

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

Maria da Graça Pereira Nunes

**DETERMINAÇÃO DE MICOTOXINAS POR UPLC-MS/MS EM GRÃOS
ARMAZENADOS SOB CONDIÇÕES DE TEMPERATURA E
ATMOSFERA CONTROLADA**

Santa Maria, RS
2019

Maria da Graça Pereira Nunes

**DETERMINAÇÃO DE MICOTOXINAS POR UPLC-MS/MS EM GRÃOS
ARMAZENADOS SOB CONDIÇÕES DE TEMPERATURA E ATMOSFERA
CONTROLADA**

Dissertação apresentada ao Curso 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 título de **Mestre em Química**.

Orientadora: Prof^a Dr^a. Ionara Regina Pizzutti

Santa Maria, RS
2019

Nunes, Maria da Graça Pereira

Determinação de micotoxinas por UPLC-MS/MS em grãos armazenados sob condições de temperatura e atmosfera controlada. / Maria da Graça Pereira Nunes.- 2019.

174 p.; 30 cm

Orientador: Ionara Regina Pizzutti

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de Pós-Graduação em Química, RS, 2019

1. Micotoxinas 2. Grãos 3. Armazenamento em atmosfera controlada 4. UPLC-MS/MS I. Pizzutti, Ionara Regina II. Título.

Maria da Graça Pereira Nunes

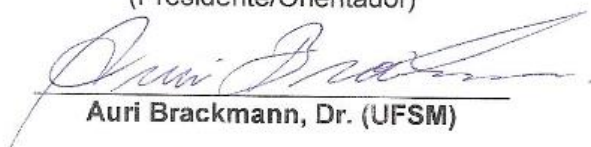
**DETERMINAÇÃO DE MICOTOXINAS POR UPLC-MS/MS EM GRÃOS
ARMAZENADOS SOB CONDIÇÕES DE TEMPERATURA E ATMOSFERA
CONTROLADA**

Dissertação apresentada ao Curso 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 título de **Mestre em Química**.

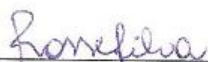
Aprovado em 28 de fevereiro de 2019:



Ionara Regina Pizzutti, Dra. (UFSM)
(Presidente/Orientador)



Auri Brackmann, Dr. (UFSM)



Rosselei Caiel da Silva, Dra. (URI)

Santa Maria, RS
2019

AGRADECIMENTOS

- A Deus, por estar sempre presente na minha vida.
- A minha mãe Maria Cristina, minha irmã Ana Maria e minha avó Zilca, que sempre tiveram palavras de conforto, carinho e incentivo, que sempre foram meu porto seguro. A existência de vocês me abençoa e me dá forças para continuar.
- Ao meu pai Moacir (*in memoriam*), com quem eu aprendi o valor do trabalho duro e da persistência, que nunca mediu esforços para me dar condições de estudar e que infelizmente não está aqui para ver o resultado desse esforço.
- A minha amiga Fabi, por ser meu braço direito, minha confidente e ombro amigo. Obrigada por todo o apoio, incentivo e paciência. Obrigada pelas melhores lembranças.
- A minha amiga Geórgia, que me ajudou muito mesmo antes de eu vir morar em Santa Maria. Obrigada pela ajuda, compreensão e paciência!
- Aos meus queridos amigos e ex-colegas de trabalho da Biocinese (Toledo, PR), com quem aprendi muito sobre cromatografia e espectrometria de massas, e que ajudaram a moldar a profissional que sou hoje.
- A professora Dra. Ionara, que aceitou ser minha orientadora antes mesmo de conhecer a mim e minha forma de trabalho. Obrigada por tudo.
- A professora Dra. Carmem, pela amizade e ombro amigo de sempre. Obrigada pelas palavras amigas e conselhos.
- Ao NPP, em especial professor Dr. Auri e seu aluno Vagner, por estarem dispostos a tirar minhas dúvidas e por esse trabalho em parceria. Obrigada pela confiança.
- Aos amigos e colegas do CEPARC, pelos momentos de descontração e pela ajuda nas atividades envolvidas nesse trabalho.

RESUMO

DETERMINAÇÃO DE MICOTOXINAS POR UPLC-MS/MS EM GRÃOS ARMAZENADOS SOB CONDIÇÕES DE TEMPERATURA E ATMOSFERA CONTROLADA

AUTORA: Maria da Graça Pereira Nunes
ORIENTADORA: Profa. Ionara Regina Pizzutti

Este trabalho teve como objetivos desenvolver e validar métodos analíticos para a determinação de micotoxinas em grãos de feijão, milho e soja empregando UPLC-MS/MS e avaliar a ocorrência de micotoxinas em amostras desses grãos após seis meses de armazenamento em atmosfera controlada. A extração das micotoxinas foi realizada com o método QuEChERS, o qual foi otimizado de forma que o maior número de micotoxinas fosse extraído com recuperações entre 70 e 120% e RSD \leq 20%. Posteriormente, os métodos foram validados para as matrizes feijão e soja com base em três documentos orientativos. As amostras (5 g) foram extraídas com 10 mL de acetonitrila contendo 1% de ácido fórmico para feijão e milho, e 5% de ácido fórmico para soja, seguido de partição com MgSO₄ e diluição do extrato 1:1 (v/v) com metanol diretamente em vial. Foram analisadas amostras submetidas a 15 tratamentos em atmosfera controlada para quatro cultivares de feijão (Fepagro 26, Garapiá, Caupi branco e Caupi vermelho), quatro cultivares de soja (Brasmax Ultra IPRO, Brasmax Desafio RR, Brasmax Bônus IPRO e Tec IRGA 6070) e 6 tratamentos para milho. Os tratamentos foram realizados em três faixas de temperatura (20, 25 e 30 °C) e em atmosfera com controle das pressões parciais de O₂ e CO₂. Não houve ocorrência de micotoxinas nos cultivares feijão Caupi branco e vermelho, e nos cultivares de soja Brasmax Desafio RR e Brasmax Ultra IPRO. Nos demais cultivares de feijão e soja detectou-se a presença de aflatoxina B1 (AF B1). Para os cultivares Fepagro 26 e Garapiá, não foram detectadas micotoxinas nos grãos armazenados em temperaturas \leq 20 °C. Para os cultivares Brasmax Bônus IPRO e Tec IRGA, detectou-se a presença de AF B1 em todas amostras estudadas, indicando que as condições de armazenamento não foram efetivas para impedir a contaminação das amostras. Nas amostras de milho detectou-se a presença das micotoxinas AF B1, fumonisinas B1 e B2 (FM B1 e FM B2, respectivamente) sendo que FM B1 não foi detectada no armazenamento dos grãos com teor de umidade 14%, à 30 °C e em atmosfera ambiente.

Palavras-chave: micotoxinas; QuEChERS; cromatografia líquida; espectrometria de massas; feijão; milho; soja; atmosfera controlada.

ABSTRACT

DETERMINATION OF MYCOTOXINS BY UPLC-MS/MS IN GRAINS STORED UNDER TEMPERATURE AND CONTROLLED ATMOSPHERE

Author: Maria da Graça Pereira Nunes

Advisor: Profa. Ionara Regina Pizzutti

This work aimed to develop and validate analytical methods for the determination of mycotoxins in beans, corn and soybean using UPLC-MS/MS and to evaluate the occurrence of mycotoxins in samples of these grains after six months of storage under controlled atmosphere. The extraction of mycotoxins was performed using the QuEChERS method, which was optimized so that the highest number of mycotoxins were extracted with recoveries between 70 and 120% and RSD \leq 20%. Subsequently, the optimized methods were validated for beans and soybeans based on three guidance documents. Samples (5 g) were extracted with 10 mL of acetonitrile containing 1% formic acid for beans and maize, and 5% formic acid for soybean, followed by partitioning with MgSO₄ and diluting the extract 1: 1 (v / v) with methanol directly into vial. Samples submitted to 15 controlled atmosphere treatments for four bean cultivars (Fepagro 26, Garapia, Cowpea white and red beans), four soybean cultivars (Brasmax Ultra IPRO, Brasmax Desafio RR, Brasmax Bonus IPRO and Tec IRGA 6070) were analyzed and 6 treatments for maize. Treatments were carried out at three temperature (20, 25 and 30 °C) and at atmosphere with control of the partial pressures of O₂ and CO₂. There was no occurrence of mycotoxins in the cultivars Cowpea white and red beans, and soybean cultivars Brasmax Desafio RR and Brasmax Ultra IPRO. Aflatoxin B1 (AF B1) was detected in the other bean and soybean cultivars. For the cultivars Fepagro 26 and Garapia, no mycotoxins were detected in the grains stored at temperatures \leq 20 °C. For the cultivars Brasmax Bonus IPRO and Tec IRGA, AF B1 was detected in all the studied samples, indicating that the storage conditions were not effective to prevent the contamination of the samples. AF B1, fumonisins B1 and B2 (FM B1 and FM B2, respectively) were detected in all maize samples, although FM B1 was not detected in grain stored with moisture content at 14% at 30 °C and ambient atmosphere.

Keywords: mycotoxins; QuEChERS; liquid chromatography; mass spectrometry; beans; maize; soybeans; controlled atmosphere.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - (a) armazenamento de grãos em silos metálicos e (b) sacas.....	40
Figura 2 - Armazenamento de grãos em silos-bolsa.	42
Figura 3 - Esquema da ionização por ESI.....	50
Figura 4 - Esquema do espectrômetro de massas triplo quadrupolo.....	52
Figura 5 - Esquema dos procedimentos de extração dos ensaios executados.	70
Figura 6 - Percentual de recuperação obtido para as micotoxinas ácidas em feijão preto, milho e soja, para os ensaios de 1 a 5 (n=3).	99
Figura 7 - Percentual de recuperação para as micotoxinas em feijão preto e soja para os ensaios 1 e 4 (n=3).....	104
Figura 8 - Cromatogramas comparativos de perfil cromatográfico para (a) DON conforme ensaio 1 e (b) DON conforme ensaio 4, e de razão S/N para (c) AF G2 conforme ensaio 1 e (d) AF G2 conforme ensaio 4.....	105
Figura 9 - Cromatogramas comparativos para a AF B2 em feijão conforme (a) ensaio 2, (b) ensaio 5 sem ampliação do cromatograma e (c) ensaio 5 com ampliação do cromatograma.	110
Figura 10 - Cromatogramas comparativos para a AF B2 em soja conforme (a) ensaio 2, (b) ensaio 5 sem ampliação do cromatograma e (c) ensaio 5 com ampliação do cromatograma.	111
Figura 11 - (a) Efeito matriz positivo para FM B1 e (b) efeito matriz negativo para AF B1 em feijão.	121
Figura 12 - (a) Efeito matriz positivo para FM B1 e (b) efeito matriz negativo para AF B1 em soja.....	133
Figura 13 - Equilíbrio higroscópico para soja.....	146

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Limite máximo tolerado para cada micotoxina em algumas mercadorias.	38
Tabela 2 - Fornecedor dos materiais de referência, pureza, solvente para o preparo e concentração das soluções estoque.	67
Tabela 3 - Preparo das soluções analíticas para a confecção das curvas analíticas.	74
Tabela 4 - Volumes de solução mistura necessários para fortificar as amostras em quatro níveis de concentração e fator de diluição do método.	81
Tabela 5 - Requisitos específicos para valores de recuperação e precisão de cada micotoxina estudada, conforme UE e MAPA.	82
Tabela 6 - Critérios de aceitação da precisão intermediária.	83
Tabela 7 - Condições de atmosfera controlada aplicadas no estudo de armazenamento de feijão e soja.	86
Tabela 8 - Condições de atmosfera controlada aplicadas no estudo de armazenamento de milho.	86
Tabela 9 – Dados de íon precursor, adutos, transições de massas, energias e tempo de retenção para cada micotoxina.	88
Tabela 10 - Valores de recuperação e de RSD para as micotoxinas fortificadas (n=3) em feijão preto.	92
Tabela 11 - Valores de recuperação e de RSD para as micotoxinas fortificadas (n=3) em milho.	93
Tabela 12 - Valores de recuperação e de RSD para as micotoxinas fortificadas (n=3) em soja.	94
Tabela 13 - Composição centesimal de diferentes matrizes.	95
Tabela 14 - Valores de pH dos extratos das matrizes, obtidos em cada ensaio.	96
Tabela 15 - Soma dos valores absolutos dos resíduos da curva analítica para escolha da ponderação para cada micotoxina em feijão.	115
Tabela 16 - Dados de linearidade das micotoxinas em feijão: equação da reta, coeficiente de correlação (r), coeficiente de determinação (r ²) e faixa linear das curvas analíticas preparadas em solvente orgânico e extrato “branco” da matriz.	117
Tabela 17 - Valores de LOD e LOQ do instrumento e do método para cada micotoxina, estimados a partir das curvas analíticas em solvente orgânico e em extrato “branco” de feijão.	118
Tabela 18 - Resultado do teste t (Student) para verificar a significância do efeito matriz e estimativa do efeito matriz (%) para cada micotoxina em feijão.	120
Tabela 19 - Média dos percentuais de recuperação e RSD (%) nos quatro níveis de fortificação, e LOQ _m para cada micotoxina em feijão.	122
Tabela 20 - Dados de precisão intermediária para cada micotoxina em feijão.	125
Tabela 21 - Soma dos valores absolutos dos resíduos da curva analítica para escolha da ponderação para cada micotoxina em soja.	127
Tabela 22 - Dados de linearidade das micotoxinas em soja: equação da reta, coeficiente de correlação (r), coeficiente de determinação (r ²) e faixa linear das curvas analíticas preparadas em solvente orgânico e extrato “branco” da matriz.	129

Tabela 23 - Valores de LOD e LOQ do instrumento e do método para cada micotoxina, estimados a partir das curvas analíticas em solvente orgânico e em extrato “branco” de soja.	130
Tabela 24 - Resultado do teste t (Student) para verificar a significância do efeito matriz e estimativa do efeito matriz (%) para cada micotoxina em soja.	131
Tabela 25 - Média dos percentuais de recuperação e RSD (%) nos quatro níveis de fortificação, e LOQ _m para cada micotoxina em soja.....	134
Tabela 26 - Dados de precisão intermediária para cada micotoxina em soja.	137
Tabela 27 - Micotoxinas encontradas em feijão, cultivares Fepagro 26 e Garapiá (feijão preto e carioca, respectivamente).	140
Tabela 28 - Micotoxinas encontradas em soja, cultivares Brasmax Bônus IPRO e Tec IRGA 6070.	144
Tabela 29 - Micotoxinas encontradas em milho.	149

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AF B1 – Aflatoxina B1

AF B2 – Aflatoxina B2

AF G1 – Aflatoxina G1

AF G2 – Aflatoxina G2

AF M1 – Aflatoxina M1

AFs – Aflatoxinas

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

APCI – Ionização química à pressão atmosférica, do inglês *Atmospheric Pressure Chemical Ionization*

ATA – Aleucia Tóxica Alimentar

C18 – Grupo orgânico contendo 18 átomos de carbono, ligado quimicamente às partículas de sílica, usado como fase estacionária em colunas cromatográficas ou como adsorvente para purificação de extratos

C8 - Grupo orgânico contendo 8 átomos de carbono, ligado quimicamente às partículas de sílica, usado como fase estacionária em colunas cromatográficas

CIT - Citrinina

CN – Ciano, grupo orgânico ligado quimicamente às partículas de sílica, usado como fase estacionária em colunas cromatográficas

DAS – Diacetoxiscirpenol

DNA – Ácido Desoxirribonucléico, do inglês *Deoxyribonucleic Acid*

DON – Deoxinivalenol

d-SPE – Extração em fase sólida dispersiva, do inglês *dispersive solid-phase extraction*

ESI – Eletronebulização, do inglês *Electrospray Ionization*

FM B1 – Fumonisina B1

FM B2 – Fumonisina B2

FM B3 – Fumonisina B3

FMs – Fumonisinas

HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Performance, do inglês *High Performance Liquid Chromatography*

HT-2 – Toxina HT-2

IARC – Agência Internacional de Pesquisa em Câncer, do inglês *International Agency for Research on Cancer*

ITD – Detector por Armadilha de Íons, do inglês *Ion Trap Detector*

LC – Cromatografia Líquida, do inglês *Liquid Chromatography*

LMT – Limite Máximo Tolerado

M⁺ - Íon molecular, consiste na molécula de analito ionizada, com a remoção de apenas um elétron

[M+H]⁺ - Aduto formado pela união de uma molécula de analito com um átomo de hidrogênio

[M+NH₃]⁺ - Aduto formado pela união de uma molécula de analito com uma molécula de amônia

[M+O]⁺ - Aduto formado pela união de uma molécula de analito com um átomo de oxigênio

m/z – Razão massa/carga

MRM – Monitoramento de Reações Múltiplas, do inglês *Multiple Reaction Monitoring*

MS – Espectrômetro de Massas, do inglês *Mass Spectrometer*

OCR A – Ocratoxina A

PLNO – modo de injeção do cromatógrafo a líquido, do inglês *Partial Loop with Needle Overfill*

PSA – Amina primária-secundária, do inglês *Primary-Secondary Amine*

QuEChERS – Rápido, fácil, econômico, efetivo, robusto e seguro, do inglês *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*

RP – Fase Reversa, do inglês *Reverse Phase*

RSD – Desvio Padrão Relativo, do inglês *Relative Standard Deviation*

S/N – Razão sinal/ruído, do inglês *Signal-to-Noise*

T-2 - Toxina T-2

ToF – Tempo de voo, do inglês *Time of Flight*

t_R – Tempo de Retenção

UV-VIS – Ultravioleta-visível

ZEA – Zearalenona

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	17
1.1	OBJETIVOS.....	19
1.1.1	Objetivos Gerais.....	19
1.1.2	Objetivos específicos	19
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	20
2.1	PRODUÇÃO DE GRÃOS NO BRASIL	20
2.1.1	Soja	20
2.1.2	Milho	22
2.1.3	Feijão	23
2.2	CONTAMINANTES COMUNS EM GRÃOS.....	25
2.2.1	Fungos	25
2.2.1.1	<i>Fatores que influenciam o crescimento fúngico e produção de micotoxinas.....</i>	<i>26</i>
2.2.1.2	<i>Condições específicas de crescimento fúngico e produção de micotoxinas</i>	<i>27</i>
2.2.1.2.1	Fungos do gênero <i>Fusarium</i> e micotoxinas relacionadas.....	27
2.2.1.2.2	Fungos do gênero <i>Aspergillus</i> e micotoxinas relacionadas	28
2.2.1.2.3	Fungos do gênero <i>Penicillium</i> e micotoxinas relacionadas	29
2.2.2	Micotoxinas	30
2.2.2.1	<i>Aflatoxinas.....</i>	<i>31</i>
2.2.2.1.1	Efeitos tóxicos das aflatoxinas.....	31
2.2.2.2	<i>Fumonisinias.....</i>	<i>32</i>
2.2.2.2.1	Efeitos tóxicos das fumonisinias.....	33
2.2.2.3	<i>Tricotecenos.....</i>	<i>33</i>
2.2.2.3.1	Efeitos tóxicos dos tricotecenos.....	34
2.2.2.4	<i>Zearalenona.....</i>	<i>35</i>
2.2.2.4.1	Efeitos tóxicos da zearalenona.....	35
2.2.2.5	<i>Ocratoxina A.....</i>	<i>35</i>
2.2.2.5.1	Efeitos tóxicos da ocratoxina A.....	36
2.2.2.6	<i>Citrinina.....</i>	<i>36</i>
2.2.2.6.1	Efeitos tóxicos da citrinina	37
2.2.3	Limites máximos tolerados para micotoxinas	37
2.3	ARMAZENAMENTO DE GRÃOS E CONTROLE DE CONTAMINANTES.....	39
2.3.1	Armazenamento convencional.....	40

2.3.2	Armazenamento hermético e atmosfera modificada	41
2.3.3	Atmosfera controlada	42
2.4	PREPARO DE AMOSTRAS PARA ANÁLISE DE MICOTOXINAS	43
2.4.1	Método QuEChERS	43
2.5	MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS PARA A ANÁLISE DE MICOTOXINAS	46
2.5.1	Cromatografia líquida	47
2.5.2	Espectrometria de massas	48
2.5.2.1	<i>Ionização por ESI</i>	49
2.5.2.2	<i>Analisador de massas TQ</i>	51
2.5.2.3	<i>Analisador de massas ToF</i>	53
2.5.2.4	<i>Analisador de massas ITD</i>	54
2.6	DESENVOLVIMENTO E OTIMIZAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS	54
2.7	VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS	55
2.7.1	Padrão interno	56
2.7.2	Linearidade e curva analítica	57
2.7.3	Limite de detecção e quantificação	60
2.7.4	Seletividade	61
2.7.5	Efeito matriz	61
2.7.6	Exatidão	62
2.7.7	Precisão	63
2.7.7.1	<i>Repetitividade</i>	63
2.7.7.2	<i>Precisão intermediária</i>	63
2.7.7.3	<i>Reprodutibilidade</i>	64
3	MATERIAIS E MÉTODOS	64
3.1	INSTRUMENTAÇÃO	64
3.2	MATERIAIS	65
3.3	SOLVENTES E REAGENTES	66
3.4	GASES	66
3.5	ANALITOS ESTUDADOS	66
3.6	PREPARO DAS SOLUÇÕES ANALÍTICAS	66
3.6.1	Preparo da solução estoque	66
3.6.2	Preparo da solução mistura	68
3.7	OTIMIZAÇÃO DO PROCEDIMENTO DE EXTRAÇÃO	69
3.8	CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS E PARÂMETROS DO ESPECTRÔMETRO DE MASSAS	71

3.8.1	Condições do cromatógrafo a líquido e espectrômetro de massas	71
3.9	PROCEDIMENTO DE EXTRAÇÃO	72
3.9.1	Feijão	72
3.9.2	Soja	73
3.10	VALIDAÇÃO DOS MÉTODOS ANALÍTICOS	73
3.10.1	Linearidade e curva analítica	73
3.10.2	Limite de detecção e quantificação	76
3.10.3	Seletividade	77
3.10.4	Efeito matriz	77
3.10.5	Exatidão (ensaios de fortificação e recuperação)	80
3.10.6	Precisão	82
3.10.6.1	<i>Repetitividade</i>	82
3.10.6.2	<i>Precisão intermediária</i>	83
3.11	ARMAZENAMENTO DE GRÃOS EM ATMOSFERA CONTROLADA	84
3.11.1	Obtenção e limpeza dos grãos antes do armazenamento	84
3.11.2	Análise dos grãos previamente ao armazenamento em atmosfera controlada	84
3.11.3	Armazenamento dos grãos em atmosfera controlada	85
3.11.4	Análise estatística dos resultados	86
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	87
4.1	ESTABELECIMENTO DAS CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS E DA ESPECTROMETRIA DE MASSAS	87
4.2	DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO ANALÍTICO: AVALIAÇÃO DA EXATIDÃO E PRECISÃO	89
4.2.1	Ensaio 1	89
4.2.2	Ensaio 2	95
4.2.3	Ensaio 3	98
4.2.4	Ensaio 4	101
4.2.5	Ensaio 5	106
4.2.6	Discussão especial – Citrinina	112
4.3	VALIDAÇÃO DOS MÉTODOS ANALÍTICOS	112
4.3.1	Padrão interno	112
4.3.2	Validação de método analítico para determinação de micotoxinas em feijão e milho	113
4.3.2.1	<i>Linearidade e curva analítica</i>	114
4.3.2.2	<i>Limite de detecção e quantificação</i>	116
4.3.2.3	<i>Seletividade</i>	118

4.3.2.4	<i>Efeito matriz</i>	118
4.3.2.5	<i>Precisão e Exatidão (ensaios de fortificação e recuperação)</i>	122
4.3.2.5.1	Precisão intermediária	124
4.3.3	Validação de método analítico para determinação de micotoxinas em soja ...	126
4.3.3.1	<i>Linearidade e curva analítica</i>	126
4.3.3.2	<i>Limite de detecção e quantificação</i>	128
4.3.3.3	<i>Seletividade</i>	130
4.3.3.4	<i>Efeito matriz</i>	130
4.3.3.5	<i>Precisão e Exatidão (ensaios de fortificação e recuperação)</i>	132
4.3.3.5.1	Precisão intermediária	135
4.4	ARMAZENAMENTO DE GRÃOS EM ATMOSFERA CONTROLADA ...	138
4.4.1	Análise dos grãos previamente ao armazenamento em atmosfera controlada	138
4.4.2	Estudo de armazenamento de feijão em atmosfera controlada	138
4.4.3	Estudo de armazenamento de soja em atmosfera controlada	142
4.4.4	Estudo de armazenamento de milho em atmosfera controlada	147
5	CONCLUSÕES	154
6	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	156
7	REFERÊNCIAS	157
	APÊNDICE A	168
	APÊNDICE B	169
	APÊNDICE C	172

1 INTRODUÇÃO

O avanço na ciência e tecnologia proporcionaram melhores condições e forneceram mais conhecimento para que melhorias no plantio pudessem colocar o Brasil entre os primeiros lugares na produção mundial de grãos.

Dentre as culturas mais produzidas no Brasil encontram-se a soja (336,7 milhões de toneladas produzidas em 2018), milho (26,8 milhões de toneladas produzidas na safra 2017/18) e feijão (3,1 milhões de toneladas).

Embora o constante investimento no setor agrícola tenha colocado o Brasil entre os primeiros lugares no *ranking* de maiores produtores do mundo (segundo lugar para a produção de soja e terceiro lugar para a produção de milho e feijão), pouco avanço e investimento tem sido feito na etapa de armazenamento dos grãos. Investir em estruturas e condições adequadas para um armazenamento seguro, por longos períodos, poderia permitir aos produtores a comercialização em épocas de baixa demanda, o que valorizaria o produto e aumentaria o lucro dos produtores.

Mesmo após a colheita e secagem, os grãos armazenados estão sujeitos às condições ambientais do local de armazenamento, como a presença de insetos e infecção de fungos. As principais causas de perdas de safras após a colheita são relacionadas à degradação do produto pela ação de fungos, que deterioram e contaminam os grãos com micotoxinas, substâncias tóxicas para animais e seres humanos.

