

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS  
PROGRAMA DE RESIDÊNCIA EM ÁREA PROFISSIONAL DA SAÚDE  
MEDICINA VETERINÁRIA- MEDICINA VETERINÁRIA PREVENTIVA

Cintia Londero

**COMPARAÇÃO DE MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE FUMONISINAS E  
OCRATOXINA A EM MILHO**

Santa Maria – RS  
2022

**Cintia Londero**

**Comparação de métodos de extração de fumonisinas e ocratoxina A em milho**

Monografia apresentada ao Programa de Residência em Área Profissional da Saúde Medicina Veterinária- Medicina Veterinária Preventiva, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Especialista em Medicina Veterinária - Ênfase em Medicina Veterinária Preventiva.**

Orientador: Prof. Dr. Carlos Augusto Mallmann

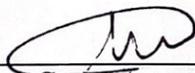
Santa Maria, RS  
2022

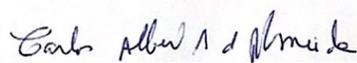
**Cintia Londero**

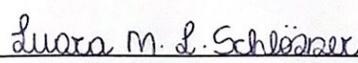
**COMPARAÇÃO DE MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE FUMONISINAS  
OCRATOXINA A EM MILHO**

Monografia apresentada ao Programa de Residência em Área Profissional da Saúde Medicina Veterinária- Medicina Veterinária Preventiva, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Especialista em Medicina Veterinária - Ênfase em Medicina Veterinária Preventiva.**

**Aprovado em 17 de fevereiro de 2022.**

  
\_\_\_\_\_  
**Carlos Augusto Mallmann, Dr. (UFSM)**  
(Presidente/Orientador)

  
\_\_\_\_\_  
**Carlos Alberto Araújo de Almeida, Dr. (UFSM)**

  
\_\_\_\_\_  
**Luara Medianeira de Lima Schlosser, Me. (UFSM)**

Santa Maria, RS  
2022

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus pais, Rubia e Miguel, agradeço por todos os ensinamentos e por serem pacientes em me ouvir desabafar nos momentos que mais precisei. Agradeço por terem me ensinado o que eu sou e por cuidarem dos meus companheiros de longa data, Kaká e Filó que sempre estiveram me esperando voltar pra casa.

Agradeço a minha irmã Julia por ter sido a minha companheira de morada por 1 ano, pelos dias de filmes e comidas e também, segurando as barras nos dias difíceis.

Ao meu marido Rodrigo, que mesmo de longe sempre tentou me ouvir, aconselhar, erguer a cabeça e seguir o caminho.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Carlos Augusto Mallmann, agradeço pela confiança no meu trabalho e por todos os ensinamentos que foram muito além de micotoxinas. Vou levar pra vida tudo o que me ensinou.

Agradeço aos amigos e colegas de trabalho do LAMIC, por toda a paciência e ensinamentos no início da residência e por terem sido uma equipe nota 1000 onde todos estenderam a mão sem pedir nada em troca.

Ao LAMIC, local onde foi possível realizar o meu trabalho, toda a estrutura e receptividade que o laboratório proporciona foram fundamentais para o conhecimento que levo comigo.

Agradeço a Universidade Federal de Santa Maria e ao Programa de Residência Uniprofissional em Medicina Veterinária por abrirem as portas para profissionais recém formados que buscam experiencia para dar início a carreira.

## RESUMO

### COMPARAÇÃO DE MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE FUMONISINAS E OCRATOXINA A EM MILHO

AUTORA: Cintia Londero

ORIENTADOR: Carlos Augusto Mallmann

O milho é um dos principais cereais produzidos no mundo e apresenta grande relevância na alimentação humana e produção de proteína animal. É um grão altamente susceptível a contaminação por micotoxinas, principalmente as fumonisinas e ocratoxina A, que são produtos tóxicos resultantes do metabolismo secundário de fungos filamentosos como *Fusarium*, *Aspergillus* e *Penicillium*, respectivamente. O objetivo deste trabalho é comparar a criação de uma nova solução de extração com uma metodologia certificada e validada para recuperação de fumonisinas e ocratoxina A. Para atingir este objetivo foram realizados experimentos com 20 amostras de milho moído e livres de contaminação por fumonisinas e ocratoxina A. Após homogeneização, as amostras foram separadas em dois grupos para testes preliminares utilizando a solução de extração A com MeOH:H<sub>2</sub>O (80:20, v:v) no grupo A e a solução de extração B com ACN:H<sub>2</sub>O:AF (80:19,9:0,1, v:v:v) no grupo B. A partir dos resultados obtidos destes testes preliminares, a solução A foi escolhida para a realização do teste de validação e ainda foi modificada com o acréscimo de 5g de NaCl (MeOH:H<sub>2</sub>O:NaCl, 80:20:5), e somente as fumonisinas foram consideradas para a comparação de métodos. Este procedimento teve a duração de três dias consecutivos e após a leitura e análise em HPLC-MS/MS, os resultados da média de recuperação obtidas nos 1º, 2º e 3º dias foram de 41,2%, 48,9% e 22,3% e 58,6%, 45,9% e 53,9% para FB<sub>1</sub> e FB<sub>2</sub>, respectivamente. A comparação do método criado utilizando a solução de extração A (modificada) com a metodologia oficial utilizada pelo laboratório, mostram diferenças no solvente orgânico utilizado pelo laboratório e também na porcentagem média de recuperação, que se encontrou entre 97-99% estando dentro da faixa de aceitação pelo *Commission Regulation*. Com os resultados obtidos, foi possível concluir que a solução de extração criada não interagiu corretamente com as micotoxinas alvo, resultando em recuperações abaixo de 60% mostrando uma grande diferença em comparação a excelente recuperação da metodologia oficial e certificada do laboratório.

**Palavras-chaves:** Micotoxinas. Fumonisinas. Ocratoxina A. Extração.

## ABSTRACT

### COMPARISON OF FUMONISIN AND OCHRATOXIN A EXTRACTION METHODS IN MAIZE

AUTHOR: Cintia Londero  
ADVISOR: Carlos Augusto Mallmann

Maize is one of the main cereals produced in the world and has great relevance in human food and animal protein production. It is a grain highly susceptible to contamination by mycotoxins, mainly fumonisins and ochratoxin A, which are toxic products resulting from the secondary metabolism of filamentous fungi such as *Fusarium*, *Aspergillus* and *Penicillium*, respectively. The objective of this work is to compare the creation of a new extraction solution with a certified and validated methodology for the recovery of fumonisins and ochratoxin A. To achieve this objective, experiments were carried out with 20 samples of ground corn and free of contamination by fumonisins and ochratoxin A. After homogenization, the samples were separated into two groups for preliminary tests using the extraction solution with MeOH:H<sub>2</sub>O (80:20, v:v) in group A and the extraction solution with ACN:H<sub>2</sub>O:AF (80:19.9:0.1, v:v:v) in group B. From the results obtained from these preliminary tests, the solution A was chosen for the validation test and modified with the addition of 5g of NaCl and only fumonisins were considered for the comparison of methods. This procedure lasted for three consecutive days and after reading and analyzing the HPLC-MS/MS, the average recovery results obtained on the 1st, 2nd and 3rd days were 41.2%, 48.9% and 22, 3% and 58.6%, 45.9% and 53.9% for FB<sub>1</sub> and FB<sub>2</sub>, respectively. The comparison of these results with the methodology used in the laboratory, shows differences in the organic solvent used and also in the recovery, which was found between 97-99% being within the range of acceptance by the *Commission Regulation*. With the results obtained, it was possible to conclude that the extraction solution created did not interact correctly with the target mycotoxins, resulting in recoveries below 60% showing a great difference compared to the excellent recovery of the official and certified laboratory methodology.

