* (MAGAN & OLSEN, 2004).

A ocorrência natural de Altenariol foi observada em diversas frutas, incluindo tomates, olivas, mandarins, melões, pimenta e maçãs e em grãos e sementes de girassol. Observou-se ainda a ocorrência de baixos níveis de altenariol em produtos processados de frutas, como sucos de maçã, produtos processados de tomate, suco de uva e vinho tinto (MAGAN & OLSEN, 2004).

Não existem evidências claras na literatura com relação a toxicidade aguda dessa toxina, porém, alguns estudos relatam sua ação mutagênica, podendo possuir propriedades carcinogênicas (SAEGER, 2011).

2.4 Determinação de micotoxinas

A determinação de micotoxinas em alimentos, ração animal, amostras biológicas, entre outros, é sempre um desafio devido a diversidades das matrizes com diferentes complexidades e a variedade de espécies moleculares que necessitam ser determinadas (SAEGER, 2011).

Um fluxo geral da análise de micotoxinas inclui a amostragem, o preparo da amostra, a extração e a purificação e, finalmente, a análise cromatográfica (SAEGER, 2011).

Para o sucesso da análise, uma das etapas mais importantes é a seleção da amostra, uma vez que a possível heterogeneidade do material leva a resultados não conclusivos, ainda mais no caso do crescimento de fungos, que é um processo que ocorre em pontos isolados (também chamado de crescimento *spot*) (GONZÁLEZ *et al.*, 2010).

Quando a determinação de micotoxinas se dá através de técnicas cromatográficas, é necessário o preparo da amostra para extrair as micotoxinas e as vezes uma etapa de purificação para remover a maior parte dos compostos da

matriz que possam interferir durante a análise instrumental. Em alguns casos também faz-se necessária uma etapa de pré-concentração, para alcançar os limites de detecção e quantificação requeridos (GONZÁLEZ *et al.*, 2010; SAEGER, 2011).

2.4.1 Métodos de extração de micotoxinas

As micotoxinas são compostos com diferentes propriedades físico-químicas. Por isso, normalmente, os procedimentos específicos de extração e purificação eram otimizados apenas para uma micotoxina alvo. Nos últimos anos a tendência é que se busque desenvolver métodos de extração diferenciados, capazes de realizar a extração simultânea de várias micotoxinas ou de um grupo de micotoxinas que apresentem características químicas semelhantes (GONZÁLEZ *et al.*, 2010; SAEGER, 2011).

Os métodos multitoxina são adotados em laboratórios principalmente pela praticidade que apresentam na determinação de um grande número de micotoxinas simultaneamente, permitindo o atendimento da demanda de monitoramentos de maneira rápida e eficiente (SAEGER, 2011).

O desenvolvimento deste tipo de método é uma tarefa difícil pois, embora grande parte das micotoxinas apresente-se como compostos polares, há grandes diferenças nas polaridades observadas (GONZÁLEZ *et al.*, 2010; SAEGER, 2011).

Em geral a extração de micotoxinas de amostras líquidas, como o vinho, cerveja, sucos e leite são baseadas na Extração em Fase Sólida (SPE) ou utilização de colunas de imunoafinidade ou outros tipos de sorventes. Apesar disso, técnicas como extração líquido-líquido (LLE), microextração em fase sólida (SPME) e microextração em fase líquida (LPME) tem sido aplicadas (GONZÁLEZ *et al.*, 2010).

A extração de ocratoxina A, por exemplo, é relatada utilizando diversos solventes orgânicos, como tolueno e clorofórmio, embora o procedimento mais comum é baseado na extração com carbonato de hidrogênio e solução de polietileno glicol (PEG). Na etapa de purificação, a aplicação de colunas de imunoafinidade é o procedimento mais amplamente utilizado e, devido a sua especificidade para determinados analitos e a capacidade de realizar a pré-concentração do analito, consegue obter limites de detecção inferiores a $0,01 \text{ mg kg}^{-1}$ (GONZÁLEZ *et al.*, 2010).

Na determinação de pesticidas em frutas e hortaliças, o conceito de métodos multirresiduais não é novidade. Os mais conhecidos métodos multirresiduais envolvem uma extração inicial com acetona, acetonitrila, ou acetato de etila, a partir da qual os analitos de interesse são transferidos para uma camada orgânica, deixando na fase aquosa os co-extrativos indesejáveis e alguns pesticidas altamente polares (DA SILVA, 2011).

O método multirresíduo que tem sido mais amplamente empregado atualmente para determinação de pesticidas em frutas e vegetais é o método QuEChERS (ANASTASSIADES *et al.*, 2003), o qual foi desenvolvido para gerar extratos que são diretamente aplicáveis tanto para as análises por GC quanto por LC.

Este método ganhou grande destaque devido ao seu desempenho adequado aliada a características como modernidade e dinamismo, podendo ser aplicado em qualquer laboratório, devido a simplificação ou corte de etapas lentas, trabalhosas e impraticáveis. O método tem características como rapidez (preparo de 8 amostras em cerca de 30 min), simplicidade, confiabilidade, robustez (poucas e simples etapas), baixo custo, baixo consumo de solventes (10 mL de acetonitrila) e utilização de pouca vidraria de laboratório (DA SILVA, 2011).

O método QuEChERS original envolve uma extração inicial com acetonitrila, seguido por uma etapa de partição líquido-líquido após adição da mistura de $MgSO_4$ e NaCl, os quais facilitam a remoção de uma quantidade significativa de componentes polares da matriz, e finalmente, uma etapa simples de purificação, onde o extrato é misturado com uma quantidade de adsorvente (dSPE). Esse método está descrito de forma esquemática na Figura 2 (DA SILVA, 2011).

Atualmente, são encontradas na literatura várias modificações do método QuEChERS original a fim de se extrair resíduos e contaminantes das mais diferentes matrizes. As modificações do método QuEChERS também vem sendo aplicadas na extração de micotoxinas das mais variadas matrizes. O emprego desta metodologia vem se mostrando uma tendência no desenvolvimento de multimétodos (SAEGER, 2011).

Deste modo, torna-se possível realizar a extração simultânea de pesticidas e micotoxinas durante um único procedimento e submeter esse extrato tanto a determinação de uma grande quantidade de micotoxinas, quanto a diversas classes de pesticidas.

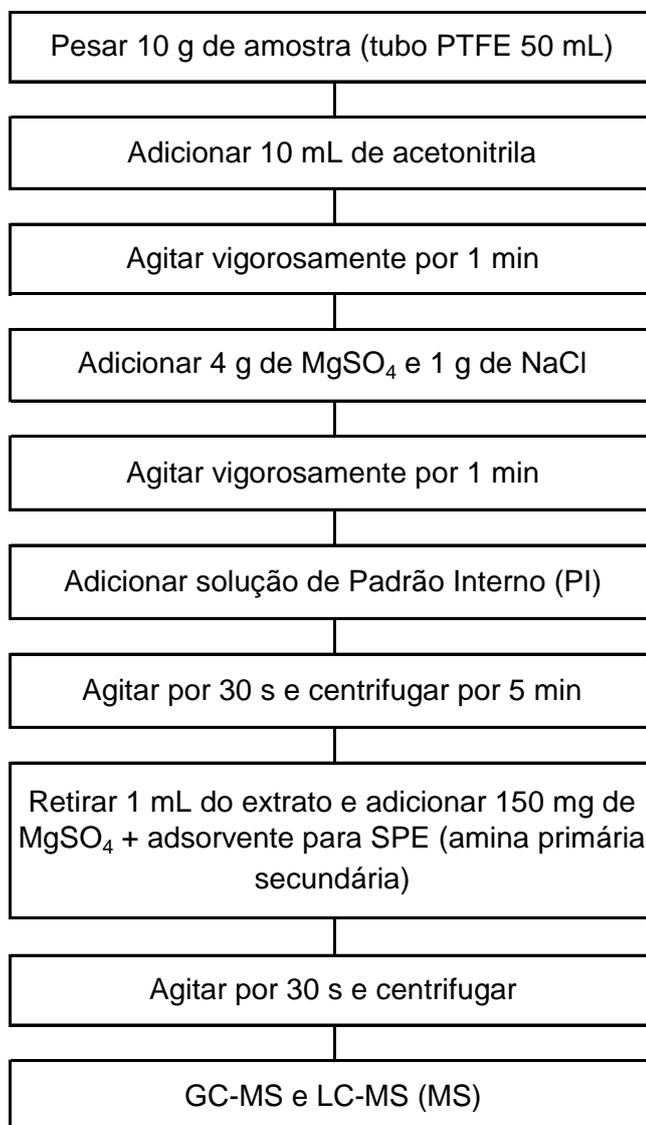


Figura 2 – Esquema da seqüência do método QuEChERS. (DA SILVA, 2011)

2.4.2 Técnicas de determinação de micotoxinas

Um grande número de métodos analíticos têm sido desenvolvidos para análise de micotoxinas. Esses métodos necessitam apresentar baixos limites de detecção, a fim de cumprir com os requisitos legais de organizações nacionais e/ou

internacionais, ser específico para evitar interferências, ser facilmente aplicado em laboratórios de rotina, ser econômico para o laboratório e fornecer testes confirmatórios para o analito detectado (GONZÁLEZ *et al.*, 2010).

Embora métodos imunoquímicos baseados em ensaio imunoenzimático (ELISA, do idioma inglês *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) possam ser usados para os procedimentos de triagem, devido à velocidade, facilidade de operação e sensibilidade, eles podem fornecer resultados errôneos devido à complexidade da matriz e reações cruzadas (GONZÁLEZ *et al.*, 2010).

Por esta razão, os métodos convencionais de análise como LC com detecção por ultravioleta (UV) ou detecção fluorimétrica, com derivatização pré ou pós-coluna vem sendo aplicados. Outros métodos cromatográficos, tais como cromatografia em camada delgada (CCD) e cromatografia gasosa acoplada a detecção por captura de elétrons (ECD, do idioma inglês *Electron Capture Detector*), detecção de ionização de chama (FID, do idioma inglês *Flame Ionization Detector*) ou MS também são empregados. O uso de CG na determinação de micotoxinas apresenta alguns problemas, entre eles, o principal é a instabilidade térmica dos analitos. Pode haver perda quando o extrato entra em contato com as áreas aquecidas do injetor, provocando a degradação das micotoxinas e erros sistemáticos durante a determinação destes compostos (GONZÁLEZ *et al.*, 2010).

Recentes avanços em instrumentação analítica tem destacado o potencial dos métodos baseados em UPLC-MS/MS, pois estes permitem a determinação de multitoxinas e sua confirmação de forma bastante confiável (GONZÁLEZ *et al.*, 2010).

2.4.2.1 Cromatografia líquida

Entre os métodos modernos de análise, a cromatografia ocupa lugar de destaque devido à facilidade com que efetua separação, identificação e quantificação das espécies químicas, por si mesma ou em conjunto com outras técnicas instrumentais de análise como espectrofotometria ou espectrometria de massas (COLLINS *et al.*, 2010).

Tendo sido inventa a mais de um século, a LC figura entre um dos membros de toda a família de técnicas de separação e encontra-se atualmente muito bem estabelecida (FERNÁNDEZ-ALBA, 2005; COLLINS *et al.*, 2010; PIZZUTTI, 2006).

A grande aplicabilidade da técnica é atribuída a sua capacidade de separação de moléculas não voláteis e termicamente frágeis, que constituem 80% dos compostos sintéticos e naturais. No entanto, a identificação em amostras complexas pode ser um problema para a LC quando esta estiver acoplada a detectores tradicionais como UV, fluorescência e condutividade (FERNÁNDEZ-ALBA, 2005).

Através da combinação da MS com a LC, componentes das amostras são separados uns dos outros (por LC) e têm suas massas individuais analisadas (por MS) para isolar, identificar e quantificar qualquer componente ionizável. Desta forma, o acoplamento LC-MS tem sido utilizado com inúmeras aplicações em vários campos da ciência e da análise química, e é usado para a análise de uma enorme faixa de compostos orgânicos, desde pequenas moléculas como metabólitos e peptídeos, até moléculas grandes como, por exemplo, as proteínas (FERNÁNDEZ-ALBA, 2005).

2.4.2.1.1 Espectrometria de massas

Com a MS, muitas classes, de diferentes analitos, presentes em uma enorme diversidade de matrizes, podem ser identificadas com grande precisão. Essa técnica é uma das ferramentas analíticas mais valiosas e amplamente disponíveis na atualidade (LANÇAS, 2009).

O fundamento da espectrometria de massas é a ionização das moléculas e identificação dos íons de acordo com a relação massa/carga (m/z). A formação de íons é uma etapa crítica de qualquer aplicação da MS, pois, independentemente do analisador, a análise de massas requer íons (LANÇAS, 2009). Os principais componentes desta técnica são a fonte de ionização e o analisador de massas que serão abordados mais especificamente nos itens 2.4.2.1.1.1 e 2.4.2.1.1.2.

2.4.2.1.1.1 Fontes de Ionização

As fontes de ionização, inicialmente investigadas para o acoplamento LC-MS foram baseadas no impacto de elétrons (EI) e ionização química (CI), entretanto, devido as diferentes características existentes entre as fases móveis empregadas nas duas técnicas de separação (GC e LC), este acoplamento mostrou-se

inadequado para análise de compostos em baixas concentrações, além de não apresentarem robustez necessária (LANÇAS, 2009).

Para resolver as dificuldades apresentadas na interface LC e MS, novas fontes foram desenvolvidas. Essas novas tecnologias foram capazes de combinar duas características em um mesmo sistema: facilitar a transferência da amostra que sai da coluna para a fase gasosa e ionizar a amostra. Entre elas, as que demonstram melhor desempenho no acoplamento LC-MS são aquelas onde a ionização ocorre sob pressão atmosférica (API, do idioma inglês *Atmospheric Pressure Ionization*) (LANÇAS, 2009).

Os modos de ionização mais utilizados no momento são: Eletronebulização (ESI, do idioma inglês *Electrospray Ionization*), Ionização Química a Pressão Atmosférica (APCI, do idioma inglês *Atmospheric Pressure Chemical Ionization*) e a Ionização por Fótons a Pressão Atmosférica (APPI, do idioma inglês *Atmospheric Pressure Photon Ionization*). Dentre elas a ESI é o modo de ionização mais empregado no acoplamento LC-MS, seguida da APCI.

Na ESI, o eluato da coluna cromatográfica entra na sonda da fonte com carga balanceada, mas, quando a deixa, carrega uma carga iônica líquida. A ESI pode ser operada no modo positivo ou negativo; as gotículas que saem do aerossol terão carga positiva e o eletrodo receberá os elétrons, ocorrendo um processo de oxidação. De forma análoga, no modo negativo o oposto ocorrerá (LANÇAS, 2009).

Neste processo, ao eluato dissolvido em um solvente, é aplicada uma voltagem tipicamente entre 3 e 5 kV. Como resultado, o líquido emerge do capilar à pressão atmosférica e na presença de um forte campo eletrostático. As gotículas formadas perdem sucessivamente o solvente, ou seja, formam um aerossol devido ao gás aquecido que passa no cone de amostragem, os íons fluem para o espectrômetro de massas induzidos pelos efeitos da atração eletrostática e pelo "vácuo" (Figura 3). Em contracorrente um gás de dessolvatação, também aquecido, é utilizado para diminuir os aglomerados de íons indesejados que se formam, assim como para facilitar o processo de eliminação do solvente (dessolvatação) (LANÇAS, 2009; FERNÁNDEZ-ALBA, 2005).

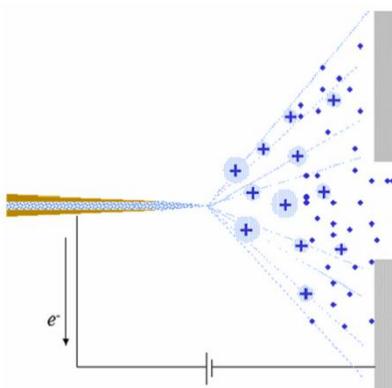


Figura 3 – Interface do tipo ESI, operando no modo positivo, onde os íons formados são conduzidos para o analisador de massas (Adaptado de LANÇAS, 2009).

Na ionização por APCI (Figura 4) os analitos provenientes da coluna de cromatografia líquida são introduzidos na sonda (usualmente um tubo capilar de vidro o qual é circundado e continuamente lavado com um gás denominado de “*make-up*” gás ou gás auxiliar, usualmente N_2) cuja extremidade é circundada por um sistema de aquecimento e dentro do qual um gás adicional passa continuamente para volatilizar a amostra e solvente (gás nebulizador). Próximo a sonda, é instalada uma agulha metálica, denominada de eletrodo de descarga tipo corona, que, submetido a um potencial de alguns milhares de Volts, provocará o aparecimento do denominado efeito corona. Este efeito ocorre quando um material condutor é submetido a um campo elétrico elevado, provocando uma descarga parcial e tendo como resultado uma ruptura elétrica da atmosfera circundante do condutor devido à ionização provocada pelo efeito corona. No caso do acoplamento LC(APCI)MS, o eluente da coluna, ao sair da sonda, conterá vapores do analito, da fase móvel e gás nitrogênio; a fase móvel será ionizada pelo efeito corona descrito, reagindo com o analito em fase gasosa (LANÇAS, 2009).

Utilizando-se uma interface do tipo APCI, pode-se operar tanto no modo positivo (PCI, do idioma inglês *Positive Chemical Ionization*), quanto no modo negativo (NCI, do idioma inglês *Negative Chemical Ionization*). O sucesso do processo dependerá basicamente da afinidade protônica do analito (LANÇAS, 2009).

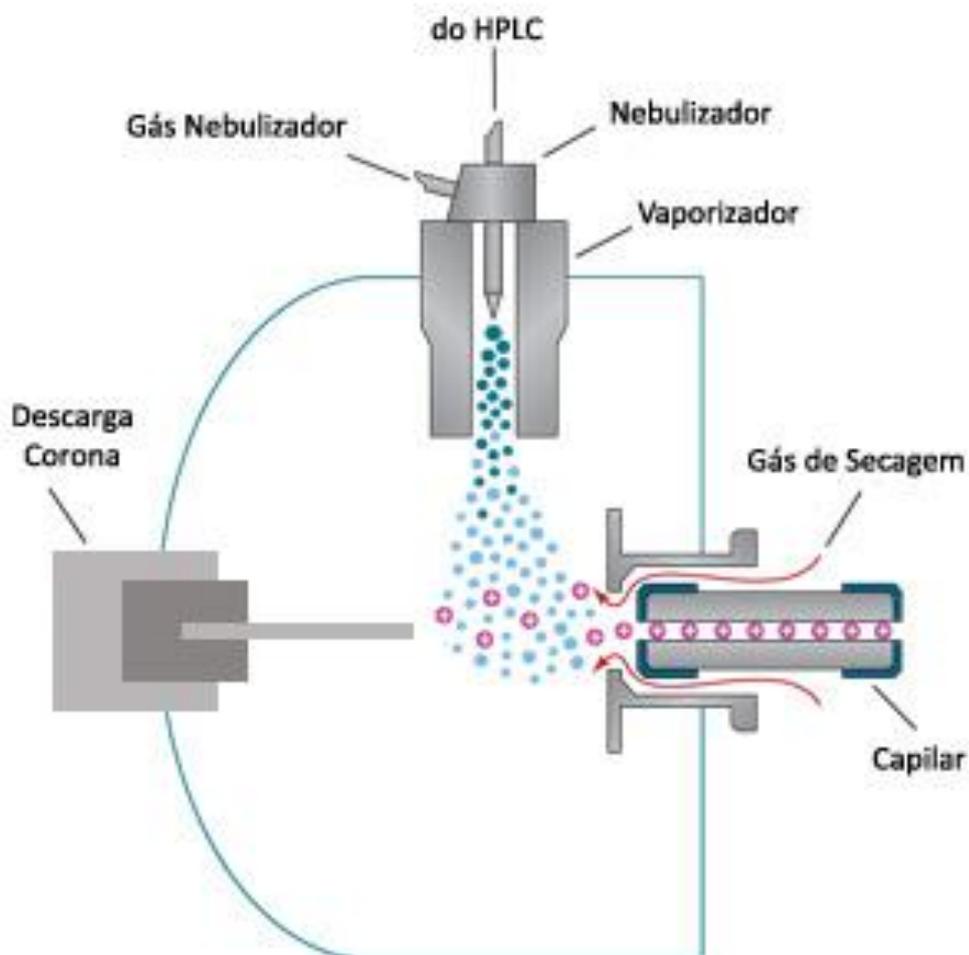
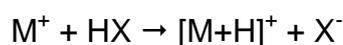
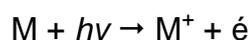


Figura 4 – Interface do tipo APCI para LC-MS (Adaptado de Agilent Technologies).

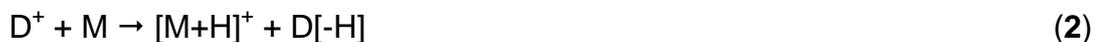
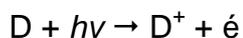
A ionização por APPI (Figura 5) baseia-se na absorção de fótons de luz pelo analito, ocasionando sua ionização com perda de um elétron, e formando um cátion radicalar do tipo M^+ . Este íon radicalar poderá ser detectado nesta forma, ou participar de reações com o ambiente que o circunda, formando outros íons os quais serão detectados. O processo mais comum, neste caso, será a abstração de um átomo de hidrogênio do solvente, de acordo com a Equação 1 (LANÇAS, 2009).



(1)

Uma variação deste procedimento consiste no uso de um Dopante (D), substância ionizável a qual é adicionada à fase móvel para carregar cargas

(alternativamente, um solvente foto ionizável pode ser utilizado para o mesmo propósito), conforme a Equação 2 (LANÇAS, 2009).



Nesta técnica, tanto os íons produzidos por ionização do solvente, quanto pelo dopante, podem reagir com moléculas neutras do analito (via diferentes processos de transferência de prótons ou reações de transferência de carga) provocando a ionização do analito em estudo. A ionização produzida por esta fonte é usualmente branda, com o aparecimento de poucos íons no espectro, uma vez que o potencial de ionização da maioria dos solventes é acima de 10 eV, energia do fóton primário emitido por uma lâmpada de Criptônio (Kr), usualmente empregada nesta técnica (LANÇAS, 2009).

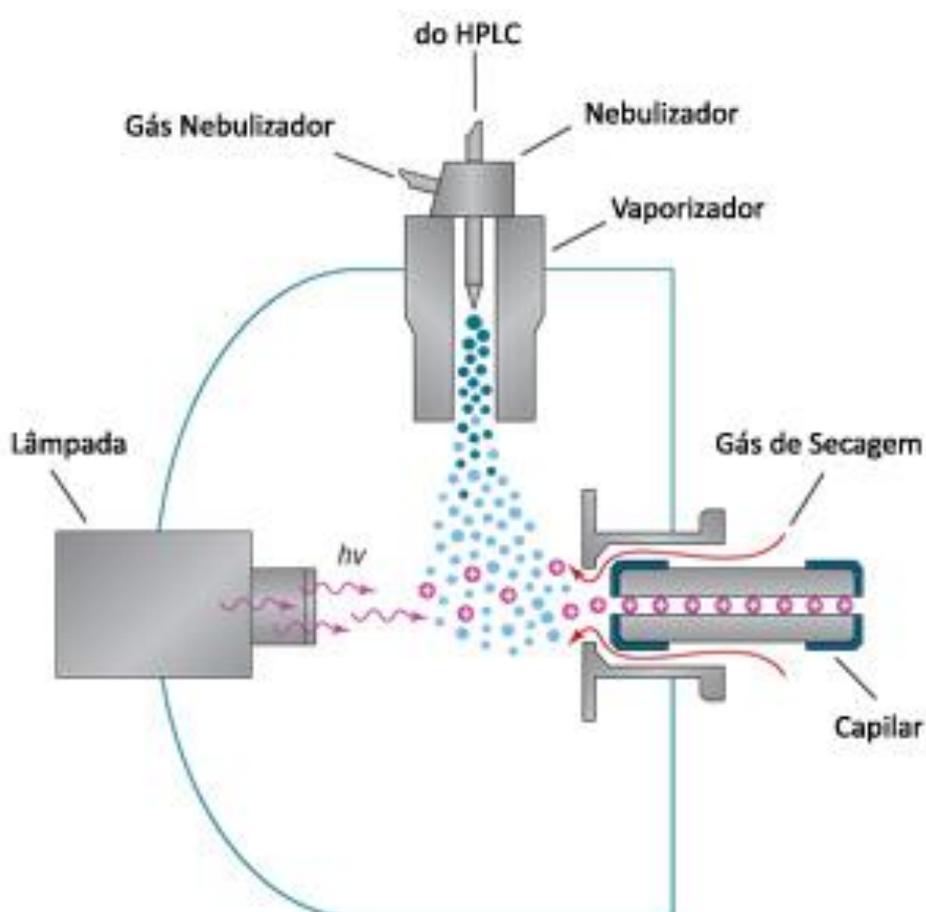


Figura 5 – Interface do tipo APPI para LC-MS (Adaptado de Agilent Technologies).

As principais características destes modos de ionização podem ser visualizadas na Figura 6 (LANÇAS, 2009).