O sistema convencional de armazenamento de grãos vem aos poucos dando lugar aos sistemas herméticos, que se mostraram uma alternativa segura e eficaz para combater o crescimento de fungos e insetos durante o armazenamento de grãos secos, evitando a contaminação e perdas por deterioração.

Durante o armazenamento em sistemas herméticos, em câmaras ou silos plásticos selados, a própria respiração dos grãos consome o oxigênio e produz o aumento na concentração de gás carbônico, produzindo uma atmosfera modificada que dificulta a infecção de fungos, cujo crescimento e produção de micotoxinas são, quase em sua maioria, essencialmente aeróbicos.

Embora o uso de atmosfera modificada e atmosfera controlada no armazenamento de grãos já venha sendo estudado há mais de 30 anos, maiores detalhes sobre a produção de micotoxinas em diferentes condições de armazenamento (concentração de gases da atmosfera e temperaturas) devem ser obtidos através de estudos, para que as melhores condições possam ser identificadas para o armazenamento de grãos tão importantes economicamente, como soja, milho e feijão.

Além do armazenamento seguro de grãos, também devem estar disponíveis métodos capazes de extrair micotoxinas de matrizes complexas, como os grãos de soja, milho e feijão, por exemplo. O uso de métodos de extração como QuEChERS, por exemplo, permite extrair de forma rápida e relativamente barata uma grande variedade de substâncias em matrizes complexas. Além disso, o acoplamento da técnica de separação por cromatografia líquida de alta eficiência com a detecção por espectrometria de massas fornece métodos sensíveis, seletivos, precisos e exatos para a identificação e quantificação de micotoxinas em diversas matrizes.

O desenvolvimento de métodos com limites de detecção cada vez menores e mais seletivos para a identificação inequívoca de micotoxinas é muito importante, considerando a alta toxicidade apresentada por muitas dessas substâncias presentes em grãos destinados à alimentação animal e humana, e a necessidade de se obter condições adequadas para a detecção desses contaminantes em concentrações cada vez mais baixas.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivos Gerais

Este trabalho teve como objetivo desenvolver e validar métodos para determinação de micotoxinas em feijão, milho e soja, e posteriormente avaliar a ocorrência de micotoxinas nesses grãos armazenados sob condições de temperatura e atmosfera controlada.

1.1.2 Objetivos específicos

- Desenvolvimento, otimização e validação de métodos analíticos para:
 - Determinação de micotoxinas em grãos de feijão e milho;
 - Determinação de micotoxina em grãos de soja.

- Avaliar a ocorrência de micotoxinas em:
 - Grãos de soja cultivares Brasmax Bônus IPRO, Brasmax Ultra IPRO, Brasmax Desafio RR e Tec IRGA 6070 após seis meses de armazenamento em 15 condições de atmosfera controlada;
 - Grãos de feijão cultivares Fepagro 26 (feijão preto), Garapiá (feijão carioca), Caupi (branco) e Caupi (vermelho) após seis meses de armazenamento em 15 condições de atmosfera controlada;
 - Grãos de milho após seis meses de armazenamento em 6 condições de atmosfera controlada.

- Avaliar o efeito da temperatura e condições de atmosfera controlada sobre a ocorrência de micotoxinas nos grãos.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 PRODUÇÃO DE GRÃOS NO BRASIL

2.1.1 Soja

A soja (*Glycine max*) é uma espécie leguminosa rica em proteínas (35 – 40%) e lipídeos (17 – 22%) e é uma das mais importantes culturas na economia mundial. Seu ciclo anual tem duração entre 90 e 160 dias e seus grãos são muito usados na indústria para a fabricação de óleo vegetal, ração para alimentação animal e produtos derivados para alimentação humana (COÊLHO, 2017; FREITAS, 2011).

Acredita-se que a soja tenha sido introduzida na agricultura há mais de 5000 anos, originando-se sua domesticação na China. Apenas no século XVI chegou ao ocidente graças às navegações europeias, e em 1822 foi introduzida no experimentalmente no Brasil, na Bahia. A distribuição de sementes e o cultivo propriamente dito ocorreram em 1901, em São Paulo, chegando ao Rio Grande do Sul em 1914 e difundida para o restante do país na década de 1970 (COÊLHO, 2017).

Graças aos avanços científicos e disponibilização de tecnologias no setor produtivo, como desenvolvimento de cultivares específicos adequados para o clima de cada região, a ampliação das áreas plantadas, produção e produtividade da soja pode ser ampliada no Brasil desde o início do seu cultivo (COÊLHO, 2017; FREITAS, 2011).

De acordo com a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), o Brasil ocupa atualmente o segundo lugar no *ranking* de produção mundial e o primeiro lugar em exportação da cultura. Dados de maio de 2018 mostram que a produção mundial de soja ficou próxima de 336,7 milhões de toneladas, sendo os Estados Unidos os maiores produtores da cultura, com pouco mais de 36 milhões de hectares plantados e produção de aproximadamente 119,5 milhões de toneladas. Dados da mesma época mostram o Brasil em segundo lugar, com 35,1 milhões de hectares plantados e produção de aproximadamente 117 milhões de toneladas. A

produtividade de soja no Brasil, no entanto, foi um pouco maior do que nos Estados Unidos, com 3333 kg/ha contra 3299 kg/ha do maior produtor mundial da cultura (EMBRAPA, 2018). Além dos Estados Unidos e Brasil, outros grandes produtores de soja no mundo são Argentina, China, Índia e Paraguai que, juntos, são responsáveis por 92% da produção mundial de soja (COÊLHO, 2017).

O levantamento feito em maio de 2018 e divulgado pela EMBRAPA mostrou que o maior produtor de soja no Brasil é o estado do Mato Grosso, com 9,5 milhões de hectares plantados e produção de aproximadamente 32 milhões de toneladas, seguido do Paraná (5,4 milhões de hectares e 19 milhões de toneladas) e Rio Grande do Sul (5,7 milhões de hectares e aproximadamente 17 milhões de toneladas) (EMBRAPA, 2018).

Além disso, a maior parte da produção brasileira de soja é destinada à exportação, tendo sido exportados 68,1 milhões de toneladas, e 59 milhões de toneladas foram destinadas ao consumo interno (EMBRAPA, 2018).

De acordo com levantamento feito em janeiro de 2019 pela Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB) e divulgado pela Federação das Indústrias do Estado de São Paulo (FIESP), estima-se um crescimento de 1,7% na área plantada e redução de 0,4% na produção da cultura no Brasil para a safra 2018/19 quando comparada à safra anterior (FIESP, 2018).

O período de semeadura da soja ocorre, geralmente, entre meados de outubro e novembro, podendo ter alguma variação dependendo do cultivar e da região de plantio. Em geral, a época ideal para a semeadura é no início das chuvas, o que pode variar de acordo com a região. A escolha do cultivar adequado a cada região é muito importante para garantir alta produtividade. No presente trabalho foram utilizadas sementes dos cultivares Brasmax Ultra IPRO, Brasmax Bônus IPRO, Brasmax Desafio RR e Tec IRGA 6070, pois são cultivares muito plantados atualmente.

Os cultivares Brasmax são adaptados para o cerrado brasileiro, região de clima tropical sazonal caracterizado por inverno seco e verão chuvoso. Brasmax Ultra IPRO é adaptado principalmente para cultivo Mato Grosso e algumas microrregiões de Tocantins. O cultivar Brasmax Bônus IPRO também é adaptado principalmente para cultivo no Mato Grosso, além da região centro-oeste e norte de Goiás, norte e sul de

Tocantins e áreas irrigadas da região oeste da Bahia. O cultivar Brasmax Desafio RR, da mesma forma que os outros dois cultivares, é adaptado para cultivo no Mato Grosso, centro-oeste e norte de Goiás e algumas regiões do Tocantins (BRASMAX GENÉTICA).

Já o cultivar Tec IRGA 6070, desenvolvido através de uma parceria entre o Instituto Rio Grandense do Arroz (IRGA) com a Bayer, tem excelente tolerância ao excesso hídrico e é indicado para rotação de culturas em áreas de plantio de arroz irrigado. É bem adaptado para o plantio na região centro-sul do país. O plantio é feito preferencialmente entre meados de outubro e novembro no Mato Grosso do Sul, e pode ser estendido até meados de dezembro nos estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná e São Paulo (IRGA, 2017).

2.1.2 Milho

O milho (*Zea mays*) é considerado um cereal, cuja definição agrupa qualquer semente comestível que pode ser utilizado como alimento, assim como arroz, trigo e centeio (COÊLHO, 2017). É uma excelente fonte de energia para o organismo, o que é devido à alta concentração de carboidratos, além de ser rico em vitaminas, proteínas e lipídeos (COÊLHO, 2017).

O milho é originário da região do México e seu consumo teve início estimado de 5000 a.C. A chegada dos europeus à América expandiu o cultivo e consumo da cultura pelo mundo, e atualmente é cultivado em todos os continentes (COÊLHO, 2017).

A cultura do milho é uma das mais importantes no cenário mundial, pois a elevada concentração de carboidratos nos grãos faz desse cereal a principal fonte de energia na alimentação animal (especialmente aves e suínos), além de ser uma importante matriz energética na produção de biocombustíveis como o etanol. É o grão mais produzido no mundo, sendo responsável por 42% de todos os grãos produzidos. No Brasil, o milho é o segundo grão mais produzido e é fundamental para a rotação de cultura, principalmente no binômio soja-milho (CONAB, 2017).

O milho é uma espécie de fácil plantio e colheita, sendo cultivado em duas safras: a principal, no verão, e a segunda, no inverno, comumente denominada “safrinha”. Atualmente, o Brasil é o terceiro maior produtor mundial de milho, sendo que Estados Unidos e China ocupam o primeiro e segundo lugar, respectivamente (COÊLHO, 2017).

De acordo com a CONAB (2019), a região Sul foi a maior produtora de milho na primeira safra de 2017/18, com pouco mais de 10,2 milhões de toneladas produzidas, seguida da região Sudeste (7,7 milhões de toneladas) e Nordeste (5,6 milhões de toneladas). A produção total de milho na primeira safra de 2017/18 foi de aproximadamente 26,8 milhões de toneladas, produzidas em pouco mais de 5 milhões de hectares. Para a primeira safra de 2018/19 está previsto um aumento de 0,1% na área plantada e 2,4% na produção.

Já a segunda safra de 2017/18 totalizou quase 54 milhões de toneladas produzidas em 11,5 milhões de hectares, sendo a região Centro-Oeste a principal produtora de milho nessa safra (pouco mais de 39 milhões de toneladas), seguida da região Sul (quase 9 milhões de toneladas) e da região Sudeste (cerca de 3,4 milhões de toneladas). De acordo com a CONAB (2019), há uma estimativa de aumentar a produção de milho na segunda safra de 2018/19 em 18,1%.

2.1.3 Feijão

O feijão (*Phaseolus vulgaris*) é uma leguminosa conhecida desde a Grécia antiga e Egito, com relatos históricos de 1000 a.C. É uma importante fonte de energia, pois é rica em carboidratos e proteínas e tem baixo teor de lipídeos. O feijão tem papel importante na dieta alimentar da população brasileira, além de importante papel econômico dos pequenos produtores, principal origem do produto no país (CONAB, 2017).

No Brasil são conhecidas 14 variedades de feijão, sendo mais conhecidos o feijão carioca, feijão preto, feijão caupi e o feijão tipo cores (branco, vermelho, roxo). O feijão adapta-se facilmente às diversas condições do solo e clima, o que permite cultivá-lo de forma isolada, em consórcio ou intercalado (COÊLHO, 2017).

O feijão é cultivado em três safras anuais, sendo a primeira entre novembro e abril (safra das águas) e concentra-se nas regiões Sul, Sudeste e nos estados de Goiás, Piauí e Bahia. A segunda safra, chamada de safra das secas, tem colheita entre abril e julho e é concentrada nas regiões Norte, Nordeste e nos estados do Mato Grosso, Rondônia e Goiás. Por fim, a colheita da terceira safra (safra de inverno) ocorre entre julho e outubro e é concentrada em Minas Gerais, Goiás, São Paulo, Bahia, Pará, Pernambuco e Alagoas (COÊLHO, 2017).

Os maiores produtores mundiais de feijão são Myanmar, Índia, Brasil, Estados Unidos, México e Tanzânia, e apesar de serem amplas as condições de produção, os valores comerciais e nutricionais são rapidamente depreciados após a colheita (COÊLHO, 2017; CONAB, 2017).

O feijão tem pouca importância mundial e toda a produção brasileira é destinada ao consumo interno, sendo que o país ainda importa feijão preto da Argentina para suprir a demanda (CONAB, 2017).

No Mercosul, o Brasil é o maior produtor e consumidor de feijão, participando com 90% na produção e consumo da cultura, seguido da Argentina.

A produção de feijão comum preto e do feijão caupi não é distribuída uniformemente nos três períodos e colheita. De acordo com a CONAB (2017) a produção de feijão comum preto na primeira, segunda e terceira safras foram, respectivamente, 317,5 milhões de toneladas, 187 milhões de toneladas e 6,5 milhões de toneladas. Já para o feijão caupi, a produção foi, respectivamente, 211 milhões de toneladas, 439,6 milhões de toneladas e 74,5 milhões de toneladas.

A produção de feijão comum preto no Brasil, na primeira safra 2017/18, foi aproximadamente 291 mil toneladas, sendo a região Sul a maior produtora, com 287,6 mil toneladas, seguida da região Sudeste (8,3 mil toneladas) e Centro-Oeste (2,3 mil toneladas). A segunda safra 2017/18 produziu quase 180 mil toneladas, com a região Sul sendo a maior produtora. Já a produção de feijão comum preto na terceira safra 2017/18 foi de apenas 11,6 mil toneladas, tendo a região Nordeste como a principal produtora da cultura nessa época (10,8 mil toneladas). A produção total de feijão comum preto no Brasil, na safra 2017/18, foi de aproximadamente 490 mil de toneladas. A estimativa da CONAB (2019) para a produção de feijão comum preto na

primeira, segunda e terceira safras 2018/19 é de 2,4%, 8,7% e 0,9%, respectivamente, e na produção total 0,6%.

Para o feijão caupi, a produção da primeira safra 2017/18 foi 184,4 mil toneladas, sendo a região Nordeste a maior produtora, com 166,1 mil toneladas, seguida da região Centro-Oeste (7,7 mil toneladas) e Sudeste (7,6 mil toneladas). A segunda safra 2017/18 produziu quase 556 mil toneladas, com a região Nordeste sendo a maior produtora (289,5 mil toneladas). Já a produção de feijão caupi na terceira safra 2017/18 foi de 46,5 mil toneladas, tendo a região Norte como a principal produtora da cultura nessa época (36,2 mil toneladas). A produção total de feijão caupi na safra 2017/18 foi de aproximadamente 787 mil de toneladas. De acordo com a CONAB (2019), estima-se um aumento de 9,4%, 2,7% e 13,8% na produção de feijão caupi para a primeira, segunda e terceira safra 2018/19, respectivamente, e 0,5% para a produção total.

A produção total de feijão no Brasil, considerando todas as variedades e as três safras 2017/18 foi de pouco mais de 3,1 milhões de toneladas, sendo estimado um aumento de 0,6% para a safra 2018/19 (CONAB, 2019).

2.2 CONTAMINANTES COMUNS EM GRÃOS

2.2.1 Fungos

Fungos filamentosos, como os mofo e bolores, são organismos multicelulares, eucariontes e heterotróficos, pertencentes ao reino *Fungi*. São organismos importantes no contexto ecológico pois são importantes decompositores, e são economicamente importantes na medicina e indústria. Por outro lado, algumas espécies de fungos podem surgir em alimentos e deteriorar os mesmos, causando problemas de saúde (VECCHIA e CASTILHO-FORTES, 2007).

Os fungos se alimentam de metabólitos primários como ácidos nucléicos, carboidratos, proteínas e lipídeos, essenciais para o crescimento desses organismos. Na fase final de crescimento, os fungos eliminam essas substâncias na forma de

metabólitos secundários, que são inofensivos para o próprio fungo mas podem causar toxicidade às plantas, animais ou bactérias (CASTILLO et al., 2009; VECCHIA e CASTILHO-FORTES, 2007).

Os metabólitos secundários são denominados antibióticos quando são nocivos apenas às bactérias, e micotoxinas quando são nocivas aos seres vertebrados, incluindo os seres humanos (RICHARD et al., 2003). Uma revisão mais completa sobre micotoxinas será abordada posteriormente.

Os principais gêneros de fungos produtores de micotoxinas são *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium*, que podem contaminar as mais diversas variedades de grãos, podendo estar presentes no solo, durante o plantio, colheita, secagem, transporte e armazenamento (ISMAIEL e PAPENBROCK, 2015; VECCHIA e CASTILHO-FORTES, 2007). As diferentes espécies de *Fusarium* são classificadas como fungos de campo e atingem muitas variedades de grãos durante o plantio, enquanto as espécies de *Aspergillus* e *Penicillium* são classificadas como fungos de armazenamento, cuja proliferação ocorre na etapa de armazenamento dos grãos (ISMAIEL e PAPENBROCK, 2015).

2.2.1.1 Fatores que influenciam o crescimento fúngico e produção de micotoxinas

A colonização e o crescimento dos fungos dependem de vários fatores, como composição do substrato, temperatura, teor de umidade dos grãos, atividade de água, umidade relativa do ar e pH. Atividade de água (a_w , do inglês *activity of water*) é definida como a água livre presente nos espaços intercelulares do alimento e que está disponível para interação com microrganismos e para reações enzimáticas. (LABUZA et al., 1970). A a_w é determinada pela relação entre a pressão de vapor da água presente no alimento e a pressão de vapor da água pura na mesma temperatura, e não pode ser relacionada com o teor de umidade dos grãos, expresso em porcentagem, mas sim deve ser medida para cada tipo de alimento (LABUZA et al., 1970).

Além disso, fatores estressantes como ataque de insetos, períodos de seca, pouca fertilização e competição com outras culturas também podem favorecer o crescimento de fungos produtores de micotoxinas (VECCHIA e CASTILHO-FORTES, 2007).

As condições que favorecem o crescimento dos fungos não são obrigatoriamente as mesmas condições necessárias para a produção das micotoxinas, e cada classe de fungos apresenta condições específicas para crescimento e produção de micotoxinas.

2.2.1.2 Condições específicas de crescimento fúngico e produção de micotoxinas

2.2.1.2.1 Fungos do gênero *Fusarium* e micotoxinas relacionadas

A espécie mais amplamente distribuída de *Fusarium* é a *F. graminearum*, cujo crescimento ótimo está situado na faixa de temperatura entre 24 e 26 °C e a_w 0,90. O efeito do pH no crescimento desta espécie depende da temperatura: pH em torno de 2,4 quando a temperatura é em torno de 30 °C e 3,0 em temperatura 25 e 37 °C. *F. graminearum* produz as micotoxinas deoxinivalenol, nivalenol e zearalenona nas mesmas condições do crescimento fúngico (SWEENEY e DOBSON, 1998).

Outra espécie conhecida dessa classe é a *F. sporotrichioides*, cujo crescimento ótimo ocorre em temperatura entre 22,5 e 27,5 °C. As temperaturas mínimas e máximas cujo crescimento desse fungo foi registrado foram, respectivamente, -2 e 35 °C. Essa espécie é responsável pela produção das micotoxinas T-2, deoxinivalenol, nivalenol e zearalenona, no entanto, as condições nas quais essas micotoxinas são produzidas são pouco conhecidas (SWEENEY e DOBSON, 1998).

A espécie *F. culmorum* também produz deoxinivalenol e é capaz de crescer em temperaturas de até 0 °C, sendo o crescimento ótimo em 21 °C e máximo em 31 °C. Em temperaturas acima de 25 °C essa espécie também é capaz de produzir zearalenona (SWEENEY e DOBSON, 1998).

F. moniliforme (sinônimo *F. verticillioides*), responsável pela produção de fumonisina B1, tem um ótimo crescimento na faixa de temperatura entre 22,5 e 27,5 °C. Crescimento fúngico já foi registrado em temperaturas mais baixas (entre 2 e 5 °C) e mais altas (entre 32 e 37 °C). A atividade de água mínima para o crescimento desse fungo é 0,92, e não há produção de micotoxinas quando a_w abaixo de 0,86 (SWEENEY e DOBSON, 1998). Essa espécie de fungo também é capaz de produzir zearalenona (NEME e MOHAMMED, 2017).

A espécie *F. proliferatum* tem um perfil de crescimento semelhante a *F. moniliforme* e é a maior produtora das fumonisinas B1, B2 e B3. Para *F. proliferatum*, a produção de toxinas é maior a 25 °C do que 30 °C e estas podem ser produzidas com a_w entre 0,92 e 0,97. A produção de fumonisinas por espécies de *Fusarium* parece ser melhorada em condições de crescimento anaeróbicas (SWEENEY e DOBSON, 1998).

2.2.1.2.2 Fungos do gênero *Aspergillus* e micotoxinas relacionadas

Diversas espécies de fungos *Aspergillus* são responsáveis pela produção de micotoxinas durante o armazenamento de grãos, como as aflatoxinas e ocratoxinas (SWEENEY e DOBSON, 1998).

As espécies *A. flavus* e *A. parasiticus* apresentam padrões de crescimento semelhantes. Ambas as espécies crescem em temperaturas entre 10 e 12 °C até 42 e 43 °C, sendo a faixa ótima para o crescimento entre 32 e 33 °C. O teor de água nos grãos (representado por a_w , referente à atividade de água) mínimo necessário para o crescimento desses fungos é menor que 0,80 para *A. flavus* e 0,84 para *A. parasiticus*, sendo a_w ótimo igual à 0,99. Ambas as espécies podem crescer em pH entre 2,1 e 11,2, sendo a faixa ótima entre 3,5 e 8,0 (SWEENEY e DOBSON, 1998).

Ambas as espécies *A. flavus* e *A. parasiticus* são responsáveis pela produção das aflatoxinas. *A. parasiticus* é responsável pela produção das aflatoxinas G e B, porém, quando isolada de outras espécies, produz aflatoxinas em concentrações mais elevadas (SWEENEY e DOBSON, 1998). Já a espécie *A. flavus* produz apenas

aflatoxinas B, e apresenta grande porcentagem de cepas não-toxigênicas, ou seja, cepas que não produzem micotoxinas (SWEENEY e DOBSON, 1998).

As aflatoxinas são produzidas em temperaturas entre 12 e 40 °C, na faixa de pH entre 3,5 e 8,0 com pH ótimo próximo à 6,0. Já a faixa de a_w para a produção dessas micotoxinas está entre 0,95 e 0,99, com a_w mínimo de 0,82 (SWEENEY e DOBSON, 1998).

Diferentemente das espécies *A. flavus* e *A. parasiticus*, a espécie *A. ochraceus* tem o crescimento mais lento. A faixa de temperatura para crescimento dessa espécie está situada entre 8 e 37 °C, com temperatura ótima entre 24 e 37 °C. *A. ochraceus* cresce em pH entre 3 e 10, e o crescimento é mínimo em pH 2,2. Essa espécie não exige alto teor de água no substrato, sendo suficiente a_w menor que 0,77. Já a produção de ocratoxina A pela espécie *A. ochraceus* ocorre em temperatura entre 12 e 37 °C, com temperatura ótima 31 °C e a_w tão baixa quanto 0,80 (SWEENEY e DOBSON, 1998).

2.2.1.2.3 Fungos do gênero *Penicillium* e micotoxinas relacionadas

A espécie *P. verrucosum* cresce em temperaturas entre 0 e 31 °C, sendo a temperatura ótima em torno de 20 °C. É uma espécie de fungo adaptada a climas secos, sendo capaz de crescer em a_w em torno de 0,80. A faixa de pH para crescimento desse fungo está situada entre 2,1 e 10,0, sendo a faixa ótima entre 6,0 e 7,0. A ocratoxina A produzida por essa espécie em toda a faixa de temperatura do crescimento fúngico, tendo a produção ótima em 20 °C. Níveis significantes dessa micotoxina são produzidos em 4 °C e a_w tão baixo quanto 0,86 (SWEENEY e DOBSON, 1998).

Outra espécie de *Penicillium* é a *P. citrinum*, que cresce em faixa de temperatura entre 5 e 40 °C, com faixa de temperatura ótima para crescimento entre 26 e 30 °C. A faixa de pH para crescimento desse fungo entre 2 e 10, sendo a faixa ótima entre 5,0 e 7,0. A atividade de água mínima para crescimento dessa espécie está entre 0,80 e 0,84. *P. citrinum* produz a micotoxina citrinina em temperaturas entre

15 e 37 °C, sendo 30 °C a temperatura ótima. O efeito do pH e a_w na produção de citrinina não são conhecidos (SWEENEY e DOBSON, 1998).

2.2.2 Micotoxinas

Micotoxinas são substâncias de baixo peso molecular pertencentes à diferentes classes químicas, produzidas como metabólitos secundários de alguns tipos de fungos e apresentam efeitos nocivos aos seres vertebrados, incluindo seres humanos (RICHARD et.al,2003).

São substâncias bastante estáveis, resistindo a temperaturas altas (até 270 °C) e à ação enzimática no sistema digestivo. Devido à grande estabilidade química, a remoção de micotoxinas de alimentos contaminados é difícil ou mesmo impossível, ainda que o fungo produtor da substância já tenha sido removido por processos de industrialização (PEREIRA e dos SANTOS, 2011).

Enquanto todas as micotoxinas são produzidas por fungos, nem todas as substâncias produzidas por fungos são micotoxinas. Substâncias produzidas por fungos e que são tóxicas para bactérias, por exemplo, são comumente chamadas de antibióticos, como é o caso da penicilina, da mesma forma que algumas substâncias produzidas por fungos são tóxicas para plantas (BENNETT e KLICH, 2003).

As micotoxinas são consideradas os principais contaminantes em alimentos, sejam estes destinados ao consumo humano ou animal, visto que são substâncias produzidas naturalmente por fungos e estes se encontram amplamente distribuídos na natureza (RAHMANI, JINAP e SOLEIMANY, 2009).