**Keywords:** Mycotoxins. Fumonisins. Ochratoxin A. Extraction.

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Curva analítica de fumonisinas. ....	23
<b>Tabela 2</b> - Curva analítica de ocratoxina A. ....	23
<b>Tabela 3</b> - Curva de FB <sub>1</sub> e FB <sub>2</sub> com a matriz milho, utilizada para validar a metodologia do laboratório.....	25
<b>Tabela 4</b> - Resultados preliminares da recuperação de ocratoxina A extraída com a solução A e com a solução B.....	26
<b>Tabela 5</b> - Resultados preliminares da quantificação e recuperação de fumonisinas B <sub>1</sub> e B <sub>2</sub> , extraídas com a solução A.....	26
<b>Tabela 6</b> - Resultados do teste de validação realizado com a solução de extração A (modificada).....	27
<b>Tabela 7</b> - Resultados da porcentagem de recuperação do teste de validação realizado com a solução de extração A (modificada). ....	28

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Estrutura química das fumonisinas B <sub>1</sub> e B <sub>2</sub> . .....	13
<b>Figura 2</b> - Estrutura química da ocratoxina A. ....	15
<b>Figura 3</b> - Esquema do processo de separação e preparação das amostras de 1 a 20 (A01-A20) utilizadas para os testes preliminares. ....	18
<b>Figura 4</b> - Esquema da separação dos grupos A e B dos testes preliminares com as soluções de extração. ....	19
<b>Figura 5</b> - Preparação das amostras utilizadas para validação durante três dias consecutivos, utilizando a solução de extração A (modificada). ....	20

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$\mu\text{g/kg}$	Micrograma por kilo
$\mu\text{g/mL}$	Micrograma por mililitro
$\mu\text{L}$	Microlitro
ACN	Acetonitrila
AF	Ácido fórmico
$A_w$	Atividade de água
FB	Fumonisinias do grupo B
g	Gramas
$\text{H}_2\text{O}$	Água
HPLC-MS/MS	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a espectrometria de massas
LAMIC	Laboratório de Análises Micotoxicológicas
LMT	Limite de Micotoxina tolerável
MeOH	Metanol
ml	Mililitro
NaCl	Cloreto de Sódio
ND	Não Detectável
pd	Padrão
pH	Potencial Hidrogênio
ppb	Partes por bilhão
rpm	Rotação por minuto
UFSM	Universidade Federal de Santa Maria
v	Volume

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	11
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	12
2.1	MILHO .....	12
2.2	MICOTOXINAS .....	12
<b>2.2.1</b>	<b>Fumonisin</b> .....	13
<b>2.2.2</b>	<b>Ocratoxina A</b> .....	14
2.3	MÉTODO DE EXTRAÇÃO DE MICOTOXINAS .....	16
2.4	CURVA DE CALIBRAÇÃO ANALÍTICA .....	16
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	16
3.1.	AMOSTRAGEM .....	17
3.2.	PREPARO DAS AMOSTRAS E FORTIFICAÇÃO .....	18
3.3	EXTRAÇÃO .....	20
<b>3.3.1</b>	<b>Testes preliminares com diferentes soluções de extração</b> .....	20
<b>3.3.2</b>	<b>Extração das amostras para validação</b> .....	21
3.4	DILUIÇÃO E ANÁLISE CROMATOGRÁFICA .....	21
<b>3.4.1</b>	<b>Diluição das amostras preliminares</b> .....	22
<b>3.4.2</b>	<b>Diluição das amostras para validação</b> .....	22
<b>3.4.3</b>	<b>Curvas de calibração</b> .....	22
3.5	MÉTODO OFICIAL DE EXTRAÇÃO DE FUMONISINAS .....	23
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	25
4.1	RECUPERAÇÃO DOS TESTES COM AS SOLUÇÕES EXTRATORAS PRELIMINARES .....	25
4.2	RECUPERAÇÃO DAS AMOSTRAS DE VALIDAÇÃO .....	27
4.3	AValiação DOS RESULTADOS .....	28
<b>5</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	31
<b>6</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	32

## 1 INTRODUÇÃO

O milho (*Zea mays L.*) é considerado um dos grãos de maior importância econômica mundial, sendo o Brasil, um dos maiores produtores de grãos de milho do mundo. A safra deste grão em 2020/21 fechou com 4,39 milhões de toneladas colhidas no Brasil, segundo dados divulgados pela Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB, 2020).

A importância econômica do milho está relacionada com as diversas formas da sua utilização, desde o uso na alimentação humana e animal até a indústria de alta tecnologia. Segundo NEUMANN et al. (2017), por causa do seu alto valor nutritivo, baixo teor de fibra e boa concentração de energia torna o uso na cadeia produtiva, principalmente avicultura e bovinocultura intensiva, indispensável. A composição nutricional do grão é bastante variável, podendo apresentar oscilações entre proteínas, aminoácidos essenciais e o amido, podendo dificultar a formulação de dietas para os animais. Estas características nutricionais servem de substrato para a multiplicação de microrganismos, como os fungos e quando manuseados e armazenados de forma incorreta, ocorre a produção de micotoxinas (KOMATSU, 2018).

As micotoxinas são metabólitos secundários produzidos por algumas espécies de fungos filamentosos em condições de temperatura, umidade e presença de oxigênio favoráveis para o seu desenvolvimento. Quando presentes em alimentos para consumo humano ou animal, trazem prejuízos para a saúde em função de suas características tóxicas e carcinogênicas (PRESTES et al., 2019). O Gênero *Fusarium* é o principal responsável pela produção de fumonisinas ( $B_1$  e  $B_2$ ), que são comumente encontradas no grão de milho. Já os gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* são os responsáveis pela produção da ocratoxina A nos grãos em situações onde o armazenamento é incorreto (OLIVEIRA, 2016).

A fim de se obter os níveis de micotoxinas no grão de milho, a amostra passa por algumas etapas até que se obtenha o resultado final da análise. Alguns fatores como desuniformidade na distribuição de micotoxinas na amostra, natureza da amostra, grau de umidade e temperatura, pH e substâncias como lipídios e pigmentos, podem interferir no resultado da amostra tornando um desafio o desenvolvimento de métodos analíticos precisos e reprodutíveis para determinar a contaminação da amostra. A necessidade de métodos precisos, sensíveis, rápidos e fáceis promoveram um avanço nas técnicas para detectar as micotoxinas nos alimentos (SOUZA, 1999).

Uma das etapas do processo de obtenção de um resultado de análise micotoxicológica, é a técnica de extração que consiste em separar as micotoxinas para uma fase líquida a partir de solventes orgânicos ou a mistura deste com água ultrapura. Fatores como o tipo de solvente

orgânico, técnica de homogeneização da amostra com o líquido extrator, filtração e centrifugação, podem influenciar na eficiência do procedimento de extração. Algumas técnicas foram sendo aperfeiçoadas ao longo dos anos a fim de otimizar os processos de extração e de cromatografia das análises de micotoxinas (MARSCHIK et al., 2013).

O objetivo deste trabalho é conduzir um estudo para avaliar a interação das fumonisinas e ocratoxina A extraídas simultaneamente com soluções de extração criadas, contendo solventes orgânicos diferentes, e comparar com o método de extração já validado pelo LAMIC com base na *Commission Regulation (EC) nº401/2006*.

## **2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 MILHO**

O milho é um dos cereais mais importantes da economia mundial. A sua produção é destinada tanto para consumo humano, formulação de rações animais quanto para o seu uso na indústria de alta tecnologia. Em torno de 70% da produção deste grão é destinada à alimentação animal (PAES, 2006; KOMATSU, 2018). Por ser considerado um grão altamente energético e sua composição média em base seca é 72% de amido, 9,5% proteínas, 9% fibra e 4% de óleo, é incluído em grande escala na formulação de rações para animais de produção (PAES, 2006).

A incidência de fumonisinas no milho é comum, ocasionadas principalmente pelos fatores externos como temperatura, precipitação e estocagem. O trabalho realizado por MISTURA (2019) encontrou uma incidência de 83,74% de fumonisinas no milho nas safras de 2015 a 2018 em estados do centro-sul brasileiro. Outra micotoxina comum de ser encontrada no milho é a ocratoxina A, onde no trabalho de FRAGA et al. (2007) mostrou uma incidência de 100% desta micotoxina em ração de aves contendo milho.

### **2.2 MICOTOXINAS**

As micotoxinas são produzidas por fungos toxigênicos a partir de seu metabolismo secundário e acredita-se que pelo menos 30% de produtos provenientes do campo no mundo, possuam contaminação por micotoxinas (RABELO, 2015). A produção das micotoxinas em determinados locais, depende de vários fatores como a localização em regiões de clima principalmente tropical e subtropical, a sazonalidade, a forma do cultivo do grão, assim como

também a genética, estado nutricional e ambiental da colheita, acarretando em danos não só na colheita, mas também na pré-colheita e durante o beneficiamento, armazenamento e transporte do grão. (MALLMANN e DILKIN, 2007; RABELO, 2015).

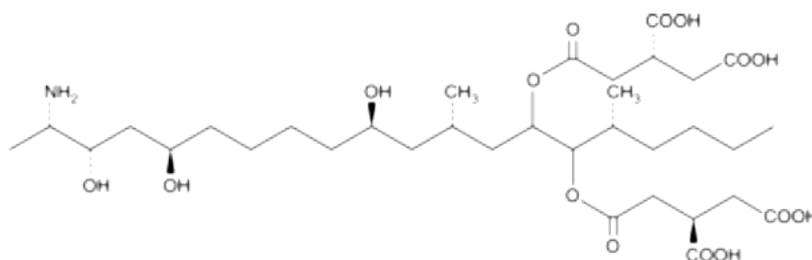
Os prejuízos econômicos e nutricionais nos grãos ocasionadas pelos efeitos das micotoxinas, ocorrem por causa da diminuição do poder germinativo, bolor visível, diminuição da coloração natural, odor repugnante, mudanças na estrutura química e perda de matéria seca. As principais espécies fúngicas que causam estes danos nos grãos, que são produtoras de micotoxinas pertencem aos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*. (RABELO, 2015).