A ionização por ESI é apropriada para determinação da estrutura de um composto, e preferencialmente aplicada para a análise de compostos iônicos grandes (massa molecular superior a 1000) ou íons pequenos com uma única carga, podendo ser usada no modo positivo ou negativo. Já na análise de compostos não polares ou de polaridade muito baixa a melhor ionização é a que baseia-se no princípio da APPI (PIZZUTTI, 2006; LANÇAS, 2009).

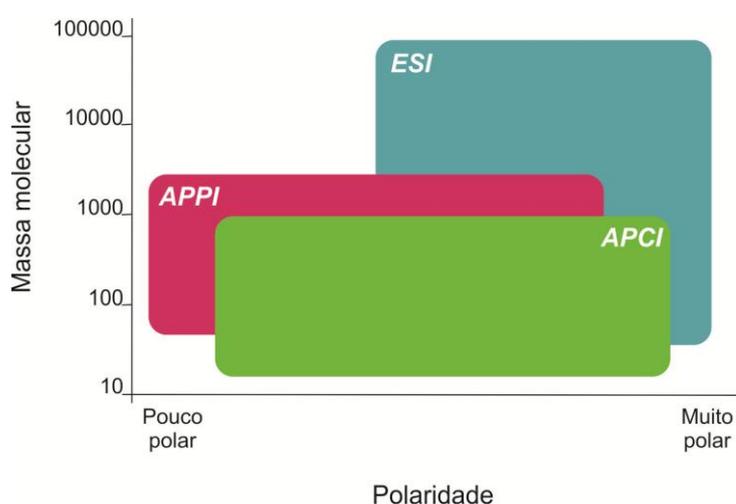


Figura 6 – Principais características dos modos de ionização a pressão atmosférica, empregadas em LC-MS (Adaptado de LANÇAS, 2009).

A ESI funciona muito bem somente em fase reversa (pois em fase normal pode necessitar de reações pós coluna para adequar as condições da fase móvel aos requisitos para obter-se boa ionização), enquanto a APPI e APCI funcionam melhor em fase normal e razoavelmente bem em fase reversa (LANÇAS, 2009).

O fenômeno de supressão de íons é mais normal em ESI do que nas outras duas formas. Este fenômeno ocorre devido a uma competição na ionização quando a amostra contém sal ou analitos que podem sofrer ionização com facilidade nas condições utilizadas no experimento. A eliminação ou minimização deste efeito é importante para análise quantitativa e deve sempre ser observado no desenvolvimento do método cromatográfico. Em APCI e APPI este efeito é quase inexistente (LANÇAS, 2009).

Com relação a estabilidade térmica, o modo de ionização APCI mostra-se como o pior entre os três, seguido pela APPI. A ESI é modo de ionização preferível para analitos de baixa estabilidade térmica (LANÇAS, 2009).

2.4.2.1.1.2 Analisadores de massas

O eluente da coluna cromatográfica, após ser ionizado, tem seus íons direcionados para o analisador de massas onde são separados de acordo com a relação existente entre suas massas e cargas, ou seja, a razão m/z (LANÇAS, 2009).

Existem vários tipos de analisadores de massa, cada qual com suas características de construção e operação que os diferem entre si, por seus benefícios e limitações. Entre os mais frequentemente encontrados tem-se o quadrupolo, o aprisionador de íons e os analisadores por tempo de voo (TOF, do idioma inglês *Time of Flight*) (LANÇAS, 2009).

O quadrupolo é o analisador de massas mais empregado, principalmente devido a sua simplicidade, boa linearidade, facilidade de ser entendido e operado (LANÇAS, 2009).

Um analisador de massas quadrupolo é composto de quatro barras cilíndricas feitas de metal, dispostas na forma de um quadrado onde os íons do analito são direcionados para o centro do quadrado. Um par de barras é mantido em um potencial elétrico positivo, enquanto o outro par é mantido a um potencial negativo. Uma combinação de corrente contínua (CC) e radio frequência (Rf) é aplicada nas barras. O par positivo atua como um filtro para valores de massas mais elevados, enquanto que o par negativo para as massas menores. Deve-se ter um controle preciso sobre as voltagens e também sobre a rádio frequência, aplicada às barras dos pólos, que geram um campo eletrostático que age como filtro de massas. Esses campos determinam quais as razões m/z podem passar através dos filtros, em uma determinada voltagem, as quais serão detectadas (LANÇAS, 2009).

Os demais íons terão suas trajetórias instáveis e, como consequência, atingirão as barras e serão eliminados como observado na Figura 7 (LANÇAS, 2009).

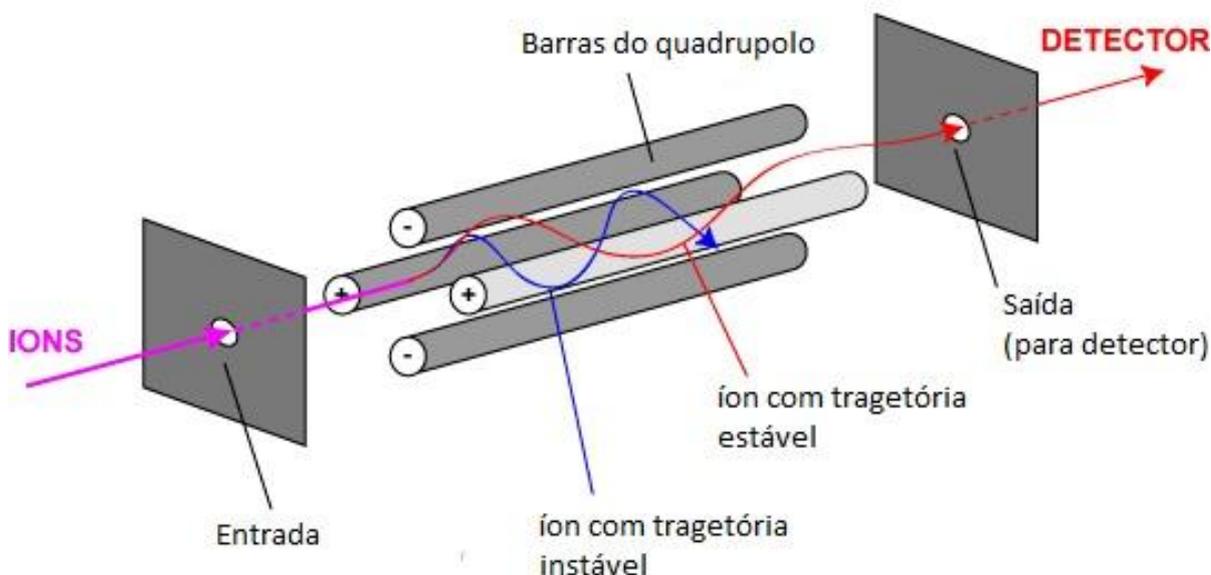


Figura 7 – Representação da trajetória dos íons em um analisador de massa do tipo Quadrupolo (Adaptado de EARL (Electronic Analytical Reference Library)).

Os analisadores de massas quadrupolo podem operar em 2 modos, sendo eles o modo varredura (*full scan*), e o modo monitoramento de íon selecionado (SIM, do idioma inglês *Select Ion Monitoring*) (LANÇAS, 2009).

No modo *full scan*, o analisador de massas monitora uma faixa de razões m/z . No modo SIM, o analisador de massas monitora somente poucos íons que são indicativos de um composto específico, ou seja, monitora razões m/z específicas. O modo SIM é significativamente mais sensível do que o modo *full scan*, mas somente fornece informações sobre os íons monitorados, isto é, podem-se perder informações importantes para a identificação do composto. O modo *full scan* é normalmente usado para análises qualitativas ou quantitativas, quando a informação espectral completa é considerada importante. Normalmente, o modo SIM é usado para quantificação de um composto alvo, nas menores concentrações possíveis (nível de traços) (LANÇAS, 2009).

Na espectrometria de massas multidimensional (tandem MS/MS), o primeiro analisador de massas atua com um filtro específico, ao distinguir em uma mistura complexa quais são os íons próprios do analito e quais procedem das interferências da matriz. Os íons filtrados passam para a célula de colisão e no segundo quadrupolo, obtêm-se o espectro de massa do íon característico do analito (filtrado pelo primeiro analisador) (STASHENKO & MARTÍNEZ, 2010).

O triplo quadrupolo é um exemplo de espectrômetro de massas multidimensional. Como exposto na Figura 8, o primeiro (Q1) e o último (Q3) quadrupolos operam ambos como um filtro/selecionador de massas, já o segundo quadrupolo (Q2), operado apenas com Rf, permite que todos os íons selecionados pelo Q1 passem por ele sem serem selecionados. O Q2 serve como uma região/compartilhamento de íons totais ou ainda uma célula de colisão. Com um equipamento do tipo triplo quadrupolo, podem se realizar todos os tipos disponíveis de varredura. Existem quatro tipos de varredura para um quadrupolo seqüencial, que são: varredura do íon produto, do íon precursor, da perda neutra e o monitoramento de reações múltiplas (MRM, do idioma inglês *Multiple Reaction Monitoring*) (RICCIO, 2011; STASHENKO & MARTÍNEZ, 2010).

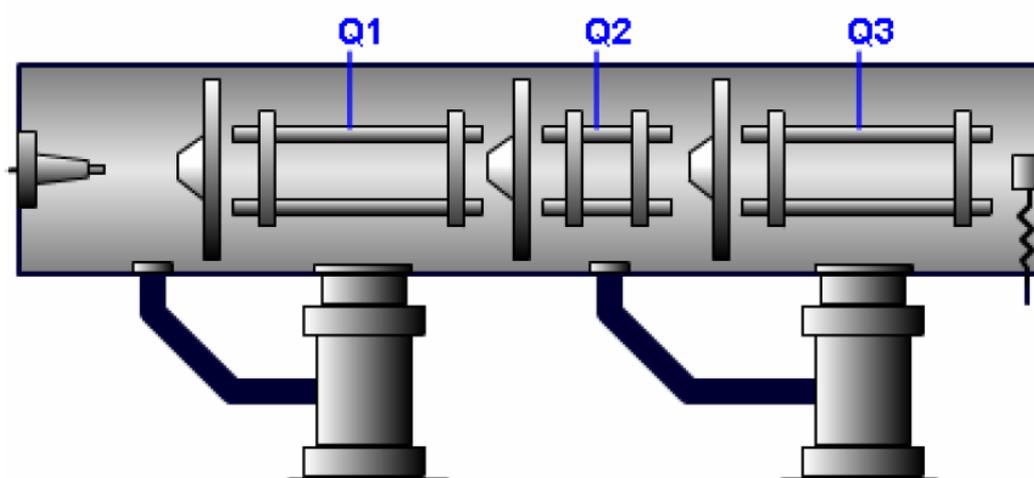


Figura 8 – Representação de um analisador de massas do tipo triplo quadrupolo (Adaptado de EARL (Electronic Analytical Reference Library)).

Monitoramento de reações múltiplas (MRM) é um dos métodos de aquisição mais interessantes, pois proporciona especificidade, seletividade e detectabilidade ao detector de massas (STASHENKO & MARTÍNEZ, 2010).

O MRM consiste em selecionar uma reação de fragmentação. Neste caso, tanto o primeiro quanto o segundo analisador são focalizados nas massas selecionadas. Portanto, não há varredura, mas sim, algo análogo ao modo SIM. Os íons selecionados pelo primeiro analisador serão detectados caso os mesmos produzam um dado fragmento, através de uma reação selecionada. A ausência de varredura permite que o equipamento focalize apenas o precursor e o fragmento,

aumentando a detectabilidade para o monitoramento, que é associada a um aumento na seletividade (RICCIO, 2011; STASHENKO & MARTÍNEZ, 2010).

Este modo é de particular importância para análise de compostos presentes em nível de traços em matrizes complexas, com muitas interferências, como por exemplo, a análise de resíduos de pesticidas e micotoxinas (STASHENKO & MARTÍNEZ, 2010).

Os aprisionadores de íons (ITD) também podem ser denominados de quadrupolo tridimensional (LANÇAS, 2009).

Neste analisador, um eletrodo hiperbólico na forma de um anel (denominado *ring electrode*) é colocado entre dois eletrodos hiperbólicos denominados eletrodos *end cap*. Uma voltagem de amplitude variável e com frequência ao redor de 1 MHz, é aplicada ao anel, enquanto que os *end cap* são aterrados. Os dois eletrodos *end cap* apresentam um orifício no centro; o eletrodo superior permite a passagem dos íons provenientes da ionização os quais são direcionados para o *ring electrode*, enquanto que o orifício do eletrodo de saída serve para direcionar os íons ejetados para detecção, (LANÇAS, 2009), conforme pode ser visualizado na Figura 9.

Existem dois tipos de espectrômetros de massas de aprisionamento de íons: aprisionamento de íons por quadrupolos tridimensionais (também chamada de captura dinâmica), e de ressonância em ciclotron (captura estática). Ambas funcionam acumulando íons no seu interior, e na manipulação simultânea de corrente alternada e de radiofrequência. A captura permite a liberação controlada de íons, permitindo a análise de sua separação controlada e com uma resolução muito grande.

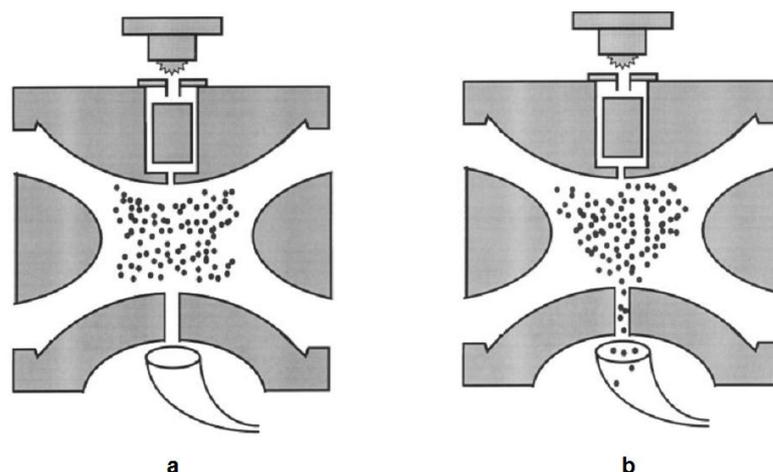


Figura 9 – Esquema de funcionamento do ITD, em (a) os íons estão aprisionados e em (b) os íons com as razões m/z selecionadas são ejetados e analisado (Adaptado de MARCH, 1997).

O espectrômetro de massas com analisador de massas por tempo de voo (TOF) (Figura 10) faz uso da propriedade do tempo em que íons de diferentes m/z levam para cruzar o sistema de separação de íons. Este tipo de detector opera em modo pulsado, de tal forma que os íons devem ser gerados repetidamente (em pulsos). Um campo elétrico acelera todos os íons formados (íon molecular e fragmentos) para uma região livre de efeitos externos (campo magnético, diferença de potencial, etc). Os íons são levados com uma energia cinética zV , onde z é a carga do íon e V é uma voltagem aplicada para que eles possam ser “carregados”.

Como a energia cinética é dada pelo termo $1/2mv^2$, íons mais leves viajarão mais rápido do que os pesados, e alcançarão o detector no fim da região, livre de efeitos externos. Logo, o tempo de voo de um íon dependerá de sua massa, carga e energia cinética o que possibilitará sua diferenciação com relação ao tempo de chegada no detector.

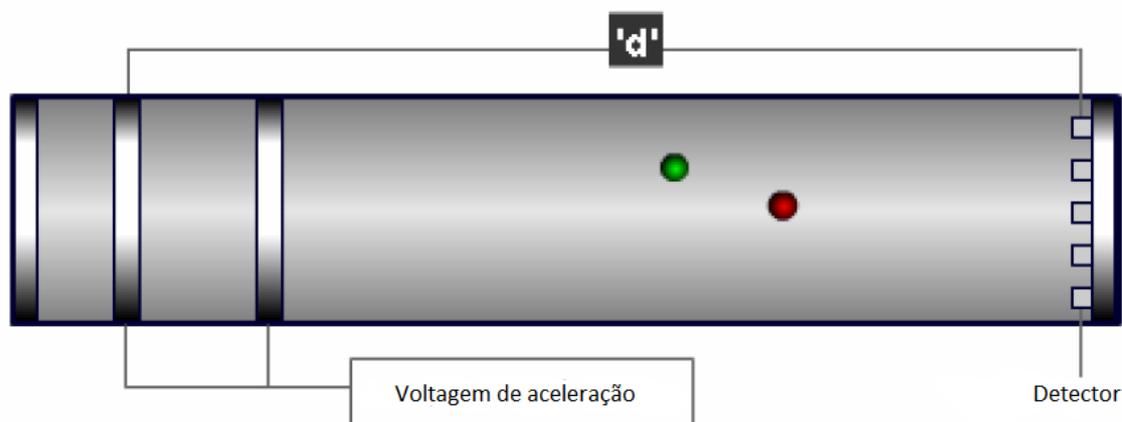


Figura 10 – Desenho esquemático de um detector do tipo TOF simples (Adaptado de EARL (Electronic Analytical Reference Library)).

2.4.2.2 Determinação de micotoxinas por cromatografia líquida

2.4.2.2.1 Determinação de micotoxinas por cromatografia líquida acoplada a detectores convencionais

Dentro os instrumentos de detecção mais comumente aplicados estão os detectores de ultravioleta (UV) e o de fluorescência. No caso dos detectores por fluorescência, é requisito necessário que o analito tenha presente (naturalmente ou por derivatização) presença de um cromóforo nas moléculas a serem determinadas (GONZÁLEZ *et al.*, 2010).

Várias micotoxinas, como a ocratoxina A e as aflatoxinas, têm fluorescência natural, e podem ser detectados diretamente pelo detector de fluorescência. No entanto, outras micotoxinas, como as fumonisinas, não possuem um grupo cromóforo adequado, e sua determinação exige derivatização pré-coluna (GONZÁLEZ *et al.*, 2010).

Uma vez que aflatoxinas têm propriedades fluorescentes, a detecção por fluorescência se mostra a melhor alternativa, pois esta é mais sensível do que a absorção por UV. No entanto, um dos principais problemas é que a maioria das aflatoxinas importantes (B1, B2, G1 e G2) tem fluorescência dependente da

composição da fase móvel, o que limita o uso de eluição por gradiente e pode dificultar sua separação (GONZÁLEZ *et al.*, 2010).

Em alguns poucos casos é possível a determinação simultânea de várias micotoxinas, como a Ocratoxina A e as aflatoxinas utilizando detectores de fluorescência com condições de detecção variáveis, porque estas são diferentes para as micotoxinas mencionadas (GONZÁLEZ *et al.*, 2010).

2.4.2.2.2 Determinação de micotoxinas por cromatografia líquida acoplada espectrometria de massas

A combinação da MS com a LC compõe uma técnica analítica completa e robusta. Os componentes das amostras são separados uns dos outros em diferentes momentos da corrida cromatográfica e têm suas massas individuais analisadas por MS para isolar, identificar e quantificar qualquer componente ionizável (FERNÁNDEZ-ALBA, 2005). Com a MS, muitas classes, de diferentes analitos, presentes em uma enorme diversidade de matrizes, podem ser identificadas com grande precisão (PIZZUTTI, 2006).

Através da aplicação da MS, um grande passo foi dado na análise de micotoxinas. Essa ferramenta possibilitou o desenvolvimento de métodos multitoxinas adequados para uma variedade de compostos com estruturas diversas, tornando possível em apenas uma análise determinar diversas micotoxinas de diferentes grupos (GONZÁLEZ *et al.*, 2010).

A necessidade da utilização desses métodos também reside no fato de que uma única espécie fúngica podem produzir toxinas diferentes ou um único produto agrícola pode ser contaminado com diferentes espécies de fungos, resultando na co-ocorrência de diferentes toxinas (GONZÁLEZ *et al.*, 2010).

Embora os fatores limitantes na utilização de MS como ferramenta analítica, sejam o alto custo dos equipamentos, os requisitos de laboratório relativamente avançados e as limitações no tipo dos solventes utilizados na extração e separação, nos últimos anos esta técnica tornou-se muito popular pois permite uma redução no tratamento da amostra e possui modo de detecção seletivo e sensível, o que garante sua aplicação universal (GONZÁLEZ *et al.*, 2010).

Além disso, ela permite um aumento na confiabilidade dos resultados obtidos. Enquanto detectores convencionais podem produzir resultados falso positivo ou

falso negativos os métodos que utilizam LC-MS mostraram-se capazes de realizar quantificação precisa, melhor seleção e maior sensibilidade em comparação com outros métodos cromatográficos (GONZÁLEZ *et al.*, 2010).

Vários analisadores de massa podem ser usado para a detecção de micotoxinas. Os detectores baseados em ITD, TQ ou TOF podem ser aplicados, pois oferecem maior confiança para a quantificação dos compostos (GONZÁLEZ *et al.*, 2010).

Entre estes, os analisadores TOF apresentam diversas vantagens como a capacidade, em contraste com quadrupolo ou armadilha de íons, de detectar uma larga faixa de massas sem perda significativa da sensibilidade. Além disso, os instrumentos TOF fornecem faixa de massa maior com maior sensibilidade e precisão, devido à sua resolução mais elevada (GONZÁLEZ *et al.*, 2010).

Hoje em dia, não há dúvida com relação a aplicabilidade do MS/MS para a determinação inequívoca de micotoxinas. Apesar disso, um grande desafio ainda é observado com relação as dificuldades na etapa de quantificação devido a interferência dos componentes da matriz (GONZÁLEZ *et al.*, 2010).

2.5 Validação de métodos analíticos

A adequação ao uso de métodos analíticos aplicados a ensaios rotineiros é geralmente avaliada através de estudos de validação. A validação é uma avaliação que garante que as informações geradas por um método analítico sejam confiáveis e interpretáveis sobre a amostra a que se refere (EURACHEM, 2000).

Atualmente, há vários conceitos e definições, provenientes tanto de pesquisadores quanto de agências e normas reguladoras nacionais e internacionais, que objetivam responder questões condizentes à função da validação de métodos e de que maneira deve ser realizada (PIZZUTTI, 2006).

Orgãos de credenciamento, como a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e o Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO), exigem o item “validação de métodos analíticos” como um requisito fundamental para a qualidade assegurada e demonstração da competência técnica analítica dos laboratórios.

Dentro dos parâmetros importantes envolvidos na validação de métodos analíticos estão a linearidade, estudos de exatidão e precisão e os limites de detecção e de quantificação (INMETRO, 2011).

2.5.1 Linearidade e curva analítica

A linearidade de um método quantitativo pode ser definida pela sua capacidade em demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais a concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado. (ALBANO & RODRIGUEZ, 2009).

A linearidade de um método pode ser observada pelo gráfico dos resultados dos ensaios (resposta do equipamento) em função da concentração do analito para as diferentes concentrações estudadas (INMETRO, 2011).

Para a maioria das técnicas cromatográficas, observa-se uma relação linear de primeira ordem entre a resposta instrumental medida (y , variável dependente) e a concentração do analito (x , variável independente). Essa relação produz uma equação de regressão linear, ou seja, $y = ax + b$, que relaciona as duas variáveis x e y e gera os coeficientes de regressão angular a (inclinação da curva/sensibilidade) e linear b (valor que y assume, quando $x = 0$). A partir dos dados obtidos na curva é possível calcular o coeficiente de correlação (ou de Pearson) (r) e o coeficiente de determinação (r^2).

Segundo o INMETRO, a obtenção de r com valores maiores ou iguais a 0,90 são os recomendados para análises de compostos ao nível de traço.

O intervalo entre os níveis inferior e superior de concentração do analito no qual foi demonstrado ser possível a determinação com a precisão, exatidão e linearidade exigidas, sob as condições específicas do ensaio, é denominado faixa linear de trabalho. É importante que este intervalo possa cobrir a faixa de aplicação para o qual o ensaio será realizado (INMETRO, 2011).

2.5.2 Seletividade

A seletividade é a capacidade do método de discriminação entre o analito analisado e compostos análogos. Um método que apresenta alta seletividade é

capaz de determinar o analito de forma exata mesmo em presença de interferentes provenientes da amostra (ALBANO *ET AL.*, 2009).

A seletividade é considerada um parâmetro importante, especialmente na análise de amostras complexas, e está relacionada ao evento de detecção. (LANÇAS, 2004) Um método que consegue produzir respostas para vários analitos, mas que pode distinguir a resposta de um analito entre os vários outros, é chamado seletivo (INMETRO, 2011).

2.5.3 Limites de detecção e de quantificação

Nas determinações de analitos presentes nas amostras em níveis muito baixos (traço), a determinação da menor concentração em que o analito pode ser detectado com confiabilidade é muito importante para evitar resultados errôneos (INMETRO, 2011).

O Limite de detecção (LOD, do idioma inglês *Limit of Detection*) de um método é definido como a concentração mínima do analito medida e declarada com 95 ou 99% de confiança que a concentração do analito é maior que zero. Pode ser determinado mediante o sinal/ruído, o desvio-padrão da resposta, do coeficiente angular e por processos estatísticos. Já o Limite de quantificação (LOQ, do idioma inglês *Limit of Quantification*) é a menor concentração do analito que pode ser determinada com um nível aceitável (20%) de exatidão e precisão (INMETRO, 2007; PIZZUTTI, 2006).