Mais de 300 micotoxinas já foram isoladas e identificadas, no entanto, algumas dessas substâncias recebem maior atenção devido à frequência com que estão presentes em diversas mercadorias e devido ao efeito tóxico que apresentam, que podem variar de imunossupressão, alterações hormonais e reprodutivas até carcinomas (GONÇALEZ, PINTO e FELICIO, 2001).

As principais classes de micotoxinas estudadas e monitoradas mundialmente em diversas mercadorias são as aflatoxinas, fumonisinas, tricotecenos, zearalenona, ocratoxina A, citrinina e patulina, sendo esta última mais comum em maçãs e produtos derivados e as demais em grãos, cereais e produtos derivados (GONÇALEZ, PINTO e FELICIO, 2001).

A estrutura e fórmula molecular, peso molecular e indicação de pK_a dos grupos funcionais das micotoxinas objeto de estudo desse trabalho são apresentadas no Apêndice A.

2.2.2.1 Aflatoxinas

As aflatoxinas (AFs) são as micotoxinas mais estudadas e são conhecidas desde 1960, quando mais de 100 mil perus morreram intoxicados após ingestão de ração contendo amendoim, na Inglaterra. Após este ocorrido, *Aspergillus flavus* e uma toxina produzida por esse fungo foram isolados dessa ração, sendo esta substância denominada como “aflatoxina” (FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2009).

As AFs são substâncias heterocíclicas altamente oxigenadas e com estruturas químicas bastante semelhantes, conforme Apêndice A. São levemente solúveis em água e bastante solúveis em solventes orgânicos moderadamente polares, como metanol e acetonitrila (IARC, 2012).

Cerca de 17 substâncias tóxicas são conhecidas e denominadas aflatoxinas, e quatro são as mais importantes: AF B1, B2, G1 e G2, sendo a AF B1 a mais importante desta classe (PEREIRA e dos SANTOS, 2011), uma vez que é a toxina mais produzida pelos fungos *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus* e por apresentar o maior potencial carcinogênico dentro deste grupo. A AF B1, quando ingerida, sofre biotransformação no organismo e origina a aflatoxina M1 (AF M1), encontrada no leite de animais alimentados com ração contaminada por AF B1 (BENNETT e KLICH, 2003).

A nomenclatura B1, B2, G1 e G2 das aflatoxinas refere-se à cor exibida pelas moléculas sob luz ultravioleta (azul para nomenclatura B, do inglês *blue*, e verde para nomenclatura G, do inglês *green*) e à mobilidade relativa de cada substância em cromatografia de camada delgada (BENNETT e KLICH, 2003).

2.2.2.1.1 Efeitos tóxicos das aflatoxinas

De acordo com o que foi publicado pela Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC, do inglês *International Agency for Research on Cancer*) em uma de suas monografias, em 2012, há evidências suficientes para concluir que as AF B1, G1

e M1, presentes nos alimentos na forma de mistura ou individualmente, são carcinogênicas para animais. Para a AF B2 há evidências limitadas e para a AF G2 não há evidências suficientemente adequadas para avaliar a carcinogenicidade em animais de laboratório (IARC, 2012).

A AF B1 pode sofrer bioativação através de enzimas, e os metabólitos formados tem maior potencial carcinogênico que a própria AF B1 (PEREIRA e dos SANTOS, 2011). Essa aflatoxina pode se ligar a moléculas de ácido nucléico e fazer com que sua replicação ocorra de forma desordenada, levando ao aparecimento de tumores, especialmente no fígado, que é o órgão mais afetado por essa classe de micotoxinas. Outros efeitos causados pelas aflatoxinas são mutagenicidade e imunossupressão (IARC, 2012; PEREIRA e dos SANTOS, 2011).

2.2.2.2 *Fumonisin*

As fumonisin (FMs) são micotoxinas produzidas por várias espécies do fungo *Fusarium*, dentre as quais destacam-se *Fusarium verticillioides* (antigamente chamado de *Fusarium moniliforme*), *Fusarium proliferatum* e *Fusarium nygamai* (GILBERT e POHLAND, 2003; BENETT e KLICH, 2003).

Pertencem a esta classe de micotoxinas cerca de 16 substâncias, sendo as mais importantes as fumonisin B1 (FM B1), B2 (FM B2), e B3 (FM B3), e sendo a FM B1 produzida em maior quantidade pelos fungos produtores desta classe e a FM B3 a mais tóxica (FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2009; PEREIRA e dos SANTOS, 2011).

As FMs foram descritas e caracterizadas pela primeira vez em 1988 (BENETT e KLICH, 2003). São compostos altamente oxigenados, com grupos funcionais éster, éter e amina. São solúveis em água, metanol e acetonitrila-água. São estáveis em metanol quando armazenadas à temperatura de -18 °C, mas instáveis neste solvente em temperatura de 25 °C, pois formam mono ou dimetil ésteres (IARC, 1993, IARC 2002).

Semelhantemente às outras micotoxinas, as FMs são estáveis ao calor (o conteúdo destas micotoxinas é reduzido em processos com temperatura acima de 150 °C), não sendo eliminadas ou degradadas em processos fermentativos e outros processamentos de alimentos comumente empregados (SOUZA, 2014).

2.2.2.2.1 Efeitos tóxicos das fumonisinas

Desde 1993 a IARC classifica as FM B1 e B2 como pertencentes ao Grupo 2B – possivelmente carcinogênicos a humanos (IARC, 1993; PEREIRA e dos SANTOS, 2011).

A ocorrência de FM B1 foi correlacionada à incidência de câncer de esôfago em regiões da África do Sul, China e Itália. Além disso, as fumonisinas afetam diferentes espécies de animais, causando leucoencefalomalácia em equinos, edema pulmonar em suínos e efeitos carcinogênicos e hepatotóxicos no fígado de ratos (BENETT e KLICH, 2003).

De acordo com PEREIRA e dos SANTOS (2011), diferentemente das aflatoxinas, o efeito carcinogênico das fumonisinas parece não estar associado à interação destas toxinas com o ácido desoxirribonucleico (DNA, do inglês *Deoxyribonucleic Acid*) mas sim na intervenção da biossíntese de esfingolípídeos, moléculas responsáveis pela formação de membranas celulares e comunicação entre as células.

2.2.2.3 *Tricotecenos*

O termo tricoteceno deriva de “tricotecina”, que foi a primeira micotoxina desta família identificada. Pertencem a este grupo mais de 150 micotoxinas produzidas por fungos *Fusarium*, *Myrothecium*, *Phomopsis*, *Stachybotrys*, *Trichoderma* e *Trichothecium* (BENETT e KLICH, 2003).

As micotoxinas pertencentes a este grupo apresentam estrutura básica sesquiterpenóide (15 carbonos), tetracíclico, e diferem entre si conforme os substituintes R (MOSTROM e RAISBECK, 2007). São substâncias termicamente estáveis, não sendo degradados em condições normais de cocção de alimentos ou processos de autoclavagem. Além disso, são estáveis em condições de pH neutro ou ácido, e por isso não são hidrolisados no estomago após ingestão (ROCHA, ANSARI e DOOHAN, 2005).

Os tricotecenos são divididos em tipo A, tipo B e tipo C. Pertencem ao tipo A micotoxinas como a toxina T-2 (T-2), toxina HT-2 (HT-2) e diacetoxiscirpenol (DAS).

Aos tricotecenos do tipo B pertencem o nivalenol, deoxinivalenol (DON) e fusareon X, e do tipo C a crotocina (MOSTROM e RAISBECK, 2007). Com exceção do nivalenol, fusareon X e crotocina, todos os tricotecenos mencionados acima foram estudados nesse trabalho.

A T-2 apresenta grupos funcionais éster e éter, é solúvel em acetonitrila, acetona, metanol e diclorometano. É estável em estado sólido, mas em meio alcalino os grupos éster sofrem saponificação e o epóxido é aberto na presença de ácidos inorgânicos fortes (IARC, 1993). A HT-2 é um metabólito desacetilado da T-2, apresentando uma meia-vida no organismo maior que a T-2 (IARC, 1993).

O DAS é solúvel em solventes como clorofórmio, acetato de etila, acetona, metanol e acetonitrila (Fermentek).

O DON é a micotoxina produzida por fungos *Fusarium* mais amplamente distribuída. É solúvel em etanol, metanol, acetato de etila e água (IARC, 1993).

De uma forma geral, os tricotecenos são potentes inibidores da síntese de proteínas, DNA e RNA, além de causar efeitos na divisão celular (BENNET e KLICH, 2003; ROCHA, ANSARI e DOOHAN, 2005).

Uma grave doença chamada Aleucia Tóxica Alimentar (ATA), que causa irritação na pele, degeneração da medula óssea, vômito, diarreia e eventualmente morte, também é associada aos tricotecenos (RICHARD et.al., 2003).

2.2.2.3.1 Efeitos tóxicos dos tricotecenos

Efeitos de redução da função dos ovários e desordens reprodutivas também são associados às micotoxinas deste grupo (ROCHA, ANSARI e DOOHAN, 2005).

A T-2, embora encontrada com menor frequência em diversas mercadorias, é a micotoxina mais importante da classe dos tricotecenos, pois é a mais tóxica deste grupo (LI et.al., 2011). De acordo com ROCHA, ANSARI e DOOHAN (2005), os linfócitos são as células mais sensíveis a esta micotoxina.

2.2.2.4 Zearalenona

A zearalenona (ZEA) é um metabólito secundário produzido principalmente pelo fungo *Fusarium graminearum* (BENNET e KLICH, 2003), foi isolada pela primeira vez em 1962 e teve sua estrutura elucidada em 1966. É considerada a micotoxina produzida pelos fungos *Fusarium* mais amplamente distribuída (IARC, 1993). Essa micotoxina apresenta grupos éster e éter em sua estrutura, é pouco solúvel em água, mas solúvel em acetonitrila, diclorometano, metanol, etanol e acetona (IARC, 1993).

2.2.2.4.1 Efeitos tóxicos da zearalenona

A ZEA é considerada pouco tóxica pela IARC, que classifica essa micotoxina como pertencente ao grupo 3 – carcinógeno para animais, mas não classificável como carcinógeno para humanos (IARC, 1993). Os principais efeitos desta micotoxina são estrogênicos, tanto em animais quanto em humanos (BENNET e KLICH, 2003; PEREIRA e dos SANTOS, 2011).

Devido à facilidade com que a ZEA se liga aos receptores de 17β -estradiol (principal hormônio produzido pelo ovário) nas células, esta micotoxina é apontada como responsável por causar abortos, infertilidade e câncer no colo do útero, além de induzir a feminilização em machos (SOUZA, 2014; BENNET e KLICH, 2003).

Apesar de conhecidos esses efeitos, a forma reduzida da ZEA, zearalenol, tem sido empregada em formulações comerciais para tratamento dos efeitos da menopausa em mulheres, e também contraceptivo, tendo em vista que essa molécula apresenta atividade estrogênica maior que a própria ZEA. (BENNET e KLICH, 2003).

2.2.2.5 Ocratoxina A

São conhecidas pelo menos 7 ocratoxinas, mas a mais conhecida e mais tóxica é a ocratoxina A (OCR A) (FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2009). Esta micotoxina foi descoberta em 1965, como um metabólito do fungo *Aspergillus ochraceus*, e pouco depois foi reconhecida como uma potente nefrotoxina (BENNET e KLICH, 2003). A OCR A é produzida também por espécies do fungo *Penicillium*, principalmente *Penicillium verrucosum* (PEREIRA e dos SANTOS, 2011).

A OCR A apresenta fluorescência verde em soluções alcalinas e azul em soluções ácidas. É moderadamente solúvel em solventes como clorofórmio, metanol e etanol. É parcialmente degradada em condições normais de cocção, e totalmente degradada em solução de hipoclorito de sódio (IARC, 1993).

2.2.2.5.1 Efeitos tóxicos da ocratoxina A

O rim é o principal órgão afetado pela OCR A, sendo esta micotoxina conhecida nefrotóxica em todos os animais estudados. Além disso, a OCR A é imunossupressora, carcinogênica e um potente teratogênico (BENNET e KLICH, 2003). O principal efeito da OCR A é a interferência no metabolismo da fenilalanina, mais precisamente inibindo a ação da enzima envolvida neste metabolismo (BENNET e KLICH, 2003).

A OCR A se liga às proteínas plasmáticas, o que faz com que permaneça no sangue por mais tempo e demore para ser eliminada, sendo assim tóxica para o organismo (PEREIRA e dos SANTOS, 2011). Esta micotoxina é classificada pela IARC como pertencente ao grupo 2B – potencialmente carcinogênico para humanos (IARC, 1993).

2.2.2.6 Citrinina

A citrinina (CIT) é uma micotoxina de cor amarela, isolada pela primeira vez em 1931 a partir do fungo *Penicillium citrinum*, tendo sido identificada posteriormente em várias espécies de *Penicillium* e *Aspergillus* (BENNET e KLICH, 2003). O fungo *Penicillium verrucosum*, responsável pela produção de ocratoxina A, também produz a CIT, e frequentemente essas micotoxinas são encontradas simultaneamente em alimentos contaminados (RICHARD et.al, 2003).

A CIT apresenta grupos funcionais éster e éter e é praticamente insolúvel em água, mas solúvel em metanol, acetonitrila e clorofórmio (IARC, 1987). Essa micotoxina apresenta fluorescência amarelo-limão sob luz ultravioleta (FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2009).

Quando aquecida a temperaturas acima de 175 oC, a CIT se decompõe e gera os produtos citrinina H1 e citrinina H2, que apresentam efeito tóxico às células maior

e menor que a própria CIT, respectivamente (EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY, 2012).

2.2.2.6.1 Efeitos tóxicos da citrinina

Da mesma forma que a OCR A, a CIT também causa danos nos rins dos animais testados, sendo este o principal órgão afetado por esta micotoxina (RICHARD et.al, 2003). A toxicidade aguda da CIT varia de acordo com a espécie, mas para todos os animais testados esta micotoxina apresentou efeito nefrotóxico (BENNET e KLICH, 2003).

Apesar da *European Food Safety Authority* (EFSA) ter publicado em 2012 que estudos *in vitro* e *in vivo* proveram dados que evidenciaram efeitos tóxicos a embriões e sistema reprodutivo, além de efeitos teratogênicos nos animais testados, não há estudos disponíveis a respeito da exposição à CIT ao longo da vida, e com isso não há dados suficientes para comprovar o efeito carcinogênico da citrinina (EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY, 2012). A própria IARC classificou esta micotoxina como pertence ao grupo 3 – não classificável como carcinogênico para seres humanos (IARC, 1987).

2.2.3 Limites máximos tolerados para micotoxinas

A legislação brasileira (ANVISA, 2011 e 2017) e europeia (EUROPEAN COMMISSION, 2006) estabelece o limite máximo tolerado (LMT) para algumas micotoxinas em algumas mercadorias, como resumo apresentado na Tabela 1.

Como pode ser observado a partir dessa tabela, apenas as micotoxinas AFs e OCR A têm LMT especificado para feijão, embora a ocorrência de outras micotoxinas (T-2 e ZEA, por exemplo) nessa matriz já tenham sido relatadas.

Para milho, mercadoria que está classificada no mesmo grupo do feijão (Grupo 5 - mercadorias com alto teor de amido e/ou proteína e baixo teor de água e conteúdo de gordura, na categoria de “Vegetais e frutas, cereais e alimentos de origem animal”),

conforme SANTE (2017), várias micotoxinas têm LMT estabelecidos (AFs, DON, ZEA, FMs, OCR A, T-2 e HT-2), seja na legislação brasileira ou europeia.

Já para soja, tanto a legislação brasileira quanto a legislação europeia não estipularam até hoje LMT para micotoxinas nessa mercadoria.

Tabela 1 - Limite máximo tolerado para cada micotoxina em algumas mercadorias.

Micotoxina	Matriz	LMT ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Legislação
AF B1, B2, G1 e G2	Feijão	5	ANVISA (2011)
	Cereais e produtos de cereais, exceto milho e derivados	5	ANVISA (2011)
	Alimentos à base de cereais para alimentação infantil (lactentes e crianças de primeira infância)	1	ANVISA (2011)
	Milho, milho em grão (inteiro, partido, amassado, moído), farinhas ou sêmolos de milho	20	ANVISA (2011)
	Milho, trigo, arroz	2 – 12 (B1) 4 – 15 (total)	EUROPEAN COMMISSION (2006)
DON	Trigo e milho em grãos para posterior processamento	3000	ANVISA (2017)
ZEA	Milho em grão e trigo para posterior processamento	40	ANVISA (2017)
	Milho de pipoca, canjiquinha, canjica, produtos e subprodutos à base de milho	150	ANVISA (2017)
	Cereais e produtos derivados, milho, trigo	20 – 100	EUROPEAN COMMISSION (2006)
FM B1 e FM B2	Milho em grão para posterior processamento	5000 (B1 + B2)	ANVISA (2017)
	Milho para consumo direto por humanos, alimentos à base de milho para consumo direto por humanos	1000	EUROPEAN COMMISSION (2006)
OCR A	Cereais para posterior processamento, incluindo grão de cevada	20	ANVISA (2017)
	Feijão	10	ANVISA (2011)
T-2 e HT-2	Milho para consumo direto por humanos	100	EUROPEAN COMMISSION (2006)
	Trigo e outros cereais	100	EUROPEAN COMMISSION (2006)
	Produtos baseados em cereais para consumo infantil	15	EUROPEAN COMMISSION (2006)

2.3 ARMAZENAMENTO DE GRÃOS E CONTROLE DE CONTAMINANTES

Para controlar a infecção de fungos em grãos e possível contaminação por micotoxinas após a colheita, os produtores contam com a manipulação das estruturas de armazenamento e das condições de temperatura, umidade e atmosfera na qual os grãos são armazenados.

Grãos armazenados ficam também sujeitos a fatores como umidade, oxigênio, microrganismos e enzimas. A conservação dos grãos depende da sua própria fisiologia, bem como da atividade dos microrganismos presentes. As características fisiológicas dos grãos e da atmosfera de armazenamento, em especial a água disponível (a_w) e temperatura, definem o quão rápida e intensa serão as atividades microbiológicas e enzimáticas que podem vir a causar a deterioração dos grãos, conduzindo à perdas econômicas e valor nutricional da mercadoria (ELIAS; OLIVEIRA e VANIER, 2017).

No entanto, o uso de atmosfera modificada (AM) ou atmosfera controlada (AC) de forma isolada não é suficiente para manter a integridade dos grãos por muito tempo. Reduzir o teor de umidade dos grãos através de procedimentos de secagem antes do armazenamento e remoção de insetos e grãos danificados é muito importante (NAVARRO et al., 2012)

Alto teor de umidade ou a_w acima de 0,85 desempenham papel importante no crescimento de fungos micotoxigênicos em grãos armazenados. A redução do teor de água nos grãos retarda a degradação destes através da inibição do processo respiratório, bem como diminui ou inibe as atividades enzimáticas e proliferação de microrganismos como os fungos (MOHAPATRA et al., 2017).

O armazenamento de grãos de cereais com teor de água entre 120 e 140 g kg⁻¹ e de sementes oleaginosas entre 50 e 80 g kg⁻¹ reduz os danos provocados por fungos nesses grãos (MOHAPATRA et al., 2017). A maioria dos fungos não é capaz de crescer em ambientes com umidade relativa abaixo de 70%, o que corresponde a a_w 0,70. Por isso, grãos com alto teor de água devem ser secos antes do armazenamento para manter a integridade das sementes, a estabilidade microbiológica e o valor nutricional (MOHAPATRA et al., 2017).

A própria respiração dos grãos libera água e energia e proporciona pontos de calor na massa de grãos armazenada, permitindo o crescimento de microrganismos, especialmente fungos (MOHAPATRA et al., 2017).

Dessa forma, o tratamento prévio dos grãos para eliminar insetos e grãos danificados e o armazenamento em condições adequadas são fatores decisivos na conservação de grãos a longo prazo.

2.3.1 Armazenamento convencional

O sistema convencional ainda é a forma mais utilizada de armazenamento de grãos, seja a granel em grandes silos metálicos ou em sacas, em armazéns (Figura 1 a e b, respectivamente).

Figura 1 - (a) armazenamento de grãos em silos metálicos e (b) sacas.



FONTE: EMBRAPA.

Várias desvantagens são associadas ao armazenamento de grãos em silos metálicos, sendo a primeira dificuldade encontrada o elevado custo para a instalação. O armazenamento em silos metálicos pode apresentar falhas ou aberturas na estrutura ao longo do tempo, o que permite troca de calor e umidade entre o ambiente externo e interno e, aliado à grande massa de grãos armazenada, faz com que a

temperatura nos espaços intergranulares aumente, favorecendo o crescimento de fungos e deterioração dos grãos, comprometendo toda a produção armazenada (SILVA, 2010). Por outro lado, a vantagem do armazenamento de grãos em silos metálicos é a possibilidade de armazenar grandes quantidades de grãos, podendo variar entre 35 e 150 mil toneladas de grão, e a possibilidade de uso da estrutura por vários anos seguidos (SILVA, 2010).

Já o armazenamento em sacas permite concentrar o estoque de diferentes culturas em um único armazém, prática que pode trazer a desvantagem da possível contaminação cruzada entre diferentes culturas. A circulação de ar e umidade favorecida através das embalagens pode causar deterioração dos grãos, no entanto, como são armazenados em embalagens menores e individuais, é mais fácil descartar as sacas com grãos danificados do que rejeitar uma produção inteira (SILVA, 2010).

2.3.2 Armazenamento hermético e atmosfera modificada

O armazenamento de grãos é uma parte extremamente importante na cadeia produtiva e tem um grande reflexo no custo e qualidade do produto que chega ao consumidor (COSTA et al., 2010). O baixo índice de unidades de armazenamento nas fazendas gera uma demanda maior no setor de transportes, fazendo com que o custo do produto final seja maior.

A respiração dos organismos vivos (insetos, fungos e dos próprios grãos) em um sistema selado reduz o nível de O_2 de 21% para 2%, enquanto o nível de CO_2 é elevado de 0,035% para aproximadamente 20%. Esse processo natural produz uma atmosfera modificada (AM) capaz de reduzir ou mesmo impedir o crescimento de fungos, que são em sua maioria essencialmente aeróbicos, sendo assim uma alternativa para o armazenamento de grãos por um longo período (NAVARRO et al., 2012; WHITE e JAYAS, 2003).

Em países como Canadá e Argentina (e mais recentemente no Brasil) o armazenamento convencional de grãos vem sendo substituído por sistemas herméticos ou selados, cuja estrutura impede a movimentação de umidade e trocas gasosas entre o ambiente externo e interno (WHITE e JAYAS, 2003).

O armazenamento em sistema hermético vem sendo realizado com os silos-bolsa, que são bolsas plásticas horizontais de comprimento variável (50 – 100 m) que permitem o armazenamento hermético de grãos, com capacidades de armazenamento também variáveis (até 200 toneladas por bolsa, dependendo do tipo de grão). A grande vantagem desse tipo de armazenamento de grãos é a facilidade no manuseio redução de perdas por preservar a qualidade dos grãos. Além disso, permite aos produtores armazenar os grãos em suas próprias fazendas, não sendo necessário aumentar os custos com transporte e armazenamento em grandes unidades de cooperativas, por exemplo. A principal desvantagem encontrada para o armazenamento em silos bolsa é a impossibilidade de utilizar a mesma estrutura para colheitas futuras, pois é necessário cortar os silos bolsa para poder coletar os grãos armazenados. Na Figura 2 é mostrado o armazenamento de grãos nos silos-bolsa.

Figura 2 - Armazenamento de grãos em silos-bolsa.



FONTE: AGROADS.

2.3.3 Atmosfera controlada

A manipulação da atmosfera para armazenamento de grãos vem sendo estudada há mais de 30 anos, sendo a Austrália a pioneira no uso de atmosfera controlada (AC) para o armazenamento de grãos (WHITE e JAYAS, 2003). Dessa forma, o uso de AM e/ou AC tornou-se uma alternativa para o controle convencional

de insetos e fungos, baseado na aplicação de fumigantes e fungicidas, eliminando assim o risco de resíduos desses produtos nos grãos (NAVARRO et al., 2012).

No armazenamento em AM, a concentração dos gases atmosféricos (ou sua pressão parcial) é alterada de forma natural pela respiração dos grãos, insetos e fungos e pode sofrer mudanças de forma gradual durante o período de armazenamento (NAVARRO et al., 2012).

Já na AC, a composição atmosférica é alterada artificialmente mediante a inflação de CO₂ ou N₂ provenientes de cilindros, que tem como objetivo diminuir a concentração de O₂ na atmosfera de armazenamento. A atmosfera assim obtida é controlada, ou seja, os níveis de O₂ e CO₂ são mantidos em um determinado nível durante todo o período de armazenamento e, da mesma forma que a AM, tem como princípio reduzir ou cessar a respiração dos grãos, insetos e fungos, permitindo que os grãos sejam armazenados por longos períodos e não se deteriore e nem percam sua qualidade nutricional (NAVARRO et al., 2012).

2.4 PREPARO DE AMOSTRAS PARA ANÁLISE DE MICOTOXINAS

A presença de micotoxinas em matrizes complexas, constituídas por lipídeos, proteínas e carboidratos, faz com que o grande desafio relacionado à análise dessas toxinas seja a escolha do método de extração adequado, principalmente no que diz respeito ao solvente extrator e pH do meio.

O solvente extrator deve ser capaz de solubilizar todas as micotoxinas estudadas sem promover reações paralelas que possam levar a degradação ou conversão das micotoxinas em outros produtos, e deve ser seletivo, extraindo preferencialmente os analitos em relação aos constituintes de matriz. Além disso, o pH do solvente extrator deve ser tal que favoreça a partição das micotoxinas preferencialmente no solvente orgânico, sem que ocorram reações ou degradação das micotoxinas durante ou após a extração.

2.4.1 Método QuEChERS

O método QuEChERS é o mais amplamente conhecido e empregado para a extração de micotoxinas em diferentes matrizes.