Os efeitos que as micotoxinas causam, quando ingeridas por humanos ou animais, implicam em grandes prejuízos econômicos, sanitários e comerciais pelas suas propriedades anabolizantes, estrogênicas, carcinogênicas, mutagênicas e teratogênicas (MALLMANN e DILKIN, 2007).

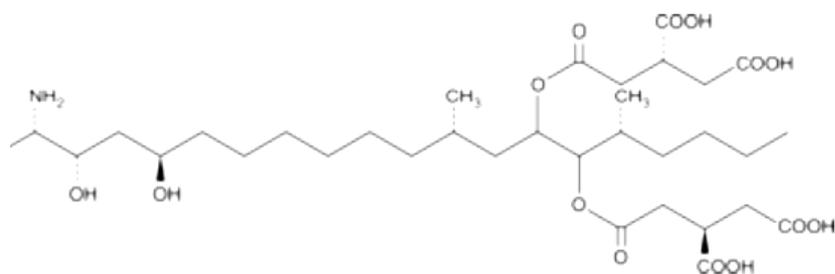
### 2.2.1 Fumonisinás

As fumonisinás são produzidas por fungos dos gêneros *Fusarium* e *Alternaria*, onde a espécie *F. moniliforme* é a mais predominante. Sua estrutura química é composta por moléculas polares, caracterizando sua solubilidade em água e em solventes polares e sua acidez, com o pH variando entre 3,16 e 3,42 (Figura 1). Existem 28 tipos de análogos de fumonisinás, porém as mais significativas e de maior ocorrência são as fumonisinás B<sub>1</sub> (FB<sub>1</sub>), B<sub>2</sub> (FB<sub>2</sub>) e B<sub>3</sub> (FB<sub>3</sub>), sendo a FB<sub>1</sub> mais tóxica e a mais comumente encontrada, seguida pela FB<sub>2</sub> e FB<sub>3</sub>. (PENA, 2006; OLIVEIRA et al., 2015; RABELO, 2015; NUNES, 2019; CHEN et al., 2021; LINO; SILVA).

**Figura 1** - Estrutura química das fumonisinás B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub>.



FB<sub>1</sub>: C<sub>34</sub>H<sub>59</sub>NO<sub>15</sub>



FB<sub>2</sub>: C<sub>34</sub>H<sub>59</sub>NO<sub>14</sub>

Fonte: PASCHOAL (2015).

As fumonisinas são encontradas em cereais de forma natural, principalmente nas regiões onde o clima tropical é predominante e a temperatura é amena, possibilitando o surgimento de alto teor de umidade no substrato (TYSKA et al., 2021). Durante e após os processos de amadurecimento de grãos de cereais que ficam expostos a essas condições, por problemas na colheita ou no armazenamento precoce, ocorre aumento na possibilidade de proliferação do fungo desencadeando o acréscimo da quantidade de micotoxinas toleráveis nestes grãos (MALLMANN e DILKIN, 2007). De acordo com MALLMANN et al. (2013), a região sul do Brasil traz o milho como o cereal que apresenta maior contaminação por fumonisinas.

Ao ingerir alimentos contaminados por fumonisinas que estiverem acima do limite permitido pela legislação brasileira, podem ocorrer algumas efemeridades tanto em humanos quanto nos animais (TYSKA et al., 2021). Segundo a Instrução Normativa – IN N° 88 (2021), o Limite Máximo Tolerado para fumonisinas (B<sub>1</sub>+B<sub>2</sub>) em grãos de milho pra posterior processamento é LMT 5000 µg/kg. Ao consumir altos teores desta micotoxina, podem ocorrer distúrbios no sistema nervoso, podendo provocar leucoencefalomalácia em equinos. Lesões em órgãos como rins e fígado em suínos costumam ser comuns, assim como a ocorrência de edema pulmonar nesta espécie. Também há estudos relacionando esta micotoxina com potencial carcinogênico em animais e seres humanos. (PASCHOAL, 2015; CHEN; RILEY; WU, 2018).

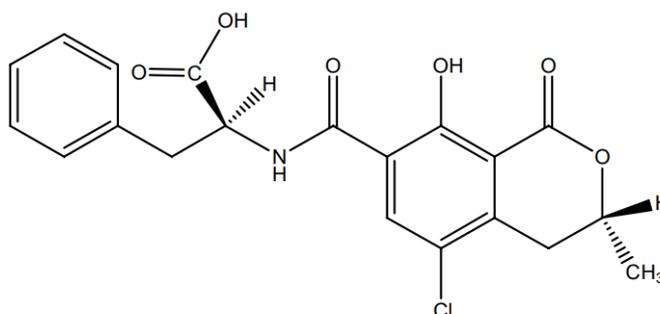
### 2.2.2 Ocratoxina A

As ocratoxinas são metabólitos de fungos dos Gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*, e são comumente encontradas no grão de milho ou seus derivados co-existindo com outras importantes micotoxinas como Aflatoxinas, Fumonisinas e Tricotecenos (MALLMANN et

al., 2021). São conhecidas sete ocratoxinas e a Ocratoxina A possui maior importância toxicológica (MALLMANN e DILKIN, 2007).

É conhecida por sua estabilidade e resistência a destruição, mesmo em alimentos processados que são submetidos a uma elevada temperatura, podendo manter-se estável diante do metabolismo dos animais e também ser encontrada em seus subprodutos. Diante de ambientes com pH ácido ou neutro, apresenta-se solúvel em solventes orgânicos devido a sua estrutura química de ácido orgânico fraco, com o pH variando entre 3,16 e 3,42 (Figura 2) (MALLMANN e DILKIN, 2007; KHOURY e ATOUI, 2010; NUNES, 2019; MALLMANN et al., 2020).

**Figura 2** - Estrutura química da ocratoxina A.



Fonte: KHOURY e ATOUI (2010).

O aumento da produção de Ocratoxina A pelos fungos, ocorre quando a temperatura está abaixo de 30°C e a atividade de água do grão está baixa, próxima de 0,8 aw. Países de clima temperado e com baixas temperaturas, estão mais suscetíveis a contaminação por este grupo de micotoxina (LOPEZ-GARCIA; MALLMANN; PINEIRO, 2008).

A Instrução Normativa – IN N° 88 (2021) determina que o LMT é de 20 µg/kg em cereais para posterior processamento, podendo causar algum prejuízo a saúde humana e animal acima deste valor. Estudos realizados com esta micotoxina, demonstraram que ela pode provocar lesões na forma de adenoma de células renais e carcinomas em camundongos (PARUSSOLO et al.; 2019). Em suínos e humanos, o surgimento de nefropatias podem estar relacionados com a ingestão de ocratoxina A (LUO et al., 2017).

## 2.3 MÉTODO DE EXTRAÇÃO DE MICOTOXINAS

A preparação da amostra é composta pelas etapas de amostragem, moagem, pesagem, extração, diluição e a análise cromatográfica. A etapa de extração da amostra é o processo que envolve o maior tempo da análise e é fundamental que seja executado de forma correta, pois os resultados não podem ser processados quando uma destas etapas não for realizada, podendo comprometer os resultados cromatográficos. A metodologia utilizada nos métodos de extração para obter micotoxinas, se baseia em combinações de solventes orgânicos, como o metanol e a acetonitrila, ou destes com água ultrapura. A solução de extração ainda pode ser incrementada com ácidos para se obter uma melhor extração de micotoxinas com estrutura polar (SAEGER, 2011; RIGHI, 2013).

O principal objetivo da etapa de extração é eliminar interferentes que possam prejudicar o contato interno entre o solvente e a micotoxina na amostra, a fim de obter uma leitura mais eficiente e limpa na leitura pelo equipamento. A determinação de micotoxinas em amostras de alimentos destinados ao consumo humano e animal ainda tem mostrado alguns desafios, devido a diversidade de matrizes existentes (RIGHI, 2013; HIDALGO-RUIZ, 2019).

Para chegar à concentração desejada de uma solução e obter a sua densidade reduzida, precisa-se fazer o uso da etapa de diluição da amostra em uma solução até obter a concentração desejada (RIGHI, 2013).

## 2.4 CURVA DE CALIBRAÇÃO ANALÍTICA

A curva de calibração é um procedimento utilizado pela química analítica para determinar, na forma de um gráfico, a concentração de uma solução a ser analisada. A curva é construída através de padrões e deve ser composta de no mínimo cinco pontos. Uma vez que a curva foi desenhada, uma análise de determinada micotoxina poderá ser realizada colocando-a em comparação com a curva baseando-se na sua absorvância ou outro parâmetro (SANTOS, 2018).