2.5.4 Exatidão

A concordância entre o resultado de um ensaio e o valor de referência aceito como convencionalmente verdadeiro é definido como a exatidão de um método em questão (INMETRO, 2007).

A exatidão representa a existência de erros sistemáticos, e é um dos critérios mais importantes para o julgamento do desempenho de um método analítico. Os processos normalmente utilizados para avaliar a exatidão de um método são: uso de materiais de referência certificado, participação em comparações interlaboratoriais e realização de ensaios de recuperação (INMETRO, 2007)

Na indisponibilidade de material de referência certificado, a exatidão pode ser avaliada através dos ensaios de fortificação e recuperação (INMETRO, 2007), geralmente expressa em percentual de recuperação absoluta, que pode ser calculada através da Equação (3) descrita abaixo.

$$R\% = \frac{C_1 - C_2}{C_3} \times 100 \quad (3)$$

Onde:

R% = Percentual de recuperação absoluta;

C₁ = Concentração determinada na amostra fortificada;

C₂ = Concentração determinada na amostra não fortificada;

C₃ = Concentração usada para fortificação.

Em geral, são aceitos intervalos de recuperação entre 70 e 120%, com precisão de até 20% para a maioria dos métodos analíticos para determinação de analitos em matrizes complexas (SANCO, 2009).

2.5.5 Precisão

A medida da precisão do método busca avaliar a dispersão dos resultados de ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, em amostras semelhantes ou em soluções padrão, analisadas em condições definidas (ALBANO & RODRIGUEZ, 2009).

A precisão reflete a concordância entre vários valores experimentais obtidos e quanto menor for a amplitude de medidas, maior será a precisão. Esta medida reflete a tendência de maior ou menor afastamento (erro) entre os resultados dos ensaios (ALBANO & RODRIGUEZ, 2009).

As maneiras mais comuns de expressar a precisão é através da repetitividade e reprodutibilidade, sendo usualmente expressa pelo desvio-padrão (INMETRO, 2007; ALBANO & RODRIGUEZ, 2009).

A precisão pode ser numericamente expressa em termos do desvio padrão relativo (RSD, do idioma inglês *Relative Standard Deviation*) (Equação 4).

$$\text{RSD}\% = \frac{s}{x_m} \times 100 \quad (4)$$

Onde:

s = estimativa do desvio padrão absoluto;

x_m = valor médio determinado.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Este trabalho foi desenvolvido como parte de um projeto de cooperação científica entre o Centro de Pesquisa e Análise de Resíduos e Contaminantes (CEPARC), do Departamento de Química da UFSM e o *Food and Consumer Product Safety Authority* (NVWA), laboratório do governo Holandês, situado na cidade de Amsterdã (Holanda), o qual disponibilizou sua infra-estrutura e apoio técnico para a realização dos experimentos envolvidos nesse projeto.

No desenvolvimento deste trabalho foram estudadas algumas modificações no método QuEChERS aplicadas a extração de micotoxinas em amostras de vinho tinto. Durante o estudo testou-se a utilização de diferentes quantidades de amostra, tamponamento e acidificação do meio de extração, além da aplicação de diferentes adsorventes e misturas destes em diferentes quantidades, para a purificação dos extratos das amostras de vinho tinto. Em seguida, as amostras foram submetidas à análise por UPLC-MS/MS no modo de ionização ESI positivo.

Após a validação do método realizou-se a aplicação do mesmo, através do monitoramento de 56 amostras de vinho adquiridas nos supermercados da cidade de Amsterdã (Holanda), provenientes de diversos países.

3.1 Instrumentação

- ✓ Cromatógrafo a líquido, sistema Acquity UPLC-MS/MS (Waters, EUA) composto por:
 - Amostrador automático, bomba quaternária, forno para coluna e sistema de degaseificação;
 - Coluna cromatográfica BECH C₁₈, 100 mm de comprimento, 2,1 mm de diâmetro interno e 1,7 µm de tamanho de partícula (Waters, EUA);
- ✓ Detector MS Triplo Quadrupolo, Quattro Premier XE (Waters Micromass, Inglaterra) com fonte API, utilizando o modo de ionização por eletronebulização com interface Z-spray, operando no modo positivo;
- ✓ Sistema de aquisição de dados através do *software* MassLynx e Targetlynx 4.1 (Waters Micromass, Inglaterra);

- ✓ Sistema de purificação de água Milli-Q[®] - resistividade 18,2 MΩcm (MilliPore[®], EUA);
- ✓ Balança analítica de precisão com 4 casas decimais (Sartorius, Alemanha);
- ✓ Balança analítica de precisão com 2 casas decimais (Sartorius, Alemanha);
- ✓ Lavadora automática de vidrarias G 7883 CD (Miele, EUA);
- ✓ Centrífuga Falcon 6/300, Refrigerada (MSE, Inglaterra);
- ✓ Mesa agitadora H501 (IKA, Alemanha);
- ✓ Pipetador Hand Step (Brand, Alemanha);

3.2 Materiais

- ✓ Seringas de volumes de 10, 25, 50, 100, 250, 500 e 1000 µL, (Hamilton, Suíça);
- ✓ Tubos de polipropileno, com tampas rosqueadas, capacidade de 50 mL e 25 mL (Nalgene, EUA);
- ✓ Frascos de vidro âmbar, capacidade de 20, 50 e 100 mL, com tampa rosqueada e batoque de teflon e silicone (Beste, Holanda);
- ✓ Vidrarias comuns de laboratório.

3.3 Gases, solventes e reagentes

- ✓ Argônio 99,999% de pureza (Air Liquid, França/ Air Gases, Brasil) (gás de colisão do UPLC-MS/MS);
- ✓ Nitrogênio 99,999% de pureza (Air Products, Holanda) (gás de dessolvatação do UPLC-MS/MS)
- ✓ Acetonitrila, ácido acético glacial, ácido fórmico e metanol, grau pesticida (Merck, Alemanha ou J. T. Baker Chemicals, EUA);
- ✓ Sulfato de magnésio anidro, grau pesticida (Merck, Alemanha);
- ✓ Formiato de amônio analar normapur, grau resíduo (VWR, EUA);
- ✓ C18, Florisil, Absolut NEXUS[®] e carbono grafitizado (Varian, Holanda);
- ✓ Chlorofiltr[®] (UCT, USA);
- ✓ OASIS HLB[®] (Waters, USA)

3.4 Micotoxinas selecionadas

Os padrões de micotoxinas selecionados para este estudo foram adquiridos de diversas companhias, as quais estão listadas na Tabela 3. Os padrões foram escolhidos devido relevância na contaminação de alimentos e por serem os de incidência mais comum.

3.5 Preparo das soluções analíticas

O preparo das soluções analíticas estoque foi efetuado de maneira diferenciada para cada uma das micotoxinas. Efetuou-se o cálculo para determinar a massa de cada padrão sólido de micotoxina a ser pesado e o volume no qual deveria ser dissolvido, em solvente apropriado, para obtenção da concentração final pretendida.

Os padrões foram pesados individualmente, diretamente dentro de frascos de vidro âmbar (tampa contendo batoque de teflon[®]), com capacidade de 20 mL, sendo em seguida, dissolvidos com volumes adequados dos solventes apropriados, dependendo da solubilidade de cada um, e homogeneizados. As concentrações das soluções estoque preparadas e os solventes utilizados para preparo de cada solução analítica de micotoxina encontram-se na Tabela 3.

Considerando que cada um dos grupos de micotoxinas estudados apresentam diferentes sensibilidades, necessitou-se que cada um desses grupos fossem estudados em níveis de fortificação diferentes. Por essa razão, a solução mistura é composta pelas 36 micotoxinas, divididas em 3 grupos, com concentrações distintas.

Como na maioria dos casos os padrões sólidos de micotoxinas não apresentam pureza especificada (por não serem obtidos sinteticamente e sim a partir de microorganismos), faz-se necessário a confirmação da sua concentração final através de outros métodos analíticos.

As soluções analíticas de Aflatoxina B1, B2, G1, G2 e de Ocratoxina A, Nivalenol, Zearalenona e Deoxinivalenol, por exemplo, tem suas concentrações confirmadas através da medida das absorvância destas soluções no comprimento de onda da região ultravioleta ou visível (UV-Vis) do espectro eletromagnético onde

apresentam máxima absorção. As demais soluções que não apresentam absorção na região UV-Vis tem suas concentrações confirmadas através da comparação do sinal analítico obtido com outra solução certificada de outro fabricante ou laboratório.

Depois de realizado o preparo das soluções estoque individuais, preparou-se 200 mL de uma mistura de todos os compostos a serem analisados por LC-MS/MS, em acetonitrila. A concentração de cada micotoxina na solução mistura encontra-se também descrita na Tabela 3. Essa solução foi armazenada em 4 frascos âmbar diferentes (tampa contendo batoque de teflon[®]), com capacidade de 50 mL, evitando assim possíveis contaminações e/ou evaporações provenientes da manipulação constante do volume total da solução. Esta solução é estável por cerca de 1 ano, segundo histórico de testes de estabilidade realizados pelo próprio laboratório.

Todas as soluções analíticas de trabalho foram armazenadas em congelador a -20 °C. Antes do uso, tais soluções eram retiradas com antecedência do congelador e deixadas em repouso até atingirem a temperatura ambiente. Posteriormente, eram submetidas a banho de ultrassom por 5 minutos para completa homogeneização.

Para a confecção das curvas analíticas de trabalho, usadas para os estudos de linearidade e de efeito matriz, as soluções analíticas foram preparadas a partir desta solução mistura. Adicionou-se volumes definidos dessa solução em 7 balões volumétricos e completou-se o volume com metanol (contendo P.I.I.), conforme descrito no apêndice 2. Feito isso, transferiu-se 500 µL de cada um dos 7 níveis obtidos anteriormente para *vials* separados e a cada um deles adicionou-se 500 µL do solvente de extração (acetonitrila contendo 1% ácido acético e P.I.P.), para confecção da curva analítica em solvente.

Para confecção da curva analítica em extrato da matriz transferiu-se 500 µL de cada um dos 7 níveis preparados em metanol (contendo P.I.I) para *vials* separados e a cada um deles adicionou-se 500 µL do extrato branco de vinho tinto, visando que tanto as curvas analíticas em solvente quanto aquelas em extrato da matriz alcançassem as concentrações finais apresentadas na Tabela 4, para cada micotoxina.

Para os ensaios de fortificação, utilizou-se também a solução mistura, preparada em acetonitrila, com as concentrações conforme exposto na Tabela 3.

Tabela 3 – Fornecedores dos padrões sólidos de micotoxinas, solventes utilizados no preparo das soluções estoque e concentrações das micotoxinas nas soluções estoques e nas soluções misturas.

Micotoxina	Grupo	Fornecedor	Solvente	Concentração da solução estoque ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Concentração da solução mistura ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
Aflatoxina B1	1	Sigma Aldrich	Metanol	54,0	0,5
Aflatoxina B2	1	Sigma Aldrich	Metanol	56,5	0,5
Aflatoxina G1	1	Sigma Aldrich	Metanol	100	0,5
Aflatoxina G2	1	Sigma Aldrich	Metanol	41,5	0,5
Ocratoxina A	1	Acros	Tolueno/ 1% Hac	32	0,5
Deoxinivalenol (DON)	2	Sigma Aldrich	Acetonitrila	1000	25
Fumonisina B1	2	Sigma Aldrich	Acetonitrila/água (1:2, v/v)	1000	25
Fumonisina B2	2	Sigma Aldrich	Acetonitrila/água (1:3, v/v)	1000	25
Fumonisina B3	2	Sigma Aldrich	Acetonitrila	105	25
Nivalenol (NIV)	2	Sigma Aldrich	Acetonitrila	1000	25
Diacetoxiscirpenol (DAS)	2	Sigma Aldrich	Acetonitrila	1000	25
T2-Toxina	2	Fermentek	Acetonitrila	1000	25
HT2-Toxina	2	Fermentek	Acetonitrila	1000	25
3-Ac-DON	2	Sigma Aldrich	Acetonitrila	1000	25
Zearalenona (ZEN)	2	Sigma Aldrich	Acetonitrila	1000	25
15-Ac-DON	2	Sigma Aldrich	Acetonitrila	1000	25
Ácido Penicílico	2	Fermentek	Acetonitrila	1000	25
Fusarenona-X	2	Sigma Aldrich	Acetonitrila	1000	25
β - Zearalanol (β - ZAL)	2	Sigma Aldrich	Acetonitrila	1000	25
α -Zearalanol (α -ZAL)	2	Sigma Aldrich	Acetonitrila	1000	25
Citrinina	2	Sigma Aldrich	Acetonitrila	1000	25
Zearalanone (ZAN)	2	Sigma Aldrich	Acetonitrila	1000	25
Ácido Ciclopiazônico (CPA)	2	Fermentek	Acetonitrila	1000	25
Esterigmatocisteina	2	Sigma Aldrich	Acetonitrila	1000	25
Roquefortina C	2	Iris Biotech GmbH	Acetonitrila	100	25
α -Zearalenol (α -ZEL)	2	Sigma Aldrich	Acetonitrila	1000	25
Ácido micofenólico	2	Sigma Aldrich	Acetonitrila	1000	25
Altenariol	2	Sigma Aldrich	Acetonitrila	1000	25
Altenariol Metílico	2	Sigma Aldrich	Acetonitrila	1000	25
Ergotamina	3	Biopure	Acetonitrila	500	5
Ergonovina	3	Biopure	Acetonitrila	500	5
Ergocornina	3	Biopure	Acetonitrila	500	5
Ergocriptina	3	Biopure	Acetonitrila	500	5
Ergocristina	3	Biopure	Acetonitrila	500	5
Ergosina	3	Biopure	Acetonitrila	500	5
Mevinolina	3	Sigma Aldrich	Acetonitrila	100	5

Tabela 4 – Concentração final das micotoxinas nas soluções das curvas analíticas e níveis de fortificação aplicados para o estudo de recuperação.

Micotoxina	Concentração das soluções utilizadas para confecção da curva analítica (ng mL ⁻¹) Níveis 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7							Níveis de fortificação para o estudo de recuperação (µg kg ⁻¹)		
	0,1	0,2	0,5	1,0	2,0	5,0	10,0	1,0	2,5	10,0
Aflatoxina B1	0,1	0,2	0,5	1,0	2,0	5,0	10,0	1,0	2,5	10,0
Aflatoxina B2	0,1	0,2	0,5	1,0	2,0	5,0	10,0	1,0	2,5	10,0
Aflatoxina G1	0,1	0,2	0,5	1,0	2,0	5,0	10,0	1,0	2,5	10,0
Aflatoxina G2	0,1	0,2	0,5	1,0	2,0	5,0	10,0	1,0	2,5	10,0
Ocratoxina A	0,1	0,2	0,5	1,0	2,0	5,0	10,0	1,0	2,5	10,0
Deoxinivalenol (DON)	5,0	10,0	25,0	50,0	100,0	250,0	1000,0	50,0	125,0	500,0
Fumonisina B1	5,0	10,0	25,0	50,0	100,0	250,0	1000,0	50,0	125,0	500,0
Fumonisina B2	5,0	10,0	25,0	50,0	100,0	250,0	1000,0	50,0	125,0	500,0
Fumonisina B3	5,0	10,0	25,0	50,0	100,0	250,0	1000,0	50,0	125,0	500,0
Nivalenol (NIV)	5,0	10,0	25,0	50,0	100,0	250,0	1000,0	50,0	125,0	500,0
Diacetoxiscirpenol (DAS)	5,0	10,0	25,0	50,0	100,0	250,0	1000,0	50,0	125,0	500,0
T2-Toxina	5,0	10,0	25,0	50,0	100,0	250,0	1000,0	50,0	125,0	500,0
HT2-Toxina	5,0	10,0	25,0	50,0	100,0	250,0	1000,0	50,0	125,0	500,0
3-Ac-DON	5,0	10,0	25,0	50,0	100,0	250,0	1000,0	50,0	125,0	500,0
Zearalenona (ZEN)	5,0	10,0	25,0	50,0	100,0	250,0	1000,0	50,0	125,0	500,0
15-Ac-DON	5,0	10,0	25,0	50,0	100,0	250,0	1000,0	50,0	125,0	500,0
Ácido Penicílico	5,0	10,0	25,0	50,0	100,0	250,0	1000,0	50,0	125,0	500,0
Fusarenona-X	5,0	10,0	25,0	50,0	100,0	250,0	1000,0	50,0	125,0	500,0
β-Zearalanol (β-ZAL)	5,0	10,0	25,0	50,0	100,0	250,0	1000,0	50,0	125,0	500,0
α-Zearalanol (α-ZAL)	5,0	10,0	25,0	50,0	100,0	250,0	1000,0	50,0	125,0	500,0
Citrinina	5,0	10,0	25,0	50,0	100,0	250,0	1000,0	50,0	125,0	500,0
Zearalanone (ZAN)	5,0	10,0	25,0	50,0	100,0	250,0	1000,0	50,0	125,0	500,0
Ácido Ciclopiazônico (CPA)	5,0	10,0	25,0	50,0	100,0	250,0	1000,0	50,0	125,0	500,0
Esterigmatocisteina	5,0	10,0	25,0	50,0	100,0	250,0	1000,0	50,0	125,0	500,0
Roquefortina C	5,0	10,0	25,0	50,0	100,0	250,0	1000,0	50,0	125,0	500,0
α-Zearalenol (α-ZEL)	5,0	10,0	25,0	50,0	100,0	250,0	1000,0	50,0	125,0	500,0
Ácido micofenólico	5,0	10,0	25,0	50,0	100,0	250,0	1000,0	50,0	125,0	500,0
Altenariol	5,0	10,0	25,0	50,0	100,0	250,0	1000,0	50,0	125,0	500,0
Altenariol Metílico	5,0	10,0	25,0	50,0	100,0	250,0	1000,0	50,0	125,0	500,0
Ergotamina	1,0	2,0	5,0	10,0	20,0	50,0	100,0	10,0	25,0	100,0
Ergonovina	1,0	2,0	5,0	10,0	20,0	50,0	100,0	10,0	25,0	100,0
Ergocormina	1,0	2,0	5,0	10,0	20,0	50,0	100,0	10,0	25,0	100,0
Ergocriptina	1,0	2,0	5,0	10,0	20,0	50,0	100,0	10,0	25,0	100,0
Ergocristina	1,0	2,0	5,0	10,0	20,0	50,0	100,0	10,0	25,0	100,0
Ergosina	1,0	2,0	5,0	10,0	20,0	50,0	100,0	10,0	25,0	100,0
Mevinolina	1,0	2,0	5,0	10,0	20,0	50,0	100,0	10,0	25,0	100,0

3.6 Avaliação e armazenamento das amostras branco

Na ausência de material de referência, amostras foram adquiridas e avaliadas para o uso como amostras branco.

As amostras de vinho tinto biológico (todas de mesmo lote) foram adquiridas no comércio da cidade de Amsterdã (Holanda), homogeneizadas e armazenadas em frascos de teflon[®] com tampa e identificação.

3.7 Desenvolvimento, otimização e validação do método multirresíduo

3.7.1 Condições cromatográficas

As condições cromatográficas utilizadas nesse estudo foram estabelecidas de acordo com os estudos de Spanjer *et al.* (2008), e encontram-se descritas nos procedimentos operacionais padrão do NVWA.

As condições instrumentais empregadas para o sistema de LC-MS/MS foram as seguintes:

- ✓ Para o LC:
 - Volume de injeção de 2 μL , no modo *partil loop with needle overfill* realizado pelo amostrador automático;
 - Temperatura do forno da coluna constante: 60 °C;
 - Eluente A: Água (0,1% de ácido fórmico);
 - Eluente B: Acetonitrila (0,1% de ácido fórmico);
 - O programa foi iniciado em 90% eluente A e foi diretamente levado a 30% em 10 min, mantendo-se constante durante 0,1 min e diminuindo linearmente para 10% do eluente A. Esta condição foi mantida constante durante 2 min. A coluna foi re-equilibrada no último minuto para a composição inicial da fase móvel;
 - Vazão da fase móvel constante em 0,45 mL min⁻¹;
 - Tempo total de corrida de 13 minutos.

- ✓ Para o MS:
 - Ionização por API com ESI no modo positivo;

- Parâmetros da fonte de ionização: voltagem do capilar de 2,0 kV, temperatura 120 °C;
- Temperatura do gás de dessolvatação: 400 °C;
- Vazões do gás nitrogênio para dessolvatação e para o cone da amostragem, respectivamente 100 e 700 L h⁻¹;
- Pressão de 3,5 x 10⁻³ mbar de argônio para colisão e fragmentação dos íons;
- A energia de colisão e a voltagem no cone de amostragem foram otimizadas para cada uma das micotoxinas através da infusão das soluções analíticas diretamente no MS, na vazão de 10 µL min⁻¹. Duas transições MRM foram monitoradas para cada um dos analitos, sendo a primeira empregada para a quantificação do analito e a segunda para a confirmação do mesmo. Para cada composto definiu-se uma razão (*ion ration*) entre as áreas destas transições. Essas condições estão sumarizadas na Tabela 5.

Tabela 5 – Condições de análise definidas para as micotoxinas empregando UPLC-MS/MS, no modo de ionização ESI positivo em amostras de vinho tinto.

Micotoxinas	t _R (min)	Íon Precursor	Voltagem do Cone (V)	Transições			
				Quantificação		Confirmação	
				Íon Produto	Energia de Colisão (eV)	Íon produto	Energia de Colisão (eV)
Aflatoxina B1	7,3	313,1	50	241,1	37	285,0	23
Aflatoxina B2	7,0	315,1	50	259,1	30	287,1	26
Aflatoxina G1	7,0	329,1	40	243,1	25	214,3	25
Aflatoxina G2	6,7	331,1	50	245,1	30	275,1	30
Ocratoxina A	8,9	404,1	25	239,1	22	241,1	22
Deoxinivalenol (DON)	1,5	297,2	23	249,1	10	231,2	12
Fumonisina B1	7,3	722,4	58	334,4	42	352,4	37
Fumonisina B2	8,0	706,5	59	336,4	34	318,4	40
Fumonisina B3	7,8	706,5	59	336,4	34	318,4	40
Nivalenol (NIV)	1,0	313,0	13	175,0	20	195,0	8
Diacetoxiscirpenol (DAS)	7,3	367,3	14	307,3	10	289,3	12
T2-Toxina	8,7	467,4	8	305,2	8	245,3	7
HT2-Toxina	7,8	425,3	23	263,2	10	105,1	37
3-Ac-DON	5,7	339,3	28	231,2	13	203,2	18
Zearalenona (ZEN)	8,8	319,1	24	187,0	18	184,9	26
15-Ac-DON	5,7	339,3	19	137,2	15	261,2	10
Ácido Penicílico	3,5	171,1	20	125,1	12	153,1	6
Fusarenona-X	2,9	355,0	20	247,0	16	229,0	16
β-Zearalanol (β-ZAL)	7,8	323,3	16	305,3	8	277,1	16
α-Zearalanol (α-ZAL)	8,2	323,3	16	305,3	8	277,1	16
Citrinina	7,9	251,2	30	205,2	27	191,2	23
Zearalanone (ZAN)	8,8	321,3	29	303,2	13	285,2	16
Ácido Ciclopiazônico (CPA)	9,5	337,3	39	196,2	23	182,1	20
Esterigmatocisteina	9,0	325,1	50	281,1	34	253,3	42
Roquefortina C	7,4	390,3	44	193,1	27	322,3	22
α-Zearalenol (α-ZEL)	8,3	321,0	15	303,0	7	285,0	12
Ácido micofenólico	8,3	320,8	22	206,8	23	274,8	16
Altenariol	7,6	258,8	48	184,8	29	213,0	25
Altenariol Metílico	8,9	273,1	50	183,8	36	198,8	29
Ergotamina	7,0	582,3	38	268,2	27	208,2	48
Ergonovina	1,9	325,9	38	222,9	22	283,0	18
Ergocornina	7,2	562,0	36	268,0	26	544,0	17
Ergocriptina	7,5	576,4	32	268,0	26	305,0	25
Ergocristina	7,7	610,0	25	268,0	28	304,9	23
Ergosina	7,0	548,0	35	223,0	35	208,0	45
Mevinolina	10,6	405,1	20	198,9	13	285,0	10

3.7.2 Seleção do padrão interno

A fim de propiciar uma avaliação capaz de confirmar a eficiência e a qualidade geral do procedimento de extração e da análise cromatográfica, houve a introdução de padrões internos nos experimentos realizados neste estudo.

O escopo maior deste trabalho buscou o desenvolvimento de um método capaz de promover a extração de pesticidas e micotoxinas simultaneamente, isto é, permitir que através de um único procedimento de extração fosse obtido um extrato possível de ser aplicado na determinação de uma gama de pesticidas e micotoxinas, evitando assim a necessidade de dois procedimentos de extração distintos para a mesma amostra. Por essa razão os compostos escolhidos para serem empregados como padrão interno neste estudo são pesticidas que apresentam comportamento químico semelhante as micotoxinas estudadas.

A quantificação foi realizada por padronização externa, ou seja, levando-se em consideração apenas a área do pico da micotoxina em estudo.