Desenvolvido entre 2001 e 2002 por Michelangelo Anastassiades, o método QuEChERS (Rápido, Fácil, Barato, Efetivo, Robusto e Seguro, do inglês *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*) foi inicialmente proposto para a análise de drogas de uso veterinário em tecidos animais (LUCCI et al., 2012). Após constarem que o método era muito eficaz na extração de resíduos de pesticidas, Anastassiades e colaboradores publicaram, em 2003, o método detalhado para a extração de resíduos de pesticidas em frutas e vegetais (LUCCI et al., 2012; ANASTASSIADES et al., 2003).

O método original consistia na extração dos resíduos de pesticidas de 10 g de amostra com 10 mL de acetonitrila, seguido de uma partição líquido-líquido formada pela adição de 4 g de sulfato de magnésio anidro ($MgSO_4$) e 1 g de cloreto de sódio (NaCl). Os tubos eram submetidos à agitação e centrifugação, e 1 mL do extrato era submetido à uma etapa de purificação por extração em fase sólida dispersiva (d-SPE, do inglês *Dispersive Solid Phase Extraction*) com amina secundária primária (PSA, do inglês *Primary Secondary Amine*) para remoção de componentes polares da matriz e $MgSO_4$ para remoção da água residual. Os tubos eram agitados e centrifugados novamente, e o extrato estava pronto para análise por cromatografia gasosa (GC, do inglês *Gas Chromatography*) (ANASTASSIADES et al., 2003).

O método QuEChERS foi otimizado para ampliar o escopo de pesticidas e matrizes e mais tarde, em 2007, uma nova proposta foi publicada por LEHOTAY et al. (2007), tornando-se o método oficial da Associação das Comunidades Analíticas (AOAC, do inglês *Association of Analytical Communities*). A otimização consistiu em um método no qual 15 g de amostra eram extraídas com 15 mL de acetonitrila contendo 1% de ácido acético, que depois de agitação, também passava por partição líquido-líquido com $MgSO_4$. Nessa nova proposta, 6 g de $MgSO_4$ eram adicionadas com 1,5 g de acetato de sódio (CH_3COONa). O tamponamento do pH do solvente de extração com acetato de sódio foi o diferencial nessa otimização, pois permitiu melhorar a recuperação de pesticidas dependentes do pH. Essa nova versão também incluía uma etapa de purificação do extrato, e era a mesma condição proposta por ANASTASSIADES et al. (2003) (AOAC, 2007).

No ano seguinte, ANASTASSIADES et al. (2008) fizeram mais uma otimização no método QuEChERS cujo objetivo era proporcionar melhores condições para extração analitos mais difíceis em matrizes complexas. Nesta nova versão, 10 g de amostra eram extraídas com 10 mL de acetonitrila, com partição líquido-líquido a partir da adição de 4 g de $MgSO_4$, 1 g de NaCl, 1 g de citrato de tri-sódio diidratado ($Na_3C_6H_5O_7 \cdot 2 H_2O$) e 0,5 g de hidrogenocitrato de di-sódio sesquidratado ($Na_2HC_6H_5O_7 \cdot 1,5 H_2O$). Essa mistura de sais proporcionava pH tamponado na faixa de 5,0 – 5,5, o que permitia a extração de uma grande variedade de pesticidas. Essa versão do método QuEChERS resultou no procedimento padrão europeu, denominado *European Standard EN 15662* (2008).

Todas as variações do método QuEChERS são semelhantes no princípio da extração, partição e purificação. O solvente usado na extração é a acetonitrila, que apresenta polaridade intermediária quando comparado com solventes como metanol, acetona ou acetato de etila, o que faz desse um solvente adequado para extrair uma grande classe de compostos, com polaridades variadas (LUCCI et al., 2012; AGILENT TECHNOLOGIES, 2013).

A grande vantagem da acetonitrila é a facilidade na separação de fases na etapa da partição líquido-líquido, o que é dificultado quando se utiliza acetona ou metanol, por exemplo, devida a miscibilidade relativamente grande desses solventes com água. Também a extração com acetato de etila não é tão eficiente quando comparado à extração com acetonitrila, pois o acetato de etila também apresenta certa miscibilidade com água, além de extrair constituintes de matriz e dificultar a etapa de purificação por d-SPE (LUCCI et al., 2012; AGILENT TECHNOLOGIES, 2013).

A etapa de partição líquido-líquido é realizada pela adição de $MgSO_4$, podendo ou não ser adicionado simultaneamente NaCl. O $MgSO_4$ tem propriedade secante, logo, atrai para si as moléculas de água, induzindo a separação das fases. Além disso, a adição de NaCl também favorece a separação de fase e induz a partição dos analitos na fase orgânica, uma vez que a água tem maior facilidade para solvatar os íons pequenos do sal do que moléculas orgânicas relativamente grandes dos analitos. Além disso, a polaridade da fase orgânica pode ser modificada de acordo com as quantidades de $MgSO_4$ e/ou NaCl adicionadas: adição de menores quantidades

desses sais favorece uma fase orgânica mais polar devido à maior proporção de água, o que pode favorecer a extração de compostos mais polares. Por outro lado, adicionar $MgSO_4$ e/ou $NaCl$ em maiores quantidades reduzirá o teor de água na fase orgânica, diminuindo a polaridade desta fase e favorecendo a extração de analitos apolares ou de polaridade moderada (LUCCI et al., 2012; AGILENT TECHNOLOGIES, 2013).

A etapa de partição líquido-líquido pode conter, além dos sais necessários para induzir a separação de fases, sais que são capazes de tamponar o pH em uma faixa específica, que é o caso do acetato de sódio e dos citratos de sódio. O uso de um ou outro sal depende da faixa de pH que se deseja obter, que por sua vez será dependente da faixa de pH ótima para a extração de cada classe de compostos (pesticidas, fármacos, drogas de uso veterinário).

A etapa seguinte que consta nas versões do método QuEChERS é a purificação, feita pela adição de pequenas quantidades de sorbentes capazes de remover constituintes de matriz do extrato orgânico. Diferentes sorbentes podem ser utilizados de forma individual ou simultânea, dependendo dos constituintes de matriz que se quer remover. Por exemplo, PSA é utilizado para remover constituintes polares, como açúcares, ácidos graxos e proteínas. Já o C18 é utilizado para remover constituintes apolares, como lipídeos, e carbono grafitizado é utilizado para remover pigmentos, esteroides e constituintes apolares (LUCCI et al., 2012; AGILENT TECHNOLOGIES, 2013).

Embora tenha sido inicialmente desenvolvido para extração de drogas de uso veterinário em tecidos animais e resíduos de pesticidas em frutas e vegetais, o método QuEChERS vem sendo constantemente otimizado e aplicado por diversos autores para a extração de micotoxinas em diversas matrizes (EOM et al., 2017; JETTANAJIT; NHUJAK, 2016; KOESUKWIWAT; SANGUANKAEW; LEEPIPATPIBOON, 2014; VARGA et al., 2013)

2.5 MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS PARA A ANÁLISE DE MICOTOXINAS

Desde a sua implementação em 2011 a legislação brasileira, através da Agência de Vigilância Sanitária (ANVISA) tem se adaptado e estipulado prazos para

que os Limites Máximos Tolerados (LMT) para algumas micotoxinas em algumas classes de alimentos sejam reduzidos (ANVISA, 2011). Associado à legislação cada vez mais rigorosa está o aumento na demanda por alimentos cada vez mais isentos de resíduos e contaminantes e com qualidade cada vez maiores. Tendo em vista a necessidade de reduzir cada vez mais os LMT para as micotoxinas, também é cada vez maior a necessidade e disponibilidade de técnicas analíticas com sensibilidade suficiente para detectar e quantificar os contaminantes em concentrações cada vez menores.

Dentre as técnicas analíticas disponíveis para a análise de micotoxinas em diversas matrizes destaca-se a cromatografia líquida (LC, do inglês *Liquid Chromatography*).

2.5.1 Cromatografia líquida

A LC é uma técnica de separação baseada na diferença de solubilidade dos analitos em uma fase móvel líquida e uma fase estacionária, que pode ser um líquido depositado em uma superfície sólida (partículas de sílica) ou um líquido ligado quimicamente às partículas sólidas. A fase móvel é pressionada através da coluna cromatográfica contendo a fase estacionária por meio de uma bomba, e a interação dos analitos presentes na amostra ora com a fase móvel ora com a fase estacionária permitirá a separação dos diversos constituintes (LANÇAS, 2009).

A fase estacionária líquida depositada na forma de um filme sobre as partículas sólidas não é mais utilizada devido às perdas de fase que ocorriam. A fase estacionária mais comum utilizada atualmente consiste em longas cadeias carbônicas ligadas quimicamente às finas partículas de sílica. Esse tipo de fase estacionária apolar é a base da cromatografia líquida por fase reversa (RP, do inglês *Reverse Phase*) e o mecanismo de separação é a partição, onde os analitos são particionados entre a fase móvel e a fase estacionária, proporcionando retenção e separação (LANÇAS, 2009).

A fase estacionária mais comumente conhecida e amplamente empregada é a C18, que consiste em uma cadeia contendo 18 átomos de carbono ligada quimicamente às partículas de sílica. Outras fases podem ser empregadas para alterar a seletividade favorecer a retenção e separação de outras classes de

compostos, como C8 (cadeia com 8 átomos de carbono), CN (chamada de coluna “ciano”, consiste em cadeia carbônica contendo grupo nitrila), fenila (cadeia carbônica contendo grupo fenil), entre outras (LANÇAS, 2009).

A fase móvel consiste em uma combinação de uma fase aquosa contendo algum aditivo químico e uma fase orgânica como o solvente forte responsável pela eluição dos compostos, geralmente acetonitrila ou metanol. Os aditivos mais comuns para a fase móvel são ácidos (acético, fórmico, trifluoracético), bases (hidróxido de amônio, trietilamina) e sais (acetato e formiato de amônio, acetato de sódio), e a escolha destes depende das características físico-químicas dos analitos e do detector empregado (LANÇAS, 2009).

O aperfeiçoamento das colunas cromatográficas e a redução do tamanho das partículas de sílica levaram ao melhoramento do sistema LC como um todo, pois a diminuição do tamanho das partículas faz com que o espaço vazio entre elas também diminua, e a passagem da fase móvel fica dificultada, fazendo com que o sistema seja submetido uma pressão mais elevada. Assim, a instrumentação dos cromatógrafos a líquido foi otimizada de forma a suportar pressões mais elevadas, principalmente as bombas de fase móvel. A técnica LC passou a ser denominada, então, cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, do inglês *High Performance Liquid Chromatography*) (LANÇAS, 2009).

Diversos detectores podem ser empregados em LC, como espectrômetros de massas (MS, do inglês *Mass Spectrometer*), espectrofotômetros na região ultravioleta-visível (UV-VIS) e por fluorescência.

2.5.2 Espectrometria de massas

O detector de massas é o mais importante e mais versátil para a análise de baixas concentrações em misturas complexas, e para combinar as pressões elevadas do eluente proveniente do LC com o alto vácuo do MS, o desenvolvimento de interfaces para tornar as técnicas compatíveis foi necessário, sendo obtido com sucesso ao longo dos anos (LANÇAS, 2009).

Para que um analito possa ser analisado por MS é necessário que este seja ionizado, pois é graças à razão massa/carga, denominada m/z , que cada substância pode ser diferenciada em meio a diversas outras.

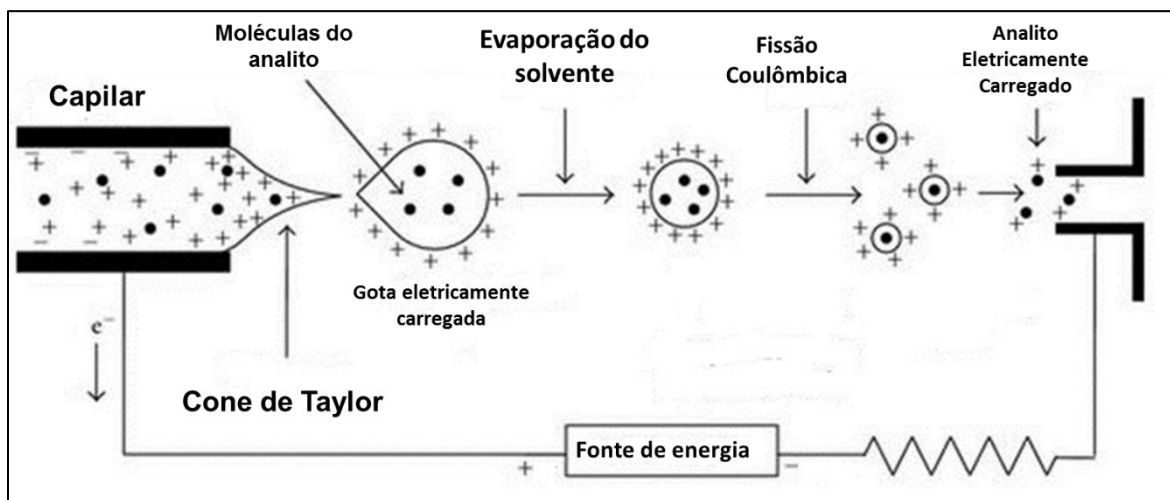
Três formas de ionização à pressão atmosférica se destacam para que o acoplamento LC – MS seja possível: a ionização química à pressão atmosférica (APCI, do inglês *Atmospheric Pressure Chemical Ionization*), na qual uma espécie química é produzida e será responsável por ionizar o analito por transferência de carga, a fotoionização à pressão atmosférica (APPI, do inglês *Atmospheric Pressure Photoionization*), através da qual a ionização das moléculas do analito em fase gasosa são ionizadas por fótons, e a eletronebulização (ESI, do inglês *Electrospray Ionization*) (LANÇAS, 2009), usada nesse trabalho e que será a única discutida em maiores detalhes.

2.5.2.1 Ionização por ESI

A Figura 3 é um esquema do princípio de funcionamento da ionização por ESI. Neste modo de ionização, o eluente da coluna passa por um capilar sob um forte campo elétrico, obtido através da aplicação de uma diferença de potencial entre esse capilar e um contra-eletrodo. Esse campo elétrico induz o acúmulo de cargas na superfície do líquido que se acumula na saída do capilar, formando um *spray* denominado cone de Taylor. Um fluxo de N₂ aquecido promove a evaporação do solvente e a gota contendo as moléculas do analito atingem um tamanho limite, até o ponto em que a repulsão entre as cargas é tão grande que a gota se rompe na chamada fissão Coulômbica, gerando gotas menores eletricamente carregadas (HOFFMANN e STROOBANT, 2007).

A partir daí as moléculas do analito recebem a carga elétrica e são direcionadas para o interior do MS por meio de um cone, responsável por atenuar a pressão atmosférica na qual os íons precursores (analito eletricamente carregado) são gerados e conduzir os íons para o alto vácuo.

Figura 3 - Esquema da ionização por ESI.



Fonte: adaptado de BHANOT, 2016.

O íon precursor de uma molécula é gerado na fonte de ionização previamente à sua transferência para o analisador de massas, e o mecanismo de produção desse íon pode variar de acordo com características do analito (molécula ácida, básica ou neutra, com ou sem pares de elétrons livres), das energias aplicadas no MS e dos aditivos da fase móvel (ARDREY, 2003).

Moléculas básicas apresentam grupos capazes de abstrair prótons (especialmente íons H^+) do solvente no qual encontram-se solubilizados. Dessa forma, passam a ficar carregados positivamente e são analisados em modo positivo no MS (denominado ESI positivo).

Quando uma molécula do analito básico se combina com um íon H^+ , o íon precursor é denominado aduto, sendo representado por $[M+H]^+$ e cuja massa é uma unidade maior que a massa do analito. Adutos também podem ser formados pela combinação de uma molécula do analito com NH_3 (íon precursor representado por $[M+NH_3]^+$, caracterizado por massa com 17 unidades maior que a massa do analito), íons NH_4^+ (íon precursor representado por $[M+NH_4]^+$, caracterizado por massa 18 unidades maior que a massa do analito) e íons Na^+ (íon precursor representado por $[M+Na]^+$, caracterizado por massa 23 unidades maior que a massa do analito). A fonte de espécies para formar adutos com as moléculas do analito é a própria fase móvel do LC, que em geral contém aditivos como ácidos e tampões. Também é comum que

o íon precursor seja produzido pela simples perda de um elétron na estrutura do analito, assim, não há a formação de adutos, mas sim íon molecular. A perda de um elétron deixa a molécula carregada positivamente, sendo analisada por ESI positivo, e o íon precursor assim formado tem a mesma massa da molécula do analito (ARDREY, 2003; HOFFMANN e STROOBANT, 2007; KELLER et al., 2008).

Semelhantemente, moléculas ácidas tendem a perder íons H^+ , e assim ficam carregadas negativamente, sendo analisadas em modo negativo (ESI negativo). Moléculas básicas também podem se combinar com estruturas dos aditivos da fase móvel para formar adutos. Quando a molécula do analito perde um íon H^+ , o íon precursor é representado por $[M-H]^-$ e é caracterizado por ter massa uma unidade menor que a massa do analito. As moléculas do analito básico também podem perder outros grupos funcionais, como por exemplo NH_3 (íon precursor representado por $[M-NH_3]^-$, caracterizado por massa 17 unidades menor que a massa do analito), H_2O (íon precursor representado por $[M-H_2O]^-$, caracterizado por massa 18 unidades menor que a massa do analito (ARDREY, 2003; HOFFMANN e STROOBANT, 2007; KELLER et al., 2008).

Moléculas ácidas e básicas dos analitos sofrem reações de oxidação e redução, respectivamente, durante a formação dos íons precursores, logo, adutos formados pela interação (ganho ou perda) entre a molécula do analito e de átomos de oxigênio também podem ocorrer, gerando íons precursores $[M+O]^+$ ou $[M-O]^-$ (ARDREY, 2003; HOFFMANN; STROOBANT, 2007; KELLER et al., 2008).

Uma vez que as moléculas ionizadas foram geradas, estas são conduzidas ao interior do MS e são focadas por meio de lentes e outros dispositivos nos analisadores de massas. O analisador mais comum, usado nesse trabalho, é o triplo quadrupolo (TQ, do inglês *Triple Quadrupole*), no entanto existe também os analisadores por tempo de voo (ToF, do inglês *Time of Flight*) e os detectores do tipo armadilha de íons (ITD, do inglês *Ion Trap Detector*).

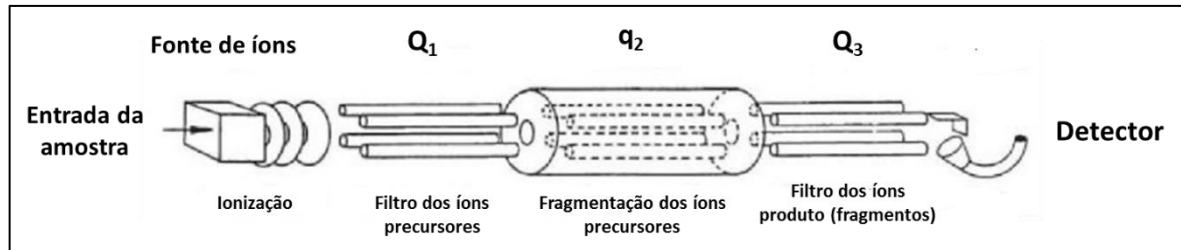
2.5.2.2 Analisador de massas TQ

O analisador mais amplamente empregado devido ao seu custo mais acessível e ao fato de atender bem às necessidades de análises de rotina é o analisador do tipo triplo quadrupolo. O quadrupolo consiste em quatro barras cilíndricas dispostas duas a duas paralelamente, sendo um para carregado positivamente e outro carregado negativamente. Uma voltagem, composta por radiofrequência e corrente direta, é aplicada para que o quadrupolo funcione como um filtro de massas (ARDREY, 2003).

Quando três quadrupolos são dispostos de forma sequencial, como mostra a Figura 4, tem-se o detector de massas do tipo triplo quadrupolo, também denominado analisador de massas sequencial ou em *tandem*, representado por MS/MS.

No primeiro quadrupolo (Q_1), os íons provenientes da fonte de ionização são filtrados pela voltagem aplicada, onde os íons de razões m/z diferentes do analito de interesse (configurada no *software*) e que não interagem com a energia deste primeiro filtro são eliminados do sistema pela bomba turbomolecular. Em seguida, os íons precursores de razão m/z estabelecida e selecionada são direcionados para a célula de colisão, comumente denominada como segundo quadrupolo (Q_2). Neste dispositivo os íons precursores selecionados no Q_1 chocam-se contra moléculas aceleradas de um gás inerte, normalmente argônio, e são fragmentadas. Cada analito, sob determinadas condições de energia de colisão, geram fragmentos específicos e característicos, que são transmitidos para o terceiro quadrupolo. No terceiro quadrupolo (Q_3), os íons produto de cada analito são filtrados novamente, e apenas os fragmentos de razão m/z selecionados são conduzidos ao detector, geralmente uma multiplicadora de elétrons, gerando o sinal elétrico que é convertido em um número adimensional interpretado pelo software. Novamente, os fragmentos que não interagem com a energia do Q_3 são eliminados do sistema por meio da bomba turbomolecular (HOFFMANN e STROOBANT, 2007).

Figura 4 - Esquema do espectrômetro de massas triplo quadrupolo.



Fonte: adaptado de What-When-How.

A grande seletividade e especificidade do detector de massas do tipo triplo quadrupolo se deve justamente ao filtro de massas de íons precursoros e produtos, na qual cada analito, quando em determinadas condições de energia, gera fragmentos característicos. A razão entre o íon precursor e cada um dos íons produto é chamada de *ion-ratio*, e é utilizada para confirmar a presença de um analito em uma amostra desconhecida (HOFFMANN e STROOBANT, 2007).

2.5.2.3 Analisador de massas ToF

O analisador do tipo ToF é considerado uns dois mais simples dispositivos de separação de massas, sendo o ToF linear o mais comum. Os íons precursoros são gerados na fonte de ionização por qualquer que seja a técnica, e são transferidos de forma simultânea e instantânea para o interior do analisador, em um tubo de vôo, onde são acelerados e adquirem a mesma energia cinética. Ao deixarem a região de aceleração, os íons entram na região de campo livre linear, onde são separados de acordo com suas velocidades (constantes). A velocidade de movimentação de cada íon é inversamente proporcional à raiz quadrada de sua massa, ou seja, íons de massa maior atravessam a região de campo livre mais lentamente que íons de massa menor, e chegam ao detector em tempos diferentes, podendo ser separados e identificados (ARDREY, 2003; HOFFMANN e STROOBANT, 2007).

Para o analisador ToF não é definida uma razão m/z como nos analisadores TQ, mas há uma relação entre a massa do íon precursor e o tempo que este leva para chegar ao detector, razão esta que é útil para identificar os analitos de interesse e diferenciá-los de outros compostos (HOFFMANN; STROOBANT, 2007).

2.5.2.4 Analisador de massas ITD

Analisadores de massas do tipo armadilha de íons (IT, do inglês *Ion Trap*) são dispositivos que utilizam campo elétrico oscilante para armazenar íons no seu interior. Todos os íons que entram no MS são capturados pelo IT, onde permanecem rotacionando e oscilando com o campo elétrico. Com o tempo, os íons começam a ser repelidos uns pelos outros e sua trajetória no dispositivo é expandida, até que sejam expelidos e detectados na multiplicadora de elétrons, que amplifica o sinal gerado e transfere o mesmo para o software, para interpretação (ARDREY, 2003; HOFFMANN e STROOBANT, 2007).

2.6 DESENVOLVIMENTO E OTIMIZAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

Validar um método analítico sem sua prévia otimização pode levar a resultados que não atendam aos requisitos de validação ou exigidos por uma legislação, além da perda de tempo, trabalho e consumo de reagentes (MAPA, 2011).

O desenvolvimento e otimização do método analítico precedem a validação e constituem parte importante do processo, pois permitem agregar conhecimentos multidisciplinares aos envolvidos na execução do projeto e podem fornecer informações importantes a respeito da relação entre analito e matriz (MAPA, 2011).

O desenvolvimento pode ser feito inicialmente a partir de métodos validados e publicados em artigos científicos para a mesma combinação de analito-matriz de interesse, ou mesmo para analitos e/ou matrizes com características físico-químicas semelhantes. Caso disponível, o método é inicialmente aplicado sem alterações em ensaios de recuperação, fortificando-se a matriz “branca” para verificar a precisão e exatidão do método para a combinação analito – matriz de interesse. Se for verificado que o procedimento “original” não atende requisitos específicos de precisão e/ou exatidão, otimizações devem ser feitas para que se obtenha resultados que atendam o propósito do método e os requisitos especificados pelo pesquisador e/ou legislação (MAPA, 2011).

A otimização do método pode ser feita a partir de um método existente, explorando diversas variáveis que podem contribuir para alcançar resultados dentro de requisitos específicos, como o uso de solventes de extração com diferentes polaridades, diferentes faixas de pH, o uso ou não de sais para promover separação de fases, entre outros.

2.7 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

Após o desenvolvimento e otimização, o método proposto para um analito (ou um conjunto de analitos) em determinada matriz deve passar pelo processo de validação, para que seja comprovada mediante dados e relatórios a confiabilidade dos resultados obtidos e do método proposto.

A validação de um método analítico tem por objetivo demonstrar, de forma documentada e confiável, que o método desenvolvido e otimizado é adequado para a finalidade proposta.

O Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO) publicou, em 2018, a sétima revisão de um documento com orientações sobre validação de métodos analíticos. O documento não aborda técnicas para analitos ou matrizes específicas, o que o torna mais abrangente e deixa à critério dos laboratórios buscar as técnicas aplicáveis aos seus estudos (INMETRO, 2018).

Além do INMETRO, outros órgãos nacionais e internacionais apresentam guias e manuais com caráter orientativo a respeito da validação de métodos analíticos, bem como critérios de aceitação dos parâmetros e tratamento dos resultados.

Esse é o caso do documento europeu SANTE, que em 2018 disponibilizou o guia para validação de métodos para determinação de resíduos de pesticidas em alimentos e ração (atualizado no final de 2017), e em 2017 disponibilizou o guia para identificação de micotoxinas em alimentos e ração (atualizado no final de 2016) (SANTE, 2017; 2016).