## 3 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Análises Micotoxicológicas (LAMIC), pertencente ao Centro de Ciências Rurais da Universidade Federal de Santa Maria,

localizado no município de Santa Maria na região central do estado do Rio Grande do Sul, Brasil.

### 3.1. AMOSTRAGEM

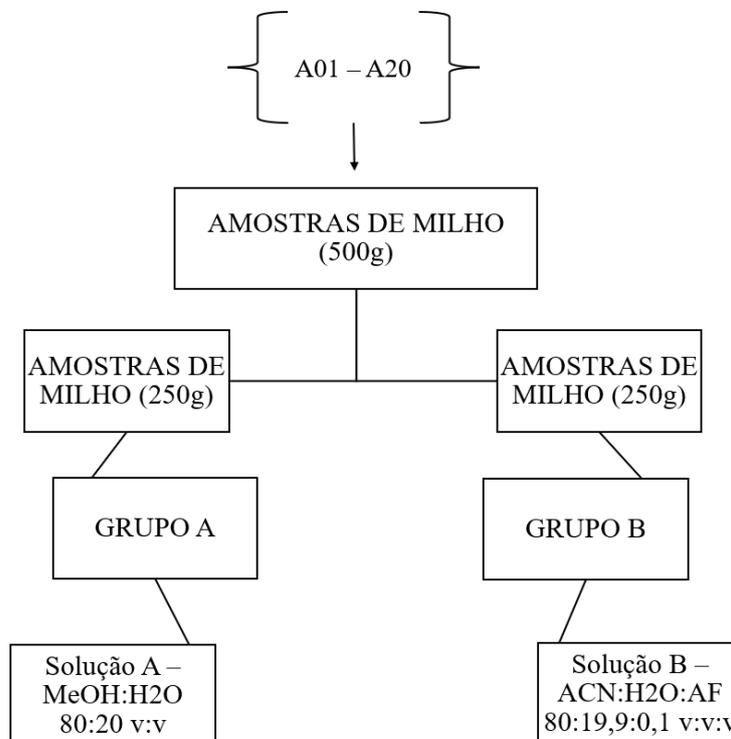
Foram selecionadas 20 amostras de grão de milho, que foram moídas a 1mm e analisadas anteriormente no Laboratório de Análises Micotoxicológicas da UFSM (LAMIC) no período de maio a agosto de 2021, e cujos laudos emitidos para ocratoxina A e fumonisinas apresentaram-se sem contaminação. Após a constatação de que não apresentavam contaminação para estas micotoxinas, foi feito um pool destas amostras e selecionado 500g para a realização das análises.

Estas 500g de amostra foram homogeneizadas e divididas em dois grupos de 250g cada, para a realização de testes preliminares com as soluções de extração. O grupo A foi utilizado para realizar o teste com a solução de extração A (solução A) em cinco tubos Falcon contendo as amostras e o grupo B foi utilizado para realizar o teste com a solução de extração B (solução B) em seis *falcon* contendo as amostras (Figura 3).

Durante todas as etapas deste processo de extração e análise das micotoxinas, amostras “branco” foram extraídas para certificar que não ocorressem contaminações naturais de ocratoxina A e fumonisinas.

Para o teste de validação, realizado durante três dias consecutivos, em cada dia foi feito o uso de oito tubos *falcon* contendo as amostras, sendo que o oitavo tubo foi composto pela amostra sem a fortificação.

**Figura 3** - Esquema do processo de separação e preparação das amostras de 1 a 20 (A01-A20) utilizadas para os testes preliminares.

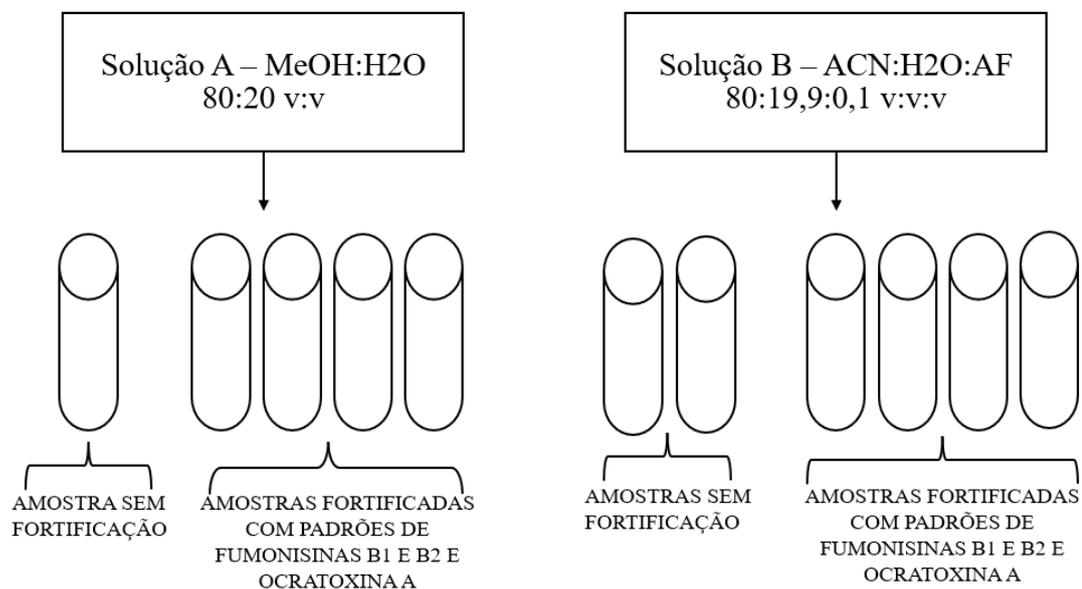


Fonte: O Autor, 2022.

### 3.2. PREPARO DAS AMOSTRAS E FORTIFICAÇÃO

Após homogeneização de cada grupo, foi separado para os testes preliminares cinco tubos tipo *falcon* de 50ml para serem usados no grupo A e seis tubos *falcon* de 50ml para o grupo B, sendo pesado 3g de amostra em cada *falcon*. Para cada grupo, uma das amostras foi separada e não foi aplicado a fortificação. Estas amostras sem fortificação ou amostras “branco”, tem como função manterem-se livres de contaminação, como um controle para certificar-se de que não houve contaminação natural ou crescimento de micotoxinas nas amostras. As demais amostras, foram fortificadas com 30  $\mu$ L de padrão de Fumonisina B<sub>1</sub> na concentração de 50.0 $\mu$ g/mL (Romer Labs Diagnostic GmbH), 29.35 $\mu$ L de padrão de Fumonisina B<sub>2</sub> na concentração de 51.1  $\mu$ g/mL (Romer Labs Diagnostic GmbH) e 15 $\mu$ L de padrão de Ocratoxina A 10.01  $\pm$  0.25  $\mu$ g/mL (Romer Labs Diagnostic GmbH) (Figura 4).

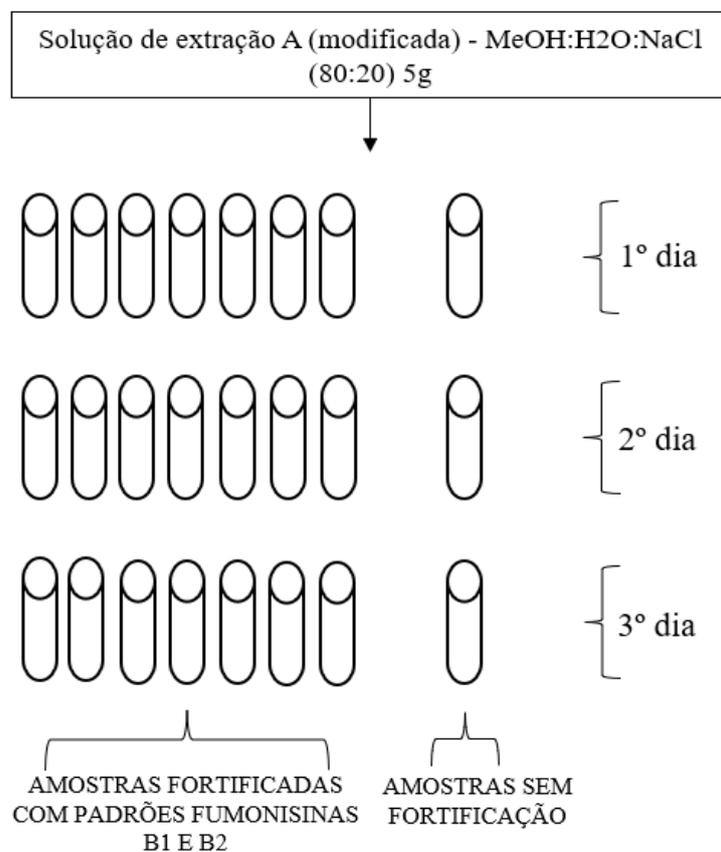
**Figura 4** - Esquema da separação dos grupos A e B dos testes preliminares com as soluções de extração.