3.7.3 Análise da pureza dos solventes, reagentes e água

A fim de verificar a pureza dos reagentes utilizados nesse estudo foi realizada análise destes através dos mesmos procedimentos de extração, porém, sem a adição da amostra, conforme descrito no item 3.7.5. O mesmo volume de água adicionado à amostra na etapa de extração foi adicionado junto aos solventes e reagentes para avaliar a presença de interferências que possam estar associadas à qualidade da água.

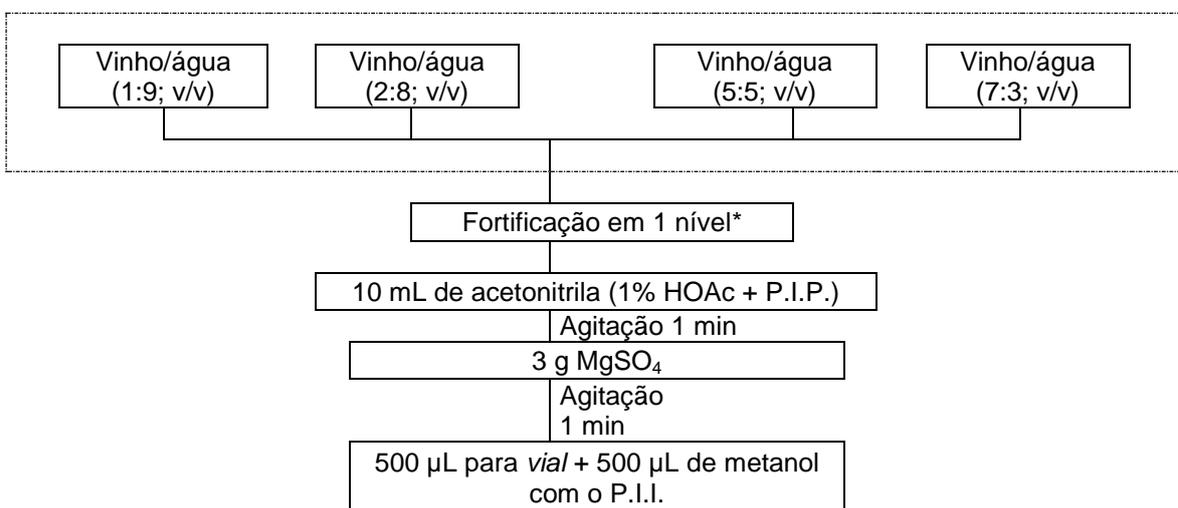
3.7.4 Experimentos para otimização do procedimento de extração e purificação

Durante o desenvolvimento deste trabalho, buscou-se otimização completa do método para determinação das 36 micotoxinas. Para isso foram estudados alterações nos procedimentos já descritos na literatura, baseados no Método QuEChERS (LEHOTAY *et al.*, 2005) para que fossem alcançadas as condições mais adequadas para fins de validação.

A aparência visual límpida do vinho tinto não traduz em sua não complexidade de matriz, pois durante o procedimento de extração, compostos tais como os ácidos graxos e álcool podem ser co-extraídos e gerar interferências na determinação dos analitos de interesse. Essas interferências podem comprometer ainda mais a análise quantitativa quando se emprega ESI-MS/MS, podendo promover a ocorrência de supressão ou aumento do sinal, o que torna a interpretação ambígua e muitas vezes errônea, pois dificulta a confirmação dos analitos. (STASHENKO & MARTÍNEZ, 2010)

3.7.4.1 Estudo do volume da matriz (amostra de vinho tinto)

Com a intenção de diminuir o efeito de matriz observado e corrigir os problemas na separação das fases, devido à presença de etanol na amostra, foram testadas diferentes proporções da mistura vinho/água no início do procedimento de preparo da amostra. A Figura 11 demonstra o esquema do experimento onde se testou as variações das proporções vinho/água.



- * $4 \mu\text{g kg}^{-1}$ (Grupo 1) / $200 \mu\text{g kg}^{-1}$ (Grupo 2) / $40 \mu\text{g kg}^{-1}$ (Grupo 3)
- Padrão interno do Procedimento (P.I.P.) = Quinalfós
- Padrão interno do Instrumento (P.I.I.) = Propoxur

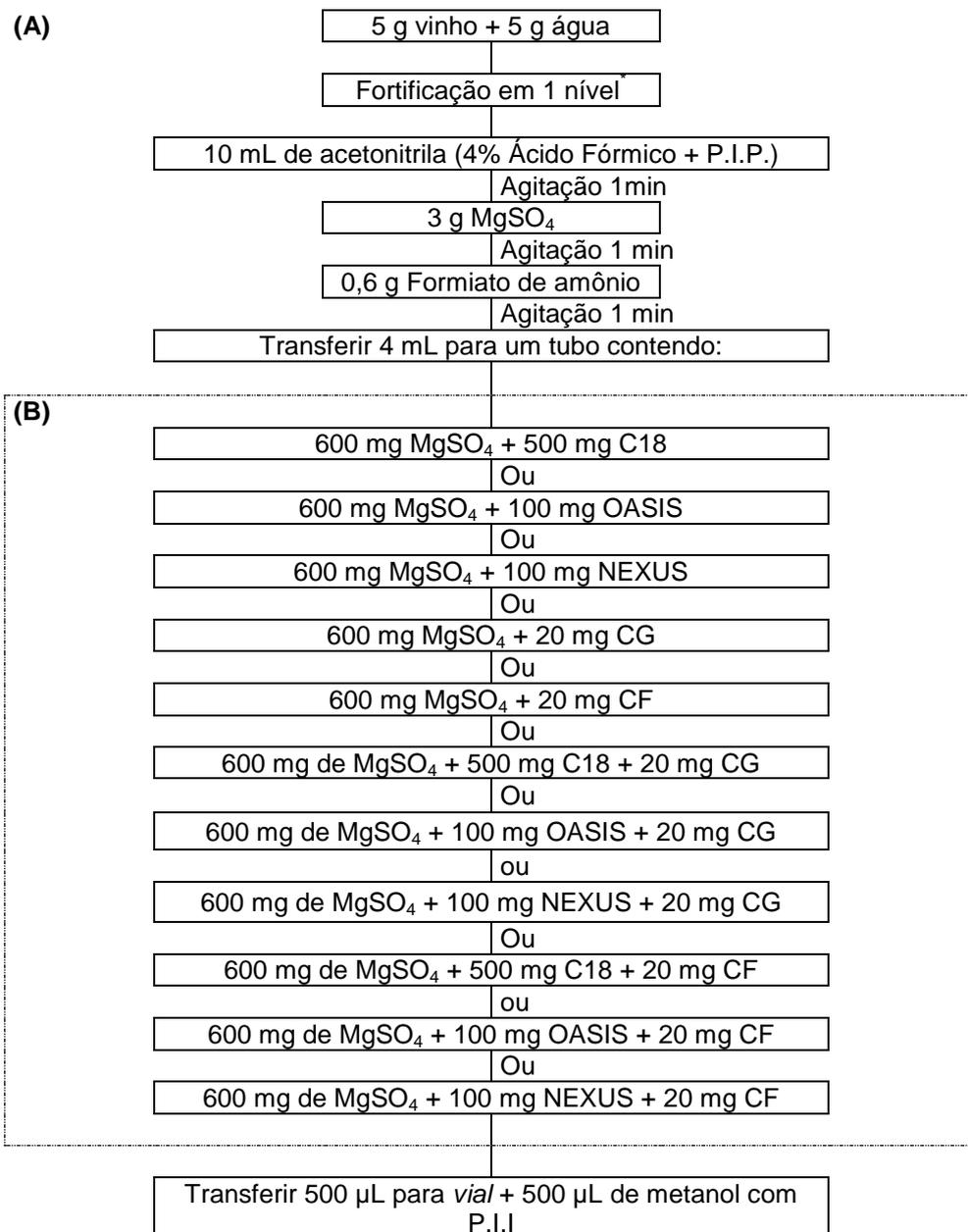
Figura 11 – Esquema do experimento avaliando a proporção vinho/água, fortificando todas as micotoxinas em um nível de concentração e procedendo a extração com acetonitrila acidificada.

3.7.4.2 Purificação do extrato e tamponamento do meio reacional

Considerando a grande interferência exercida pelos componentes da matriz buscou-se desenvolver um procedimento de purificação eficaz na redução deste efeito sem a perda dos compostos de interesse.

Foram avaliados diferentes adsorventes e misturas entre eles. Os adsorventes estudados por dSPE foram C18, Oasis[®], Nexus[®], Carbono Grafitizado (CG) e ChloroFiltr[®] (CF) em quantidades conforme descrito na Figura 12.

Conhecidamente, a estabilidade das micotoxinas durante o procedimento de extração é diretamente dependente do pH do meio em que se encontram. O controle deste parâmetro durante a extração pode evitar baixas recuperações e também baixa precisão do método analítico. Pensando nisso, aliado aos estudos de purificação, simultaneamente, verificou-se o efeito da formação de uma solução tampão de ácido fórmico/formiato de amônio no meio extrator em vez da combinação ácido acético/acetato de sódio, já amplamente estudado por Lehotay (LEHOTAY *et al.*, 2005) (Figura 12).



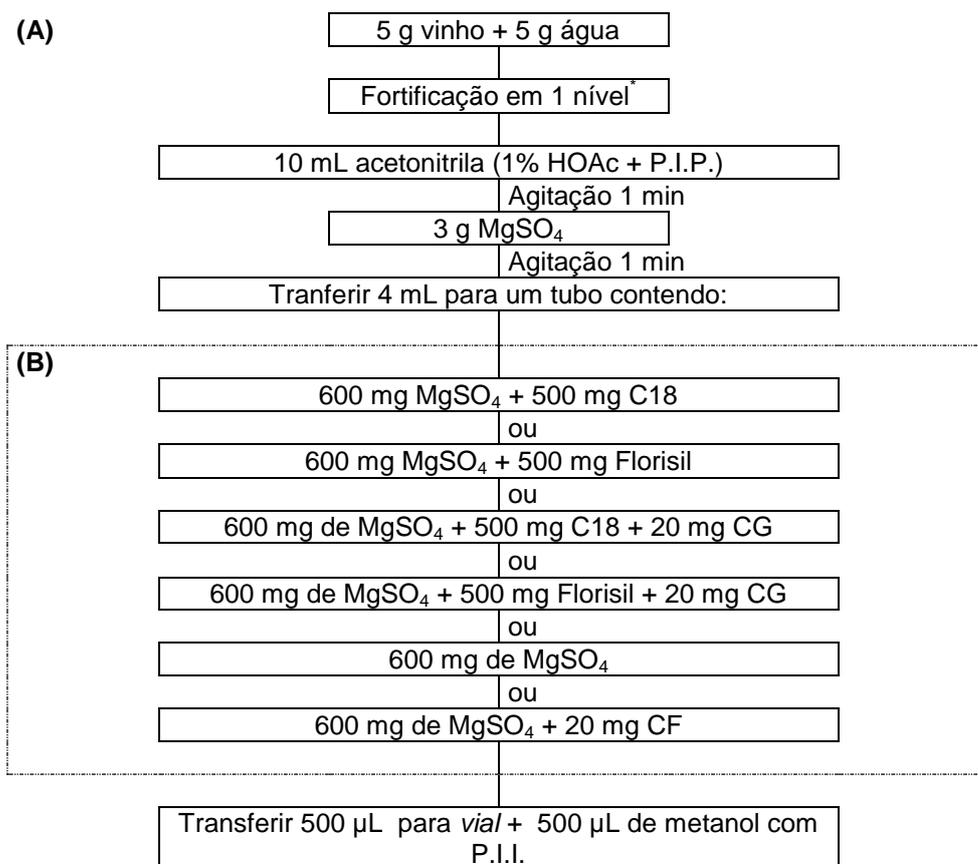
* $4 \mu\text{g kg}^{-1}$ (Grupo 1) / $200 \mu\text{g kg}^{-1}$ (Grupo 2) / $40 \mu\text{g kg}^{-1}$ (Grupo 3)

† Padrão interno do Procedimento (P.I.P.) = Quinalfós

‡ Padrão interno do Instrumento (P.I.I.) = Propoxur

Figura 12 – (A) Esquema dos experimentos estudados com etapa de tamponamento com ácido fórmico e formiato de amônio e (B) com purificação aplicando os adsorventes C18, Oasis HBL[®], Nexus[®], ChloroFiltr[®], carbono grafitizado e misturas entre eles.

Os adsorventes que apresentaram os melhores resultados com o tamponamento do meio reacional com ácido fórmico/formiato de amônio foram também avaliados considerando um meio de extração contendo apenas a adição de ácido acético 1%. Além de C18 e CF também foram testados alguns outros adsorventes como Florisil e CG e mistura entre eles. Também avaliou-se o procedimento sem purificação, apenas secagem com uso de MgSO_4 (Figura 13).



* $4 \mu\text{g kg}^{-1}$ (Grupo 1) / $200 \mu\text{g kg}^{-1}$ (Grupo 2) / $40 \mu\text{g kg}^{-1}$ (Grupo 3)

ˆ Padrão interno do Procedimento (P.I.P.) = Quinalfós

ˆ Padrão interno do Instrumento (P.I.I.) = Propoxur

Figura 13 – (A) Esquema do experimento sem o aplicação da etapa de tamponamento, apenas usando acetonitrila acidificada com ácido acético e (B) etapa de secagem extra e aplicação de dSPE com C18, Florisil, carbono grafitizado, ChloroFiltr[®] e misturas entre eles.

3.7.5 Validação do método

3.7.5.1 Curva analítica e linearidade

Avaliou-se a linearidade das curvas analíticas a partir das soluções analíticas tanto em solvente quanto no extrato da matriz (extrato “branco” da matriz, sem a presença de micotoxina fortificada).

Primeiramente, injetou-se metanol, e em seguida, 6 vezes a sequência das soluções analíticas preparadas conforme item 3.5. Para evitar *carryover* na coluna optou-se por uma sequência de injeção em que o primeiro nível em solvente e o primeiro nível em matriz de mesma concentração são injetados sucessivamente, seguindo em ordem crescente do nível 1 ao 7 (da menor para maior concentração). As concentrações estudadas para cada grupo de micotoxinas encontram-se na Tabela 4, no item 3.6, e o detalhamento dos volumes de solução mistura para obtenção de cada uma das concentrações encontra-se no Apêndice 2.

A partir dos dados obtidos realizaram-se os cálculos da média das áreas e do RSD %. Para obtenção das curvas analíticas ($y = ax + b$) os valores de concentração de cada micotoxina estudada foram plotados no eixo das abscissas e as respectivas áreas obtidas no eixo das ordenadas. A partir da plotagem desses dados obteve-se o coeficiente de determinação (r^2), o coeficiente angular (a) e o coeficiente linear (b) das curvas analíticas bem como a equação da reta, para cada micotoxina analisada.

3.7.5.2 Avaliação do efeito matriz

O efeito matriz representa uma das maiores fontes de erro nas determinações analíticas a nível de traços, especialmente de micotoxinas. Para realizar a avaliação da magnitude da interferência deste efeito nos resultados deste estudo aplicou-se dois métodos.

O primeiro deles baseia-se na comparação entre as áreas obtidas das soluções analíticas em solvente orgânico e daquelas obtidas com soluções analíticas preparadas no extrato da matriz (amostras de vinho tinto). O cálculo foi efetuado através da Equação 5 onde A1 representa a média das áreas da solução analítica de cada micotoxina, preparada em extrato da matriz, numa dada concentração e A2 a média das áreas da solução analítica de cada micotoxina,

preparada em solvente, numa dada concentração. Através dessa fórmula é possível determinar o efeito matriz observado em cada um dos níveis de concentração estudado.

$$\text{Efeito matriz (\%)} = \frac{A1 - A2}{A2} \times 100 \quad (5)$$

A outra forma de avaliação do efeito matriz foi feita com base na comparação das inclinações das curvas analíticas obtidas a partir das soluções analíticas preparadas em solvente com aquelas obtidas a partir das soluções analíticas preparadas em extrato da matriz. Para isso foram preparadas soluções em sete níveis de concentração no solvente e na matriz, sendo realizadas seis injeções para cada nível de concentração.

O cálculo para a avaliação do efeito matriz foi feito utilizando a Equação 6, onde S_m representa a inclinação da curva obtida pela injeção das soluções analíticas de cada micotoxina preparada em extrato matriz, e S_s a inclinação da curva obtida pela injeção das soluções analíticas de cada micotoxina preparada no solvente.

$$\text{Efeito matriz (\%)} = 100 \times \left[1 - \frac{S_m}{S_s} \right] \quad (6)$$

Através dessas equações é possível determinar se a matriz exerce efeito positivo (acréscimo na intensidade do sinal) ou negativo (supressão do sinal) sobre o resultado da análise. Segundo recomendação do SANCO, resultados com efeito matriz entre +20% e -20% são considerados aceitáveis para análises de contaminantes em alimentos a nível de traços (SANCO, 2009)

3.7.5.2 Limite de detecção e limite de quantificação

A partir da avaliação dos dados de linearidade das curvas analíticas, de cada uma das 36 micotoxinas estudadas, procedeu-se à determinação da estimativa do

LOD do instrumento (LOD_i) e do método (LOD_m), bem como do LOQ do instrumento (LOQ_i) e do método (LOQ_m).

A partir, das áreas e do RSD% (6 réplicas) de cada composto, presente nas sete soluções analíticas estudadas, aplicou-se a Equação 7 e obteve-se a estimativa do LOD_i ($\mu\text{g L}^{-1}$).

$$LOD_i (\mu\text{g L}^{-1}) = 3 \times RSD \times C \quad (7)$$

Onde:

RSD: desvio padrão relativo das áreas obtidas

C: concentração da solução analítica

Multiplicando-se o valor estimado do LOD_i pelo fator obtido para o método de extração (fator 4), obtém-se a estimativa do LOD_m ($\mu\text{g kg}^{-1}$).

A partir do LOD_i , aplicando-se a Equação 8, obtém-se o LOQ_i .

$$LOQ_i (\mu\text{g L}^{-1}) = LOD_i \times 3,33 \quad (8)$$

Através da multiplicação do LOQ_i pelo fator do método é possível obter o LOQ_m estimado calculado. No entanto, considera-se como valor real do LOQ_m (em $\mu\text{g kg}^{-1}$) a menor concentração que, ao ser fortificada na matriz, apresenta recuperações entre 70 e 120%, com RSD% menor ou igual a 20% (PIZZUTTI, 2006)

3.7.5.3 Procedimento de fortificação e recuperação

Após realização dos estudos de otimização do procedimento de extração e purificação (item 3.8.4), obteve-se as melhores condições para fins de validação do método de análise para 36 micotoxinas em amostras de vinho tinto. Optou-se pela adicificação do meio de extração com ácido acético (1%) e utilização de uma etapa extra de secagem dos extratos com sulfato de magnésio.

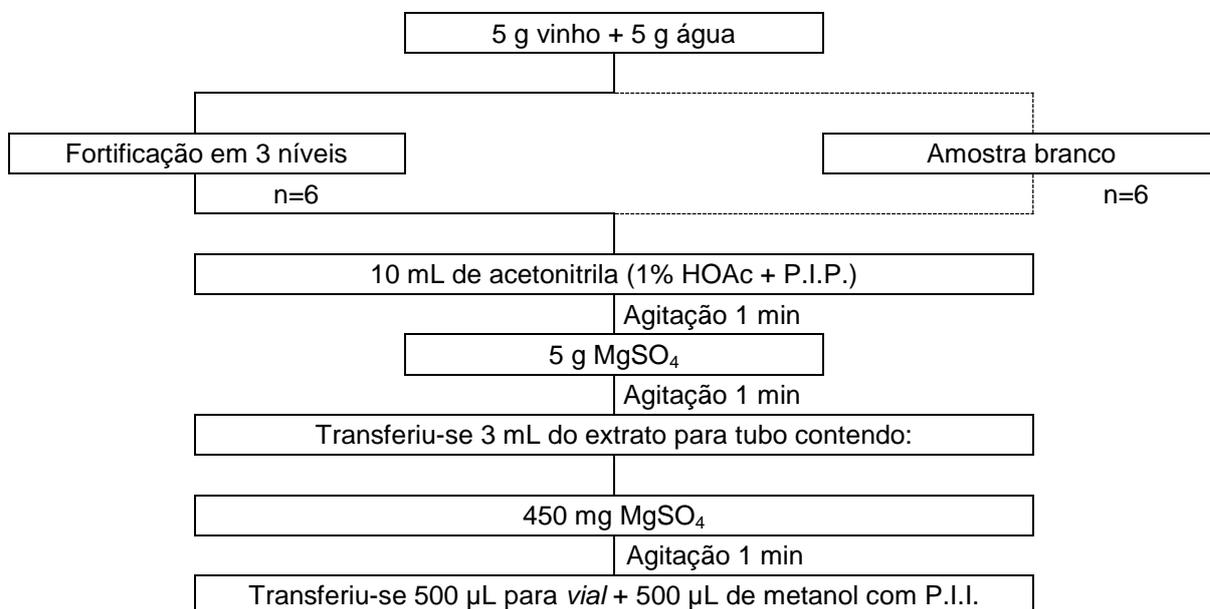
Para execução dos estudos de recuperação, realizou-se a fortificação para cada uma das 3 concentrações foram 6 vezes. Também foi realizada a extração das

amostras de vinho “branco” (aquelas sem a presença de micotoxinas), para verificação da real ausência desses compostos na matriz. Denominou-se “branco” da matriz o extrato que apresentou-se livre de contaminação e este também foi utilizado para o preparo das soluções analíticas, quando em extrato da matriz.

Em tubos de teflon[®] com tampa rosqueável e capacidade de 50 mL pesou-se $5 \pm 0,05$ g de vinho e diretamente adicionou-se 5 mL água. Logo após, efetuou-se a fortificação, com a mistura das micotoxinas estudadas, utilizando-se pipetador automático *Hand Step*[®], nas concentrações descritas na Tabela 4 (item 3.6), através da adição de 10, 25 e 100 μ L da solução mistura à amostra (o detalhamento dos cálculos para adição de cada um desses volumes encontra-se no Apêndice 3).

Adicionaram-se 10 mL de acetonitrila contendo 1% de ácido acético e o padrão interno do procedimento (P.I.P), quinalfós, na concentração de $12,5 \mu\text{g L}^{-1}$, em cada tubo, e após fechá-los efetuou-se agitação em mesa agitadora por cerca de 1 minuto. Em seguida, acrescentaram-se 5,0 g de sulfato de magnésio anidro, e repetiram-se as agitações. Posteriormente transferiu-se 3 mL do extrato sobrenadante para tubos de teflon[®] com tampa rosqueável (capacidade de 25 mL) contendo 450 mg de sulfato de magnésio anidro.

Procedeu-se a agitação por 1 minuto em mesa agitadora e posteriormente transferiu-se 0,5 mL do extrato para *vial* e adicionou-se 0,5 mL de metanol contendo o padrão interno do instrumento (P.I.I.), propoxur, na concentração de $10 \mu\text{g L}^{-1}$, seguindo, diretamente para a análise por UPLC-MS/MS. Na Figura 14, está representado o procedimento adotado para fins de validação do multimétodo.



ˆ Padrão interno do procedimento (P.I.P): quinalfós ($12,5 \mu\text{g L}^{-1}$)

ˆ Padrão interno do instrumento (P.I.I.): propoxur ($10 \mu\text{g L}^{-1}$)

Figura 14 – Representação esquemática do procedimento de validação do multimétodo para análise de 36 micotoxinas em vinho, utilizando o método QuEChERS modificado, seguido de análise por UPLC-MS/MS.

3.8 Aplicação do método desenvolvido e validado

Após o desenvolvimento e a validação do multimétodo para determinação de 36 micotoxinas, 56 amostras vinho foram adquiridas em supermercados da cidade de Amsterdã (Holanda), e analisadas para avaliar a possível presença destes contaminantes naturais.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Padrões internos selecionados

O padrão interno do procedimento (P.I.P.) e o padrão interno do instrumento (P.I.I.) selecionados foram o quinalfós e propoxur, respectivamente. O P.I.P. foi adicionado na concentração de $12,5 \mu\text{g L}^{-1}$ no início do procedimento, a fim de monitorar possíveis perdas no decorrer do procedimento de extração e purificação. Para monitorar parâmetros de injeção e outros possíveis erros que pudessem estar associados ao instrumento, adicionou-se P.I.I. imediatamente antes da análise cromatográfica, na concentração de $10 \mu\text{g L}^{-1}$.

O quinalfós e propoxur são pesticidas e foram selecionados devido apresentarem os requisitos necessários para atuarem como padrões internos para determinação de micotoxinas. Adicionalmente, esses pesticidas foram empregados de modo satisfatório em outros métodos utilizados pelo NVWA com o mesmo objetivo.

4.2 Análise da pureza dos solventes, reagentes e água

Ao efetuar-se o procedimento descrito no item 3.7.5 para os solventes e reagentes puros e livres da presença da amostra, não foi detectada nenhuma contaminação nos mesmos, considerando assim que estes poderiam ser utilizados, com segurança adicional a do fabricante, nos procedimentos de extração das micotoxinas e purificação dos extratos obtidos.