No Brasil, o MAPA foi o órgão responsável por elaborar e disponibilizar um manual cujo objetivo é instruir os laboratórios sobre como realizar validações para métodos analíticos destinados à determinação de resíduos de pesticidas e micotoxinas em alimentos (MAPA, 2011).

Os guias e manuais citados acima listam os mesmos parâmetros que devem ser avaliados na validação de um método analítico: linearidade e curva analítica, determinação do LOD e LOQ, precisão, exatidão, seletividade e efeito matriz.

Para este trabalho, o documento orientativo do INMETRO (2018), o guia europeu SANTE (2016; 2017) e o manual do MAPA (2011) foram usados como base para proceder à validação dos métodos analíticos para determinação de micotoxinas em feijão (aplicado também para milho) e soja, tanto na execução dos parâmetros de validação como na avaliação dos resultados quanto ao atendimento dos critérios de aceitação.

2.7.1 Padrão interno

Padrão interno é uma substância química adicionada às amostras (todas), em quantidade e concentração igual, durante ou após o procedimento de extração (MAPA, 2011). O padrão interno deve ter características físico-químicas semelhantes ao analito e não deve estar presente na amostra.

O padrão interno pode ser usado para quantificar as amostras de concentração desconhecida, sendo adicionado às soluções da curva analítica e às amostras de concentração desconhecida. A razão sinal analítico do analito/sinal analítico do padrão interno é definida na curva analítica, e a razão obtida para as amostras de concentração desconhecida é comparada com a razão da curva analítica. Essa comparação permite determinar a concentração do analito nas amostras desconhecidas, e o método, nesse caso, é denominado quantificação por padronização interna (SKOOG et al., 2006). No entanto, o padrão interno pode ser adicionado às amostras apenas para que seja feito um controle do procedimento de extração e do funcionamento do instrumento de análise.

Quando adicionado às amostras durante a extração (ou imediatamente antes do início do procedimento de extração), o padrão interno é denominado “padrão interno do procedimento”, abreviado como P.I.P. Nesse caso, a função dessa substância é garantir a qualidade da extração nas amostras, o que pode ser verificado pelo sinal analítico do P.I.P no instrumento, que deve ser igual para todas as amostras. Variação no sinal analítico do P.I.P pode indicar falhas no processo extrativo, como perdas por vazamento nos tubos de extração, por exemplo.

Quando adicionado às amostras após a extração, quando as amostras já estão prontas para a análise, o padrão interno é denominado “padrão interno do instrumento”, abreviado como P.I.I. Nesse caso, a função dessa substância é verificar, ao longo das injeções das amostras, se o instrumento utilizado na análise apresenta precisão. Isso pode ser verificado pelo sinal analítico gerado para o P.I.I, que deve ser igual para todas as amostras. Qualquer variação no sinal do P.I.I deve ser investigado para que sejam eliminados os problemas instrumentais.

2.7.2 Linearidade e curva analítica

Linearidade é definida como a capacidade de o método produzir resultados diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra dentro de uma determinada faixa de concentração, produzindo curvas adequadamente ajustadas pela equação de uma reta (MAPA, 2011).

Embora os instrumentos de medição tenham uma faixa dinâmica linear estabelecida, é necessário verificar se a faixa de concentração do analito coincide com a faixa linear do instrumento (INMETRO, 2018). Para isso, a curva analítica deve ser obtida a partir do preparo de soluções analíticas em diferentes concentrações, por padronização externa ou interna (MAPA, 2011).

De acordo com SANTE (2017) e MAPA (2011), são necessários no mínimo cinco níveis de concentração para a confecção da curva analítica. O MAPA (2011) instrui, ainda, que cada nível de concentração seja preparado de forma independente no mínimo três vezes, que cada solução seja injetada mais de uma vez e que o número total de respostas instrumentais seja maior ou igual à 30. Ambos os guias

orientam que o LMT de cada micotoxina deve estar compreendido na faixa linear de trabalho do método e deve, preferencialmente, estar localizado na parte central da curva analítica.

Curvas analíticas lineares são representadas pela equação de uma reta, que relaciona as variáveis concentração do analito e resposta instrumental, conforme a Equação 1.

$$Y = ax + b \quad (\text{Eq. 1})$$

Onde Y é a resposta instrumental obtida para cada solução analítica; a é a inclinação da curva; x é a concentração do analito na solução analítica e b é o intercepto, ou seja, o valor que Y assume quando x é igual à zero.

A equação de regressão linear da curva analítica é acompanhada dos coeficientes de correlação (r) e determinação (r^2). O coeficiente de correlação (r) da reta indica se existe ou não relação linear entre a concentração do analito na solução e a resposta instrumental obtida para essa solução (BRITO et al., 2003).

O coeficiente de determinação (r^2) indica, em porcentagem, o quanto o modelo obtido pela regressão linear consegue explicar os valores observados, sendo, portanto, uma medida do ajustamento do modelo linear (BRITO et al., 2003). Por exemplo, uma reta de regressão linear que apresenta r^2 igual à 0,912 significa que 91,2% da variável dependente pode ser explicado pelo modelo linear dessa curva.

A equação da reta é obtida por regressão linear simples ou ponderada. Para saber qual regressão deve ser aplicada, deve-se observar os resíduos da curva analítica (diferença entre a concentração de cada solução analítica determinada a partir da curva analítica e a concentração nominal de cada solução) em toda a faixa linear, o que pode ser feito por meio de um gráfico de resíduos x concentração, para cada micotoxina. Se for observada homoscedasticidade, ou seja, se os resíduos se distribuem de forma aleatória em torno de zero sem apresentar tendência, a regressão linear simples pode ser aplicada e a equação da reta pode ser determinada por meio do método dos mínimos quadrados ordinários. Se for observada

heteroscedasticidade, ou seja, se os resíduos não são iguais para todos os níveis de concentração, não se distribuem de forma aleatória em torno de zero e apresentam tendência conforme o nível de concentração, a regressão linear ponderada deve ser aplicada, e a equação da reta deve ser determinada através do método dos mínimos quadrados ponderados (MAPA, 2011; INMETRO, 2018).

Ao constatar heteroscedasticidade, é necessário avaliar qual ponderação fornece a equação de reta que melhor representa o conjunto de valores observados. A ponderação escolhida deve ser aquela na qual os resíduos apresentem-se distribuídos de forma aleatória em torno de zero, sem tendências.

Além de avaliar o gráfico resíduos x concentração, a ponderação escolhida deve ser aquela que proporcionar a menor soma de erros relativos, que pode ser calculada de forma simples pela soma dos valores absolutos dos resíduos para cada nível de concentração da curva analítica (ALMEIDA; CASTEL-BRANCO; FALCÃO, 2002).

A linearidade do método deve ser avaliada tanto pelo coeficiente de correlação (r) quanto pelos resíduos da curva analítica, que devem se apresentar distribuídos de forma aleatória em torno de zero, sem tendências, independente do uso de regressão linear ponderada ou não (MAPA, 2011; INMETRO, 2018).

De acordo com BRITO et al. (2003), valores de r entre 0,61 e 0,91 indicam uma forte correlação entre a concentração do analito e a resposta instrumental, enquanto valores entre 0,91 e 0,99 indicam uma correlação fortíssima e r igual à 1, uma correlação perfeita. Em relação ao coeficiente de determinação (r^2), embora o manual do MAPA (2011) oriente que o valor mínimo de r^2 deve ser $\geq 0,995$, não há uma regra ou valores mínimos especificados para esse coeficiente em outros guias (SANTE, 2016 e 2017; INMETRO, 2011).

Os principais guias usados como base para a validação dos métodos analíticos desse trabalho instruem que os resíduos individuais para cada nível de concentração da curva analítica não devem exceder $\pm 20\%$ (SANTE, 2016 e 2017; MAPA, 2011).

2.7.3 Limite de detecção e quantificação

Limite de detecção (LOD, do inglês *Limit of Detection*) é definido como a menor quantidade de analito presente na amostra que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada (INMETRO, 2018).

Embora o LOD possa ser estimado, esse parâmetro deve ser obtido experimentalmente por meio da análise de soluções analíticas contendo baixas concentrações de analito, sendo considerado o LOD a solução que apresentar a menor concentração de analito que gerar resposta instrumental com relação sinal/ruído igual ou maior que 3. É importante que o LOD seja determinado experimentalmente a partir de pelo menos seis réplicas independentes das soluções analíticas (INMETRO, 2018).

A estimativa do LOD do instrumento (LOD_i) pode ser feita a partir da inclinação da curva analítica em solvente orgânico, e o LOD do método (LOD_m) a partir da inclinação da curva analítica em extrato “branco” de matriz.

O limite de quantificação (LOQ, do inglês *Limit of Quantification*) é definido pelo INMETRO (2018) como a menor quantidade de analito na amostra que pode ser determinada quantitativamente com precisão e exatidão aceitáveis, correspondendo ao padrão de calibração de menor concentração, sendo, geralmente, determinado pela análise de amostras com concentrações conhecidas dos analitos em um nível mínimo que possa ser quantificado com recuperação e precisão aceitáveis.

Embora o LOQ também possa ser estimado, o LOQ do método (LOQ_m) para cada analito em cada matriz deve ser determinado experimentalmente por meio dos ensaios de recuperação, sendo considerado o LOQ_m a menor concentração de analito na amostra que pode ser determinada com recuperação entre 70 e 120% e desvio padrão relativo (RSD, do inglês *Relative Standard Deviation*) $\leq 20\%$ (SANTE, 2017).

O INMETRO (2018) e o MAPA (2011) orientam para que o LOQ seja determinado a partir de pelo menos seis réplicas de amostras fortificadas e extraídas conforme procedimento em validação, e SANTE (2017) orienta para que o número de réplicas seja no mínimo cinco.

2.7.4 Seletividade

Devido à existência de amostras complexas, constituídas de compostos com propriedades físico-químicas variadas e que podem ser semelhantes às dos analitos de interesse, é cada vez mais exigido de laboratórios que procedem às análises de resíduos, métodos com alta seletividade.

A seletividade é a extensão na qual um método é capaz de identificar o analito na presença de outros analitos, constituintes de matriz ou outras substâncias potencialmente interferentes (MAPA, 2011). Um método pode apresentar resposta para diversos analitos, mas se puder distinguir um analito de outro, o método é considerado seletivo (INMETRO, 2018).

2.7.5 Efeito matriz

Os constituintes da matriz podem influenciar na linearidade, precisão e exatidão do método e seu efeito deve ser avaliado para cada analito em cada matriz estudada (INMETRO, 2018).

O efeito matriz é um estudo de seletividade que tem por objetivo avaliar a influência dos constituintes da matriz na resposta instrumental dos analitos (MAPA, 2011).

Utilizando a técnica LC-MS/MS com ionização ESI, o efeito matriz é observado pela alteração na ionização dos compostos em matriz quando comparada com a ionização em solvente. A resposta instrumental dos analitos pode sofrer supressão ou melhoramento devido à extração dos constituintes da matriz concomitantemente. Essas substâncias coextraídas competem com os analitos na fonte de ionização do espectrômetro de massas, ocasionando as diferenças na resposta instrumental observadas (KOWALSKI, J., LUPO, S., & COCHRAN, 2013).

Em LC-MS/MS o que se observa geralmente é supressão no sinal dos analitos em matriz, e em níveis de concentração mais baixos esse efeito pode comprometer a precisão e exatidão do método.

O efeito matriz pode ser minimizado com procedimentos de purificação das amostras durante a etapa de extração. Para a análise de micotoxinas, esse efeito é considerado praticamente inexistente quando colunas de imunoafinidade são usadas na etapa de purificação, tendo em vista a especificidade dos adsorventes que contém anticorpos específicos para cada micotoxina (MAPA, 2011).

Procedimentos de purificação podem ser caros e de difícil acesso, além de demandarem mais tempo e maior manipulação das amostras, o que pode ser impraticável para laboratórios que efetuam análises de rotina. Assim, outra forma de compensar o efeito matriz é usar curvas analíticas preparadas em extrato “branco” da matriz, dessa forma, tanto as soluções da curva analítica quanto as amostras fortificadas ou em estudo apresentam a mesma combinação de solventes e matriz (MAPA, 2011).

2.7.6 Exatidão

A exatidão de um método, também denominada veracidade, é definida como o grau de concordância entre o resultado obtido de uma medição e o valor verdadeiro ou valor de referência (MAPA, 2011).

Vários procedimentos podem ser usados para determinar a exatidão de um método, como a análise de materiais de referência certificados, participação em ensaios de proficiência, comparações interlaboratoriais e ensaios de fortificação e recuperação (INMETRO, 2018).

O ensaio de fortificação e recuperação consiste em fortificar (contaminar) uma amostra de matriz “branca” ou com baixa concentração dos analitos em estudo, em pelo menos três níveis de concentração (baixa, média e alta). A recuperação tem por objetivo corrigir erros provenientes das etapas do procedimento de extração (MAPA, 2011).

Esse procedimento é limitado pelo fato de que o analito adicionado não está necessariamente na mesma forma que é encontrado na matriz, podendo ser mais

facilmente extraído e detectado na amostra fortificada, o que pode levar a resultados superestimados de recuperação (INMETRO, 2018).

2.7.7 Precisão

É definida pelo MAPA (2011) como a estimativa da dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostra semelhantes ou padrões, analisadas em condições definidas.

A precisão pode ser expressa de três formas, sendo elas a repetitividade, a precisão intermediária e a reprodutibilidade.

2.7.7.1 Repetitividade

É a precisão intracorrida e é definida como o grau de concordância entre resultados de medições sucessivas, efetuadas nas mesmas amostras ou padrões e nas mesmas condições de análise (MAPA, 2011).

As condições de repetitividade devem ser caracterizadas pelos mesmos operadores, mesmo instrumento de medição utilizado nas mesmas condições, mesmo procedimento de extração e em um curto espaço de tempo. As repetições devem ser independentes e devem contemplar todas as etapas do procedimento, desde o início do processo de extração das amostras até a análise instrumental. Além disso, a repetitividade deve ser avaliada em pelo menos três níveis de concentração (baixa, média e alta). (INMETRO, 2018).

2.7.7.2 Precisão intermediária

Também denominada reprodutibilidade intralaboratorial ou interna, refere-se à precisão intermediária avaliada sobre as mesmas amostras ou padrões e no mesmo

laboratório, mas alterando algumas condições, como analistas e equipamentos diferentes, dia de análise ou condições ambientais (MAPA, 2011).

Os valores de precisão intermediária são, em geral, dependentes do nível de concentração e é o parâmetro que melhor representa a variabilidade dos resultados em um laboratório (INMETRO, 2018).

2.7.7.3 *Reprodutibilidade*

A reprodutibilidade é a precisão interlaboratorial e não consiste em um parâmetro de validação, mas sim um procedimento adotado por um laboratório que busca verificar o desempenho dos seus métodos pela comparação com resultados obtidos por outros laboratórios, executados sobre as mesmas amostras e nas mesmas condições (INMETRO, 2018).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 INSTRUMENTAÇÃO

- ✓ Cromatógrafo a líquido, sistema Acquity UPLC (Waters, EUA) equipado com:
 - Amostrador automático, bomba binária, forno para coluna e sistema de desgaseificação de fase móvel;
 - Coluna cromatográfica BEH C18, 100 mm de comprimento, 2,1 mm de diâmetro interno e partícula de 1,7 μm (Waters, EUA);
- ✓ Detector MS triplo quadrupolo, Xevo TQS (Waters, EUA) operando no modo de ionização por eletronebulização (ESI) positivo;
- ✓ Sistema de aquisição de dados através do *software* MassLynx e TargetLynx versão 4.1 (Waters, EUA);
- ✓ Gerador de Nitrogênio (Peak Scientific, EUA);
- ✓ Sistema de purificação de água Milli-Q® (Millipore, EUA);
- ✓ Moinho (Walita Master, Brasil);

- ✓ Balança analítica de precisão com quatro casas decimais, calibrada (Sartorius, Alemanha);
- ✓ Balança analítica de precisão com duas casas decimais, calibrada (Mettler, Suíça);
- ✓ Mesa agitadora modelo 3016 (GFL, Alemanha);
- ✓ Centrífuga Hareaus Varifugue (Thermo Scientific, Alemanha);
- ✓ Pipetador automático Handy Step, calibrado (Brand, Alemanha);
- ✓ Micropipetas automáticas Eppendorf de volumes variáveis (10 a 100 e 100 a 1000 μ L) (Eppendorf, Alemanha);
- ✓ Homogeneizador Vórtex Genie 2 (Scientific Industries, EUA).

3.2 MATERIAIS

- Tubos de polipropileno, com tampas rosqueáveis, capacidade de 15 e 50 mL (Nalgene, EUA);
- Frascos de vidro para armazenamento de soluções nos volumes de 15 e 25 mL (National Scientific, EUA);
- Balões volumétricos calibrados de 5, 10 e 200 mL (Blau Brand, Alemanha ou Restek, EUA);
- Vials com capacidade para 1,5 mL, tampa de rosca, septo de silicone/PTFE pré-cortado (Waters, EUA);
- Frascos de vidro âmbar para armazenamento de soluções;
- Vidrarias comuns de laboratório.

3.3 SOLVENTES E REAGENTES

- Acetonitrila grau HPLC (Macron, EUA);
- Ácido acético glacial e metanol grau HPLC (J.T. Baker Chemicals, EUA);
- Ácido fórmico (J.T. Baker Chemicals, Holanda);
- Água ultrapura, purificada em sistema Milli-Q (Milford, EUA);
- Sulfato de magnésio anidro e acetato de sódio anidro (J.T. Baker Chemicals, Mexico);
- Formiato de amônio (Sigma – Aldrich, Alemanha).

3.4 GASES

- Argônio 99,999% de pureza (Air Liquide, Brasil), proveniente de cilindro;
- Nitrogênio 99,999% de pureza (Peak Scientific, EUA), proveniente do gerador de nitrogênio.

3.5 ANALITOS ESTUDADOS

Na Tabela 2 encontra-se o fornecedor, pureza do material de referência, data de validade, solvente para o preparo e concentração da solução estoque para cada micotoxina em estudo.

3.6 PREPARO DAS SOLUÇÕES ANALÍTICAS

3.6.1 Preparo da solução estoque

As soluções estoque das micotoxinas ZEA e FM B2 foram preparadas na concentração de 1000 mg L⁻¹, e as soluções estoque das demais micotoxinas foram preparadas na concentração 500 mg L⁻¹, levando em consideração a quantidade do material de referência disponível, a solubilidade e o grau de pureza dos analitos especificados pelo fabricante. O material de referência foi pesado e efetuou-se o

cálculo do volume de solvente a ser adicionado para alcançar as concentrações necessárias.

Os materiais de referência foram pesados diretamente em frasco de vidro âmbar contendo tampa com batoque de teflon, com capacidade de 10 mL. Em seguida, foram dissolvidos no volume calculado do solvente apropriado, fazendo-se o uso de pipetador automático calibrado. Os frascos foram fechados, agitados manualmente e então levados para banho de ultrassom por cerca de 5 minutos para a completa solubilização do sólido.

Tabela 2 - Fornecedor dos materiais de referência, pureza, solvente para o preparo e concentração das soluções estoque.

Analito	Massa molecular (g mol⁻¹)	Fornecedor	Pureza (%)	Solvente	Concentração da solução estoque (mg L⁻¹)
Ocratoxina A	403,82	Sigma-Aldrich	99,30	Tolueno: Ácido Acético (99:1 v/v)	500
Aflatoxina B1	312,27	Sigma-Aldrich	99,83	Metanol	500
Aflatoxina B2	314,29	Sigma-Aldrich	98,00	Metanol	500
Aflatoxina G1	328,27	Fermentek	99,77	Metanol	500
Aflatoxina G2	330,29	Sigma-Aldrich	99,50	Metanol	500
Deoxinivalenol	296,32	Sigma-Aldrich	99,50	Acetonitrila	500
Diacetoxiscirpenol	366,41	Fermentek	99,00	Acetonitrila	500
Zearalenona	318,36	Sigma-Aldrich	99,50	Acetonitrila	1000
Toxina T-2	466,53	Sigma-Aldrich	98,60	Acetonitrila	500
Toxina HT-2	424,49	Sigma-Aldrich	99,50	Acetonitrila	500
Fumonisina B1	721,83	Sigma-Aldrich	99,40	Metanol	500
Fumonisina B2	705,83	Sigma-Aldrich	98,00	Metanol	1000
Citrinina	250,25	Fermentek	99,66	Acetonitrila	500

3.6.2 Preparo da solução mistura

Preparou-se 50 mL de solução mistura, contendo todas as micotoxinas em estudo, utilizando-se acetonitrila como solvente. As micotoxinas foram divididas em dois grupos, de acordo com a faixa de concentração da curva analítica para cada uma. Grupo 1 contendo as micotoxinas OCR A e as AFs (B1, B2, G1 e G2), e Grupo 1, e as micotoxinas DON, DAS, ZEA, T-2, HT-2, FMs B1 e B2.

As curvas analíticas foram obtidas a partir de soluções analíticas preparadas em extrato “branco” da matriz e em solvente orgânico. As soluções analíticas das micotoxinas pertencentes ao Grupo 1 foram preparadas na faixa de concentração de 0,1 a 100 ng mL⁻¹. Para isso, as soluções estoques das micotoxinas do Grupo 1 foram diluídas em uma solução mistura (contendo todas as micotoxinas em estudo) para obter-se uma concentração final de 500 ng mL⁻¹ em balão volumétrico de 50 mL.

Da mesma forma, para as micotoxinas pertencentes ao Grupo 2, preparou-se soluções analíticas na faixa de concentração de 5 a 2500 ng mL⁻¹ diluindo as soluções estoques das micotoxinas do Grupo 2 na solução mistura para obter-se concentração final de 25000 ng mL⁻¹ em balão volumétrico de 50 mL. Completou-se o volume do balão volumétrico até o menisco com acetonitrila, e após homogeneização, a solução mistura foi transferida para frasco âmbar devidamente identificado. Tanto as soluções estoque de cada micotoxina bem como a solução mistura, foram armazenadas em congelador com temperatura controlada (abaixo de -18 °C).

A solução mistura foi utilizada para os ensaios de recuperação e para a confecção das curvas analíticas, sendo que para as micotoxinas do Grupo 1 as concentrações da curva analítica foram 0,1 – 0,2 – 0,5 – 1,0 – 5,0 – 10,0 – 50,0 – 100,0 ng mL⁻¹, e para as micotoxinas do Grupo 2 as concentrações da curva analítica foram 5 – 10 – 25 – 50 – 250 – 500 – 1000 – 2500 ng mL⁻¹.

Para a confecção da curva analítica a partir de soluções analíticas preparadas em solvente orgânico, volumes calculados da solução mistura foram adicionados em oito balões volumétricos calibrados de 5 mL e o volume foi completado com 50% de acetonitrila contendo 1% de ácido acético, quinalfós 25 ng mL⁻¹ e 50% de metanol contendo propoxur 40 ng mL⁻¹.

Para a confecção da curva analítica a partir de soluções analíticas preparadas em extrato “branco” da matriz, as amostras “branco” de feijão preto, milho e soja foram extraídas conforme procedimento de extração descrito em 3.7, até a etapa de

transferência de 500 μL do extrato para vial. Uma curva analítica em solvente metanol e propoxur 40 ng mL^{-1} foi preparada em balão volumétrico de 5 mL no dobro da concentração descrita anteriormente. A curva foi preparada no dobro da concentração, pois uma alíquota da solução de cada balão foi diluída 1:1 (v/v) com o extrato “branco” de cada matriz, conforme cada ensaio. Dessa maneira, tanto as soluções analíticas preparadas em solvente orgânico quanto aquelas preparadas em extrato “branco” da matriz, apresentaram a mesma composição de solventes, bem como as mesmas concentrações. A quantificação foi realizada por padronização externa, ou seja, levando-se em consideração apenas as áreas dos picos cromatográficos de cada analito em estudo.

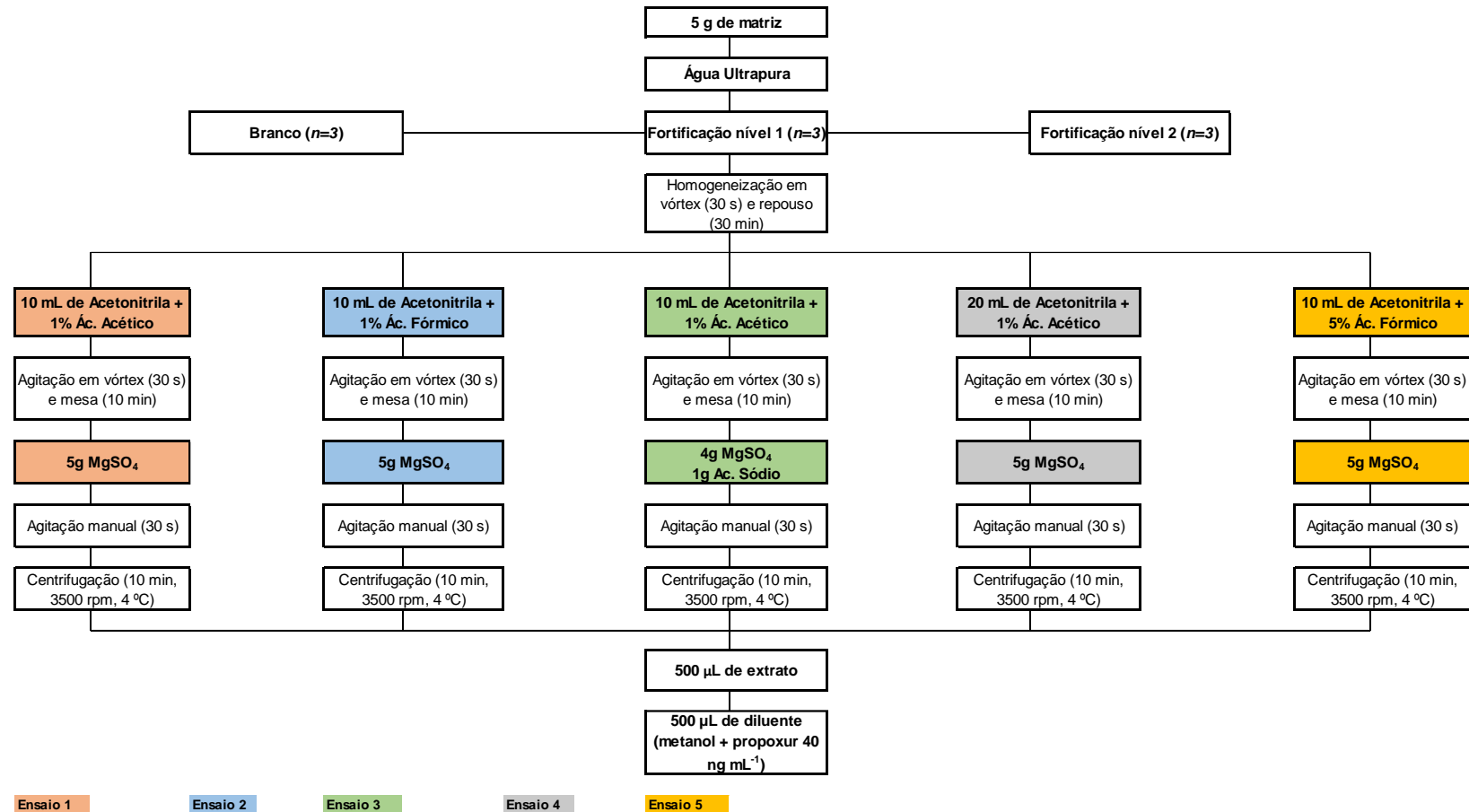
3.7 OTIMIZAÇÃO DO PROCEDIMENTO DE EXTRAÇÃO

Para definir o procedimento de extração das micotoxinas para as matrizes feijão, milho e soja, diferentes ensaios foram executados para verificar qual condição favoreceria a obtenção de percentuais de recuperação entre 70 e 120% e $\text{RSD} \leq 20\%$ para os analitos em estudo, conforme recomenda o SANTE (2017).