Fonte: O Autor, 2022.

Para o teste de validação, foi realizado durante três dias consecutivos a pesagem de 3g de amostras providas do grupo A, em oito tubos *falcon* de 50ml. A oitava amostra sempre foi composta pela amostra branco, enquanto as outras receberam a fortificação com as mesmas concentrações e padrões anteriores para fumonisinas (Figura 5).

**Figura 5** - Preparação das amostras utilizadas para validação durante três dias consecutivos, utilizando a solução de extração A (modificada).



Fonte: O Autor, 2022.

### 3.3 EXTRAÇÃO

#### 3.3.1 Testes preliminares com diferentes soluções de extração

Foram feitas duas soluções de extração para a realização dos testes preliminares, a fim de avaliar a melhor solução extratora para interagir com as micotoxinas e comparar os resultados com o método validado utilizado pelo laboratório.

A solução A foi baseada no trabalho de SUGITA-KONISHI et al. (2006) composta por metanol e água ultrapura na proporção 80:20 (v:v), e utilizada para extrair as amostras do grupo A. Já a solução B foi baseada no trabalho de AL-TAHER et al. (2017) composta por acetonitrila, água ultrapura e ácido fórmico na proporção 80:19.9:0.1 (v:v:v), e utilizada para extrair as amostras do grupo B.

Para a extração das amostras do grupo A foi utilizado 15ml da solução A, onde as amostras foram agitadas por 20 minutos no agitador orbital para tubos (MA563, Marconi) e em seguida centrifugadas (5804R, Eppendorf) em rotação de 2500 rpm por 5 minutos.

As amostras do grupo B foram extraídas com 20 ml da solução B. As amostras foram separadas em dois grupos, onde o primeiro grupo contendo 3 tubos *falcon* foi levado para o agitador orbital (MA563, Marconi) por 20 minutos e o segundo grupo com o restante das amostras foi agitado por 60 minutos no agitador orbital (MA563, Marconi). Após a agitação, as amostras foram levadas para a centrífuga (5804R, Eppendorf) em rotação de 2500 rpm por 5 minutos.

Foi realizado uma verificação do pH das soluções extratoras com uma fita medidora de pH, onde a solução A apresentou um pH de 7 e a solução B apresentou pH 3. Após a extração, foi verificado o pH de cada amostra com a fita medidora de pH onde foi obtido uma média de pH 5,4 nas amostras do grupo A e uma média de pH 4 nas amostras do grupo B.

### **3.3.2 Extração das amostras para validação**

A solução A deste trabalho foi baseada na pesquisa de SUGITA-KONISHI et al. (2006) e com base nos resultados obtidos da extração preliminar, foi escolhida para realizar os testes de validação do método de extração. A solução de extração A foi modificada, acrescentando-se a ela 5g de cloreto de sódio (MeOH:H<sub>2</sub>O:NaCl, 80:20:5).

As etapas deste processo foram as mesmas durante os três dias consecutivos, onde as 3g de cada amostra foram extraídas com 15 ml da solução de extração A modificada. Para homogeneização, foi utilizado o agitador orbital (MA563, Marconi) por 20 minutos e após esse período, as amostras foram encaminhadas para a centrífuga (5804R, Eppendorf) em rotação de 2500 rpm por 5 minutos.

O Ph da solução de extração A modificada foi aferido com a fita medidora de pH e apresentou o pH 7. Também foi verificado o pH das amostras após passarem pela centrífuga e a média encontrada foi pH 5.

## **3.4 DILUIÇÃO E ANÁLISE CROMATOGRÁFICA**

Após os extratos serem centrifugados, as amostras foram encaminhadas para a cromatografia para realizar a diluição. A solução de diluição utilizada foi feita com acetonitrila, água ultra pura e ácido fórmico (50:49:1, v:v:v). Após este processo, as amostras

foram encaminhadas e submetidas à separação por cromatografia líquida, seguido de detecção por espectrometria de massas no equipamento de cromatografia HPLC 1290 Infinity (Agilent Technologies) acoplado a um espectrômetro de massas (QTRAP 5000, Sciex), coluna Eclipse XDB-C<sub>8</sub> (5µm; 4,6 x 150 mm), temperatura da coluna 40°. As fases móveis do equipamento foram compostas por uma fase líquida de água ultrapura e ácido fórmico (1000:5, v:v) e uma fase orgânica com acetonitrila e ácido fórmico (1000:5, v:v), vazão de 0,8 mL min<sup>-1</sup>, volume injetado 5µL e o tempo de cromatografia de 10 min.

#### **3.4.1 Diluição das amostras preliminares**

As amostras do grupo A foram diluídas com 980 µL da solução de diluição e 20 µL coletados do sobrenadante da amostra. As amostras do grupo B foram diluídas com 800 µL da solução de diluição e 200 µL coletados do sobrenadante da amostra. Após o procedimento de diluição, as amostras foram homogeneizadas e encaminhadas para leitura cromatográfica.

#### **3.4.2 Diluição das amostras para validação**

As amostras submetidas a extração por três dias consecutivos, passaram também pela etapa de diluição, onde durante este período de dias foi utilizado 980 µL da solução de diluição e 20 µL coletados do sobrenadante da amostra. Após homogeneização, as amostras foram encaminhadas para a análise cromatográfica.

#### **3.4.3 Curvas de calibração**

Para avaliar a linearidade dos métodos analíticos para determinação de fumonisina e ocratoxina A, foram utilizadas as curvas de calibração analítica e um extrato branco da matriz, em sequências analíticas distintas como mostram as Tabelas 1 e 2. O diluente utilizado nas curvas de fumonisinas e ocratoxina A foi preparado com acetonitrila, água ultra pura e ácido fórmico (50:49:1, v:v:v).

**Tabela 1** - Curva analítica de fumonisinas.

CONCENTRAÇÃO	VOLUME DE PADRÃO (pd)	VOLUME DE DILUENTE
0,2 ppb	2 µl (pd 100 ppb)	998 µl
0,5 ppb	5 µl (pd 100 ppb)	995 µl
2 ppb	20 µl (pd 100 ppb)	980 µl
4 ppb	40 µl (pd 100 ppb)	960 µl
20 ppb	20 µl (pd 1000 ppb)	980 µl
40 ppb	40 µl (pd 1000 ppb)	960 µl

Fonte: LAMIC, 2006.

**Tabela 2** - Curva analítica de ocratoxina A.

CONCENTRAÇÃO	VOLUME DE PADRÃO (pd)	VOLUME DE DILUENTE
0,5 ppb	5 µl (pd 100 ppb)	995 µl
1 ppb	10 µl (pd 100 ppb)	990 µl
2 ppb	20 µl (pd 100 ppb)	980 µl
10 ppb	100 µl (pd 100 ppb)	900 µl
20 ppb	200 µl (pd 100 ppb)	800 µl
0,05 ppb	5 µl (pd 10 ppb)	995 µl

Fonte: LAMIC, 2006.

Segundo a instrução do MAPA (2011), orienta-se que sejam realizadas curvas analíticas com no mínimo cinco níveis de concentração diferentes, geralmente da menor para a maior concentração para evitar efeito residual.

### 3.5 MÉTODO OFICIAL DE EXTRAÇÃO DE FUMONISINAS

O método de extração de fumonisinas utilizado pelo LAMIC foi validado de acordo com a *Commission Regulation* (EC) n°401/2006. A validação deste método constou com a repetição das etapas de todo o processo e com a utilização dos mesmo materiais e volumes com o objetivo de encontrar os resultados esperados durante todos os dias da repetição.

Alguns parâmetros são exigidos pelas normas para que o método seja aceito, como o coeficiente de recuperação para FB<sub>1</sub> e FB<sub>2</sub> que precisa encontrar-se na faixa de 60-120% para ser considerado um método de excelência e de confiança.

A metodologia é descrita através de alguns parâmetros, como a pesagem de 3g de amostra em tubos *falcon* de 50 ml. A solução de extração é composta da combinação de

ACN:H<sub>2</sub>O (1:1, v:v) e durante a extração é adicionado as amostras, 15ml desta solução extratora onde são homogeneizadas em agitador orbital (MA563, Marconi) por 20 minutos e após esse período, as amostras são encaminhadas para a centrífuga (5804R, Eppendorf) em rotação de 2500 rpm por 5 minutos.