4.3 Experimentos de otimização

4.3.1 Quantidade de amostra

O vinho é uma matriz que contém de 10 a 15% de etanol. Essa quantidade significativa de etanol na amostra influencia diretamente na miscibilidade e distribuição entre as fases orgânica e aquosa durante o procedimento de extração. Devido a essa característica da matriz, algumas modificações na quantidade de

amostra utilizada no procedimento de extração através do método QuEChERS modificado fizeram-se necessárias.

A adição de sais (como o MgSO_4) para promover o efeito *salting out* tem sido amplamente utilizado em métodos multirresíduos. O uso de sais como o MgSO_4 para promover a partição resulta em melhores percentuais de recuperação para analitos polares, uma vez que a adição de sais diminui a solubilidade destes compostos na fase aquosa, bem como a quantidade de água na fase orgânica e vice-versa (ZANELLA *et al.*, 2009).

Especialmente no método QuEChERS, a adição de sais é muito conveniente. Essa etapa é rápida, fácil, apresenta baixo custo e tem a grande vantagem de não diluir o extrato da amostra e proporcionar a separação das fases orgânica e aquosa (ZANELLA *et al.*, 2009).

Dentre os sais aplicados nesta etapa, o sulfato de magnésio (MgSO_4), segundo estudos de Anastassiades e colaboradores (2003), demonstrou ser o sal mais indicado devido sua maior capacidade de remoção da água. Além de reduzir o volume de fase aquosa, sua hidratação é uma reação exotérmica, tendo como resultado o aquecimento entre 40 e 45 °C da amostra durante as etapas de extração/partição, favorecendo a extração, especialmente dos compostos apolares.

Em alguns casos a temperatura atingida pelo extrato pode ser um fator limitante, uma vez que pode promover a degradação dos compostos de interesse, fato que não foi observado neste estudo.

Nos primeiros experimentos de otimização estudados observou-se que após a mistura de 10 mL de acetonitrila com 10 mL da amostra de vinho tinto seguido da adição de MgSO_4 , ocorria a separação das fases aquosa e orgânica, porém, em proporções diferentes daquela esperada. O volume esperado para cada uma das fases seria de 10 mL, porém, devido à presença de álcool na amostra em estudo, a fase orgânica (superior) apresentava volume em torno de 12,5 mL.

Os problemas relacionados à separação das fases orgânica e aquosa resultaram em um erro sistemático que reduzia a recuperação de todas as micotoxinas na mesma proporção (cerca de 50%). Buscando minimizar ou eliminar o problema, testou-se a diluição da amostra inicial com diferentes quantidades de água, alterando as proporções água-vinho, diminuindo assim o teor de etanol na amostra a ser extraída.

Os testes realizados com menores volumes de vinho (vinho/água, 1:9 v/v e vinho/água, 2:8 v/v) resultaram em boas respostas com relação a redução do efeito matriz e eliminou o problema de separação das fases. Entretanto observou-se uma piora significativa no limite de detecção do método. Já a utilização da proporção de vinho/água, 7:3 (v/v) não foi suficiente para promover a redução do efeito provocado pela presença de etanol na amostra e suas consequências negativas em razão do procedimento de extração.

A utilização da proporção vinho/água, 5:5 (v/v) mostrou-se a opção mais adequada, pois permitiu que o limite de detecção se mantivesse inalterado e reduziu significativamente a influência do efeito matriz.

Os resultados do efeito matriz observados para cada uma das proporções de vinho e água estudadas encontram-se na Figura 15.

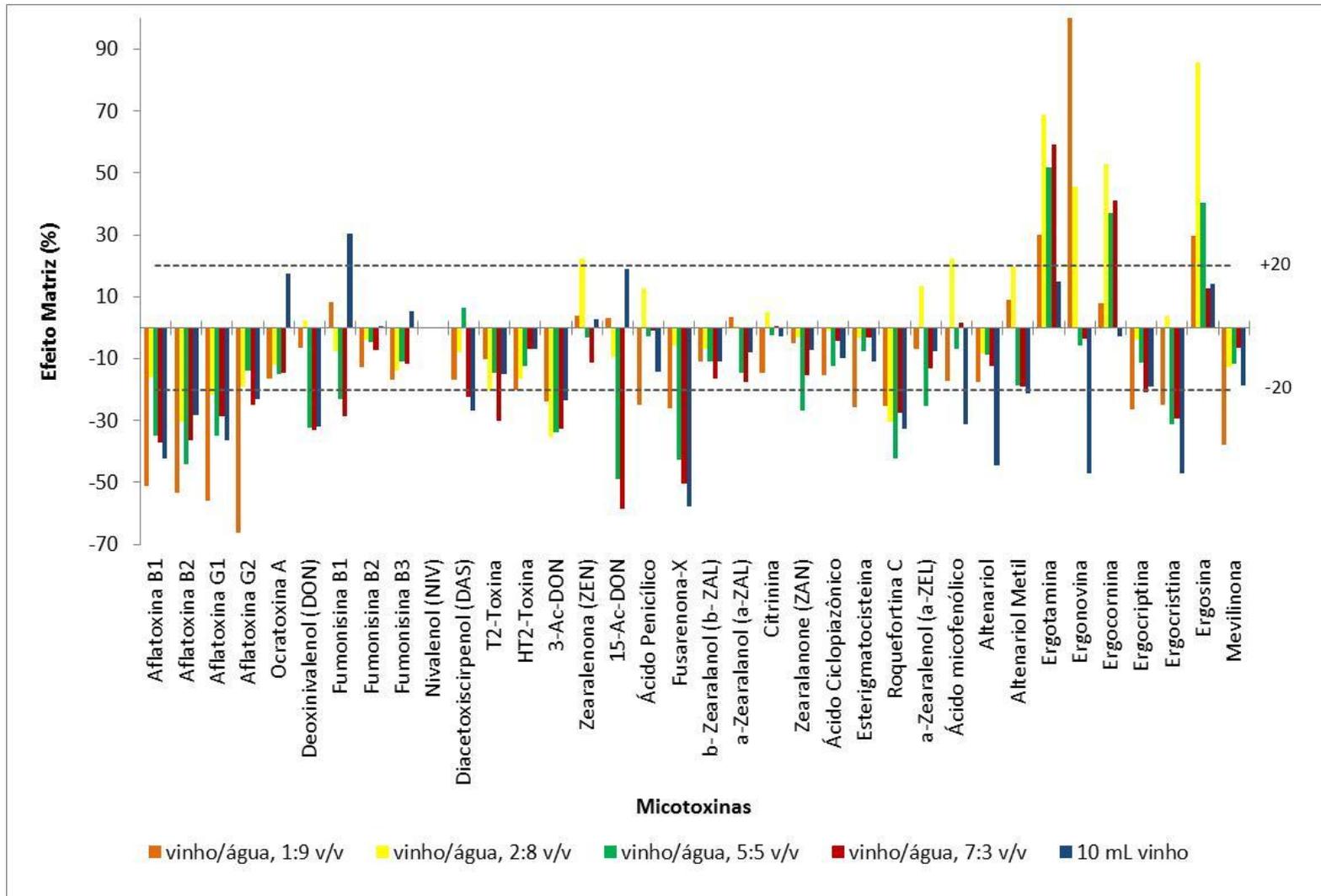


Figura 15 – Efeito matriz (%) observado nas análises de cada micotoxina avaliando diferentes proporções do volume entre vinho e água durante o procedimento de extração.

4.3.2 Purificação do extrato e tamponamento do meio

4.3.2.1 Tamponamento do meio com ácido fórmico e formiato de amônio e purificação com adsorventes C18, Oasis HLB[®], Absolut Nexus[®], Carbono Grafítico (CG) e ChloroFiltr[®] (CF).

Os solventes aplicados nos procedimentos de extração, em muitos casos, retiram não apenas os analitos de interesse da matriz, mas também outros interferentes que afetam a qualidade do resultado analítico obtido.

Buscando minimizar a interferência desses compostos na quantificação e confirmação das micotoxinas estudadas testou-se a adição de uma etapa de purificação com os adsorventes C18, Oasis HLB[®], Absolut Nexus[®], CG e CF nas quantidades descritas na Figura 16.

Esse procedimento de adição dos adsorventes foi realizado após a extração com 10 mL acetonitrila com o meio tamponado pela adição de ácido fórmico (4%) e formiato de amônio (0,6 g).

O adsorventes foram estudados nas seguintes quantidades quando aplicados individualmente: C18 (500 mg); Oasis (100 mg); Absolut Nexus (100 mg); CG (20 mg); CF (20 mg). Quando foram usados sob a forma de mistura, as quantidades aplicadas foram: C18 e CG (500 mg e 20 mg respectivamente); Oasis e CG (100 mg e 20 mg respectivamente); Nexus e CG (100 mg e 20 mg respectivamente); C18 e CF (500 mg e 20 mg respectivamente); Oasis e CF (100 mg e 20 mg respectivamente); Nexus e CF (100 mg e 20 mg respectivamente). Em todos os casos, juntamente aos adsorventes individuais ou às misturas deles, foi adicionado 600 mg de MgSO₄.

O adsorvente Absolut Nexus é composto por um polímero com características lipofílicas e hidrofílicas, com capacidade para extração de compostos ácidos e básicos (Agilent Technologies, 2012).

O Oasis HLB é um adsorvente que possui um recheio de equilíbrio hidrofílico-lipofílico, passível de ser molhável com água, o que facilita sua passagem, sem sofrer efeitos de secagem dos poros. Essa características de recheio o tornam aplicável a quase todas as necessidades de extração em fase sólida em geral. O adsorvente C18 é conhecido, principalmente, pela sua eficiência na remoção de gorduras (Waters, 2012).

O CG é um adsorvente bastante efetivo, porém, pode remover junto com os interferentes da matriz uma grande quantidade de compostos aromáticos polares, o que limita sua aplicação (ZANELLA, *et al.*, 2009).

O CF, entre os adsorventes poliméricos avaliados, é o mais recente e inovador. Este adsorvente foi desenvolvido quase que especificamente para aplicação no método QuEChERS. Inicialmente, o CF buscou substituir o uso de carbono grafitizado, que era utilizado para promover a remoção de resíduos de clorofila proveniente das extrações de frutas e vegetais. Porém, este resultava também na perda de muitos outros analitos de interesse. Em testes aplicados a outras matrizes, o CF comprovou ser um adsorvente excelente para remoção de outros interferentes da matriz (além da clorofila) e que impede a perda de analitos de interesse do extrato (UCT, 2012).

Na Figura 16 demonstra-se o resumo dos resultados de recuperação e o efeito matriz, obtidos através da utilização de cada um dos adsorventes e das misturas avaliadas. Observa-se que melhores valores de recuperações, na faixa de 80 e 90% para maioria das micotoxinas foram obtidos com o uso dos adsorventes CF e C18 utilizados individualmente.

Todas as combinações contendo carbono grafitizado resultaram na perda de aproximadamente 50% das micotoxinas estudadas.

É possível observar que o uso individual dos adsorventes, sem a utilização de misturas, resultou em maior número de micotoxinas com bons resultados de recuperação e com efeito matriz aceitável (dentro da faixa de $\pm 20\%$).

A formação de uma solução tampão composta por ácido fórmico e formiato de amônio (pH = 3,8) resultou em um meio de extração um pouco mais ácido do que aquele obtido com solução tampão de ácido acético e acetato de sódio (pH = 4,8). Esperava-se que em menor valor de pH (3,8) a recuperação fosse melhorada para algumas micotoxinas, especialmente para as do grupo das Fumonisinas devido a sua estrutura química. As fumonisinas apresentam quatro grupos hidroxila na sua estruturas e, quando em meio levemente alcalino, essas toxinas já podem ser hidrolisadas. Ao adquirirem essa configuração, possuem maior afinidade com a fase aquosa, o que ocasiona sua perda significativa durante o procedimento de extração. Quanto mais ácido o pH de extração aplicado, mais favorecida será a extração desse grupo de micotoxinas para a fase orgânica.

Entretanto, os resultados de recuperação e efeito matriz obtidos não se mostraram promissores tanto quanto teoricamente era esperado. Dessa forma, a utilização do tamponamento com ácido fórmico / formiato de amônio não foi utilizado no procedimento final.

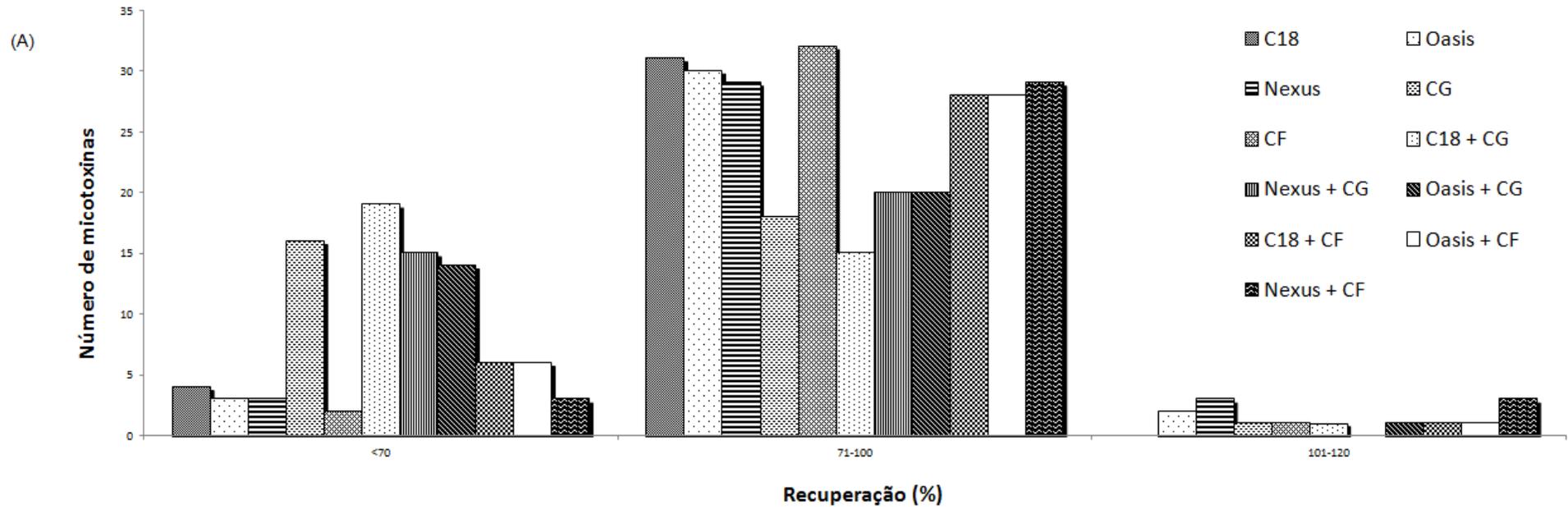


Figura 16 – (A) Micotoxinas em diferentes faixas de recuperação percentual e (B) efeito matriz observado com a aplicação dos adsorventes CF, C18, Absolut Nexus[®], Oasis HBL[®], CG e misturas entre eles, considerando extração em meio tamponado com ácido fórmico e formiato de amônio. (continua)

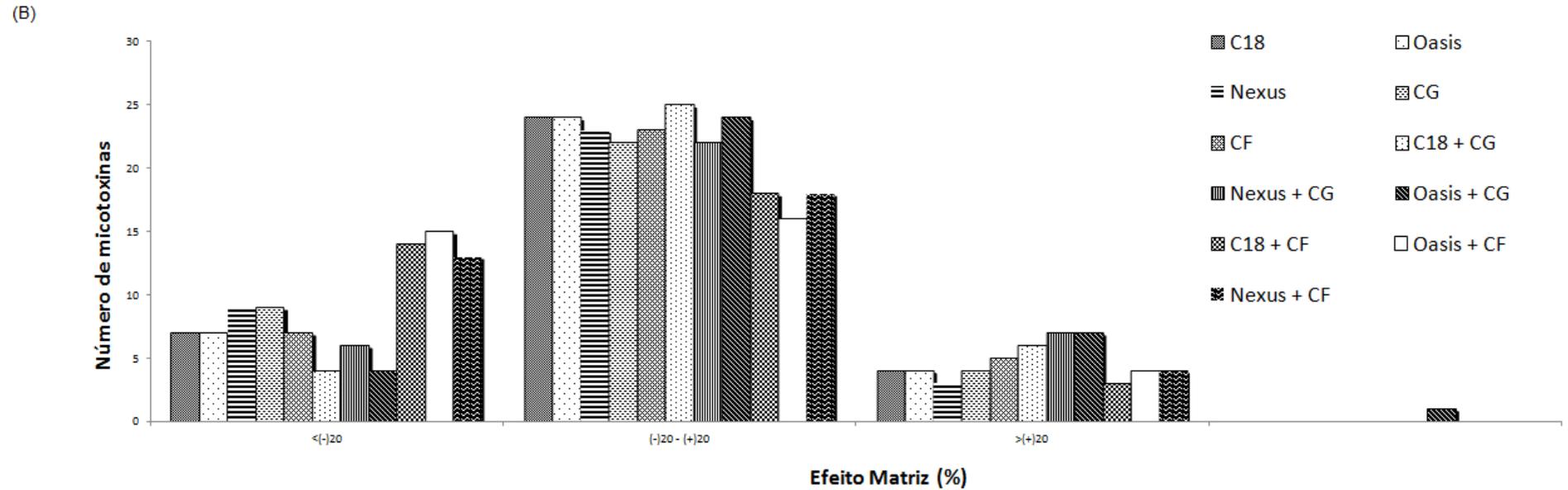


Figura 16 – (A) Micotoxinas em diferentes faixas de recuperação percentual e (B) efeito matriz observado com a aplicação dos adsorventes CF, C18, Absolut Nexus[®], Oasis HBL[®], CG e misturas entre eles, considerando extração em meio tamponado com ácido fórmico e formiato de amônio. (conclusão)

4.3.2.2 Acidificação do meio com ácido acético e purificação com adsorventes C18, Carbono Grafitizado (CG), Florisil e ChloroFiltr® (CF).

Os demais experimentos de otimização que seguem, envolveram a acidificação do meio de extração com ácido acético e posterior purificação do extrato com C18, CG, Florisil, CF e mistura desses adsorventes, os quais apresentaram resultados de recuperação e efeito matriz muito semelhante aos obtidos no item 4.3.2.1.

O adsorventes foram avaliados nas seguintes quantidades quando aplicados individualmente: C18 (500 mg); CF (20 mg); Florisil (500 mg). Quando foram avaliados em misturas, as quantidades aplicadas foram: C18 e CG (500 mg e 20 mg respectivamente); Florisil e CG (500 mg e 20 mg respectivamente). Em todos os casos, juntamente aos adsorventes e às misturas, foi adicionado 600 mg de $MgSO_4$.

É comum a adição de pequenas quantidades de $MgSO_4$ associada aos adsorventes aplicados para SPE dispersiva, com o objetivo de atuar como um agente de secagem e, remover a maior parte da água promovendo uma melhor purificação (ANASTASSIADES *et al.*, 2003).

Além disso, estudou-se a aplicação de uma etapa extra de secagem, aplicando 600 mg de $MgSO_4$, sem este ser combinado a nenhum adsorvente.

A Figura 17 mostra uma comparação entre os resultados obtidos com o uso de tamponamento do meio de extração com solução de ácido fórmico e formiato de amônio e os resultados obtidos pela acidificação do meio com ácido acético 1%, ambos os procedimentos seguidos de purificação com CF. Pode-se observar que o tamponamento do meio de extração pela formação do tampão de ácido fórmico e formiato de amônio exerceu pouca influência sobre os resultados de recuperação e de efeito matriz.

Comparando o desempenho dos adsorventes testados, os melhores resultados observados, tanto sobre o efeito matriz quanto em relação as recuperações das micotoxinas, se deram com a aplicação de CF como adsorvente.

Como pode ser observado na figura 18, o uso da mistura de adsorventes novamente resultou em um efeito matriz pior, quando comparado ao uso dos adsorventes individuais. Particularmente, o uso de CG resultou em uma perda significativa dos compostos de interesse.

Neste experimento foi testado também a inserção de uma etapa extra de secagem, sem a presença de adsorventes, atuando apenas como uma correção das possíveis perdas que poderiam ser observadas pela separação das fases em níveis diferentes pela presença de etanol na matriz.

Os resultados obtidos com a adoção da etapa extra de secagem, sem a presença de adsorventes para purificação, foram muito semelhantes aos obtidos com o uso do CF como adsorvente. Por essa razão, optou-se por utilizar apenas MgSO_4 na segunda etapa de secagem do extrato, sem adição de nenhum adsorvente, para fins de validação do método.

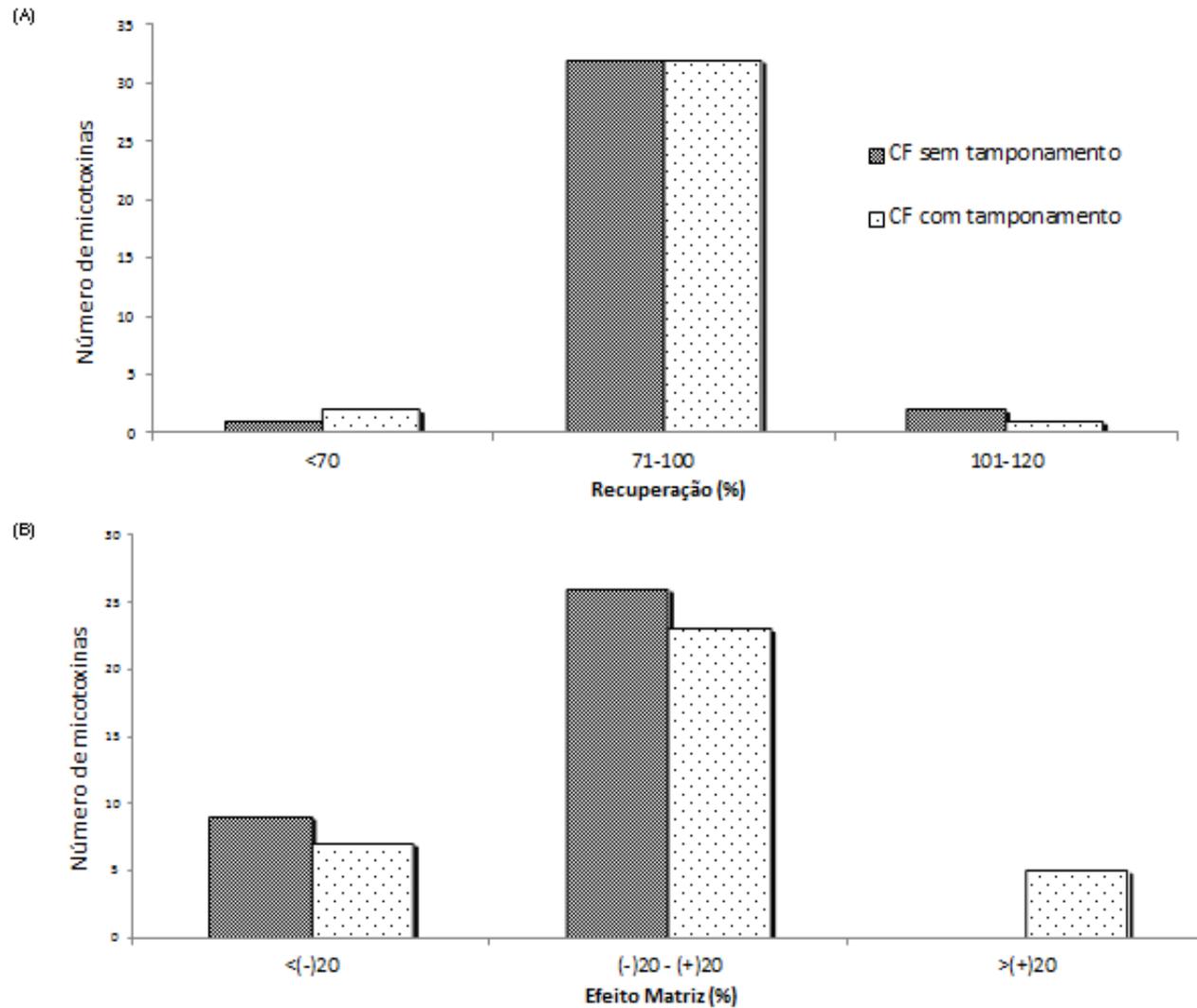


Figura 17 - (A) Número de micotoxinas em cada uma das faixas de recuperação percentual e (B) efeito matriz observado com tamponamento (ácido fórmico e formiato de amônio) e sem tamponamento (apenas acidificação do meio com ácido acético 1%) seguido de purificação com CF.