Partindo de um método anteriormente validado para determinação de micotoxinas em matrizes de milho e trigo (SOUZA, 2014), denominado Ensaio 1, a otimização do procedimento de extração incluiu a composição do solvente extrator (acidificação da acetonitrila com ácido acético ou ácido fórmico) e ao tamponamento (ou não) com acetato de sódio na etapa de partição. O procedimento adotado para cada ensaio pode ser visto na Figura 5.

Para avaliar cada ensaio, procedeu-se à extração de amostras fortificadas em dois níveis de concentração, em triplicata, juntamente com as amostras “branco”. As amostras foram fortificadas com as micotoxinas do Grupo 1 nas concentrações 2 e 20 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (nível 1 e 2, respectivamente) e com as micotoxinas do Grupo 2 nas concentrações 100 e 1000 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (nível 1 e 2, respectivamente).

Figura 5 - Esquema dos procedimentos de extração dos ensaios executados.



Nível 1 de fortificação: $2 \mu\text{g kg}^{-1}$ para micotoxinas do Grupo 1 e $100 \mu\text{g kg}^{-1}$ para micotoxinas do Grupo 2. Nível 2 de fortificação: $20 \mu\text{g kg}^{-1}$ para micotoxinas do Grupo 1 e $1000 \mu\text{g kg}^{-1}$ para micotoxinas do Grupo 2.

Volume de água ultrapura para preparo do *slurry* diretamente nos tubos de extração: 7,5 mL para milho e 10 mL para feijão e soja.

Para obter-se amostras fortificadas nessas concentrações, volumes de 20 e 200 μL da solução mistura foram adicionados nos tubos (níveis 1 e 2, respectivamente) contendo 5 g de matriz. Em seguida e adicionando-se em seguida água ultrapura para o preparo do *slurry* (7,5 mL para a matriz de milho e 10 mL para as matrizes de feijão e soja). As amostras foram homogeneizadas em agitador vórtex e foram mantidas em repouso por 30 minutos antes do início do procedimento de extração.

3.8 CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS E PARÂMETROS DO ESPECTRÔMETRO DE MASSAS

3.8.1 Condições do cromatógrafo a líquido e espectrômetro de massas

As condições cromatográficas utilizadas no sistema UPLC-MS/MS foram as seguintes:

- Volume de injeção: 2 μL no modo *partial loop with needle overfill (PLNO)*;
- Eluente A: Água: Metanol (90:10, v/v) + 5 mM de formiato de amônio e 0,1% de ácido fórmico;
- Eluente B: Metanol: água (90:10, v/v) + 5 mM de formiato de amônio e 0,1% de ácido fórmico;
- Fase móvel em modo gradiente: a fase móvel iniciou com 90% do eluente A, que foi mantido até 4 minutos, e em 2 minutos atingiu 30%, sendo mantido por mais 5 minutos. Em 1 minuto a fase móvel retornou à proporção inicial, sendo mantida até 14 minutos para equilibrar a coluna antes da próxima injeção.
- Vazão da fase móvel: 0,3 mL min^{-1} ;
- Temperatura do forno da coluna: 45 $^{\circ}\text{C}$;
- Temperatura do injetor: 15 $^{\circ}\text{C}$
- Tempo total de análise: 14 minutos.

Os parâmetros do espectrômetro de massas foram configurados da seguinte forma:

- Ionização a pressão atmosférica por ESI no modo positivo;
- Voltagem do capilar: 3,0 kV;

- Temperatura do gás de dessolvatação: 400 °C;
- Vazão do gás para dessolvatação (N₂): 600 L h⁻¹;
- Vazão do gás no cone de amostragem (N₂): 150 L h⁻¹;
- Vazão do gás de colisão (argônio): 0,15 mL min⁻¹.

Duas transições MRM (monitoramento de reações múltiplas, do inglês *Multiple Reaction Monitoring*) foram escolhidas para cada micotoxina, uma para quantificação e outra para confirmação. Os analitos foram agrupados em diferentes janelas de tempo no método do espectrômetro de massas, chamadas de *Functions*, que foram configuradas para monitorar as transições em tempos específicos. As energias de capilar (3,0 kV) e cone (30 V) foram iguais para todas as micotoxinas. Todas as energias foram otimizadas para cada micotoxina, através da infusão direta no MS de soluções individuais de cada analito. As transições de massa e energias para cada micotoxina estão descritas nos resultados e discussão.

3.9 PROCEDIMENTO DE EXTRAÇÃO

O procedimento para a extração de micotoxinas para as matrizes feijão e soja foi selecionado com base nos resultados dos ensaios executados na etapa de desenvolvimento e otimização.

O Ensaio 2 foi escolhido para ser validado para determinação de micotoxinas em feijão (e posteriormente aplicado para milho) e o Ensaio 5, para determinação de micotoxinas em soja. O procedimento final para extração de micotoxinas em feijão e soja é apresentado nos itens 3.9.1 e 3.9.2, respectivamente.

3.9.1 Feijão

As amostras de feijão foram trituradas à seco em moinho de facas e homogeneizadas manualmente antes da pesagem. Para a extração, 5 g ($\pm 0,05$ g) de feijão triturado foram pesados em tubos falcon de 50 mL e 10 mL de água ultrapura foram adicionados para o preparo do *slurry*. Após homogeneização em vórtex (30 s) e repouso (30 min), as amostras foram extraídas com 10 mL de acetonitrila contendo 1% de ácido fórmico e quinalfós 25 ng mL⁻¹ (padrão interno do procedimento, P.I.P.). Os tubos foram agitados em vórtex por 30 s e em mesa agitadora por 10 min. Para promover a separação de fases, 5 g de MgSO₄ foram adicionados aos tubos e

agitados manualmente por cerca de 30 s. Os tubos foram centrifugados por 10 min, à 4 °C e 3500 rpm, e em seguida 500 µL de extrato foram transferidos com micropipeta automática para vial, sendo diluídos com 500 µL de metanol contendo propoxur a 40 ng mL⁻¹ (padrão interno do instrumento, P.I.I.). Após a diluição, os vials foram fechados, agitados em vórtex por 20 s e posicionados no injetor do cromatógrafo.

3.9.2 Soja

As amostras de soja foram trituradas à seco em moinho de facas e homogeneizadas manualmente antes da pesagem. Para a extração, 5 g (± 0,05 g) de feijão triturado foram pesados em tubos falcon de 50 mL e 10 mL de água ultrapura foram adicionados para o preparo do *slurry*. Após homogeneização em vórtex (30 s) e repouso (30 min), as amostras foram extraídas com 10 mL de acetonitrila contendo 5% de ácido fórmico e quinalfós 25 ng mL⁻¹ (P.I.P). Os tubos foram agitados em vórtex por 30 s e em mesa agitadora por 10 min. Para promover a separação de fases, 5 g de MgSO₄ foram adicionados aos tubos e agitados manualmente por cerca de 30 s. Os tubos foram centrifugados por 10 min, à 4 °C e 3500 rpm, e em seguida 500 µL de extrato foram transferidos com micropipeta automática para vial, sendo diluídos com 500 µL de metanol contendo propoxur a 40 ng mL⁻¹ (P.I.I.). Após a diluição, os vials foram fechados, agitados em vórtex por 20 s e posicionados no injetor do cromatógrafo.

3.10 VALIDAÇÃO DOS MÉTODOS ANALÍTICOS

3.10.1 Linearidade e curva analítica

A linearidade dos métodos analíticos para determinação de micotoxinas em feijão e soja foi avaliada a partir de curvas analíticas em solvente orgânico e extrato “branco” de matriz, em sequências analíticas distintas para cada matriz.

O preparo das soluções analíticas está resumido na Tabela 3. Todas as soluções foram preparadas em balão volumétrico de 5 mL em metanol e P.I.I. Em seguida, 500 µL de cada solução foram transferidos para *vial* e diluídos com o solvente extrator de cada método, gerando assim as curvas analíticas em solvente orgânico. Da mesma forma, 500 µL de cada solução foram transferidos para outros *vials* e diluídos com extrato “branco” de feijão ou soja, cujas amostras de matriz “branco” foram extraídas conforme procedimento definido para cada matriz (item 3.9.1 e 3.9.2).

Cada solução analítica foi preparada de forma independente três vezes e foi analisada duas vezes no UPLC-MS/MS, ou seja, três curvas analíticas em solvente orgânico e três curvas analíticas em matriz, analisadas duas vezes cada.

Primeiramente, analisaram-se seis réplicas de “branco” de solvente, seguido das curvas analíticas em solvente orgânico, da menor para a maior concentração para evitar efeito residual e contaminação entre as amostras. Em seguida, seis réplicas de “branco” da matriz foram analisadas, seguidas das curvas analíticas preparadas em extrato “branco” de matriz, também da menor para a maior concentração. A sequência analítica consistiu da injeção de 54 amostras em solvente orgânico e 54 amostras em matriz, totalizando 108 amostras.

Tabela 3 - Preparo das soluções analíticas para a confecção das curvas analíticas.

Nível	Solução utilizada ¹	Volume de solução (µL)	Volume final ²	Concentração em balão volumétrico (ng mL ⁻¹)		Concentração em vial (ng mL ⁻¹)	
				Grupo 1	Grupo 2	Grupo 1	Grupo 2
1	Solução mistura 2	20	5 mL	0,2	10	0,1	5
2	Solução mistura 2	40	5 mL	0,4	20	0,2	10
3	Solução mistura 2	100	5 mL	1,0	50	0,5	25
4	Solução mistura 1	20	5 mL	2,0	100	1,0	50
5	Solução mistura 1	100	5 mL	10	500	5,0	250
6	Solução mistura 1	200	5 mL	20	1000	10	500
7	Solução mistura 1	400	5 mL	40	2000	20	1000
8	Solução mistura 1	1000	5 mL	100	5000	50	2500

¹ Solução mistura 1: solução contendo todas as micotoxinas em estudo, onde as micotoxinas pertencentes ao grupo 1 (OCR e AFs) encontram-se na concentração 500 ng mL⁻¹ e as micotoxinas do grupo 2 (DON, FMs, HT-2, T-2, DAS, CIT e ZEA) encontram-se na concentração 25000 ng mL⁻¹. Solução mistura 2: solução contendo todas as micotoxinas em estudo, onde as micotoxinas pertencentes ao grupo 1 (OCR e AFs) encontram-se na concentração 50 ng mL⁻¹ e as micotoxinas do grupo 2 (DON, FMs, HT-2, T-2, DAS, CIT e ZEA) encontram-se na concentração 2500 ng mL⁻¹.

² O volume do balão foi completado com o diluente metanol e P.I.I.

Os resíduos das curvas analíticas, para cada analito foram avaliados a partir de gráficos de resíduos versus concentração para verificar a homoscedasticidade, calculados pela Equação 2.

$$RE (\%) = \left(\frac{C_{det} - C_{nom}}{C_{nom}} \right) \times 100 \quad (\text{Eq.2})$$

Onde C_{det} é a concentração de cada solução analítica determinada pela equação da reta e C_{nom} é a concentração nominal de cada solução analítica.

O MAPA (2011) orienta que a regressão linear (para obtenção da equação da reta) seja feita pelo método dos mínimos quadrados ordinários ponderados caso seja observada a heteroscedasticidade dos resíduos da curva analítica.

A regressão linear ponderada tem o objetivo de avaliar o peso (ponderação) que minimiza a soma dos resíduos ponderados para gerar resíduos homoscedásticos, e as ponderações mais comuns testadas são $1/X^2$, $1/X$, $1/X^{0,5}$, $1/Y^2$, $1/Y$ e $1/Y^{0,5}$ (ALMEIDA; CASTEL-BRANCO; FALCÃO, 2002).

Assim, a inclinação (a) e o intercepto (b) da reta de regressão linear ponderada para cada micotoxina em cada matriz foram calculados pelas equações 3 e 4, respectivamente.

$$a = \frac{\sum w_i \cdot \sum w_i x_i y_i - \sum w_i x_i \cdot \sum w_i y_i}{\sum w_i \cdot \sum w_i x_i^2 - (\sum w_i x_i)^2} \quad (\text{Eq. 3})$$

$$b = \frac{\sum w_i x_i^2 \cdot \sum w_i y_i - \sum w_i x_i \cdot \sum w_i x_i y_i}{\sum w_i \cdot \sum w_i x_i^2 - (\sum w_i x_i)^2} \quad (\text{Eq. 4})$$

Onde w_i é a ponderação testada, x_i e y_i as concentrações e respostas instrumentais dos analitos, respectivamente, e i é o i -ésimo par de dados (concentração e resposta instrumental) do total de medidas.

Da mesma forma que os coeficientes a e b , o coeficiente de correlação na regressão linear ponderada foi determinado pela Equação 5.

$$r = \frac{\sum w_i \cdot \sum w_i x_i y_i - \sum w_i x_i \cdot \sum w_i y_i}{\sqrt{\sum w_i \cdot \sum w_i x_i^2 - (\sum w_i x_i)^2} \cdot \sqrt{\sum w_i \cdot \sum w_i y_i^2 - (\sum w_i y_i)^2}} \quad (\text{Eq. 5})$$

Para as três equações apresentadas, substituindo-se w_i por 1, os coeficientes calculados correspondem àqueles da regressão linear simples, do método dos mínimos quadrados ordinários.

A ponderação escolhida para cada micotoxina em cada matriz foi aquela que apresentou a menor soma dos valores absolutos dos resíduos da curva analítica e que proporcionou distribuição aleatória dos resíduos em torno de zero nos gráficos resíduo x concentração.

3.10.2 Limite de detecção e quantificação

O LOD e LOQ do instrumento (LOD_i e LOQ_i , respectivamente) e LOD e LOQ do método (LOD_m e LOQ_m , respectivamente) foram estimados a partir do estudo de linearidade para cada micotoxina, tanto em feijão quanto em soja.

O LOD foi estimado pela Equação 6 e o LOQ pela Equação 7 (INMETRO, 2018). Alternativamente, o LOQ também pode ser calculado pela Equação 8.

$$LOD = 3,3 \times \frac{s}{a} \quad (\text{Eq. 6})$$

Onde s é o desvio padrão da resposta da amostra “branco” e a é a inclinação da curva analítica, obtida pela regressão linear na avaliação da linearidade. Se a amostra “branco” não gerar resposta instrumental, pode ser usado o desvio padrão do menor nível de concentração da curva analítica (INMETRO, 2018).

$$LOQ = 10 \times \frac{s}{a} \quad (\text{Eq. 7})$$

$$LOQ = LOD \times 3,3 \quad (\text{Eq. 8})$$

Onde s é o desvio padrão da resposta da amostra “branco” e a é a inclinação da curva analítica, obtida pela regressão linear na avaliação da linearidade. Se a amostra “branco” não gerar resposta instrumental, pode ser usado o desvio padrão do menor nível de concentração da curva analítica (INMETRO, 2018).

O LOQ_m deve ser determinado experimentalmente através da exatidão e precisão, devendo atender critérios específicos discutidos mais adiante.

3.10.3 Seletividade

A seletividade dos métodos analíticos foi avaliada pela análise de seis amostras “branco” de cada matriz para verificar possíveis interferentes. Para isso, verificou-se a ocorrência (ou não) de pico cromatográfico nas amostras “branco” no mesmo tempo de retenção de cada micotoxina, comparando-se esses picos com os picos cromatográficos das micotoxinas em extrato “branco” de matriz.

Para considerar o método seletivo, os interferentes observados nas amostras “branco” no mesmo tempo de retenção das micotoxinas devem apresentar sinal analítico $\leq 30\%$ do sinal apresentado para o LOQ de cada micotoxina em cada matriz.

3.10.4 Efeito matriz

O efeito matriz foi avaliado para cada micotoxina nas matrizes feijão e soja.

Esse parâmetro foi avaliado conforme instrução do MAPA (2011), que orienta que curvas analíticas em solvente orgânico e em extrato “branco” de matriz sejam preparadas com no mínimo cinco níveis de concentração cada uma, que cada nível de concentração seja preparado de forma independente pelo menos três vezes e que cada solução analítica seja analisada mais de uma vez, gerando uma sequência analítica com pelo menos 30 análises.

Na validação dos métodos para determinação de micotoxinas em feijão e soja, as curvas analíticas em solvente orgânico e extrato “branco” de matriz foram preparadas com oito níveis de concentração, cada nível foi preparado de forma independente três vezes e cada solução foi analisada no UPLC-MS/MS duas vezes, ou seja, três curvas analíticas em solvente orgânico e três curvas analíticas em extrato “branco” de matriz, analisadas duas vezes cada.

Primeiramente, analisaram-se seis réplicas de “branco” de solvente, seguido das curvas analíticas em solvente orgânico, da menor para a maior concentração para evitar efeito residual e contaminação entre as amostras. Em seguida, seis réplicas de extrato “branco” da matriz foram analisadas, seguidas das curvas analíticas preparadas em extrato “branco” de matriz, também da menor para a maior concentração. A sequência analítica consistiu na análise de 54 amostras em solvente orgânico e 54 amostras em matriz, totalizando 108 amostras. O efeito matriz foi avaliado em sequências analíticas distintas para feijão e soja.

De acordo com SANTE (2017), as respostas obtidas para cada analito em solvente e extrato “branco” de matriz devem ser comparadas e o efeito matriz é considerado não-significativo se for $\leq \pm 20\%$. O guia europeu descreve a necessidade de usar curvas analíticas em extrato “branco” de matriz se o efeito matriz for significativo ($\geq \pm 20\%$).

Apesar do Documento Guia SANTE (2017) descrever de forma resumida a forma de avaliação do efeito matriz, denominando este como significativo ou não, o MAPA (2011) instrui que testes estatísticos devem ser aplicados para determinar se o efeito matriz é ou não significativo. O teste estatístico indicado é o teste *t* de Student e deve ser calculado conforme a Equação 9.

$$t_{a,calc} = \frac{|a_1 - a_2|}{\sqrt{\frac{s_{a1}^2}{N_{x1}} + \frac{s_{a2}^2}{N_{x2}}}} \quad (\text{Eq. 9})$$

Onde a_1 e a_2 são as inclinações das curvas analíticas em solvente orgânico e em extrato “branco” de matriz, s_{a1}^2 e s_{a2}^2 as variâncias e N_{x1} e N_{x2} o número de soluções das curvas analíticas, respectivamente.

Para comparar o t calculado ($t_{a,calc}$) com o t tabelado (t_{tab}) o número de graus de liberdade (G.L.) deve ser calculado pela Equação 10.

$$G.L. = \frac{\left(\frac{s_{a1}^2}{N_{x1}} + \frac{s_{a2}^2}{N_{x2}}\right)^2}{\frac{\left(\frac{s_{a1}^2}{N_{x1}}\right)^2}{N_{x1} + 1} + \frac{\left(\frac{s_{a2}^2}{N_{x2}}\right)^2}{N_{x2} + 1}} - 2 \quad (\text{Eq. 10})$$

Considerando um nível de confiança de 95%, se $t_{a,calc}$ for menor que t_{tab} , pode-se concluir que as duas curvas analíticas têm a mesma inclinação (MAPA, 2011).

Os termos a_1 e a_2 (referentes à inclinação das curvas) podem ser substituídos por b_1 e b_2 e as equações 9 e 10 podem ser usadas para comparar o intercepto das duas curvas. Se tanto a inclinação quanto o intercepto de ambas as curvas forem estatisticamente iguais, pode-se dizer que não há efeito de matriz significativo (MAPA, 2011).

Esse teste estatístico para determinar se o efeito matriz é significativo ou não também foi aplicado por FRASELLE et al. (2007) no estudo de nitroimidazoles e metabolitos em plasma suíno por HPLC-MS/MS.

O teste t de Student é útil para dizer se o efeito matriz é significativo ou não, mas o grau de influência da matriz na resposta instrumental dos analitos, dado em porcentagem, pode ser calculado a partir das inclinações das retas de regressão linear das curvas analíticas, conforme Equação 11.

$$EM (\%) = \left(\frac{a_1}{a_2} - 1\right) \times 100 \quad (\text{Eq. 11})$$

Essa é a forma mais comum e prática de estimar o quanto a matriz pode influenciar a resposta instrumental para os analitos, e foi aplicada por outros autores (KOESUKWIWAT; SANGUANKAEW e LEEPIPATPIBOON, 2014; SULTYOK et al., 2006 e KIM et al., 2017).

3.10.5 Exatidão (ensaios de fortificação e recuperação)

A exatidão dos métodos analíticos foi avaliada por ensaios de fortificação e recuperação.

Seis réplicas das amostras “branco” de feijão e soja foram fortificadas com quantidade conhecida da solução mistura (na concentração 500 ng mL⁻¹ para as micotoxinas do grupo 1 e 25000 ng mL⁻¹ para as micotoxinas do grupo 2) contendo todas as micotoxinas em estudo. As amostras foram fortificadas em quatro níveis de concentração, sendo 2, 5, 10 e 20 µg kg⁻¹ para as micotoxinas do grupo 1, que correspondem às concentrações 100, 250, 500 e 1000 µg kg⁻¹ para as micotoxinas do grupo 2. Os volumes de solução mistura necessários para fortificar as amostras nesses níveis de concentração encontram-se na Tabela 4.

Após a fortificação, as amostras permaneceram em repouso durante 30 minutos antes de iniciar o procedimento de extração, específico para cada matriz. Além das amostras fortificadas, seis réplicas de amostra “branco” de cada matriz foram extraídas junto com as demais para avaliar possível contaminação da matriz. O extrato das amostras “branco” de cada matriz foi reservado para preparar a curva analítica injetada previamente às amostras fortificadas, para que fosse possível a quantificação das mesmas.

A recuperação é calculada de acordo com a Equação 12.

$$\text{REC (\%)} = \left(\frac{C_1 - C_2}{C_3} \right) \times 100 \quad (\text{Eq. 12})$$

Onde C_1 é a concentração do analito na amostra fortificada (concentração recuperada), C_2 é a concentração do analito na amostra não fortificada (caso a matriz apresente baixa concentração do analito) e C_3 é a concentração do analito adicionada à amostra.

De acordo com o Documento Guia SANTE (2017), o critério de aceitação para os ensaios de fortificação é que os percentuais de recuperação devem estar na faixa de 70 a 120%, sendo aceitável recuperações de até 40%, desde que apresente boa precisão. O guia europeu alerta para que percentuais de recuperação não devem estar abaixo de 30% e acima 140%.

Tabela 4 - Volumes de solução mistura necessários para fortificar as amostras em quatro níveis de concentração e fator de diluição do método.

Nível de fortificação	Concentração (µg/kg)		Volume de solução mistura (µL)	Massa absoluta de micotoxina adicionada à amostra (ng)		Volume de solvente (mL)	Quantidade de amostra (g)	Concentração das micotoxinas no vial antes da injeção (ng mL ⁻¹)		Fator do método ³
	Grupo 1 ¹	Grupo 2 ²		Grupo 1	Grupo 2			Grupo 1	Grupo 2	
	1	2		100	20			10	500	
2	5	250	50	25	1250	10	5	1,25	62,5	4
3	10	500	100	50	2500	10	5	2,5	125	4
4	20	1000	200	100	5000	10	5	5	500	4

¹ Micotoxinas do grupo 1: OCR A, AF B1, AF B2, AF G1 e AF G2.

² Micotoxinas do grupo 2: DON, FM B1, FM B2, T-2, HT-2, ZEA, DAS e CIT.

³ Fator de diluição do método, igual para as micotoxinas do grupo 1 e grupo 2.

O MAPA (2011) orienta que o método analítico proposto deve atender critérios de desempenho específicos de acordo com cada micotoxina e o nível de concentração que constam Tabela 5, os quais são os mesmos critérios apresentados pela COMISSÃO DAS COMUNIDADES EUROPEIAS (2006).

Tabela 5 - Requisitos específicos para valores de recuperação e precisão de cada micotoxina estudada, conforme UE e MAPA.

Micotoxina	Concentração (g kg ⁻¹)	Recuperação recomendada (%)	RSD _r (%)
AFs⁽¹⁾ (B1, B2, G1 e G2)	< 1,0	50 - 120	0,66 x RSD _R ⁽²⁾
	1 – 10	70 – 110	
	> 10	80 - 110	
OCR A	< 1	50 - 120	≤ 40
	≥ 1	70 - 120	≤ 20
DON	≥ 100 ≤ 500	60 - 110	≤ 20
	> 500	70 - 120	≤ 20
ZEA	≤ 50	60 - 120	≤ 40
	> 50	70 - 120	≤ 25
FM B1 e FM B2 (Separadamente)	≤ 500	60 - 120	≤ 30
	> 500	70 - 110	≤ 20
T-2 e HT-2 (Separadamente)	12 - 250	60 - 130	≤ 30
	> 250	60 - 130	≤ 25
CIT	Todas as faixas de concentração	70 – 120	0,66 x RSD _R ⁽²⁾

(1) Esses critérios aplicam-se para AF B1 e para a soma de B1, B2, G1 e G2.