Na sala de diluição, os extratos são diluídos utilizando vials e adicionando-se 980µL de diluente ACN:H<sub>2</sub>O (50:50, v:v) 1% ácido fórmico e 20 µL de amostra. A fase líquida utilizada no equipamento de análise é constituída de H<sub>2</sub>O:AF (1000:5, v:v) e a fase orgânica de ACN:AF (1000:5, v:v), vazão de 0,8 mL min<sup>-1</sup> e o volume injetado 5µL.

A análise foi realizada através da separação por cromatografia líquida, seguido de detecção por espectrometria de massas no equipamento de cromatografia HPLC 1290 Infinity (Agilent Technologies) acoplado a um espectrômetro de massas (QTRAP 5000, Sciex), coluna Eclipse XDB-C<sub>8</sub> (5µm; 4,6 x 150 mm), temperatura da coluna 40° e o tempo de cromatografia de 10 min.

A metodologia para determinação de fumonisinas B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> foi feita com base na fortificação em três níveis diferentes, sendo sete fortificações na concentração de 125 µg kg<sup>-1</sup>, sete fortificações na concentração de 2000,0 µg kg<sup>-1</sup> e sete fortificações na concentração de 10000,0 µg kg<sup>-1</sup>, sendo a faixa de trabalho representada por 125 a 10000 µg kg<sup>-1</sup> e linearidade > 0,99.

A curva analítica realizada com base na matriz milho, teve cinco pontos com concentrações que variaram de 125 a 10000 ppb para FB<sub>1</sub> e para FB<sub>2</sub> e os excelentes resultados obtidos de cada concentração são representados na Tabela 3. A média de FB<sub>1</sub> e FB nos pontos de 125 ppb, 500 ppb, 1000 ppb, 5000 ppb e 10000 ppb foram de 124, 498, 993, 4983 e 9991 ppb e 123, 488, 986, 4973 e 9963 ppb, respectivamente.

**Tabela 3** - Curva de FB<sub>1</sub> e FB<sub>2</sub> com a matriz milho, utilizada para validar a metodologia do laboratório.

Curva de FB1 e FB2 com a matriz milho										
Conc.*	1 <sup>a</sup> rep**		2 <sup>a</sup> rep		3 <sup>a</sup> rep		4 <sup>a</sup> rep		5 <sup>a</sup> rep	
	FB1	FB2	FB1	FB2	FB1	FB2	FB1	FB2	FB1	FB2
125	124,0	123,2	124,9	123,8	124,0	123,5	123,9	123,1	124,5	123,4
500	498,6	488,2	497,7	487,7	499,4	489,4	498,5	488,5	497,6	487,6
1000	998,1	988,1	997,4	987,4	988,4	988,4	990,0	989,2	991,6	981,6
5000	4981,3	4978,3	4980,0	4972,0	4987,2	4971,2	4983,1	4973,1	4985,3	4970,3
10000	9991,6	9961,6	9990,0	9960,0	9988,2	9968,2	9992,2	9962,2	9993,6	9967,6

\* Concentração de cada ponto da curva dada em ppb.

\*\* Rep = repetição.

Obs.: Resultados obtidos em ppb.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 RECUPERAÇÃO DOS TESTES COM AS SOLUÇÕES EXTRATORAS PRELIMINARES

Para verificar a interação do solvente orgânico na extração de fumonisinas e ocratoxina A, para as amostras preliminares foram utilizados a solução de extração A contendo MeOH e água ultrapura (80:20, v:v), e a solução de extração B contendo ACN, água ultrapura e ácido fórmico (80:19,9:0,1, v:v:v). Não houve recuperação de ocratoxina A com a solução de extração A e também com a solução B, extraídas tanto no tempo de 20 como de 60 minutos, como mostra a Tabela 4.

**Tabela 4** - Resultados preliminares da recuperação de ocratoxina A extraída com a solução A e com a solução B.

	<b>Solução A</b>		<b>Solução B</b>	
	<b>Recuperação (ppb)</b>		<b>Recuperação (ppb)</b>	
Amostra 1	ND	Amostra 1 – 20*	ND	
Amostra 2	ND	Amostra 2 – 20*	ND	
Amostra 3	ND	Amostra 3 – 20*	ND	
Amostra 4	ND	Amostra 1 – 60**	ND	
Amostra 5	ND	Amostra 2 – 60**	ND	
-	-	Amostra 3 – 60**	ND	

\* Amostras extraídas no período de 20 minutos.

\*\* Amostras extraídas no período de 60 minutos.

Os resultados obtidos para fumonisinas, tiveram como base o spike de 500 ppb para FB<sub>1</sub> e FB<sub>2</sub>. A recuperação de fumonisinas foi mais significativa com a solução de extração A, apesar de não ter ocorrido uma porcentagem alta de recuperação, como mostrado na Tabela 5.

**Tabela 5** - Resultados preliminares da quantificação e recuperação de fumonisinas B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub>, extraídas com a solução A.

	<b>Solução A</b>			
	*FB1	%	*FB2	%
Amostra 1	ND	-	ND	-
Amostra 2	352,0	70,0	284,0	60,0
Amostra 3	348,0	70,0	331,0	60,0
Amostra 4	418,0	80,0	375,0	70,0
Amostra 5	377,0	70,0	380,0	80,0
Média	373,7	70,2	342,5	60,7

\*Resultados da quantificação em ppb.

A recuperação de fumonisinas foi acima de 60%, mas ainda é considerada baixa, sendo a média de recuperação de FB<sub>1</sub> foi 70,25% e FB<sub>2</sub> 60,75%. No cálculo para obter a média de recuperação de fumonisinas, não foi considerado a amostra 1 por ser a amostra

branco e sua recuperação ser apresentada com Não Detectável, como mostra a Tabela 5. Os resultados obtidos da extração com a solução B para fumonisinas foram não conclusivos, sendo assim, não foram considerados os seus valores de recuperação.

#### 4.2 RECUPERAÇÃO DAS AMOSTRAS DE VALIDAÇÃO

A partir dos resultados obtidos com os testes preliminares para avaliar a melhor interação entre a micotoxina e a solução de extração, foi selecionado a solução de extração A para os testes de validação. Para a tentativa de melhoramento de recuperação, a solução A sofreu uma modificação acrescentando-se 5g de Cloreto de Sódio.

Com base nos resultados preliminares obtidos com a extração da solução A, foi possível verificar que não ocorreu interação da solução com a ocratoxina A e a validação foi feita somente com as fumonisinas pelo seu melhor resultado de extração.

Os resultados do teste de validação com a solução de extração A (modificada) são apresentados em ppb a partir do spike de 250 ppb para os padrões de fumonisinas, são apresentados na Tabela 6.

**Tabela 6** - Resultados do teste de validação realizado com a solução de extração A (modificada).

	Solução de extração A (modificada) – ppb*					
	1º dia		2º dia		3º dia	
	FB1	FB2	FB1	FB2	FB1	FB2
Amostra 1	98,9	110,0	136,0	164,0	61,3	116,0
Amostra 2	110,0	151,0	121,0	111,0	58,7	136,0
Amostra 3	105,0	174,0	125,0	97,3	56,3	166,0
Amostra 4	99,2	155,0	119,0	96,0	56,0	124,0
Amostra 5	100,0	162,0	119,0	140,0	46,6	121,0
Amostra 6	109,0	136,0	142,0	123,0	52,0	147,0
Amostra 7	105,0	137,0	95,0	71,6	59,7	134,0
Amostra 8	<0	<0	<0	<0	<0	<0
Média	103,0	146,4	122,4	114,7	55,8	134,8

\* Resultados apresentados em ppb.

Tendo como base a fortificação de 250 ppb nas amostras 1 a 7, os resultados encontrados foram inferiores ao esperado e encontram-se muito abaixo em comparação a metodologia oficial do laboratório que está de acordo com o exigido pela *Commission Regulation* (EC) nº401/2006. A oitava amostra representa a amostra branco. A recuperação de fumonisinas dos três dias de testes, é dada em porcentagem e apresentada na Tabela 7.

**Tabela 7** - Resultados da porcentagem de recuperação do teste de validação realizado com a solução de extração A (modificada).

<b>Recuperação com a solução de extração A (modificada) - %*</b>						
	<b>1º dia</b>		<b>2º dia</b>		<b>3º dia</b>	
	FB1	FB2	FB1	FB2	FB1	FB2
Amostra 1	37,1	44,0	54,4	65,6	24,5	46,4
Amostra 2	44,0	60,4	48,4	44,4	23,4	54,4
Amostra 3	42,0	69,6	50,0	38,9	22,5	66,4
Amostra 4	39,6	62,0	47,6	38,4	22,4	49,6
Amostra 5	40,0	64,8	47,6	56,0	18,6	48,4
Amostra 6	43,6	54,4	56,8	49,2	20,8	58,8
Amostra 7	42,0	54,8	38,0	28,6	23,8	53,6
Amostra 8	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Média	41,2	58,5	48,9	45,8	22,2	53,9

\* Resultado da recuperação de fumonisinas em %.