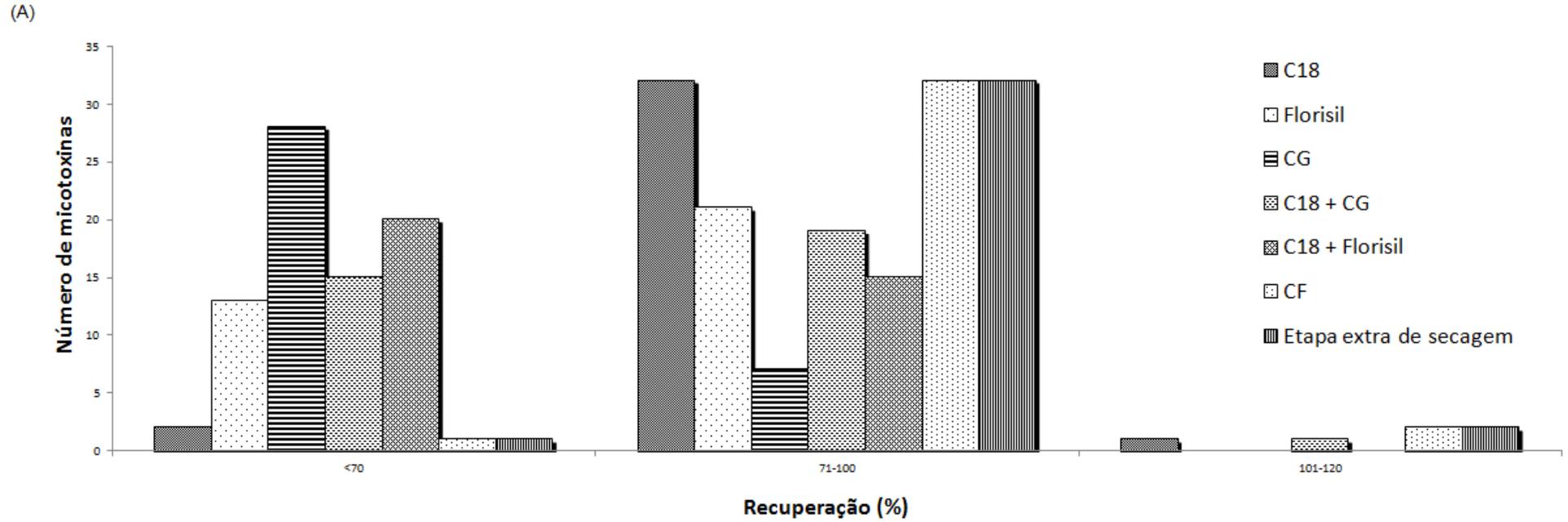


Figura 18 – (A) Micotoxinas em diferentes faixas de recuperação percentual e (B) efeito matriz observado com a aplicação dos adsorventes C18, Florisil, CF, CG e misturas entre eles, considerando extração em meio acidificado com ácido acético 1%. (continua)

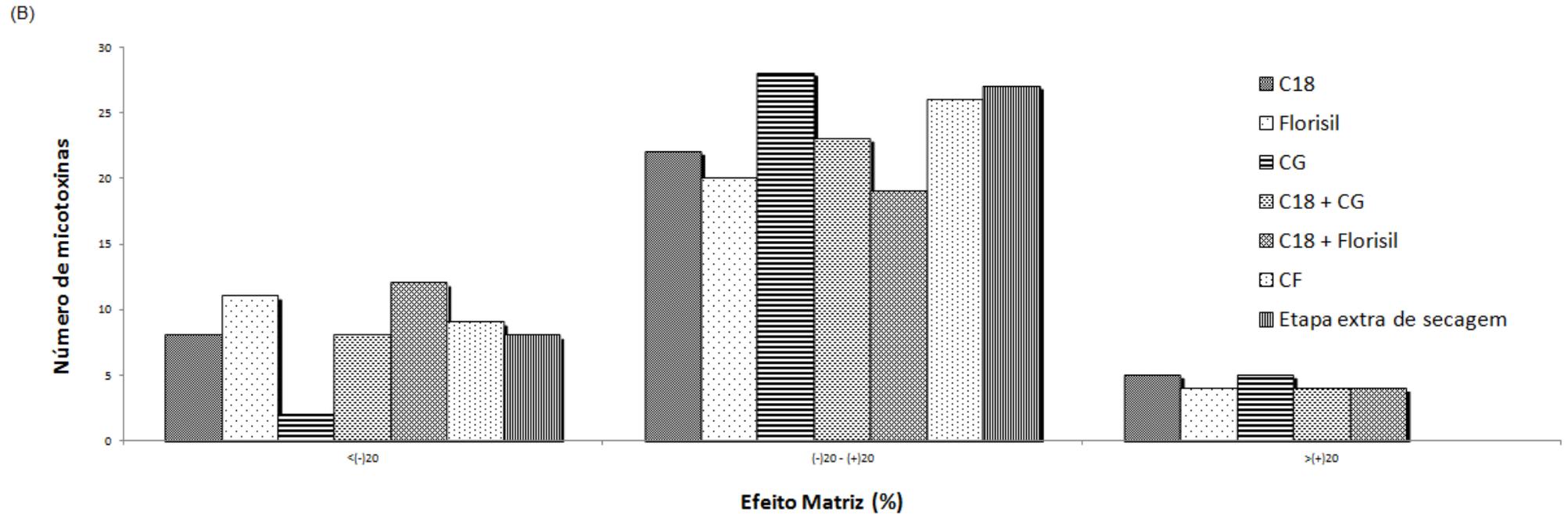


Figura 18 – (A) Micotoxinas em diferentes faixas de recuperação percentual e (B) efeito matriz observado com a aplicação dos adsorventes C18, Florisil, CF, CG e misturas entre eles, considerando extração em meio acidificado com ácido acético 1%. (conclusão)

4.4 Validação do método

4.4.1 Curva analítica e linearidade

Para o estudo de linearidade das curvas analíticas todas as soluções analíticas foram preparadas em solvente orgânico no extrato da matriz, conforme procedimento descrito no item 3.5.

Na Tabela 6 consta coeficiente angular (a), coeficiente linear (b) e coeficiente de determinação (r^2) das equações de reta obtidas como curvas analíticas, bem como as faixas lineares de trabalho para cada um das micotoxinas em solvente orgânico e no extrato da matriz.

O valor do coeficiente de determinação (r^2) expressa numericamente o percentual da variação total do sinal analítico (y) explicado pela variação da concentração do analito (x). Esse percentual, como qualquer outro, varia de 0 a 100% e o valor de r^2 , sendo a expressão numérica do mesmo, varia de 0 a 1. Idealmente, quanto mais próximo de 100% for o percentual da variação observada para o sinal analítico modificado pela variação da concentração se terá um valor de r^2 mais próximo de 1. Logo, melhor será a qualidade da curva analítica, pois a variação da resposta analítica em função da concentração do analito será mais sensível e melhor representada pela equação da reta obtida.

Conforme pode ser observado na Tabela 6 e na Figura 19, as curvas analíticas obtidas tanto a partir de soluções preparadas em solvente orgânico como preparadas no extrato da matriz, apresentaram comportamento muito similar. Em ambos os casos, das 36 micotoxinas analisadas, 11% apresentaram coeficiente de determinação (r^2) acima de 0,99. Para as curvas analíticas em extrato da matriz, 80% das micotoxinas apresentaram r^2 entre 0,95 e 0,98, e para as curvas analíticas em solvente, 78% apresentaram r^2 neste mesmo intervalo.

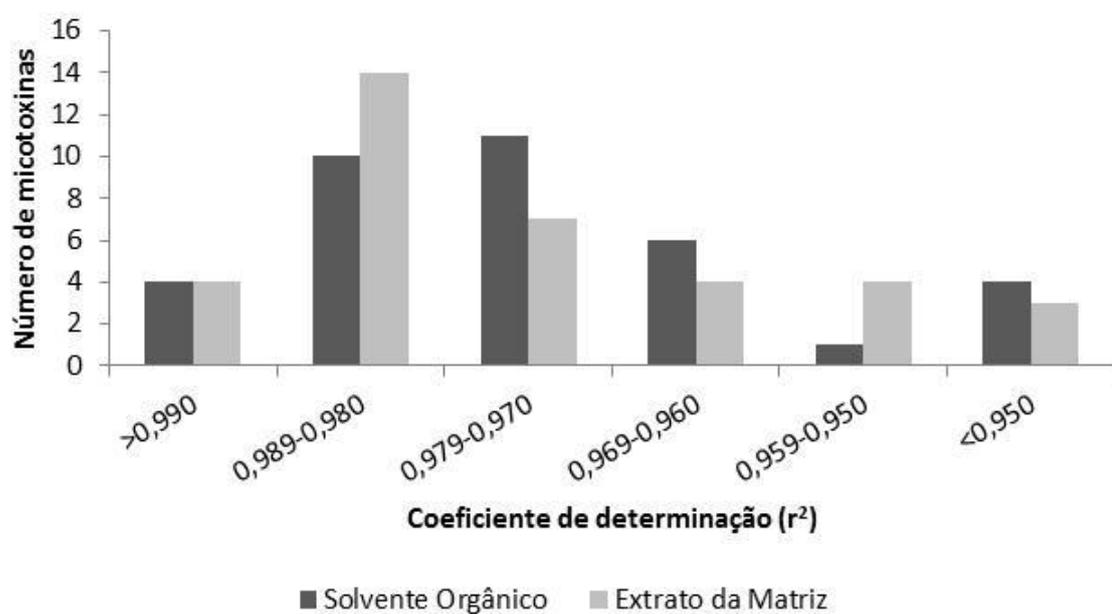


Figura 19 – Faixas de valores de coeficientes de determinação (r^2) obtidos através das curvas analíticas em solvente e em extrato da matriz.

Tabela 6 – Coeficiente angular (a), coeficiente linear (b), coeficiente de determinação (r^2) e faixa linear de trabalho obtidos pela análise cromatográfica das soluções analíticas (Concentrações vide Apêndice 2) preparadas em solvente orgânico e no extrato da matriz, para cada uma das micotoxinas estudadas.

(continua)

Micotoxinas	Solvente orgânico				Extrato da matriz			
	A	b	r^2	Faixa Linear ($\mu\text{g L}^{-1}$)	a	b	r^2	Faixa Linear ($\mu\text{g L}^{-1}$)
Aflatoxina B1	351,03	-68,81	0,9748	0,2 – 10	248,44	-17,966	0,9738	0,2 - 10
Aflatoxina B2	342,03	49,014	0,9820	0,1 – 10	260,5	9,861	0,9763	0,2 - 10
Aflatoxina G1	368,64	42,885	0,9722	0,1 – 10	298,18	29,996	0,9514	0,1 - 10
Aflatoxina G2	951,93	28,533	0,9643	0,2 – 10	115	39,427	0,9559	0,5 - 10
Ocratoxina A	288,46	1,9037	0,9904	0,1 – 10	272,43	15,776	0,9879	0,1 - 10
Deoxinivalenol (DON)	7,9679	17,573	0,9940	25 – 500	5,0607	-12,529	0,9803	25 - 500
Fumonisina B1	131,69	-660,03	0,9786	5 – 500	132,26	-660,72	0,9918	5 - 500
Fumonisina B2	196,74	-759,48	0,9882	5 – 500	192,91	-341,89	0,9907	5 - 500
Fumonisina B3	249,3	-521,31	0,9693	5 – 500	247,91	-753,51	0,9757	5 - 500
Nivalenol (NIV)								
Diacetoxiscirpenol (DAS)	5,9671	33,368	0,9648	10 – 500	7,0397	-79,297	0,9308	10 - 500
T2-Toxina	3,5415	26,912	0,9657	25 – 500	3,7124	22,536	0,9513	25 - 500
HT2-Toxina	4,5771	12,009	0,9940	5 – 500	3,8797	49,913	0,9768	5 - 500
3-Ac-DON	5,1533	51,227	0,9455	5 – 500	3,6091	7,4924	0,9548	5 - 500
Zearalenona (ZEN)	13,493	79,878	0,9772	5 – 500	12,77	96,097	0,9623	5 - 500
15-Ac-DON	3,3087	-31,499	0,8508	50 – 500	1,9716	12,617	0,8125	50 - 500
Ácido Penicílico	125,46	588,19	0,9845	5 – 500	106,43	374,42	0,9757	5 - 500
Fusarenona-X	4,0441	27,11	0,9815	25 – 500	2,787	19,001	0,9874	25 - 500

Células em branco – não detectado

Tabela 6 – Coeficiente angular (a), coeficiente linear (b), coeficiente de determinação (r^2) e faixa linear de trabalho obtidos pela análise cromatográfica das soluções analíticas (Concentrações vide Apêndice 2) preparadas em solvente orgânico e no extrato da matriz, para cada uma das micotoxinas estudadas.

(conclusão)

Micotoxinas	Solvente orgânico				Extrato da matriz			
	A	b	r^2	Faixa Linear ($\mu\text{g L}^{-1}$)	a	b	r^2	Faixa Linear ($\mu\text{g L}^{-1}$)
β - Zearalanol (β - ZAL)	45,8	-129,27	0,9868	5 – 500	41,077	50,698	0,9679	5 - 500
α -Zearalanol (α -ZAL)	56,135	127,69	0,9905	5 - 500	52,563	440,18	0,9824	5 - 500
Citrinina	171,67	294,1	0,9752	5 - 500	167,63	3103,9	0,9807	5 - 500
Zearalanona (ZAN)	19,434	190,11	0,9504	5 - 500	19,143	180,61	0,9803	5 - 500
Ácido Ciclopiazônico (CPA)	185,42	438,42	0,9769	5 - 500	213,49	-3353,2	0,9817	25 - 500
Esterigmatocisteina	486,68	11032	0,9751	5 - 500	484,8	9330,2	0,9771	5 - 500
Roquefortina C	619,12	9802,2	0,9729	5 - 500	589,47	9538,2	0,9834	5 - 500
α -Zearalenol (α -ZEL)	19,256	231,08	0,9485	5 - 500	19,058	185,71	0,9808	5 - 500
Ácido micofenólico	200,54	831,84	0,9792	5 - 500	191,67	1650,1	0,9692	5 - 500
Altenariol	35,267	36,781	0,9732	5 - 500	31,566	141,37	0,9789	5 - 500
Altenariol Metílico	23,171	88,434	0,9806	5 - 500	21,838	145,93	0,9918	5 - 500
Ergotamina	144,3	141,74	0,9849	1 - 100	141,13	124,85	0,9819	1 - 100
Ergonovina	179,83	222,11	0,9452	1 - 100	220,43	-118,3	0,9667	1 - 100
Ergocornina	402,72	186,23	0,9814	1 - 100	363,79	15,847	0,9880	1 - 100
Ergocriptina	334,89	565,99	0,9783	1 - 100	323,84	634,21	0,9826	1 - 100
Ergocristina	153,79	256,1	0,9600	1 - 100	163,31	181,75	0,9929	1 - 100
Ergosina	286,82	414,03	0,9815	1 - 100	482,1	181,13	0,9889	1 - 100
Mevilinona	317,6	409,21	0,9834	1 - 100	265,74	101,85	0,9882	1 - 100

4.4.2 Efeito Matriz

O efeito matriz é definido como o efeito observado pelo aumento ou decréscimo na resposta do detector para um determinado analito presente no extrato da matriz quando comparado com a resposta do detector para o analito em um solvente orgânico. Esse efeito é dependente do equipamento aplicado na análise, das características físicas e químicas dos analitos, do tipo e da quantidade de matriz presente no extrato e do pré-tratamento aplicado a amostra (MOL *et al.*, 2003).

Em LC-MS/MS este efeito é normalmente causado pela interferência dos componentes da matriz que eluem na mesma banda ou no mesmo t_R que o analito e competem com o mesmo, durante o processo de ionização (PIZZUTTI, 2006).

Em baixas concentrações, o efeito matriz pode tornar-se significativamente relevante, pois ocorre um decréscimo da ionização da concentração do analito em relação à concentração desse na matriz (PIZZUTTI, 2006).

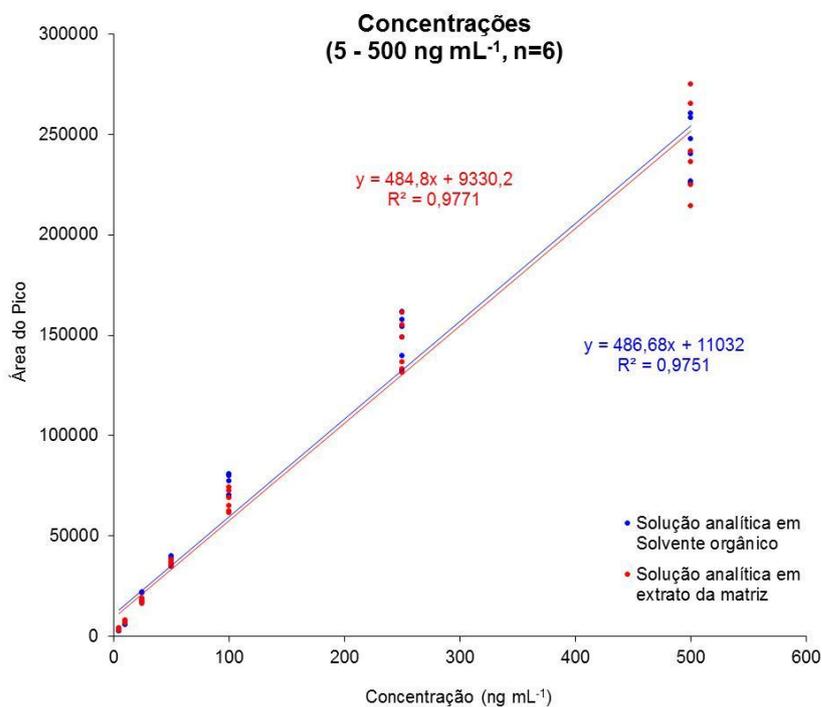
Os resultados dos cálculos do efeito matriz em cada uma das 7 concentrações estudadas, bem como aqueles determinados através da inclinação da curva analítica, encontram-se nas Tabelas 7 e 8, respectivamente.

Dentre as micotoxinas estudadas, as que apresentaram maior similaridade entre a curva analítica obtida em solvente e aquela em extrato da matriz foram Esterigmatocisteína e Fumonisina B1, conforme pode ser observado através da Figura 20.

Os resultados apresentados na Tabela 8 demonstraram que o efeito matriz para 75% das micotoxinas estudadas situou-se entre +20% e -20%. Através destes resultados é possível concluir que o procedimento de extração e purificação da amostra foi otimizado sem comprometimento para determinação confiável dos analitos.

O efeito matriz obtido foi em sua maioria negativo, ou seja, a matriz exerce um efeito de supressão da ionização do analito, diminuindo a intensidade do sinal através da interferência dos componentes provenientes da matriz.

(a)



(b)

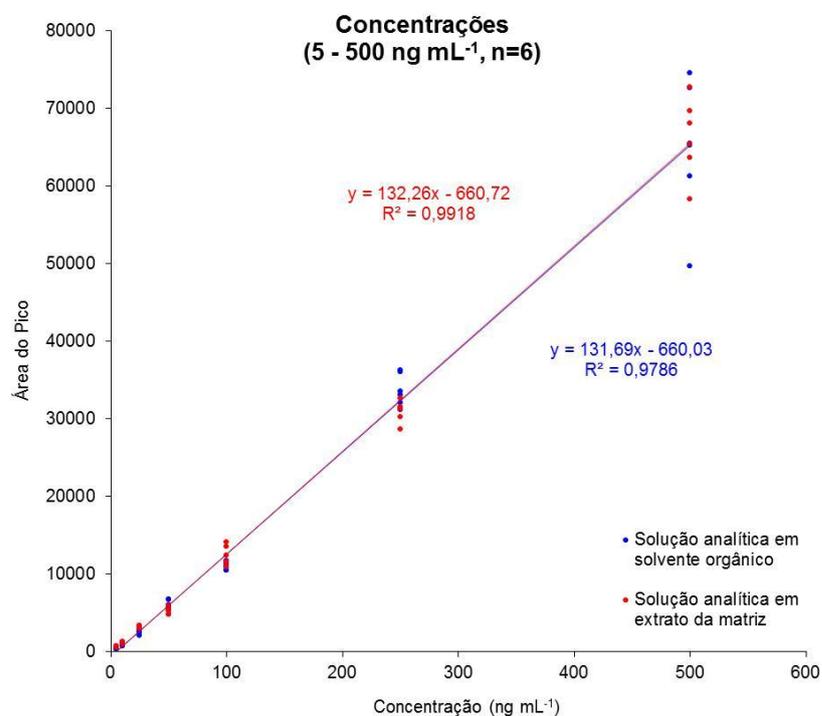


Figura 20 – Curva analítica preparada a partir das soluções analíticas das micotoxinas (a) Esterigmatocistina e (b) Fumonisina B1, em solvente orgânico e extrato da matriz.

Tabela 7 – Percentual do efeito matriz observado na faixa de concentração estudada nas curvas analíticas.

(continua)

Micotoxinas	Efeito Matriz calculado em cada concentração (n=6)														
	Concentração 1		Concentração 2		Concentração 3		Concentração 4		Concentração 5		Concentração 6		Concentração 7		Média
	(ng mL ⁻¹)	(%)	(ng mL ⁻¹)	(%)	(ng mL ⁻¹)	(%)	(ng mL ⁻¹)	(%)	(ng mL ⁻¹)	(%)	(ng mL ⁻¹)	(%)	(ng mL ⁻¹)	(%)	(%)
Aflatoxina B1	0,1		0,2	88	0,5	-7	1,0	-37	2,0	-17	5	-25	10	-29	-4
Aflatoxina B2	0,1		0,2	32	0,5	-47	1,0	-32	2,0	-27	5	-31	10	-23	-21
Aflatoxina G1	0,1	-35	0,2	59	0,5	-35	1,0	-3	2,0	-32	5	-17	10	-19	-12
Aflatoxina G2	0,1		0,2		0,5	1	1,0	-16	2,0	-14	5	-29	10	-21	-16
Ocratoxina A	0,1	3	0,2	1	0,5	-4	1,0	-7	2	10	5	-5	10	-5	-1
Deoxinivalenol (DON)	5		10		25	-34	50,0	-42	100	-35	250	-43	500	-36	-38
Fumonissina B1	5	67	10	29	25	22	50,0	-7	100	11	250	-8	500	2	17
Fumonissina B2	5	13	10	24	25	-9	50,0	11	100	8	250	-4	500	-1	6
Fumonissina B3	5	22	10	25	25	-2	50,0	-1	100	3	250	-8	500	1	6
Nivalenol (NIV)	5		10		25		50,0		100		250		500		
Diacetoxiscirpenol (DAS)	5		10	-26	25	31	50,0	-3	100	17	250	-23	500	23	3
T2-Toxina	5		10		25	20	50,0	8	100	-9	250	8	500	4	6
HT2-Toxina	5	85	10	76	25	12	50,0	14	100	-12	250	-6	500	-15	22
3-Ac-DON	5	67	10	-35	25	-27	50,0	-38	100	-38	250	-43	500	-28	-20
Zearalenona (ZEN)	5	66	10	22	25	-5	50,0	0	100	-6	250	-5	500	-5	10
15-Ac-DON	5		10		25		50,0	-35	100	-37	250	-33	500	-39	-36
Ácido Penicílico	5	25	10	-14	25	-12	50,0	-15	100	-16	250	-19	500	-14	-9
Fusarenona-X	5		10		25	-17	50,0	-29	100	-26	250	-37	500	-30	-28
β- Zearalanol (β- ZAL)	5	68	10	31	25	-4	50,0	2	100	-12	250	-4	500	-11	10
α-Zearalanol (α-ZAL)	5	65	10	28	25	18	50,0	13	100	-3	250	-2	500	-6	16

* Células em branco: valores não calculados devido a exclusão de 2 ou mais pontos (n=6) desta concentração da curva analítica.

Tabela 7 – Percentual do efeito matriz observado na faixa de concentração estudada nas curvas analíticas.

(conclusão)

Micotoxinas	Efeito Matriz calculado em cada concentração (n=6)														
	Concentração 1		Concentração 2		Concentração 3		Concentração 4		Concentração 5		Concentração 6		Concentração 7		Média
	(ng mL ⁻¹)	(%)	(ng mL ⁻¹)	(%)	(ng mL ⁻¹)	(%)	(ng mL ⁻¹)	(%)	(ng mL ⁻¹)	(%)	(ng mL ⁻¹)	(%)	(ng mL ⁻¹)	(%)	(%)
Citrinina	5	21	10	36	25	10	50,0	4	100	5	250	-2	500	-1	11
Zearalanona (ZAN)	5	29	10	16	25	-11	50,0	11	100	9	250	-13	500	1	6
Ácido Ciclopiazônico (CPA)	5		10		25	-52	50,0	-8	100	-4	250	0	500	13	-10
Esterigmatocisteína	5	21	10	15	25	-6	50,0	-1	100	-12	250	-3	500	0	2
Roquefortina C	5	15	10	23	25	-2	50,0	-3	100	-4	250	-9	500	-4	2
α-Zearalenol (α-ZEL)	5	25	10	6	25	-17	50,0	8	100,0	9	250	-13	500	1	3
Ácido micofenólico	5	56	10	30	25	5	50,0	-4	100,0	-2	250	4	500	-5	12
Altenariol	5	85	10	2	25	-3	50,0	1	100,0	-11	250	-6	500	-11	8
Altenariol Metílico	5	44	10	-7	25	4	50,0	1	100	9	250	-11	500	-4	5
Ergotamina	1	60	2	46	5	0	10,0	-3	20	-7	50	-5	100	-1	13
Ergonovina	1	7	2	24	5	-26	10,0	4	20	-1	50	15	100	22	6
Ergocornina	1	1	2	20	5	-8	10,0	1	20	-21	50	-16	100	-8	-4
Ergocriptina	1	52	2	31	5	2	10,0	6	20	1	50	-11	100	-1	12
Ergocristina	1	28	2	11	5	26	10,0	6	20	0	50	-5	100	8	11
Ergosina	1	20	2	1	5	-4	10,0	0	20,0	-8	50	-12	100	0	0
Mevilinona	1	3	2	-13	5	-31	10,0	-23	20	-20	50	-23	100	-16	-17

* Células em branco: valores não calculados devido a exclusão de 2 ou mais pontos (n=6) desta concentração da curva analítica.