(2) RSD_R = desvio padrão relativo obtido em condições de reprodutibilidade.

Fonte: adaptado de MAPA (2011) e COMISSÃO DAS COMUNIDADES EUROPEIAS (2006).

3.10.6 Precisão

3.10.6.1 Repetitividade

A precisão intracorrida foi avaliada através dos ensaios de fortificação e recuperação para as micotoxinas em feijão e soja, em sequências analíticas distintas.

A média dos percentuais de recuperação das seis réplicas foi calculada para cada micotoxina, em cada um dos quatro níveis de fortificação. O RSD, que é a forma mais comum de expressar a precisão, também foi calculado para cada nível de fortificação, conforme Equação 13.

$$\text{RSD (\%)} = \left(\frac{s}{x_m} \right) \times 100 \text{ (Eq.13)}$$

Onde s é o desvio padrão amostra e x_m é o valor médio determinado.

3.10.6.2 Precisão intermediária

A precisão intermediária também foi avaliada por meio dos ensaios de fortificação e recuperação, no entanto, o parâmetro foi executado por dois analistas em dias distintos. Cada analista realizou o procedimento desde a etapa de fortificação das amostras de matriz “branca” até a diluição final.

A média dos percentuais de recuperação das seis réplicas foi calculada para cada micotoxina, em cada um dos quatro níveis de fortificação. O RSD também foi calculado para cada nível de fortificação, conforme Equação 13 (item 3.10.6.1). Foi obtida a média das médias entre os analistas e calculado o desvio padrão e RSD para cada nível de fortificação, para cada micotoxina em ambas as matrizes.

O MAPA (2011) orienta que o RSD da precisão intermediária não exceda os valores apresentados na Tabela 6, cujos valores dependem da faixa de concentração do analito. A tabela apresentada no manual é mais extensa e mostra valores de RSD para níveis de concentração de até kg kg^{-1} (MAPA, 2011), no entanto, na Tabela 7 são apresentados os valores permitidos de RSD de precisão intermediária apenas para a faixa de concentração usada neste trabalho.

Tabela 6 - Critérios de aceitação da precisão intermediária.

Concentração (c)	RSD (%)
$c < 1 \mu\text{g kg}^{-1}$	35
$1 \mu\text{g kg}^{-1} \leq c < 10 \mu\text{g kg}^{-1}$	30
$10 \mu\text{g kg}^{-1} \leq c < 100 \mu\text{g kg}^{-1}$	20
$100 \mu\text{g kg}^{-1} \leq c < 1 \text{mg kg}^{-1}$	15

Fonte: adaptado de MAPA, 2011.

3.11 ARMAZENAMENTO DE GRÃOS EM ATMOSFERA CONTROLADA

3.11.1 Obtenção e limpeza dos grãos antes do armazenamento

As sementes dos cultivares Garapiá (feijão carioca) e Fepagro 26 (feijão preto) foram obtidas da Fundação Agropecuária de Pesquisa Agropecuária (FEPAGRO) de Júlio de Castilhos – RS. As sementes dos cultivares Caupi (feijão branco e feijão vermelho) foram obtidas de Sinop - MT, e as sementes de milho foram obtidas de Jaguari - RS. As sementes de soja cultivares Brasmax Bônus IPRO, Brasmax Desafio RR e Brasmax Ultra IPRO foram obtidas de Sinop – MT, e as sementes do cultivar Tec IRGA 6070 foram obtidas de Santa Maria – RS.

Todos os cultivares passaram por limpeza para remoção de materiais estranhos e grãos danificados previamente ao armazenamento em AC. Para remoção de materiais indesejáveis mais leves que as sementes, os grãos foram separados por tamanho e peso utilizando-se máquina de ventilador e peneiras, cujo funcionamento consiste em passagem de corrente de ar sob uma bancada com superfície porosa que separa as sementes por peso específico. As sementes foram secas até teor de umidade de 11%.

3.11.2 Análise dos grãos previamente ao armazenamento em atmosfera controlada

Amostras de cada cultivar (cerca de 100 g) foram enviados ao CEPARC para avaliar a ocorrência de micotoxinas previamente ao início do armazenamento em atmosfera controlada. O processamento e extração das amostras ocorreu conforme itens 3.9.1 e 3.9.2.

Esse procedimento teve o objetivo de comparar a ocorrência (ou não) de micotoxinas antes e após o período de armazenamento dos grãos, para dizer, assim, se as condições estudadas foram eficazes no controle da produção de micotoxinas.

3.11.3 Armazenamento dos grãos em atmosfera controlada

Cerca de 1,0 kg de cada cultivar foi armazenado em câmaras com atmosfera controlada para simular o armazenamento dos grãos em sistemas herméticos. Os cultivares de feijão e soja foram submetidos à 15 tratamentos, descritos na Tabela 7. Já as sementes de milho foram submetidas à 6 tratamentos, descritos na Tabela 8.

O estudo de armazenamento dos grãos em AC foi realizado pelo Núcleo de Pesquisa em Pós-Colheita, no Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM).

Durante o armazenamento dos grãos, as temperaturas das câmaras de armazenamento foram monitoradas duas vezes ao dia e as pressões parciais dos gases foram monitoradas semanalmente e ajustadas conforme necessidade, a fim de manter a concentração desejada em cada atmosfera.

Após seis meses de armazenamento, 100 g de cada cultivar foram acondicionados em sacos de papel e transferidos para o Centro de Pesquisa e Análise de Resíduos e Contaminantes (CEPARC), na UFSM, onde foram mantidos em freezer com temperatura controlada de -18 °C e foram analisados após o desenvolvimento, otimização e validação dos métodos analíticos para determinação de micotoxinas.

Tabela 7 - Condições de atmosfera controlada aplicadas no estudo de armazenamento de feijão e soja.

Tratamento	Temperatura (°C)	Atmosfera
T1	20	Ambiente ¹
T2	20	1,0 kPa de O ₂
T3	20	2,0 kPa de O ₂
T4	20	2,0 kPa de O ₂ + 30 kPa de CO ₂
T5	20	2,0 kPa de O ₂ + 80 kPa de CO ₂
T6	25	Ambiente ¹
T7	25	1,0 kPa de O ₂
T8	25	2,0 kPa de O ₂
T9	25	2,0 kPa de O ₂ + 30 kPa de CO ₂
T10	25	2,0 kPa de O ₂ + 80 kPa de CO ₂
T11	30	Ambiente ¹
T12	30	1,0 kPa de O ₂
T13	30	2,0 kPa de O ₂
T14	30	2,0 kPa de O ₂ + 30 kPa de CO ₂
T15	30	2,0 kPa de O ₂ + 80 kPa de CO ₂

¹ Ambiente: em ar sem controle da pressão parcial dos gases O₂ e CO₂.

Tabela 8 - Condições de atmosfera controlada aplicadas no estudo de armazenamento de milho.

Tratamento	Temperatura (°C)	Atmosfera
T1	20	2,0 kPa de O ₂ , teor umidade 11%
T2	20	Ambiente ¹ , teor umidade 14%
T3	25	2,0 kPa de O ₂ , teor umidade 11%
T4	25	Ambiente ¹ , teor umidade 14%
T5	30	2,0 kPa de O ₂ , teor umidade 11%
T6	30	Ambiente ¹ , teor umidade 14%

¹ Ambiente: em ar sem controle da pressão parcial dos gases O₂ e CO₂.

3.11.4 Análise estatística dos resultados

A concentrações média de micotoxinas quantificadas nos tratamentos estudados foram avaliadas estatisticamente pelo método de Análise de Variância (ANOVA, do inglês *Analysis of Variance*), utilizando a função própria para isso no editor de planilhas Microsoft Office Excel 2013. A ANOVA tem como objetivo verificar

se os resultados obtidos para as diferentes combinações de atmosfera e temperatura apresentam diferenças significativas entre si.

Foi utilizada a função ANOVA: fator duplo sem repetição, sendo um fator a condição de atmosfera e outro a temperatura de armazenamento. A análise estatística foi aplicada considerando erro menor que 5% ($p < 0,05$), ou, 95% de confiança.

Em caso de resultado significativamente diferente, uma segunda análise foi feita pelo teste-*t* para duas amostras, presumindo variâncias diferentes, para identificar quais resultados foram responsáveis pela diferença estatística.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 ESTABELECIMENTO DAS CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS E DA ESPECTROMETRIA DE MASSAS

Soluções individuais das micotoxinas em estudo foram infundidas diretamente no espectrômetro de massas para o ajuste das transições (de razão massa/carga específicas para cada micotoxina) e energias de colisão. Após esse procedimento, uma solução de cada micotoxina foi injetada individualmente no equipamento de UPLC-MS/MS a fim de determinar o tempo de retenção (t_R) de cada uma. A Tabela 9 mostra o íon precursor monitorado para cada micotoxina e o tipo de aduto formado, bem como as respectivas energias envolvidas e os tempos de retenção.

Tabela 9 – Dados de íon precursor, adutos, transições de massas, energias e tempo de retenção para cada micotoxina.

Micotoxina	Íon precursor (m/z)	Aduto formado	Transição de Quantificação		Transição de Confirmação		t _R (min)
			Íon produto (m/z)	Energia de Colisão (eV)	Íon produto (m/z)	Energia de Colisão (eV)	
Deoxinivalenol	296,0	M ⁺⁺	249,2	12	231,1	12	3,70
Aflatoxina G2	331,1	[M+H] ⁺	245,1	30	275,1	30	4,30
Aflatoxina G1	329,1	[M+H] ⁺	243,1	25	214,3	25	5,30
Aflatoxina B2	315,1	[M+H] ⁺	259,1	30	287,1	26	6,45
Aflatoxina B1	313,1	[M+H] ⁺	241,1	37	285,0	23	7,35
Fumonisina B1	722,0	[M+H] ⁺	352,4	30	334,4	30	7,40
Diacetoxiscirpenol	383,2	[M+NH ₃] ⁺	307,3	10	289,3	15	7,45
Citrinina	250,1	M ⁺⁺	233,1	25	191,2	25	7,45
Fumonisina B2	705,2	M ⁺⁺	336,3	30	318,5	30	7,70
Toxina T-2	483,1	[M+O] ⁺	215,1	20	185,1	30	7,75
Ocratoxina A	403,0	M ⁺⁺	239,1	20	221,1	35	7,80
Zearalenona	318,0	M ⁺⁺	187,2	20	185,2	20	7,90

t_R: tempo de retenção.

FONTE: autor.

4.2 DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO ANALÍTICO: AVALIAÇÃO DA EXATIDÃO E PRECISÃO

Os percentuais de recuperação para as micotoxinas estudadas nas matrizes feijão preto, milho e soja, extraídas conforme os ensaios de 1 a 5 (itens 4.2.1 até 4.6), encontram-se nas Tabelas 10, 11 e 12, respectivamente. Os valores entre parênteses após cada recuperação referem-se ao RSD (desvio padrão relativo, do inglês *Relative Standard Deviation*), também em porcentagem.

Nesses resultados não se aplicou nenhum teste estatístico de comparação de médias porque a escolha do método consistiu apenas em identificar o teste que proporcionou recuperação entre 70 e 120%, $RSD \leq 20\%$, maior número de micotoxinas com recuperação entre 70 e 120% e $RSD \leq 20\%$ e perfil cromatográfico.

4.2.1 Ensaio 1

Ao avaliar o resultado do ensaio 1 para as matrizes estudadas, observou-se recuperações entre 55 e 68% para FM B1 e FM B2 em ambos os níveis de fortificação, tanto para feijão preto quanto para milho (exceto nível 2 de fortificação da FM B2 em milho, que atingiu 78% de recuperação). Também para a CIT obteve-se recuperação baixa, entre 24 e 42% para feijão e milho (exceto para o segundo nível de fortificação em milho, cuja recuperação foi de 81%).

Os resultados de recuperações obtidos para o ensaio 1 estão abaixo da faixa recomendada pelo SANTE (2017), entre 70 e 120% e discordam de SOUZA (2014), que validou o mesmo procedimento para avaliar essas micotoxinas em milho e trigo, obtendo recuperações entre 74 e 100% para todos os analitos, em ambas as matrizes estudadas.

Além do documento SANTE (2017), a faixa de recuperação recomendada para diversas micotoxinas e seus respectivos valores de RSD também é recomendada pela União Europeia (UE) em seu Regulamento N° 401/2006 de 23 de fevereiro de 2006, que já foram mostrados na Tabela 6, item 3.10.5.

Considerando esse regulamento e avaliando as micotoxinas que apresentaram recuperações abaixo do que recomenda o SANTE (2017), apenas a recuperação das

FM B1 e B2, no primeiro nível de fortificação, e em feijão, atenderia a faixa recomendada.

REICHERT et al. (2017) reportaram recuperações dentro da faixa recomendada de 70 a 120% e $RSD \leq 20\%$ para AFs (B1, B2, G1 e G2), FMs (B1 e B2), OCR A, ZEA, DAS, DON, T-2 e HT-2 em grãos de café verde, classificada pelo SANTE (2017) como uma matriz difícil/única. Para isso, os autores otimizaram e validaram um método baseado no método QuEChERS utilizando acetonitrila com 1% de ácido acético como solvente extrator, sem adição de tampão, para avaliar simultaneamente micotoxinas e pesticidas nesta matriz.

SOLEIMANY et al. (2012) também validaram uma modificação do método QuEChERS utilizando como solvente extrator acetonitrila: água: ácido acético (79:20:1, v/v/v) para determinação dessas mesmas micotoxinas em diversos cereais (arroz, aveia, trigo, cevada e farinha de milho). Os autores não realizaram a etapa de partição com sulfato de magnésio no procedimento de extração, apenas centrifugaram as amostras e diluíram os extratos da mesma forma que foi feito por SULYOK et al. (2006). Porém, diferentemente dos resultados obtidos no ensaio 1, os autores reportaram recuperações entre 83 e 103% para todas as micotoxinas avaliadas. No entanto, esses últimos autores relataram recuperações baixas para FM B1 e B2 (entre 34 e 50%) utilizando o mesmo método.

Também foram observadas recuperações abaixo da faixa recomendável para algumas micotoxinas avaliadas em soja, como as FMs (B1 e B2) que apresentaram recuperações abaixo de 40% e CIT abaixo de 30%, para os dois níveis de fortificação. A micotoxina DAS também apresentou recuperação abaixo da faixa recomendável, porém entre 54 e 65% para os dois níveis de fortificação.

A diferença de recuperação observada para as micotoxinas extraídas conforme o ensaio 1, em relação ao que foi reportado por SOUZA (2014) e SOLEIMANY et al. (2012), pode ser atribuída as diferentes composições das matrizes. A Tabela 13 reúne informações a respeito da composição centesimal de algumas matrizes, obtidas a partir do banco de dados do *United States Department of Agriculture*, embora essa composição possa variar de acordo com o cultivar e condições ambientais.

Segundo HUMPF; RYCHLIK e CRAMER (2018), micotoxinas podem estar presentes nos alimentos na forma livre e assim ser facilmente extraídas das matrizes através de procedimentos de extração bem estabelecidos, ou podem ser encontradas associadas aos constituintes da matriz, especialmente amido e proteínas.

As micotoxinas associadas à matriz podem se encontrar ligadas de forma covalente às proteínas e amido, podendo ser extraídas por meio de tratamento químico da amostra, como hidrólise ácida ou básica, ou podem estar ligadas de forma não-covalente, consistindo em um aprisionamento físico da micotoxina na estrutura da matriz que pode ser responsável pelas baixas recuperações (DALL'ASTA; BATTILANI, 2016; HUMPF; RYCHLIK e CRAMER, 2018), como foi obtido para algumas micotoxinas (FMs e CIT em feijão, milho e soja; DAS em feijão e soja) conforme ensaio 1.

As recuperações para as demais micotoxinas avaliadas nas três matrizes conforme ensaio 1, apresentaram-se dentro da faixa recomendada pelo SANTE (2017).

Tabela 10 - Valores de recuperação e de RSD para as micotoxinas fortificadas (n=3) em feijão preto.

Ensaio	1		2		3		4		5	
	Nível 1 Rec. (RSD) %	Nível 2 Rec. (RSD) %	Nível 1 Rec. (RSD) %	Nível 2 Rec. (RSD) %	Nível 1 Rec. (RSD) %	Nível 2 Rec. (RSD) %	Nível 1 Rec. (RSD) %	Nível 2 Rec. (RSD) %	Nível 1 Rec. (RSD) %	Nível 2 Rec. (RSD) %
OCR A	138 (39)	100 (2)	99 (11)	84 (3)	-	58 (5)	101 (2)	104 (3)	72 (16)	78 (12)
AF B1	130 (19)	83 (6)	111 (13)	66 (6)	-	-	130 (20)	86 (4)	65 (10)	52 (6)
AF G1	91 (16)	86 (15)	-	83 (5)	43 (58)	87 (5)	-	112 (9)	-	74 (7)
AF B2	-	72 (12)	54 (21)	73 (4)	61 (16)	99 (10)	94 (10)	73 (17)	-	95 (10)
AF G2	-	71 (12)	-	73 (7)	-	103 (10)	-	77 (12)	-	44 (127)
DON	78 (1)	79 (2)	74 (12)	70 (5)	82 (2)	80 (1)	91 (2)	87 (2)	79 (7)	71 (9)
FM B1	55 (5)	58 (1)	92 (7)	81 (10)	-	-	59 (3)	68 (3)	73 (8)	83 (6)
FM B2	65 (3)	68 (1)	87 (4)	79 (8)	3 (23)	2 (14)	71 (1)	74 (4)	73 (8)	79 (7)
T-2	31 (6)	36 (2)	34 (4)	42 (7)	26 (3)	48 (3)	19 (9)	27 (5)	36 (22)	55 (2)
HT-2	105 (2)	131 (3)	127 (4)	107 (7)	66 (4)	110 (2)	99 (14)	122 (7)	104 (12)	98 (9)
ZEA	89 (5)	85 (1)	89 (3)	81 (8)	81 (1)	88 (2)	86 (4)	92 (4)	72 (10)	76 (7)
DAS	32 (1)	33 (3)	32 (4)	46 (7)	23 (2)	35 (4)	23 (4)	23 (3)	32 (25)	53 (1)
CIT	24 (3)	30 (4)	43 (2)	33 (6)	28 (4)	29 (1)	-	-	36 (10)	47 (4)

Nível 1 = 2 µg/kg e Nível 2 = 20 µg/kg para OCR A e AFs.

Nível 1 = 100 µg/kg e Nível 2 = 1000 µg/kg para as demais micotoxinas.

Tabela 11 - Valores de recuperação e de RSD para as micotoxinas fortificadas (n=3) em milho.

Ensaio	1		2		3		4		5	
	Nível 1 Rec. (RSD) %	Nível 2 Rec. (RSD) %	Nível 1 Rec. (RSD) %	Nível 2 Rec. (RSD) %	Nível 1 Rec. (RSD) %	Nível 2 Rec. (RSD) %	Nível 1 Rec. (RSD) %	Nível 2 Rec. (RSD) %	Nível 1 Rec. (RSD) %	Nível 2 Rec. (RSD) %
OCR A	84 (7)	35 (10)	95 (9)	83 (7)	75 (20)	71 (9)	Ensaio não executado para essa matriz		89 (10)	80 (4)
AF B1	96 (0)	69 (2)	110 (11)	78 (10)	108 (6)	94 (11)			72 (18)	81 (9)
AF G1	76 (7)	76 (3)	93 (4)	77 (8)	114 (9)	94 (7)			92 (17)	82 (5)
AF B2	-	85 (5)	118 (15)	80 (5)	95 (24)	96 (5)			64 (28)	79 (8)
AF G2	92 (18)	79 (5)	-	79 (15)	115 (10)	98 (7)			65 (20)	78 (4)
DON	76 (11)	78 (3)	91 (3)	74 (7)	89 (6)	71 (3)			69 (7)	77 (5)
FM B1	43 (2)	55 (7)	109 (12)	82 (7)	29 (19)	3 (6)			79 (3)	81 (5)
FM B2	58 (4)	78 (3)	112 (10)	82 (6)	-	-			64 (7)	78 (5)
T-2	80 (35)	86 (15)	35 (3)	35 (5)	37 (10)	64 (10)			15 (11)	36 (5)
HT-2	92 (1)	81 (2)	163 (3)	124 (3)	239 (5)	201 (3)			134 (8)	121 (6)
ZEA	82 (9)	81 (12)	102 (5)	81 (6)	190 (6)	161 (5)			76 (11)	79 (5)
DAS	75 (75)	81 (1)	29 (3)	32 (7)	7 (5)	14 (13)			7 (22)	36 (5)
CIT	42 (10)	81 (3)	70 (3)	52 (6)	40 (7)	28 (8)			66 (9)	69 (7)

Nível 1 = 2 µg/kg e Nível 2 = 20 µg/kg para OCR A e AFs.

Nível 1 = 100 µg/kg e Nível 2 = 1000 µg/kg para as demais micotoxinas.

Tabela 12 - Valores de recuperação e de RSD para as micotoxinas fortificadas (n=3) em soja.

Ensaio	1		2		3		4		5	
	Nível 1 Rec. (RSD) %	Nível 2 Rec. (RSD) %	Nível 1 Rec. (RSD) %	Nível 2 Rec. (RSD) %	Nível 1 Rec. (RSD) %	Nível 2 Rec. (RSD) %	Nível 1 Rec. (RSD) %	Nível 2 Rec. (RSD) %	Nível 1 Rec. (RSD) %	Nível 2 Rec. (RSD) %
OCR A	95 (22)	92 (10)	81 (16)	98 (12)	-	52 (7)	-	54 (2)	178 (11)	68 (16)
AF B1	109 (20)	92 (13)	-	66 (3)	-	45 (10)	-	-	76 (13)	113 (1)
AF G1	-	90 (1)	-	76 (10)	-	95 (5)	-	90 (2)	-	81 (19)
AF B2	-	94 (6)	-	62 (3)	-	84 (15)	-	61 (12)	-	69 (20)
AF G2	90 (56)	74 (10)	-	74 (7)	-	94 (17)	117 (37)	92 (17)	-	81 (16)
DON	85 (15)	83 (2)	89 (2)	76 (7)	103 (1)	91 (8)	87 (2)	81 (1)	71 (16)	81 (8)
FM B1	30 (25)	25 (20)	57 (3)	49 (7)	13 (5)	1 (9)	41 (9)	41 (6)	67 (6)	72 (7)
FM B2	38 (14)	33 (17)	63 (0,3)	56 (7)	12 (4)	2 (12)	51 (4)	53 (8)	70 (9)	74 (7)
T-2	52 (5)	71 (1)	57 (7)	72 (10)	27 (11)	75 (12)	12 (36)	77 (3)	78 (14)	86 (6)
HT-2	57 (7)	89 (6)	81 (1)	75 (6)	63 (43)	94 (13)	-	-	106 (9)	89 (6)
ZEA	89 (2)	82 (2)	86 (2)	78 (11)	139 (2)	98 (12)	74 (8)	87 (4)	83 (11)	84 (6)
DAS	54 (13)	65 (2)	65 (1)	67 (7)	37 (10)	60 (9)	19 (31)	84 (8)	78 (11)	78 (5)
CIT	20 (3)	19 (5)	26 (4)	17 (7)	27 (5)	18 (8)	-	-	24 (8)	30 (7)

Nível 1 = 2 µg/kg e Nível 2 = 20 µg/kg para OCR A e AFs.

Nível 1 = 100 µg/kg e Nível 2 = 1000 µg/kg para as demais micotoxinas.

Tabela 13 - Composição centesimal de diferentes matrizes.

Constituinte	Composição centesimal (g/100 g)						
	Feijão	Milho	Trigo	Arroz	Aveia	Cevada	Soja
Água	11,02	10,37	10,42	13,29	8,22	9,44	8,54
Proteína	21,6	9,42	10,69	6,50	16,89	12,48	36,49
Gorduras totais	1,42	4,74	1,99	0,52	6,90	2,30	19,94
Carboidratos	62,36	74,26	75,36	79,15	66,27	73,48	30,16
Fibra alimentar	15,5	7,3	12,7	2,8	10,6	17,3	9,3
Açúcares totais	2,12	0,64	0,41	N.D.	N.D.	0,80	7,33

N.D.: Não disponível

Fonte: UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE.

4.2.2 Ensaio 2

O ensaio 2 forneceu valores de recuperação mais elevados para as micotoxinas que, no ensaio anterior ficaram abaixo da faixa recomendada.

Para feijão e milho as FM B1 e B2 apresentaram recuperações entre 81 e 112% para as duas matrizes, em ambos os níveis de fortificação. Por outro lado, a recuperação para T-2 e DAS em milho ficou abaixo de 35% para ambos os níveis estudados.

Para soja, apesar da melhora nos valores de recuperação das FM B1 e B2 comparado ao ensaio 1, os valores ainda ficaram abaixo da faixa recomendada, apresentando-se entre 50 e 63% nos dois níveis de fortificação.

Visando explicar as recuperações obtidas para as diferentes matrizes, o pH do extrato de cada matriz para cada ensaio foi medido com tiras indicadoras de pH, e os valores obtidos estão reunidos na Tabela 14.

Tabela 14 - Valores de pH dos extratos das matrizes, obtidos em cada ensaio.

Ensaio	pH		
	Feijão preto	Milho	Soja
Água	6	6	6
1	4	4	5
2	3	3	4
3	5	5	5
4	4	4	5
5	2	2	3

As micotoxinas OCR A, FM B1, FM B2 e CIT são consideradas ácidas e apresentam valores de pKa entre 3,16 e 3,42. As demais micotoxinas são consideradas neutras, com valores de pKa acima de 8. Os valores de pKa foram obtidos a partir da plataforma online Chemicalize, e vários autores (EOM et al., 2017; JETTANAJIT e NHUJAK, 2016; KOESUKWIWAT; SANGUANKAEW e LEEPIPATPIBOON, 2014) tratam essas micotoxinas como ácidas e neutras.