Os resultados obtidos da recuperação de fumonisinas foram abaixo do esperado, tendo uma média de recuperação no 1º, 2º e 3º dia de 41,2%, 48,9% e 22,3% e 58,6%, 45,9% e 53,9% para FB<sub>1</sub> e FB<sub>2</sub>, respectivamente. A *Commission Regulation* (EC) nº401/2006 caracteriza como critério de aceitação, a recuperação de fumonisinas que estejam dentro da faixa de 60-120% de recuperação.

#### 4.3 AVALIAÇÃO DOS RESULTADOS

Para uma matriz complexa como o milho, antes de passar pela análise de quantificação de micotoxinas em HPLC-MS/MS, as amostras precisam ser extraídas a fim de liberar a micotoxina alvo da matriz e ocorrer uma leitura mais precisa no equipamento. Este processo

de extração consiste na adição de solventes orgânicos puros ou misturados com água e ácidos. Quando ocorre a adição de água junto de solventes orgânicos para a extração, esta aumenta o poder da extração do analito fazendo a função de facilitar a penetração do solvente na amostra, principalmente de cereais (SAEGER, 2011; RIGHI, 2013).

Algumas micotoxinas são similares dentre as suas características físico-químicas, possibilitando que sejam extraídas juntas com a mesma solução de extração. Para que isso seja possível, elas devem ter polaridades semelhantes, grau de absorção de água pela matriz e equilíbrio na quantidade de solvente. A ocratoxina A por exemplo, é solúvel em solventes orgânicos polares e ligeiramente solúvel em água. Já as Fumonisinias possuem como característica baixa lipossolubilidade (NUNES, 2019).

O metanol é um solvente polar com grande solubilidade em água e a acetonitrila possui a capacidade de dissolver uma grande variedade de substâncias de origem iônica e natureza polar, sendo também, compatível com a água e com outros solventes orgânicos (NUNES, 2019).

Nos testes preliminares realizados para testar a solução de extração A e B para ocratoxina A e fumonisinias, não foi obtido boa interação entre as soluções e a ocratoxina A demonstrando nos resultados a Não Detecção (ND) deste analito. Já os resultados obtidos para fumonisinias com a solução de extração A foram mais significativos, resultando em uma recuperação entre 60-80%. As fumonisinias testadas com a solução de extração B obtiveram resultados inclusivos para serem considerados no trabalho.

A partir dos resultados dos testes preliminares, a solução A foi escolhida para a realização do teste de validação e comparação com a metodologia oficial já utilizada e validada pelo laboratório. Os resultados ND encontrados para ocratoxina A na solução de extração A, foram determinantes para que se optasse por realizar os testes de validação somente com as fumonisinias B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub>.

A solução de extração A foi baseada no trabalho de SUGITA-KONISHI et al. (2006), sobre recuperação de ocratoxina A e fumonisinias onde foi utilizado para a solução de extração a proporção de MeOH:H<sub>2</sub>O (80:20, v:v) e 5g de Cloreto de Sódio e recuperado mais de 80% de ocratoxina A e fumonisinias B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> e B<sub>3</sub>. Para tentar maximizar a porcentagem de recuperação de fumonisinias, foi optado por modificar a solução de extração A acrescentando a ela 5g de Cloreto de Sódio.

Os resultados obtidos para fumonisinias a partir do teste de validação, nos três dias consecutivos em que foi realizado, apresentaram-se com menor porcentagem de recuperação comparado com o teste preliminar, onde na solução de extração A não continha o Cloreto de

Sódio. A taxa de recuperação do analito foi baseada no spike de 250 ppb dos padrões de fumonisinas B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> e a recuperação obtida dos três dias de análise variou entre 18-69%, sendo considerado abaixo do que exige a *Commission Regulation* (EC) n°401/2006 (Coeficiente de Recuperação - CR de 60-120%).

Para analisar ainda a qualidade da recuperação que o método criado obteve, foi feita uma comparação com a metodologia oficial para fumonisinas B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> utilizada pelo LAMIC, que segue todas as exigências impostas pelos órgãos regulamentadores, como a *Commission Regulation* (EC) n°401/2006. A média dos resultados de recuperação da curva analítica utilizando cinco diferentes pontos com concentrações para FB<sub>1</sub> e para FB<sub>2</sub> de 125 ppb, 500 ppb, 1000 ppb, 5000 ppb e 10000 ppb foram de 124, 498, 993, 4983 e 9991 ppb e 123, 488, 986, 4973 e 9963 ppb, respectivamente.

A curva analítica para FB<sub>1</sub> e FB<sub>2</sub> considerou cinco pontos e cada ponto com uma concentração de padrão diferente a fim de serem a base para a comparação dos resultados obtidos de cinco repetições. A média de recuperação encontrada nestes resultados varia 97-99% constando dentro do limite exigido pela EC.

Os resultados obtidos do trabalho realizado utilizando a solução de extração A modificada a fim de se obter o valor de recuperação de fumoninsinas, resultou em uma recuperação abaixo do esperado em comparação com a metodologia oficial onde a recuperação encontra-se próxima de 100%.

Tendo como base que a extração de fumonisinas utilizada na metodologia oficial do laboratório utiliza como solvente a acetonitrila, alguns autores como AL-TAHER et al. (2016) consideram este solvente como polar resultando em uma boa interação com fumonisinas e também com ocratoxina A, consideradas também compostos polares. Alguns autores ainda, consideram que a adição de ácidos ou sais na solução extratora com acetonitrila, aumentam a capacidade de as moléculas interagirem com a micotoxina e resultarem uma boa qualidade do processo de extração (ANDRADE; LANÇAS, 2015; NUNES, 2019).

Tendo como base os resultados de recuperação de fumonisinas de SUGITA-KONISHI et al. (2006) e os resultados obtidos do teste preliminar com a solução de extração A, foi optado pela utilização do metanol como solvente orgânico extrator. Além do solvente, a solução foi composta por água e Cloreto de Sódio.

O metanol é considerado por alguns autores como solvente polar, sendo compatível a sua interação com micotoxinas polares, como é o caso das fumonisinas e ocratoxina A. No estudo realizado por HACKBART (2009) com ocratoxina A, foi empregado o uso de metanol e cloreto de potássio na extração e foi obtido uma recuperação de 60% do analito. Em outro

estudo feito por FERREIRA et al. (2013) com fumonisinas, foi utilizado para extração a solução preparada com metanol e água (80:20, v:v) e adição de 2g de cloreto de sódio, detectando-se uma incidência de 92,68% de fumonisinas nas amostras nos resultados cromatográficos. Os trabalhos sugerem que com acidificação da solução extratora, a interação deste com os analitos em questão seja alta, fazendo com que a porcentagem de recuperação seja satisfatória.

A ausência de recuperação de ocratoxina A dos testes preliminares e os diferentes resultados obtidos para fumonisinas com as soluções extratoras preparadas, indicam que algum interferente impossibilitou a interação das moléculas de solvente com o analito. Segundo o estudo feito por NUNES (2019), uma boa recuperação de micotoxinas ácidas como fumonisinas e OTA A e a eficiência da extração, estão ligadas a solubilidade e neutralização na solução extratora. Quanto mais alto for o pH da solução extratora, menor vai ser a recuperação destas micotoxinas, pois elas podem permanecer associadas a matriz e não se encontrarem solubilizadas com a solução extratora.

Algumas características físico-químicas da matriz e das micotoxinas e também, características referentes aos solventes, ácidos e sais das soluções extratoras deste trabalho, podem ter interferido na extração correta e posterior recuperação do analito. Por isso, ao criar novos métodos de extração é preciso estudar cada componente envolvido na metodologia e encontrar o equilíbrio entre cada elemento do estudo.

## **5 CONCLUSÃO**

As fumonisinas e a ocratoxina A são importantes micotoxinas presentes no milho destinado a alimentação humana e a de animais. As análises micotoxicológicas são necessárias para que não ocorram prejuízos a nossa saúde e a de animais com a ingestão de quantidades excessivas destes produtos fúngicos.