Tabela 8 – Percentual do efeito matriz obtido através do cálculo a partir da inclinação da curva analítica obtida em solvente orgânico e em extrato da matriz.

Micotoxinas	Efeito Matriz (%) calculado a partir da inclinação das curvas analíticas (n=6)
Aflatoxina B1	-29
Aflatoxina B2	-24
Aflatoxina G1	-19
Aflatoxina G2	-22
Ocratoxina A	-5
Deoxinivalenol (DON)	-37
Fumonisina B1	0
Fumonisina B2	-2
Fumonisina B3	-1
Nivalenol (NIV)	n.d.*
Diacetoxiscirpenol (DAS)	16
T2-Toxina	4
HT2-Toxina	-15
3-Ac-DON	-30
Zearalenona (ZEN)	-5
15-Ac-DON	-39
Ácido Penicílico	-15
Fusarenona-X	-31
β - Zearalanol (β - ZAL)	-10
α -Zearalanol (α -ZAL)	-6
Citrinina	-2
Zearalanona (ZAN)	-1
Ácido Ciclopiazônico (CPA)	14
Esterigmatocisteina	0
Roquefortina C	-5
α -Zearalenol (α -ZEL)	-1
Ácido micofenólico	-4
Altenariol	-10
Altenariol Metílico	-6
Ergotamina	-2
Ergonovina	23
Ergocornina	-10
Ergocriptina	-3
Ergocristina	6
Ergosina	-2
Mevilinona	-16

*n.d. – Não detectado

Para Ocratoxina A, a micotoxina mais importante a ser determinada em amostras de vinhos tintos, o efeito matriz observado em cada uma das faixas de concentração (Tabela 7) não apresentou variações significativas, mantendo-se sempre dentro do intervalo considerado aceitável.

Apenas a exemplo de ilustração, a Figura 21 mostra que a intensidade do sinal da transição de quantificação e de confirmação da solução preparada no extrato das amostras de vinho tinto é um pouco inferior aquela obtida quando preparada em solvente, demonstrando que há uma leve supressão do sinal pela presença da matriz, porém, esse comportamento manteve-se reprodutível na faixa de concentração estudada.

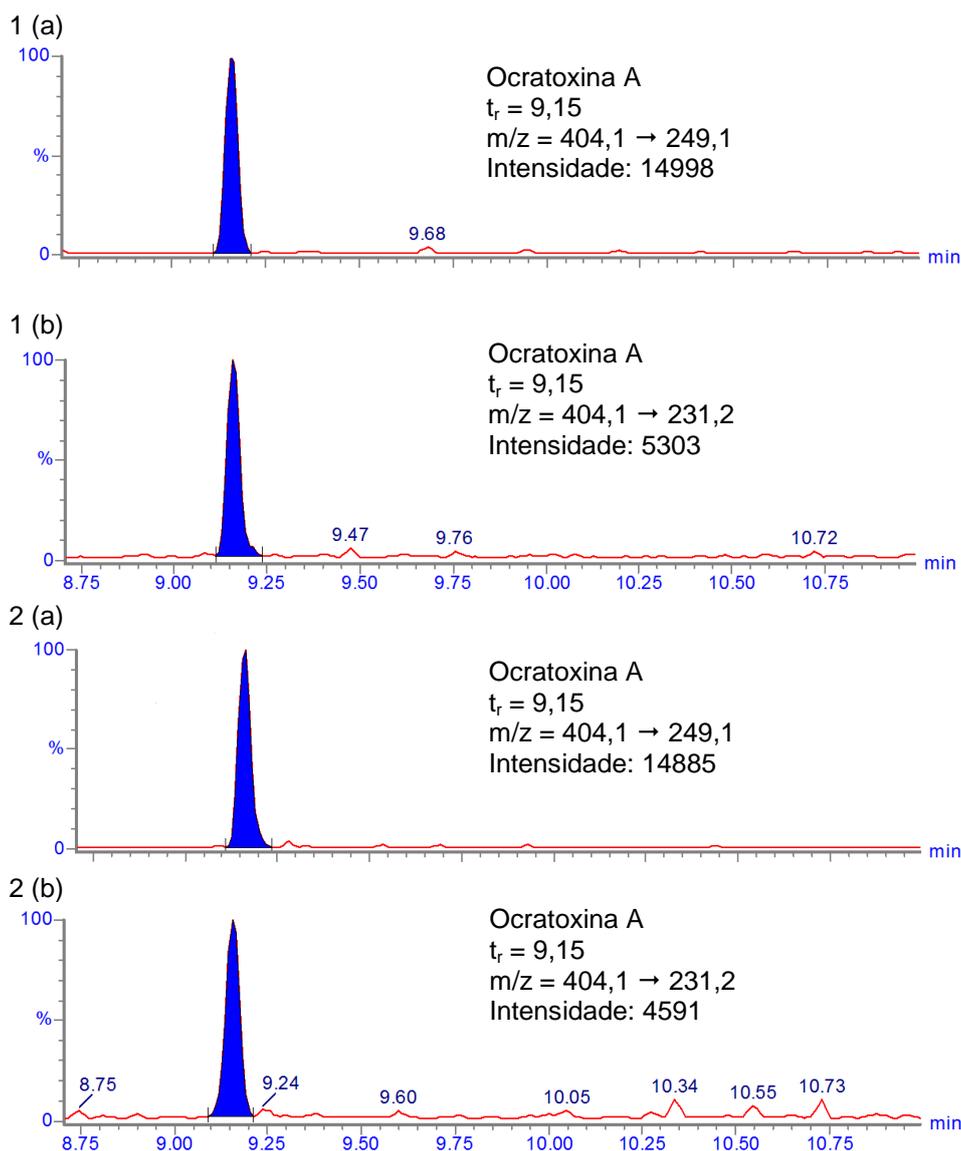


Figura 21 – Cromatograma obtido para Ocratoxina A para (a) transição de quantificação e (b) de confirmação, por UPLC-MS/MS, na concentração de 2 ng mL^{-1} , em solvente (1) e em extrato da matriz (2).

4.4.3 Limite de detecção e limite de quantificação

Para a determinação dos valores de LOD e LOQ do instrumento e do método, as soluções analíticas foram preparadas em solvente orgânico e no extrato da matriz (amostra de vinho tinto), com a finalidade de avaliar a influência do extrato da matriz sobre estes parâmetros.

A partir da medida das áreas das micotoxinas estudadas, para $n=6$, das soluções analíticas preparadas em solvente orgânico e em extrato da matriz pode-se estimar o LOD e LOQ do método.

As Tabelas 9 e 10 trazem os resultados de LOD estimado do método (LOD_m) e do instrumento (LOD_i) e do LOQ estimado do instrumento (LOQ_i) para as micotoxinas em solvente orgânico e em extrato da matriz, respectivamente.

Conforme mencionado no item 3.7.5.2, considera-se como valor real do LOQ_m (em $\mu\text{g kg}^{-1}$) a menor concentração que, ao ser fortificada na matriz, apresenta recuperações entre 70 e 120%, com RSD% menor ou igual a 20% (PIZZUTTI, 2006).

Os resultados de LOQ_m obtidos através dos estudos de recuperação encontram-se também expostos nas Tabelas 9 e 10, para comparação com os valores obtidos através dos estudos de linearidade.

Apenas para Nivalenol não foi possível determinar o LOD e o LOQ estimado para o método e instrumento pois o mesmo não pode ser detectado satisfatoriamente em nenhuma das concentrações estudadas.

A micotoxina Nivalenol é o primeiro analito a ser eluído na corrida cromatográfica (em 1 min). Nos estudos de Spanjer e colaboradores (2008) essa micotoxina também não pode ser detectada satisfatoriamente, pois apresenta um pico cromatográfico que não pode ser separado satisfatoriamente, acompanhado de um ruído base muito elevado. As otimizações realizadas nesse trabalho não foram suficientes para melhoria da qualidade dos picos cromatográficos obtidos para que pudesse haver determinação inequívoca dessa micotoxina.

Tabela 9 – LOD estimado do método (LODm) e instrumento (LODi) e LOQ estimado do método (LOQm) e instrumento (LOQi) para as soluções de micotoxinas preparadas em solvente orgânico obtidos pelos estudos de linearidade e LOQ real do método obtido através dos estudos de recuperação.

Micotoxinas	LOD Estimado		LOQ Estimado		LOQm Real (mg kg ⁻¹)
	Instrumento (ng mL ⁻¹)	Método (µg kg ⁻¹)	Instrumento (ng mL ⁻¹)	Método (µg kg ⁻¹)	
Aflatoxina B1	0,2	0,8	0,67	2,66	1
Aflatoxina B2	0,1	0,4	0,33	1,33	1
Aflatoxina G1	0,1	0,4	0,33	1,33	2,5
Aflatoxina G2	0,2	0,8	0,67	2,66	10
Ocratoxina A	0,1	0,4	0,33	1,33	1
Deoxinivalenol (DON)	25	100	83,25	333	50
Fumonisina B1	5	20	16,65	66,6	50
Fumonisina B2	5	20	16,65	66,6	50
Fumonisina B3	5	20	16,65	66,6	50
Nivalenol (NIV)	n.d.*	n.d.*	n.d.*	n.d.*	n.d.*
Diacetoxiscirpenol (DAS)	10	40	33,30	133,2	50
T2-Toxina	25	100	83,25	333	50
HT2-Toxina	5	20	16,65	66,6	50
3-Ac-DON	5	20	16,65	66,6	125
Zearalenona (ZEN)	5	20	16,65	66,6	50
15-Ac-DON	50	200	166,50	666	500
Ácido Penicílico	5	20	16,65	66,6	50
Fusarenona-X	25	100	83,25	333	50
β- Zearalanol (β- ZAL)	5	20	16,65	66,6	50
α-Zearalanol (α-ZAL)	5	20	16,65	66,6	50
Citrinina	5	20	16,65	66,6	50
Zearalanona (ZAN)	5	20	16,65	66,6	50
Ácido Ciclopiazônico (CPA)	5	20	16,65	66,6	50
Esterigmatocisteína	5	20	16,65	66,6	50
Roquefortina C	5	20	16,65	66,6	50
α-Zearalenol (α-ZEL)	5	20	16,65	66,6	50
Ácido micofenólico	5	20	16,65	66,6	50
Altenariol	5	20	16,65	66,6	50
Altenariol Metílico	5	20	16,65	66,6	50
Ergotamina	1	4	3,33	13,32	10
Ergonovina	1	4	3,33	13,32	10
Ergocornina	1	4	3,33	13,32	10
Ergocriptina	1	4	3,33	13,32	10
Ergocristina	1	4	3,33	13,32	10
Ergosina	1	4	3,33	13,32	10
Mevilinona	1	4	3,33	13,32	10

* n.d. – Não detectado

Tabela 10 – LOD estimado do método (LOD_m) e instrumento (LOD_i) e LOQ estimado do método (LOQ_m) e instrumento (LOQ_i) para as soluções de micotoxinas preparadas em extrato da matriz obtidos pelos estudos de linearidade e LOQ real do método obtido através dos estudos de recuperação.

Micotoxinas	LOD Estimado		LOQ Estimado		LOQ _m Real (mg kg ⁻¹)
	Instrumento (ng mL ⁻¹)	Método (µg kg ⁻¹)	Instrumento (ng mL ⁻¹)	Método (µg kg ⁻¹)	
Aflatoxina B1	0,2	0,8	0,67	2,66	1
Aflatoxina B2	0,2	0,8	0,67	2,66	1
Aflatoxina G1	0,2	0,8	0,67	2,66	2,5
Aflatoxina G2	0,5	2	1,67	6,66	10
Ocratoxina A	0,1	0,4	0,33	1,332	1
Deoxinivalenol (DON)	25	100	83,25	333	50
Fumonisina B1	5	20	16,65	66,6	50
Fumonisina B2	5	20	16,65	66,6	50
Fumonisina B3	5	20	16,65	66,6	50
Nivalenol (NIV)	n.d.*	n.d.*	n.d.*	n.d.*	n.d.*
Diacetoxiscirpenol (DAS)	10	40	33,30	133,2	50
T2-Toxina	10	40	33,30	133,2	50
HT2-Toxina	5	20	16,65	66,6	50
3-Ac-DON	5	20	16,65	66,6	125
Zearalenona (ZEN)	5	20	16,65	66,6	50
15-Ac-DON	25	100	83,25	333	500
Ácido Penicílico	5	20	16,65	66,6	50
Fusarenona-X	25	100	83,25	333	50
β-Zearalanol (β-ZAL)	5	20	16,65	66,6	50
α-Zearalanol (α-ZAL)	5	20	16,65	66,6	50
Citrinina	5	20	16,65	66,6	50
Zearalanona (ZAN)	5	20	16,65	66,6	50
Ácido Ciclopiazônico (CPA)	25	100	83,25	333	50
Esterigmatocisteína	5	20	16,65	66,6	50
Roquefortina C	5	20	16,65	66,6	50
α-Zearalenol (α-ZEL)	5	20	16,65	66,6	50
Ácido micofenólico	5	20	16,65	66,6	50
Altenariol	5	20	16,65	66,6	50
Altenariol Metílico	5	20	16,65	66,6	50
Ergotamina	1	4	3,33	13,32	10
Ergonovina	1	4	3,33	13,32	10
Ergocornina	1	4	3,33	13,32	10
Ergocriptina	1	4	3,33	13,32	10
Ergocristina	1	4	3,33	13,32	10
Ergosina	1	4	3,33	13,32	10
Mevilinona	1	4	3,33	13,32	10

* n.d. – Não detectado

4.4.4 Fortificação e Recuperação

Os resultados das recuperações médias ($n=6$) percentuais e o RSD%, para as micotoxinas em cada um dos 3 níveis fortificados, podem ser visualizados na Tabela 11. Os valores de recuperação média estão relacionados à exatidão do método e a eficiência de extração do procedimento analítico e foram calculados conforme descrito no item 2.5.4. Já os valores de RSD%, estão relacionados à precisão do método e foram calculado conforme descrito no item 2.5.5.

Conforme pode ser observado na Tabela 11Tabela 11, os percentuais de recuperação ficaram na faixa de 70 a 120%, para 98% das micotoxinas avaliadas em todos os níveis de fortificação estudados, confirmando a ótima exatidão do método.

Em relação ao RSD%, os resultados obtidos também foram excelentes em todos os níveis estudados. Nos primeiro e segundo níveis de fortificação, dentre as 36 micotoxinas estudadas, 31 e 32, respectivamente, apresentaram RSD abaixo de 20%. Já no terceiro nível o RSD obtido para todas as micotoxinas estudadas (exceto nivalenol) foi inferior a 20%.

Tabela 11 – Média dos percentuais de recuperação e RSD% dos extratos das amostra de vinho tinto fortificados nos 3 níveis estudados (Concentrações vide Apêndice 3).

Micotoxinas	Níveis de fortificação					
	1°		2°		3°	
	Rec (%)	RSD (%)	Rec (%)	RSD (%)	Rec (%)	RSD (%)
Aflatoxina B1	81	13,2	86	8,6	83	8,7
Aflatoxina B2	102	13,3	85	12	81	13,4
Aflatoxina G1	80	27,9	95	15,4	89	11,8
Aflatoxina G2	74	23,2	72	27,5	89	17,6
Ocratoxina A	100	18,8	98	12,7	91	11,8
Deoxinivalenol (DON)	92	15,4	88	16,2	95	7,4
Fumonisina B1	81	16,1	81	7,8	80	7,4
Fumonisina B2	82	6,8	81	8,8	82	8,4
Fumonisina B3	88	10,1	85	8,6	88	7,8
Nivalenol (NIV)	n.q	n.q	n.q	n.q	n.q	n.q
Diacetoxiscirpenol (DAS)	79	19,5	82	22,9	85	11,3
T2-Toxina	106	11,7	95	12,7	83	6,6
HT2-Toxina	83	17,8	88	10,5	84	9
3-Ac-DON	75	30,9	92	17	88	17,3
Zearalenona (ZEN)	88	10,8	90	11,3	90	9,2
15-Ac-DON	104	44,4	113	29,2	110	18,4
Ácido Penicílico	93	4,5	92	8,5	90	8,8
Fusarenona-X	89	7,6	86	12,9	84	8,1
β - Zearalanol (β - ZAL)	86	5,2	87	6,8	88	9,2
α -Zearalanol (α -ZAL)	95	10,7	90	5,4	91	10,1
Citrinina	79	4,7	94	6,2	95	4,2
Zearalanona (ZAN)	90	10,3	96	17,7	83	9,6
Ácido Ciclopiazônico (CPA)	70	17	80	16,9	88	9,6
Esterigmatocisteina	81	13	97	12,2	94	12,2
Roquefortina C	71	14,7	92	11,5	100	4,7
α -Zearalenol (α -ZEL)	90	10,3	96	17,7	84	9,6
Ácido micofenólico	92	10,6	93	8,8	92	10,6
Altenariol	72	10,6	86	5,8	93	11,3
Altenariol Metílico	82	13,5	91	13,3	93	8,8
Ergotamina	78	6,5	82	7,6	82	6,2
Ergonovina	80	11,9	86	5,9	90	2,3
Ergocomina	94	14,2	87	13,1	92	9,5
Ergocriptina	94	10,4	89	9,1	87	7,3
Ergocristina	83	9,8	86	9,9	86	6,8
Ergosina	93	6,1	90	6,2	87	9,1
Mevilinona	90	10,4	89	7,8	89	5

*n.q. = não quantificado

4.4.5 Aplicação do método desenvolvido e validado

O método desenvolvido e validado foi aplicado no monitoramento de 56 amostras de vinho adquiridos em supermercados da cidade de Amsterdam (Holanda). Das 56 amostras avaliadas, nenhuma apresentou contaminação com as micotoxinas estudadas.

Com a aplicação do método pode-se observar que o mesmo é de fácil e rápida execução.

5 CONCLUSÕES

O desenvolvimento e a validação de métodos analíticos com detectabilidade e que sejam confiáveis para determinação de contaminantes naturais em alimentos são de grande importância para a garantia da saúde da população pois, através destes, garante-se a qualidade dos alimentos que chegam à mesa dos consumidores de todo o mundo.

Neste trabalho foi desenvolvido e validado um novo método analítico multirresidual, que envolveu o método QuEChERS modificado em seu procedimento de preparo da amostra, para a determinação de 36 micotoxinas em amostras de vinho tinto. A técnica analítica empregada foi a cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas, operada em modo de ionização por eletronebulização positiva (UPLC- ESI-MS/MS).

Antes da validação do método analítico, observou-se a necessidade de uma modificação do método escolhido para o procedimento de preparo da amostra, justamente por se tratar de uma bebida alcoólica, o que acarretava erros no procedimento. Dessa forma, todos os experimentos para a otimização do procedimento foram conduzidos de forma a minimizar os interferentes da matriz e maximizar a extração dos analitos de interesse. Otimizados tais parâmetros e obtidos os resultados de recuperação aceitáveis e com reprodutibilidade para amostras com essa característica, a validação do método pode ser realizada.

Aplicando-se o método QuEChERS modificado para extração das 36 micotoxinas verificou-se que 97% foram quantificadas nos extratos das amostras de vinho tinto. Com relação aos valores de r^2 para as curvas analíticas preparadas em solvente orgânico, 11% das micotoxinas estudadas apresentaram $r^2 \geq 0,99$ e 78% apresentaram r^2 entre 0,95 e 0,98. Para as curvas analíticas preparadas em extrato da matriz, 80% das micotoxinas apresentaram r^2 entre 0,95 e 0,98.

Considerando o percentual do efeito matriz, 75% das micotoxinas estudadas situaram-se entre +20% e -20%, ou seja, a matriz não exerce um efeito significativo na determinação desses compostos.

Os percentuais de recuperação se apresentaram entre 70 e 120%, para 98% das micotoxinas, em todos os níveis de concentração estudados, confirmando a ótima exatidão do método e sua eficiência no procedimento de extração. Em relação ao RSD%, os resultados obtidos também foram excelentes. Nos primeiro, segundo e

terceiro níveis de concentração estudados, 86%, 89% e 97% das micotoxinas, respectivamente, apresentaram RSD inferior a 20%.

Apenas a micotoxina nivalenol não pode ser determinada satisfatoriamente em nenhum dos níveis estudados pois não apresentou um pico cromatográfico com qualidade suficiente para sua detecção inequívoca e quantificação. Essa micotoxina compõe a família dos tricotecenos e tem ocorrência frequente em matrizes como milho e trigo. Não há relatos da contaminação de amostras de vinho tinto por nivalenol na literatura consultada.

Todos os parâmetros avaliados durante a validação do método (linearidade, curva analítica, seletividade, limites de detecção e de quantificação, e estudos de exatidão e precisão) apresentaram valores dentro dos limites, em concordância aos órgãos governamentais que regulamentam métodos para análise de contaminantes (INMETRO, 2011).

Dessa forma, os objetivos traçados para este trabalho foram plenamente alcançados. O método de análise desenvolvido e validado empregando UPLC-MS/MS foi aplicado na determinação de micotoxinas em amostras reais de vinho tinto e mostrou-se eficiente. O procedimento de extração é de fácil e rápida execução.

6 REFERÊNCIAS

Agilent Technologies. Disponível em: <[http://www.chem.agilent.com/en-US/products-services/columns-sample-preparation/sample-preparation/solid-phase-extraction-\(spe\)/bond-elut-nexus-and-bond-elut-nexus-wcx/Pages/default.aspx?cid=4868](http://www.chem.agilent.com/en-US/products-services/columns-sample-preparation/sample-preparation/solid-phase-extraction-(spe)/bond-elut-nexus-and-bond-elut-nexus-wcx/Pages/default.aspx?cid=4868)>; Acessado em: 14 de outubro de 2012 as 13:07h.

ANASTASSIADES, M.; LEHOTAY, S. J.; STAJNBAHER, D.; SCHENCK, F. J. Fast and Easy Multiresidue Method Employing Acetonitrile Extraction/Partitioning and “Dispersive Solid-Phase Extraction” for the Determination of Pesticide Residues in Produce. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists International**, v. 86, n. 2, p. 412-431, 2003.

ALBANO, F. M. RODRIGUEZ, M. T. R. **Validação e garantia da qualidade de ensaios laboratoriais – Guia Prático**. 1ª ed. Porto Alegre: Rede Metrológica do Rio Grande do Sul, 2009.

BANERJEE, K.; PATIL, S. H.; DASGUPTA, S.; OULKAR, D. P.; PATIL, S. B.; JADHAV, M. R.; SAVANT, R. H.; ADSULE, P. G.; DESHMUKH, M. B. Multiresidue analysis of 83 pesticides and 12 dioxin-like polychlorinated biphenyls in wine by gas chromatography–time-of-flight mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, n. 1216 , p. 2307–2319, 2009.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, S. P. **Fundamentos de cromatografia**. 1ª ed. São Paulo: UNICAMP, 2010.

Council for Agricultural Science and Technology (CAST) - Task force report. **Mycotoxins: Risks in Plant, Animal, and Human System**. USA: 2003.

CHARTERS, S. **Wine and Society: The Social and Cultural Context of a Drink**. 1ª ed. USA, Elsevier Butterworth-Heinemann, 2006.

CUNHA, S.C.; FERNANDESA, J. O.; ALVESB, A.; OLIVEIRAA, M.B.P.P. Fast low-pressure gas chromatography–mass spectrometry method for the determination of

multiple pesticides in grapes, musts and wines. **Journal of Chromatography A**, n. 1216, p. 119–126, 2009.

DA SILVA, R. C. **Métodos individual e multirresidual para determinação de pesticidas em grãos e derivados por GC-PFPD, GC-ITD-MS e LC-MS/MS**. Tese de Doutorado, UFSM, Santa Maria, 2011.

DE KOK, A. Food and Consumer Product Safety Authority. **Procedimento Operacional Padrão CHE01-WV630**, The Hague, Holanda: Ministry of Helth, Welfare and Sport, 2005.

Enciclopédia do Vinho. Disponível em: <<http://www.e-vinho.com.br/pais.php?pais=Brasil&continente=Am%E9ricas>>; Acessado em: 02 de janeiro de 2012 as 12:44h.

Embrapa Uva e Vinho. Disponível em: <<http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/artigos/prodvit2010.pdf>>, Acessado: em 02 de janeiro de 2012 as 13:31h.

EURACHEM. EURACHEM Guide. **Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement**. 2ª Ed., 2000.

FAO. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx#ancor>>; Acessado em: 14 de dezembro de 2011 as 14:00h.

FERNÁNDEZ-ALBA, A. R. **Chromatographic Mass Spectrometry Food Analysis for Trace Determination of Pesticide Residues**. Amsterdã, Holanda: Elsevier, 2005.

FILHO, W. G. V. **Bebidas Alcoólicas: Ciência e Tecnologia – Volume 1**. 1ª ed. São Paulo: Blucher, 2010.

FRANCO, B. D. G. M.; COZZOLINO, S. M. F. **Segurança e Alimento**. 1ª ed. São Paulo: Blucher, 2010.

GOLAN, R. B.; PASTER, N. **Mycotoxins in fruits and vegetables**. 1ª ed. USA: Academic Press/Elsevier, 2008.

GONZÁLEZ, R. R.; VIDAL, J. L. M.; FRENICH, A. G. **Liquid chromatography for the determination of mycotoxins in foods**. 1ª ed. New York: Nova Science Publishers, Inc., 2010.

GRAINGER, K.; TATTERSALL, H. **Wine Production: Vine to Bottle**. 1ª ed. Oxford, UK: Blackwell Publishing Ltd., 2005.

HIEMSTRA, M.; DE KOK, A. Comprehensive multi-residue method for the target analysis using liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1154, p. 3-25, 2007.

INMETRO. **Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos, DOQ-CGCRE-008**. Revisão 2, 2007.

INMETRO. **Orientações sobre validação de métodos analíticos, DOQ-CGCRE-008**. Revisão 4, 2011.

JACKSON, R. S. **Wine Science: Principles and applications**. 3ª ed. USA: Academic Press/Elsevier, 2008.

JESTOI, M. Emerging Fusarium-mycotoxins fusaproliferin, beauvericin, enniatins, and moniliformin: a review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 48 n. 1, p. 21-49, 2008.

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

LEHOTAY, S. J.; DE KOK, A.; HIEMSTRA, M.; VAN BODEGRAVEN, P. Validation of a Fast and Easy Method for the Determination of 229 Pesticide Residues in Fruits

and Vegetables Using Gas and Liquid Chromatography and Mass Spectrometric Detection, **Journal of AOAC International**, v. 88, p. 595-614, 2005.

LANÇAS, F. M. **Validação de métodos cromatográficos de análise**, v. 6. São Carlos: RiMa. 2004.

MARCH, R. E. An Introduction to Quadrupole Ion Trap Mass Spectrometry. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 32, p. 351-369, 1997.

MAGAN, N.; OLSEN, M. **Mycotoxins in food: Detection and control**. 1ª ed. England: Woodhead Publishing in Food Science and Technology, 2004.

MELLO, L. M. R. de - Embrapa Uva e Vinho: Comunicado técnico, 115 - **Vitivinicultura brasileira: Panorama 2011**. 2012.

MELLO, L. M. R. de; PROTAS, J. F. S.; CAMARGO, U. A. – Embrapa Uva e Vinho: Artigos Técnicos. **A vitivinicultura brasileira: realidade e perspectivas**. 2002.

MOL, H. G.; VAN DAM, R. C.; STEIJGER, O. M. Determination of polar organophosphorus pesticides in vegetables and fruits using liquid chromatography with tandem mass spectrometry: selection of extraction solvent. **Journal of Chromatography A**. v. 1015, p. 119-27, 2003.

NJAPAU, H.; TRUJILLO, S.; POHLAND, A. E.; PARK, D. L. **Micotoxin contamination and control**. 1ª ed. USA: AuthorHouse, 2008.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger Princípios de Bioquímica**. 3ª ed. São Paulo: RR Doneley, 2002.

PIRES, A. P. M. **Composição química e actividade antioxidante de folhas de diferentes castas de videira**. Dissertação de Mestrado / Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, Portugal, 2010.

PIZZUTTI, I. R.; DE KOK, A. 5th European Pesticide Residues Workshop - Pesticides

in Food and Drink. **Anais**, Estocolmo, 2004.

PIZZUTTI, I. R. **Validação de métodos multirresíduos de extração e desenvolvimento de métodos de purificação por GPC para análise de resíduos de pesticidas em soja utilizando GC-MS, GC-MS/MS e LC-MS/MS**. Tese de Doutorado, UFSM, Santa Maria, 2006.

PIZZUTTI, I. R.; DE KOK, A.; HIEMSTRA, M.; WICKERT, C.; PRESTES, O. D. Method validation and comparison of acetonitrile and acetone extraction for the analysis of 169 pesticides in soya grain by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, p. 4539-4552, 2009.

RAI, M.; VARMA, A. **Mycotoxins in Food, Feed and Bioweapons**. 1ª ed. Germany: Springer, 2010.

RICCIO, M. F. **Analisadores de massas**. Disponível em: <<http://www.espectrometriademassas.com.br/capitulos/assuntos/assunto.asp?codcapitulo=8&codassunto=63&numero=9>>. Acessado em: 19 de março de 2012.

SAEGER, S. D. **Determining mycotoxins and mycotoxigenic fungi in food and feed**. 1ª ed. England: Woodhead Publishing in Food Science and Technology, 2011.

SANCO, **Method validation and quality control procedures for pesticide residues analysis in food and feed**, Document No. SANCO/10684, 2009.

SANTIN, E.; MAIORKA, A.; ZANELLA, I.; MAGON, L. Micotoxinas do *Fusarium spp* na avicultura comercial. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.31, n.1, p.185-190, 2000.

SCUSSEL, V. M. **Micotoxinas em alimentos**. 1ª ed. Florianópolis: Insular, 1998.

SILVA, H. A. D. F. O. **Estudo da eliminação de pesticidas ao longo da produção de um vinho**. Dissertação de Mestrado Universidade do Porto, Portugal, 2004.

SPANJER, M. C.; RENSEN, P. M.; SCHOLTEN, J. M. LC-MS/MS multi-method for mycotoxins after single extraction, with validation data for peanut, pistachio, wheat, maize, cornflakes, raisins and figs. **Food Additives and contaminants**, April 2008; 25 (4): 472-489

STASHENKO, E. E.; MARTÍNEZ, J. R. Preparación de la muestra: un paso para el análisis por GC-MS. **Scientia Chromatographica**, v. 2, n. 4, p.25-48, 2010.

The New York Times (TNYT). A Brief History of Wine. Disponível em: <http://www.nytimes.com/2007/11/05/timestopics/topics-winehistory.html?_r=0>; 12 de dezembro de 2011 as 18:20h; Publicado em 5 de novembro de 2007.

UNIÃO EUROPÉIA. Decreto nº 1881/2006. **Seta os limites máximos para certos contaminantes em alimento. Official Journal of European Union**. p. L364 (2006), 19 de dezembro de 2006

United Chemical Technologies (UCT). Disponível em: <<http://unitedchem.com/product.aspx?P=276>>; Acessado em: 14 de outubro de 2012 as 13:50h.

Vinhos do Brasil. Disponível em: <<http://www.vinhosdobrasil.com.br/Conteudo.aspx?id=2>>; Acessado em: 12 de dezembro de 2011 as 10:19h.

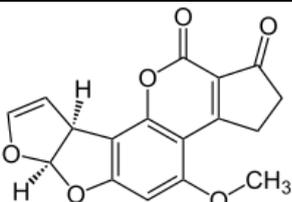
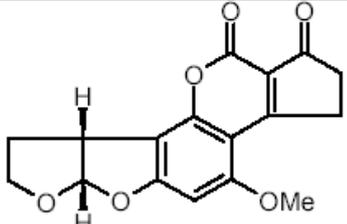
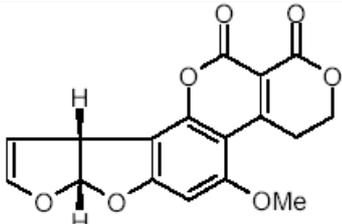
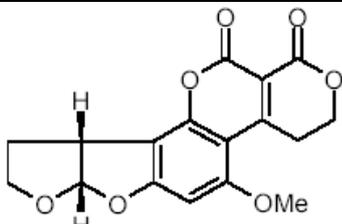
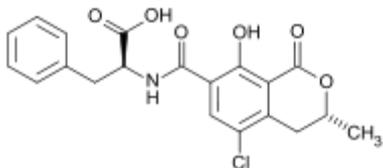
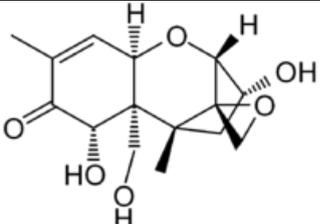
Waters. Disponível em: <http://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=513209&locale=pt_BR>; Acessado em: 14 de outubro de 2012 as 13:12h.

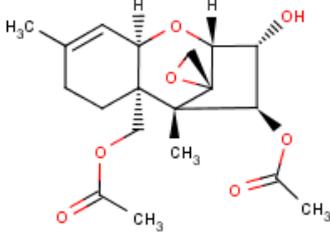
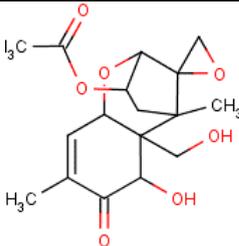
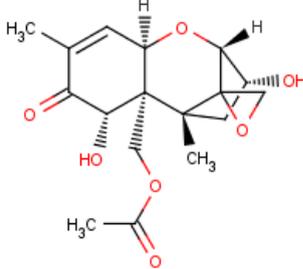
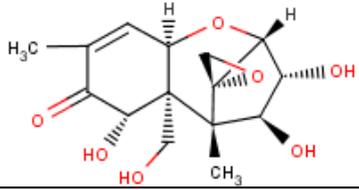
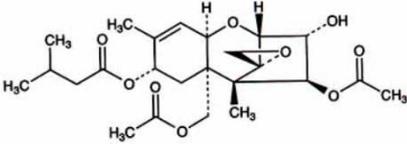
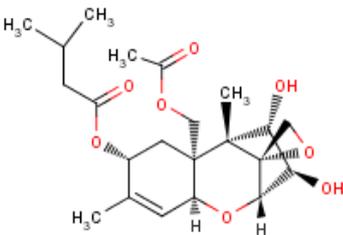
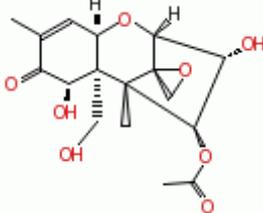
Wine Institute. Disponível em: <www.wineinstitute.org/resources/statistics>; Acessado em: 12 de dezembro de 2011 as 14:20h.

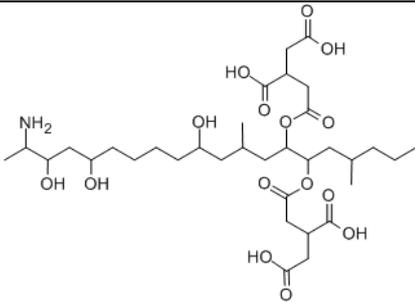
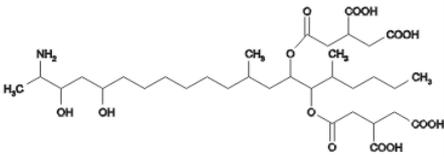
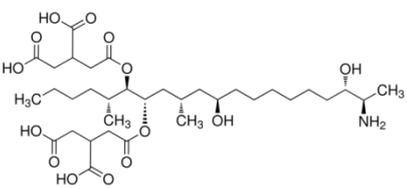
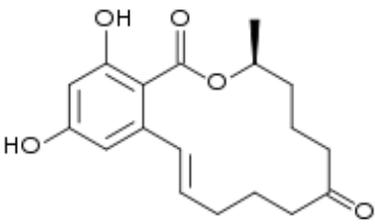
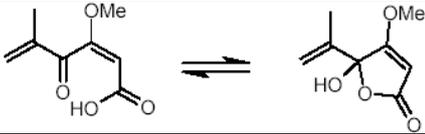
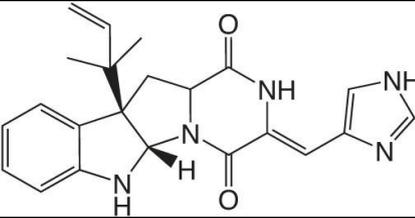
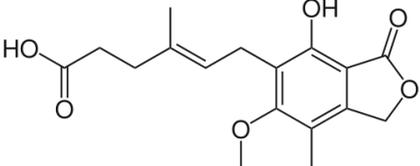
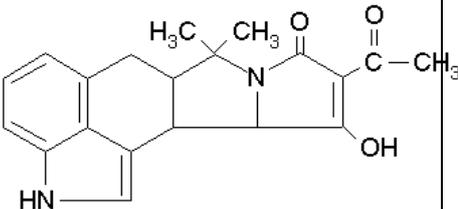
ZANELLA, R.; ADAIME, M. B.; PRESTES, O. D.; FRIGGI, C. A. QuEChERS – um método moderno de preparo de amostra para determinação multirresíduo de

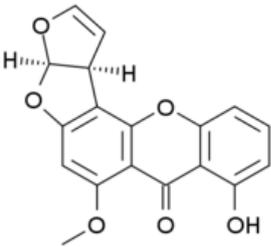
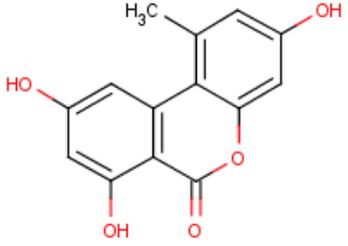
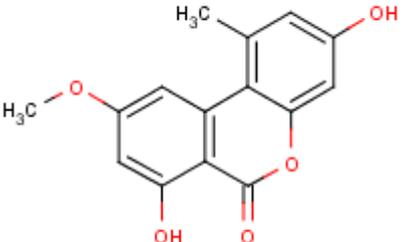
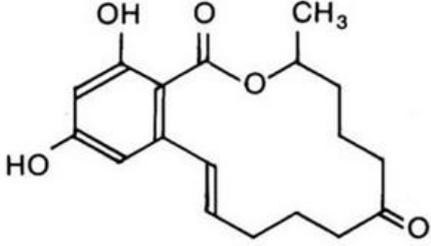
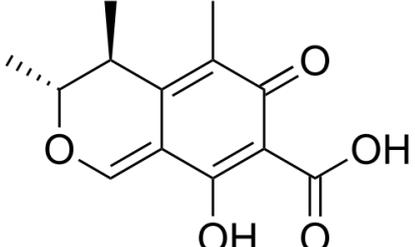
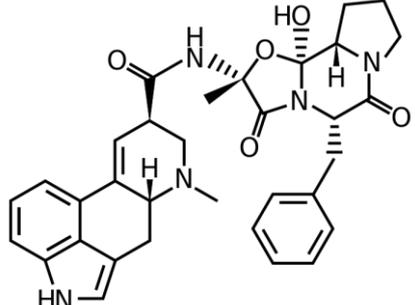
pesticidas em alimentos por métodos cromatográficos acoplados à espectrometria de massas. **Química Nova**, Vol. 32, n. 6, p. 1620-1634, 2009.

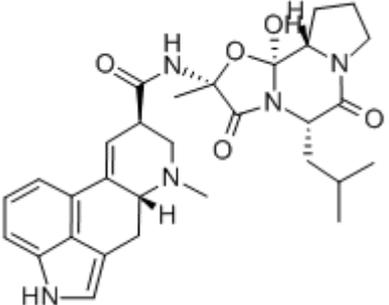
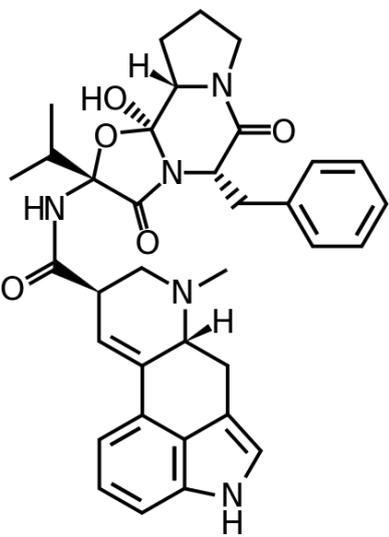
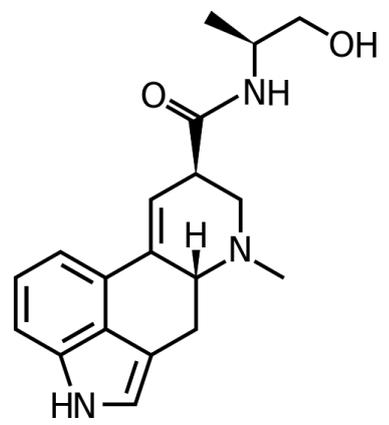
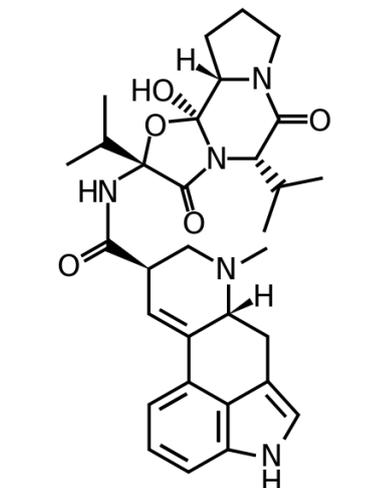
APÊNDICE 1 – Estrutura química, fórmula molecular e massa molecular de cada uma das micotoxinas estudadas.

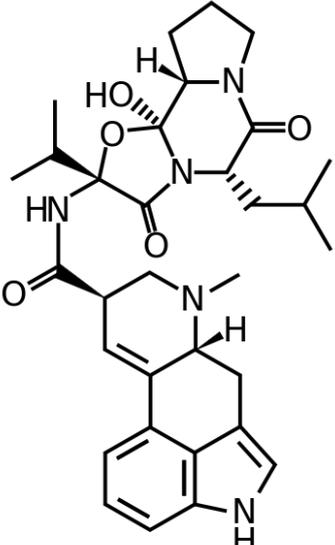
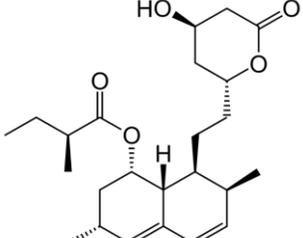
Micotoxina	Estrutura	Fórmula Molecular	Massa Molecular (g)
Aflatoxina B1		$C_{17}H_{12}O_6$	312,30
Aflatoxina B2		$C_{17}H_{14}O_6$	314,30
Aflatoxina G1		$C_{17}H_{12}O_7$	328,30
Aflatoxina G2		$C_{17}H_{14}O_7$	330,30
Ocratoxina A (OTA)		$C_{20}H_{18}ClNO_6$	403,80
DeOxiNivalenol (DON)		$C_{15}H_{20}O_6$	296,32

DiAcetoxyScirpenol (DAS)		$C_{19}H_{26}O_7$	366,40
3-Ac-DON		$C_{17}H_{22}O_7$	338,40
15-Ac-DON		$C_{17}H_{22}O_7$	338,40
Nivalenol (NIV)		$C_{15}H_{20}O_7$	312,30
Toxina T-2		$C_{24}H_{34}O_9$	466,52
Toxina HT-2		$C_{22}H_{32}O_8$	424,48
Fusarenone X		$C_{17}H_{22}O_8$	354,00

Fumonisina B1		$C_{34}H_{59}NO_{15}$	721,80
Fumonisina B2		$C_{34}H_{59}NO_{14}$	705,80
Fumonisina B3		$C_{34}H_{59}NO_{14}$	708,83
Zearalenona (ZEN)		$C_{18}H_{22}O_5$	318,36
Ácido Penicílico		$C_8H_{10}O_4$	170,20
Roquefortina C		$C_{22}H_{23}N_5O_2$	389,46
Ácido micofenólico		$C_{17}H_{20}O_6$	320,30
Ácido Ciclopiazónico (CPA)		$C_{20}H_{20}N_2O_3$	336,40

Esterigmatocistina		$C_{18}H_{12}O_6$	324,28
Altenariol		$C_{14}H_{10}O_5$	258,20
Altenariol Metílico		$C_{15}H_{12}O_5$	272,30
Zearalanona (ZAN)		$C_{18}H_{22}O_5$	318,36
Citrinina		$C_{13}H_{14}O_5$	250,25
Ergotamina		$C_{33}H_{35}N_5O_5$	581,66

Ergosina	 <p>The structure of Ergosina features a tetracyclic ergoline core. It has a methyl group at the 8-position, a 2-(isobutylamino)ethyl group at the 6-position, and a 2-(2-hydroxy-2-(2-methylpropylamino)ethyl)amino group at the 3-position.</p>	$C_{30}H_{37}N_5O_5$	547,64
Ergocristina	 <p>The structure of Ergocristina features a tetracyclic ergoline core. It has a methyl group at the 8-position, a phenylethyl group at the 6-position, and a 2-(2-hydroxy-2-(2-methylpropylamino)ethyl)amino group at the 3-position.</p>	$C_{35}H_{39}N_5O_5$	609,71
Ergonovina	 <p>The structure of Ergonovina features a tetracyclic ergoline core. It has a methyl group at the 8-position and a 2-(1-hydroxyethyl)amino group at the 3-position.</p>	$C_{19}H_{23}N_3O_2$	325,41
Ergocornina	 <p>The structure of Ergocornina features a tetracyclic ergoline core. It has a methyl group at the 8-position, a 2-(2-hydroxy-2-(2-methylpropylamino)ethyl)amino group at the 3-position, and a 2-(2-methylpropylamino)ethyl group at the 6-position.</p>	$C_{31}H_{39}N_5O_5$	561,67

Ergocriptina	 <p>The chemical structure of Ergocriptina is a complex ergoline alkaloid. It features a tetracyclic ergoline core with a benzene ring fused to the side chain. The structure is highly substituted with various functional groups, including a hydroxyl group, a secondary amine, a tertiary amine, and a quaternary ammonium salt. The side chain is a long, branched chain with multiple stereocenters and a terminal amide group.</p>	$C_{32}H_{41}N_5O_5$	575,70
Mevinolina	 <p>The chemical structure of Mevinolina is a complex ergoline alkaloid. It features a tetracyclic ergoline core with a benzene ring fused to the side chain. The structure is highly substituted with various functional groups, including a hydroxyl group, a secondary amine, a tertiary amine, and a quaternary ammonium salt. The side chain is a long, branched chain with multiple stereocenters and a terminal amide group.</p>	$C_{24}H_{36}O_5$	404,54

APÊNDICE 2 – Determinação da linearidade das curvas analíticas.

Concentração da curva analítica (ng g ⁻¹)			Concentração da solução mistura (ng mL ⁻¹)			Volume adicionado da solução mistura (µL)	Massa absoluta fortificada na amostra (ng)			Volume final (volume do balão volumétrico completo com metanol) (mL)
Grupo I	Grupo II	Grupo III	Grupo I	Grupo II	Grupo III		Grupo I	Grupo II	Grupo III	
0,4	20	4	500	25000	5000	10	5	250	50	25
0,8	40	8	500	25000	5000	20	10	500	100	25
2	100	20	500	25000	5000	20	10	500	100	10
4	200	40	500	25000	5000	40	20	1000	200	10
8	400	80	500	25000	5000	80	40	2000	400	10
20	1000	200	500	25000	5000	200	100	5000	1000	10
40	2000	400	500	25000	5000	400	200	10000	2000	10

Concentração das micotoxinas (ng mL ⁻¹)			Volume adicionado da solução preparada em balão volumétrico (mL)	Volume adicionado de acetonitrila ou extrato da matriz adicionado (mL)	Volume antes do UPLC-MS/MS (mL)	Concentração das micotoxinas antes da injeção no UPLC-MS/MS (ng mL ⁻¹)			Fator do método*
Grupo I	Grupo II	Grupo III				Grupo I	Grupo II	Grupo III	
0,2	10	2	0,5	0,5	1	0,1	5	1	4
0,4	20	4	0,5	0,5	1	0,2	10	2	4
1	50	10	0,5	0,5	1	0,5	25	5	4
2	100	20	0,5	0,5	1	1	50	10	4
4	200	40	0,5	0,5	1	2	100	20	4
10	500	100	0,5	0,5	1	5	250	50	4
20	1000	200	0,5	0,5	1	10	500	100	4

*Fator do método = Nível de fortificação / concentração das micotoxinas no vial antes da injeção.

APÊNDICE 3 – Avaliação da exatidão do método analítico.

Nível de Fortificação ($\mu\text{g kg}^{-1}$)			Concentração da solução mistura (ng mL^{-1})			Volume adicionado da solução mistura (μL)	Massa absoluta fortificada na amostra (ng)			Quantidade da amostra (g)	Volume de água adicionado a amostra (mL)	Volume do solvente de extração (mL)
Grupo I	Grupo II	Grupo III	Grupo I	Grupo II	Grupo III		Grupo I	Grupo II	Grupo III			
1	50	10	500	25000	5000	10	5	500	100	5	5	10
2,5	125	25	500	25000	5000	25	12,5	3125	625	5	5	10
10	500	100	500	25000	5000	100	50	50000	10000	5	5	10

Concentrações das micotoxinas após extração (ng mL^{-1})			Volume da aliquota retirado (mL)	Volume de metanol adicionado (mL)	Volume antes do UPLC- MS/MS (mL)	Concentração das micotoxinas antes da injeção no UPLC-MS/MS (ng mL^{-1})			Fator do método*
Grupo I	Grupo II	Grupo III				Grupo I	Grupo II	Grupo III	
0,5	25	5	0,5	0,5	1	0,25	12,5	2,5	4
1,25	62,5	12,5	0,5	0,5	1	0,625	31,25	6,25	4
5	250	50	0,5	0,5	1	2,5	125	25	4

*Fator do método = Nível de fortificação / concentração das micotoxinas no vial antes da injeção.