Com os resultados obtidos dos testes preliminares e também do teste de validação, foi possível concluir que com as soluções de extração criadas para este trabalho, não foi possível obter a interação entre solução de extração e micotoxina desejada. Ainda, a comparação do método de validação com a metodologia oficial utilizada pelo laboratório, reforça o baixo potencial da solução extratora.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AL-TAHER, F.; CAPPOZZO, J.; ZWEIGENBAUM, J.; LEE, H.J.; JACKSON, L.; RYU, D. Detection and quantitation of mycotoxins in infant cereals in the U.S. market by LC-MS/MS using a stable isotope dilution assay. **Food Control**, v. 72, p. 27-35, 2017.
- ANDRADE, M.A.; LANÇAS, F.M. Estado-da-arte na análise cromatográfica de Ocratoxina A em amostras de alimentos. **Scientia Chromatographica**, v. 7, p. 31-52, 2015.
- CHEN, C.; RILEY, R.T.; WU, F. Dietary Fumonisin and Growth Impairment in Children and Animals: A Review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 17, p. 1448-1464, 2018.
- CHEN, J.; WEI, Z.; WANG, Y.; LONG, M.; WU, W.; KUCA, K. Fumonisin B1: Mechanisms of toxicity and biological detoxification progress in animals. **Food and Chemical Toxicology**, v. 149, 2021.
- CONAB, Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da Safra Brasileira de Grãos**, v. 8, n. 3, terceiro levantamento – Safra 2020/21, Brasília, p. 1-86, 2020.
- FERREIRA, P.; QUEIROZ, V.A.V.; CONCEIÇÃO, R.R.P.; MIGUEL, R.A. Incidência de aflatoxinas e fumonisinas em produtos de milho consumidos no estado de Minas Gerais. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v.12, n.1, p. 54-60, 2013.
- FRAGA, M.E.; CURVELLO, F.; GATTI, M.J.; CAVAGLIERI, L.R.; DALCERO, A.M.; ROSA, C.A.R. Potential Aflatoxin and Ochratoxin A Production by *Aspergillus* Species in Poultry Feed Processing. **Veterinary Research Communications**, v. 31, p. 343–353, 2007.
- HACKBART, H.C.S. **Ocratoxina A e citrinina em arroz: um estudo de metodologia para determinação simultânea de ocorrência**, 95p. Dissertação de mestrado na área de Química Tecnológica e Ambiental, da Universidade Federal do Rio Grande (FURG), Rio Grande, Rio Grande do Sul, 2009.
- HIDALGO-RUÍZ, J.L.; ROMERO-GONZÁLES, R.; VIDAL, J.L.M.; FRENICH, A.G. A rapid method for the determination of mycotoxins in edible vegetable oils by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 288, p. 22 – 28, 2019.
- KHOURY, A.E.; ATOUI, A. Ochratoxin A: General Overview and Actual Molecular Status. **Toxins**, v. 2, p. 461-493, 2010.
- KOMATSU, G.S.N. **Características químicas e físicas de diferentes tipos de milho segregados em mesa densimétrica e sua influência sobre o valor nutricional para frangos de corte**, 67p. Tese de doutorado na área de ciência animal e pastagens, da Universidade de São Paulo (USP), Piracicaba, São Paulo. 2018.
- LINO, C.M.; SILVA, L.J.G.; PENA, A.S. Metodologias analíticas para determinação das fumonisinas em milho e alimentos à base de milho. **Química nova**, v. 29, 2006.

LOPEZ-GARCIA, R.; MALLMANN, C.A.; PINEIRO, M. Design and implementation of an integrated management system for ochratoxin A in the coffee production chain. **Food Additives and Contaminants**, v. 25, p. 231 - 240, 2008).

LUO, X.; QI, L.; LIU, Y.; WANG, R.; YANG, D.; LI, K.; WANG, L.; LI, Y.; ZHANG, Y.; CHEN, Z. Effects of Electron Beam Irradiation on Zearalenone and Ochratoxin A in Naturally Contaminated Corn and Corn Quality Parameters. **Toxins**, v. 9, 2017.

MALLMANN, C.A.; DILKIN, P. **Micotoxinas e micotoxicoses em suínos**. 1ª ed. Editora: Sociedade Vicente Pallotti, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil, 2007.

MALLMANN, C.A.; SIMÕES, C.T.; VIDAL, J.K.; SILVA, C.R. da; SCHLOSSER, L.M. de L.; ALMEIDA, C.A.A. de. Occurrence and concentration of mycotoxins in maize dried distillers' grains produced in Brazil. **World Mycotoxin Journal**, v. 14, p. 259-268, 2021.

MALLMANN, C.A.; TYSKA, D.; ALMEIDA, C.A.A.; OLIVEIRA, M.S.; GRESSLER, L.T. Mycotoxicological monitoring of breakfast and infant cereals marketed in Brazil. **International Journal of Food Microbiology**, v. 331, 2020.

MAPA. **Manual de garantia da qualidade analítica – resíduos e contaminantes em alimentos**. 1 ed., Brasília: Ministérios da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2011.

MARSCHIK, S.; HEPPELLE, J.; LAUBER, U.; SCHNAUFER, R.; MAIER, S.; KUHN, C.; SCHWAB-BOHNERT, G. Extracting fumonisins from maize: efficiency of different extraction solvents in multi-mycotoxin analytics. **Mycotoxin Research**, v. 29, p.119–129, 2013.

MISTURA, M. **Avaliação da incidência de aflatoxina, fumonisina e zearalenona em milho produzido entre 2016 e 2018 nos estados de Paraná, Mato Grosso e Mato Grosso do Sul**, 70 p. Dissertação de mestrado área de química, Universidade do Oeste do Paraná (UNIOESTE), Toledo, Paraná. 2019.

NEUMANN, M.; LEÃO, G.F.M.; COELHO, M.G.; FIGUEIRA, D.N.; SPADA, C.A.; PERUSSOLO, L.F. Aspectos produtivos, nutricionais e bioeconômicos de híbridos de milho para produção de silagem. **Archivos de zootecnia**, v. 66, p. 51 – 58, 2017.

NUNES, M.G.P. **Determinação de micotoxinas por UPLC-MS/MS em grãos armazenados sob condições de temperatura e atmosfera controlada**, 174p. Dissertação de mestrado na área de Química Analítica, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, Rio Grande do Sul, 2019.

OLIVEIRA, D.H. **Ocorrência de fumonisinas em milho e derivados, destinados à alimentação humana**, 48p. Dissertação de mestrado, área de Tecnologia de Alimentos, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), Londrina, Paraná. 2016.

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

PAES, M.C.D. Aspectos Físicos, Químicos e Tecnológicos do Grão de Milho. **Circular Técnica EMBRAPA**, v. 75, p. 1 – 6, 2006.

PARUSSOLO, G.; OLIVEIRA, M.S.; GARCIA, M.V.; BERNARDI, A.O.; LEMOS, J.G.; STEFANELLO, A.; MALLMANN, C.A.; COPETTI, M.V. Ochratoxin A production by *Aspergillus westerdijkiae* in Italian-type salami. **Food Microbiology**, v. 83, p. 134-140, 2019.

PASCHOAL, F.N. **Aflatoxinas B1, B2, G1 e G2, Fumonisina B1 e Zearalenona em fubá: validação de método por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas e ocorrência de contaminação**, 128p. Dissertação de mestrado, área de Ciência de Alimentos, da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Minas Gerais. 2015.

PRESTES, I.D.; ROCHA, L.O.; NUÑES, K.V.M.; SILVA, N.C.C. Principais fungos e micotoxinas em grãos de milho e suas consequências. **Scientia Agropecuaria**, v. 10, p. 559 – 570, 2019.

RABELO, T.U. **Fumonisina em milho (*Zea mays L.*) e seus derivados**, 75p. Monografia de especialização, área de microbiologia aplicada, da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Minas Gerais. 2015.

RIGHI, L.W. **Método multirresíduo para determinação de micotoxinas em vinho por UPLC-MS/MS**, 142 p. Dissertação de mestrado, área de química analítica, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, Rio Grande do Sul, 2013.

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

SANTOS, J.V. **Validação e revalidação de métodos para a análise de micotoxinas: Aflatoxina B1, B2, G1, G2, Desoxinivalenol, Zearalenona e Ocratoxina**, 84p. Dissertação de mestrado, área de Tecnologia e Ciência Alimentar, Universidade do Porto, Porto, 2018.

SOUZA, A.V.C. **Composição química e valor nutritivo do milho com diferentes níveis de carunchamento para suínos**, 88p. Tese de doutorado, área de Zootecnia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, 1999.

SUGITA-KONISHI, Y.; NAKAJIMA, M.; TABATA, S.; ISHIKURO, E.; TANAKA, T.; NORIZUKI, H.; ITOH, Y.; AOYAMA, K.; FUJITA, K.; KAI, S.; KUMAGAI, S. Occurrence of Aflatoxins, Ochratoxin A, and Fumonisin in Retail Foods in Japan. **Journal of Food Protection**, v. 69, n. 6, p. 1365-1370, 2006.

TYSKA, D.; MALLMANN, A.O.; VIDAL, J.K.; ALMEIDA, C.A.A; GRESSLER, L.T.; MALLMANN, C.A. Multivariate method for prediction of fumonisins B1 and B2 and zearalenone in Brazilian maize using Near Infrared Spectroscopy (NIR). **Plos One**, v. 16, 2021.