O aumento na recuperação das micotoxinas ácidas, especialmente FM B1 e B2 em feijão e milho, pode ser associado à estabilização desses analitos em um meio com pH menor. Em pH 3, FM B1 e B2 encontram-se na forma neutra, protonada, e por isso encontram-se estabilizadas e preferencialmente solubilizadas no solvente extrator do que na água ou do que associadas à matriz.

Acredita-se que para soja, o aumento na recuperação das FM B1 e B2 não foi tão expressivo em relação ao ensaio 1 pois o pH do extrato dessa matriz ficou uma unidade acima do pKa dessas micotoxinas. Isso indica que as moléculas das micotoxinas provavelmente estavam ionizadas e preferencialmente solubilizadas na fase aquosa ou mesmo associadas à matriz. No entanto, o pH do extrato de soja para o ensaio 2 foi uma unidade menor do que para o ensaio 1, o que explica o aumento no valor de recuperação das FM B1 e B2 entre esses dois ensaios.

Além do pH dos extratos influenciar diretamente na estabilização das micotoxinas ácidas no solvente extrator, este também pode influenciar na extração de constituintes de matriz, fazendo com que quantidades maiores ou menores de substâncias sejam extraídas simultaneamente às micotoxinas. Isso pode explicar o fato de que a recuperação das micotoxinas neutras como T-2 e DAS em milho reduziram em pH mais ácido.

KOESUKWIWAT; SANGUANKAEW e LEEPIPATPIBOON (2014) também avaliaram acetonitrila com ácido fórmico e ácido acético em diferentes concentrações, e reportaram melhores recuperações com 10% de ácido fórmico (concentração mais alta estudada). Os autores avaliaram as mesmas micotoxinas estudadas neste projeto, porém em arroz, e as recuperações obtidas ficaram entre 70 e 120% com $RSD \leq 20\%$, exceto para FM B1 e CIT, cujas recuperações ficaram abaixo de 70%. Os autores ainda relacionaram o aumento na recuperação das micotoxinas ácidas à estabilização destas em meio ácido, e à baixa recuperação da FM B1 e CIT às possíveis perdas durante o processo extrativo, principalmente na etapa de purificação aplicada.

JETTANAJIT e NHUJAK (2016) aplicaram o mesmo método de KOESUKWIWAT; SANGUANKAEW e LEEPIPATPIBOON (2014) para arroz integral, mas obtiveram recuperações abaixo de 50% para todas as micotoxinas. Os autores otimizaram o procedimento de extração para arroz integral avaliando acetonitrila como solvente extrator com ácido fórmico e ácido acético em diferentes concentrações, e obtiveram os melhores resultados com 10% de ácido acético. O aumento na recuperação das micotoxinas ácidas também foi reportado pelos autores como consequência da estabilização das micotoxinas ácidas na sua forma neutra no solvente extrator, e atribuíram as baixas recuperações com 10% de ácido fórmico (teste inicial) à extração de uma quantidade maior de constituintes de matriz, especialmente pigmentos, verificado por extratos de cor mais escura.

A recuperação das micotoxinas neutras não foi prejudicada ou melhorada com a substituição do ácido acético do ensaio 1 pelo ácido fórmico do ensaio 2, exceto para T-2 em milho, cuja recuperação caiu para 35%, e DAS, também em milho, cuja recuperação caiu para uma média de 30%. Ainda para essa matriz, a recuperação de HT-2 aumentou, ficando entre 124 e 163%. Este valor acima da faixa recomendada também pode ser devido à extração simultânea de constituintes de matriz, causando assim efeito de matriz com incremento no sinal analítico dessa micotoxina.

4.2.3 Ensaio 3

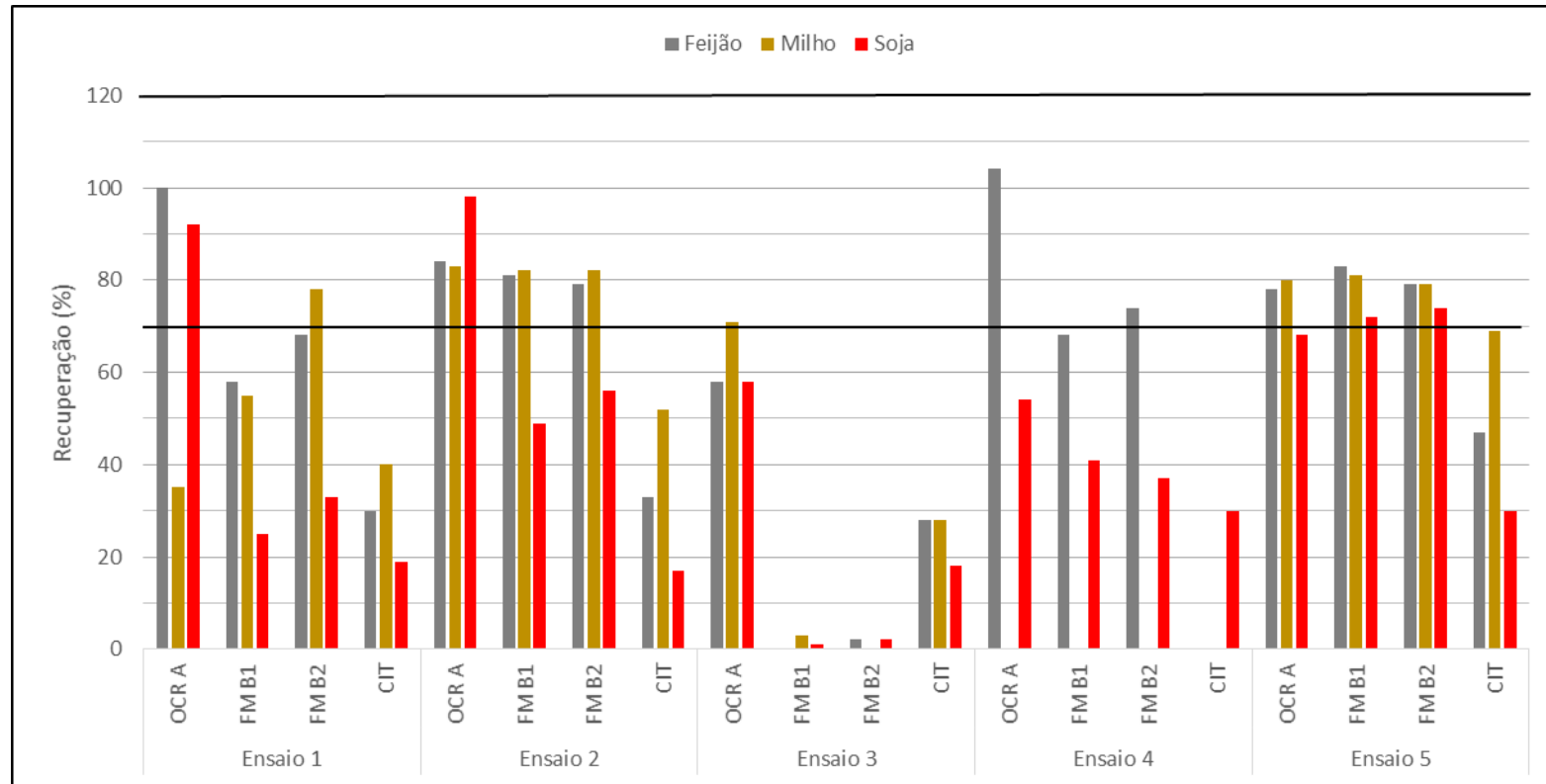
Este ensaio foi conduzido com tampão acetato na etapa de partição para as três matrizes. Como mostrado anteriormente na Tabela 14, o pH verificado para os extratos das três matrizes nesse ensaio foi igual à 5.

As recuperações obtidas para as micotoxinas ácidas (OCR A, FMs e CIT) neste pH foram muito baixas, conforme pode ser comparado no gráfico da Figura 6, que mostra o comportamento dessas micotoxinas para as três matrizes em todos os ensaios avaliados. Através deste gráfico é possível visualizar de forma clara que as micotoxinas mais afetadas por este ensaio foram as FM B1 e B2, cujas recuperações foram quase nulas nas três matrizes. A única micotoxina ácida que apresentou recuperação acima de 70% neste ensaio foi a OCR A em milho.

PIZZUTTI et al. (2014) afirmaram que a estabilidade e/ou eficiência da extração para as FMs é diretamente dependente do pH, e por isso o controle desse fator durante o procedimento de extração é importante, caso contrário baixos percentuais de recuperação e precisão podem ser obtidos.

A baixa recuperação das micotoxinas ácidas mais uma vez pode ser atribuída ao pH típico do tampão formado por ácido acético/acetato de sódio, que foi igual à 5 para todas as matrizes. Esse valor de pH fica duas unidades acima dos valores de pKa das micotoxinas ácidas, região na qual as moléculas destes analitos encontram-se ionizadas. A acetonitrila é um solvente polar, porém, menos polar que a água e metanol, e por isso tem menor capacidade de solvatar cargas elétricas (analitos ionizados), o que conduz às baixas recuperações observadas.

Figura 6 - Percentual de recuperação obtido para as micotoxinas ácidas em feijão preto, milho e soja, para os ensaios de 1 a 5 (n=3).



20 µg/kg para OCR A e 1000 µg/kg para FM B1, FM B2 e CIT.

Alguns autores reportam métodos baseados no método QuEChERS para a extração de micotoxinas em diversas matrizes sem a partição com MgSO_4 (SOLEIMANY et al., 2012; SULYOK et al., 2006) e consideram como um dos fatores responsáveis pela alta recuperação dos analitos mais polares a maior polaridade do extrato, contendo acetonitrila e água. Outros autores relatam o uso de apenas MgSO_4 para induzir a separação de fases (REICHERT et al., 2017; SOUZA, 2014), mas a grande maioria dos autores aplicam métodos baseados no método QuEChERS usando como tampão sais de citrato de sódio (EOM et al., 2017; JETTANAJIT; NHUJAK, 2016; KOESUKWIWAT; SANGUANKAEW; LEEPIPATPIBOON, 2014).

O tamponamento com citrato de sódio tribásico diidratado e citrato de sódio dibásico sesquidratado ocorre em pH entre 5,0 e 5,5, no entanto, quando esses sais são usados juntamente com MgSO_4 , o pH observado nos extratos é cerca de 4, isso porque os íons Mg^{+2} formam complexos com os íons citrato, liberando prótons e conduzindo a um pH menor (EU REFERENCE LABORATORIES FOR RESIDUES OF PESTICIDES, 2016), o que favorece percentuais de recuperação maiores quando comparado ao tamponamento em pH 5 pelo acetato de sódio.

JETTANAJIT e NHUJAK (2016), além de avaliarem diferentes composições de solvente extrator, onde variaram o constituinte ácido (fórmico ou acético) e a concentração deste (1; 5 e 10%), também estudaram a partição e tamponamento com diferentes misturas de sais para determinar micotoxinas em arroz integral. Os autores observaram que, para a maioria das micotoxinas avaliadas, as maiores recuperações foram obtidas quando utilizaram uma mistura de MgSO_4 , NaCl e acetato de sódio, exceto para FMs (B1 e B2) e OCR A. Assim, o método final otimizado e validado pelos autores foi a mistura dos sais MgSO_4 , NaCl, citrato de sódio tribásico diidratado e citrato de sódio dibásico sesquidratado.

Para as micotoxinas neutras avaliadas nesse ensaio houve um incremento na recuperação de HT-2 e ZEA em milho, no entanto os valores ficaram muito acima da faixa recomendada (entre 200 e 239% e 161 e 190%, respectivamente), o que pode estar relacionado à extração de constituintes de matriz que promoveram um incremento no sinal analítico para as amostras extraídas. Além disso, DAS apresentou baixa recuperação em milho e soja quando comparado ao resultado do ensaio 1, o que pode estar relacionado à supressão de sinal causada pela extração de constituintes de matriz em pH mais ácido, como já foi discutido anteriormente. A

recuperação das demais micotoxinas neutras avaliadas não foi favorecida ou comprometida nesse ensaio.

4.2.4 Ensaio 4

Este ensaio foi planejado e executado de forma a se obter maior precipitação de proteínas das matrizes como uma alternativa para aumentar as recuperações das micotoxinas, visto que feijão e soja apresentam cerca de 22 e 36% deste constituinte, respectivamente, como mostrado anteriormente na Tabela 13. Este ensaio não foi executado para milho, pois esta matriz não estava disponível quando da execução deste ensaio.

O método de precipitação de proteínas é conhecido e amplamente empregado para extrair diversos compostos de amostras biológicas como sangue e plasma sanguíneo. É o método mais simples para separar substâncias de baixa massa molecular (como as micotoxinas) de macromoléculas (como as proteínas), cuja presença pode comprometer a recuperação dos analitos da matriz, separação cromatográfica e ionização no espectrômetro de massas (VAS; NAGY e VÉKEY, 2008).

A precipitação de proteínas, seja em amostras biológicas ou alimentos contendo essas macromoléculas, ocorre devido à alteração em sua solubilidade mediante a adição de solventes orgânicos (metanol ou acetonitrila), ácidos (ácido fosfórico, trifluoracético ou perclórico) ou sais (sulfato de amônio ou zinco) (VAS; NAGY e VÉKEY, 2008).

A solubilidade das proteínas é modificada, pois a água que solubiliza essas moléculas passa a ser solvatada por moléculas do solvente ou passa a solvatar os íons dos sais. Isso faz com que a interação entre as moléculas de proteínas aumente e faz com que elas sejam agrupadas, formando estruturas maiores e cada vez menos solúveis, precipitando (AGILENT TECHNOLOGIES, 2013). Após agitação e centrifugação, as proteínas são depositadas no fundo dos tubos de extração e o sobrenadante, contendo os analitos de interesse, é recolhido e analisado.

No entanto, diferentes proteínas podem necessitar de diferentes condições para precipitar, o que pode comprometer a remoção dessas macromoléculas (VAS; NAGY e VÉKEY, 2008). Além disso, algumas proteínas podem precipitar e levar consigo, ligadas aos seus grupos funcionais, moléculas pequenas (como as

micotoxinas), removendo-as do sobrenadante e conduzindo à uma recuperação menor.

A técnica de precipitação de proteínas está associada à diluição das amostras, dificilmente as mesmas são concentradas. Isso porque, para que a precipitação das proteínas seja eficaz, é necessário uma proporção solvente orgânico:amostra igual à, no mínimo 3:1, sendo que a proporção 4:1 é mais indicada por garantir que a precipitação seja mais completa (PHENOMENEX, 2012). A proporção 4:1 de solvente orgânico:amostra foi aplicada no ensaio 4, levando à uma diluição total da amostra de 8 vezes (o dobro dos demais ensaios).

Na Figura 7 é mostrado um gráfico, para fins de comparação entre as recuperações obtidas pelos ensaios 1 e 4, cujo pH dos extratos foi o mesmo (pH = 4) e diferenciaram-se um do outro apenas no volume de solvente extrator. Como pode ser visto neste gráfico, houve pouca diferença de recuperação entre esses ensaios para a maioria das micotoxinas, tanto em feijão quanto em soja. Isso mostra que, apesar das amostras terem sofrido uma diluição duas vezes maior do que a realizada nos outros ensaios, a recuperação das micotoxinas não foi prejudicada.

Para feijão, por exemplo, apenas as micotoxinas DAS, T-2 e HT-2 apresentaram recuperações menores para o ensaio 4 do que para o ensaio 1, sendo que DAS e T-2 já apresentavam recuperação abaixo de 40%, o que indica que a precipitação de proteínas e diluição da amostra não favoreceu a recuperação desses analitos, contrariando o que era esperado.

Por outro lado, o aumento na recuperação das FM B1 (de 58 pelo ensaio 1 para 68% pelo ensaio 4) e B2 (de 68 pelo ensaio 1 para 74% pelo ensaio 4) foi o mais expressivo para feijão. Isso pode ser atribuído ao fato de que o uso de um volume maior de solvente contribuiu para uma precipitação de proteínas mais eficaz, como era esperado. Além disso, a diluição maior que foi aplicada nesse ensaio, comparada com o fator de diluição dos demais, pode ter contribuído, pois o extrato obtido possuía aparência mais límpida, o que pode ser verificado pela obtenção de um sobrenadante de cor mais clara.

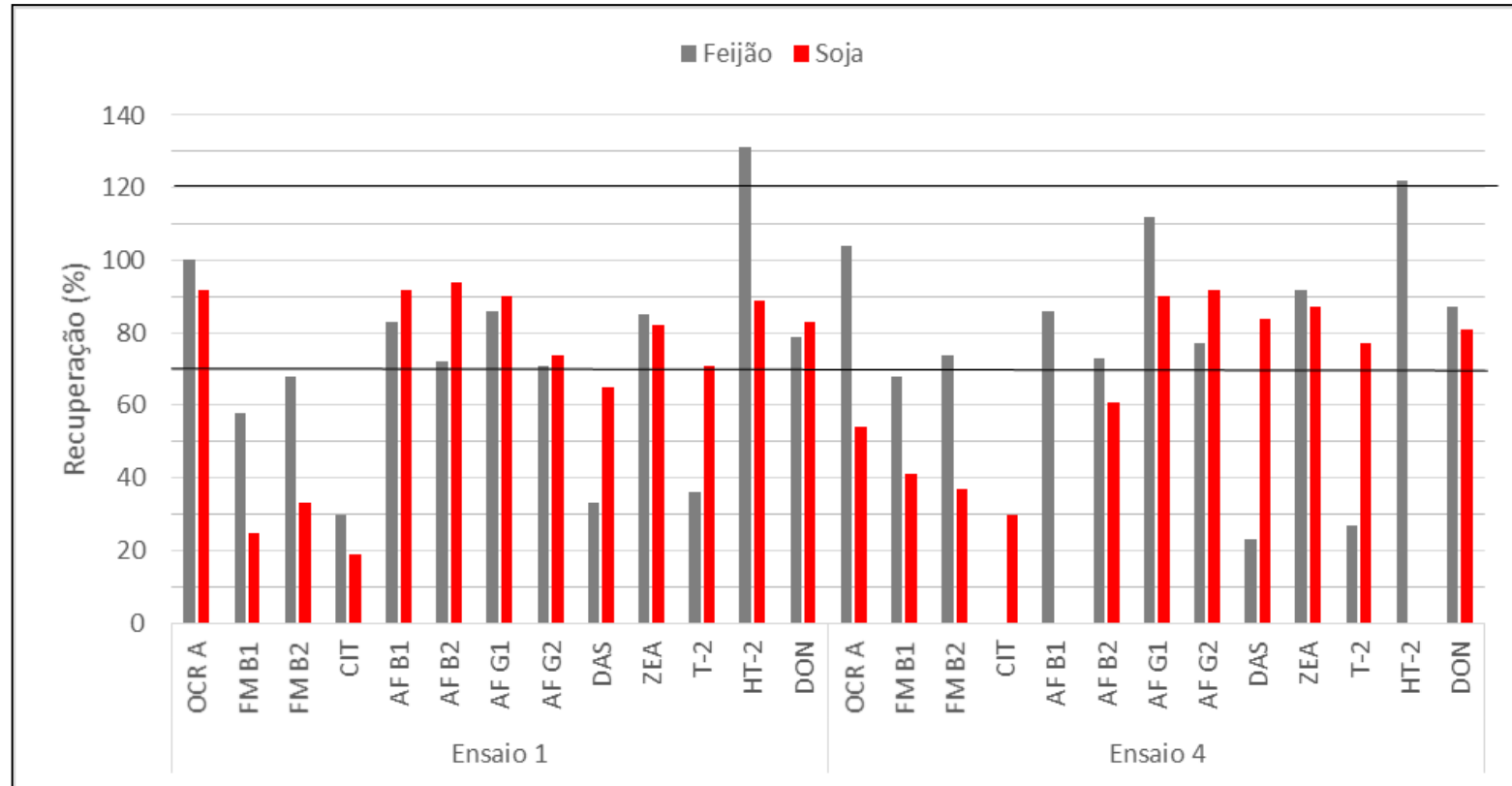
As demais micotoxinas em feijão apresentaram recuperações semelhantes àquelas obtidas pelo ensaio 1. No entanto, observou-se que, para DON o perfil cromatográfico para o ensaio 4 foi prejudicado, como mostra a Figura 8 (a) e (b), possivelmente pelo fato de que um volume maior (4 μ L) de amostra contendo acetonitrila (solvente que não está presente na fase móvel) foi injetado, o que pode

ter provocado uma diferença de polaridade mais acentuada entre a fase móvel e o diluente da amostra, comprometendo a separação cromatográfica.

Além disso, a integração do pico cromatográfico da AF G2 foi dificultada para o ensaio 4. Isso ocorreu devido à má resolução entre o pico cromatográfico da AF G2 e um pico de um interferente da matriz, (como demonstrado a Figura 8 (c) e (d)) e a relação sinal-ruído (S/N, do inglês *signal-to-noise*) que diminuiu. A diminuição nesta relação indica que o sinal analítico para a AF G2 diminuiu em relação ao ruído da linha de base, o que resulta no pico cromatográfico de baixa intensidade mostrado na Figura 8 (d) e a dificuldade em integrar e quantificar corretamente.

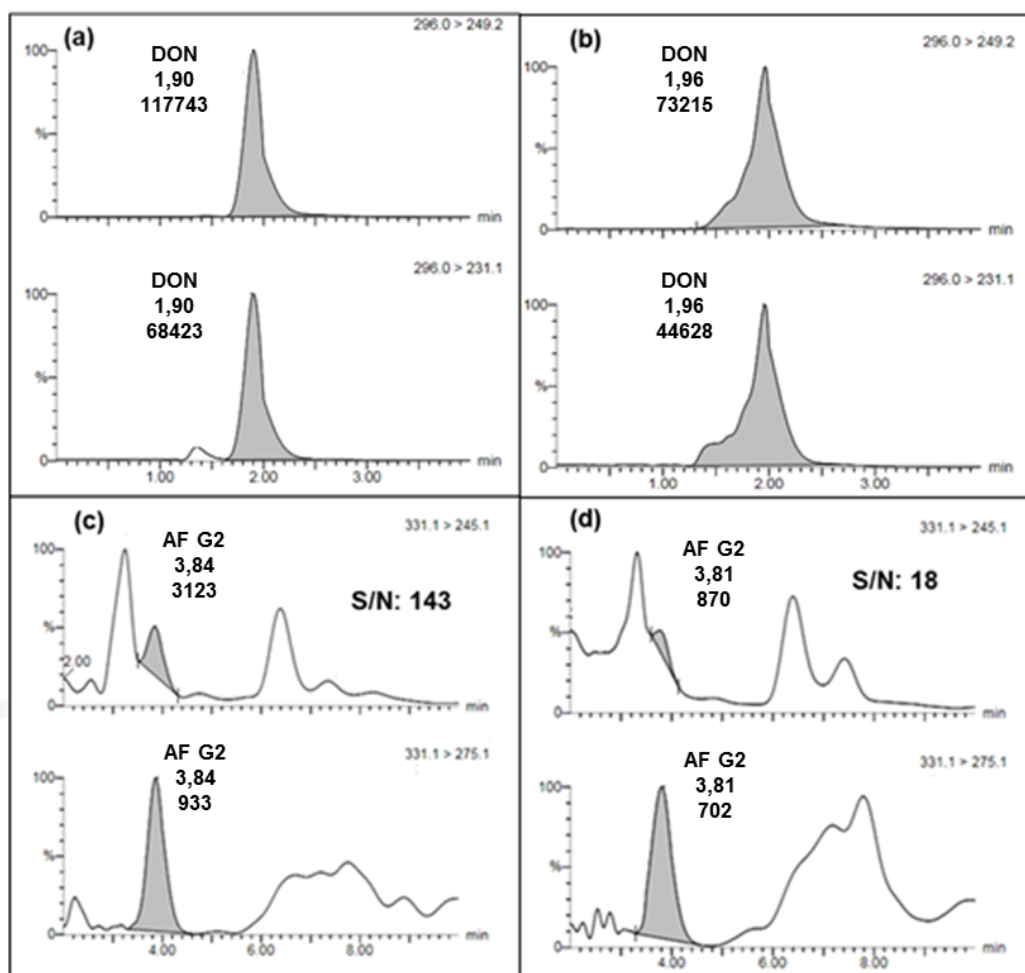
Para soja o aumento na recuperação das FMs (B1 e B2) foi o que mais chamou a atenção, saindo de 25% para FM B1 e 33% para FM B2 no ensaio 1 para 41 e 53% para o ensaio 4, respectivamente. Ainda que o resultado tenha ficado abaixo da faixa recomendada, o resultado obtido mostra que o uso de volume maior de solvente pode ter proporcionado uma precipitação de proteínas mais eficaz do que para o ensaio 1, o que teoricamente era esperado, considerando que soja tem quase 37% de proteínas em sua composição e uma proporção de solvente orgânico:amostra igual à 4:1 foi empregado. Também foi constatado aumento na recuperação de DAS nessa mesma matriz, fazendo com que o resultado obtido ficasse dentro da faixa recomendada pelo SANTE (2017).

Figura 7 - Percentual de recuperação para as micotoxinas em feijão preto e soja para os ensaios 1 e 4 (n=3).



20 µg/kg para OCR 20 µg/kg para OCR A e 1000 µg/kg para FM B1, FM B2 e CIT.

Figura 8 - Cromatogramas comparativos de perfil cromatográfico para (a) DON conforme ensaio 1 e (b) DON conforme ensaio 4, e de razão S/N para (c) AF G2 conforme ensaio 1 e (d) AF G2 conforme ensaio 4.



Com exceção de OCR A e AF B1 e B2 que apresentaram diminuição na recuperação para o ensaio 4 (o que pode estar associado ao grande fator de diluição do procedimento), as demais micotoxinas em soja apresentaram recuperações semelhantes àquelas obtidas pelo ensaio 1, e com exceção de DON que apresentou perfil cromatográfico inadequado, as demais micotoxinas recuperadas satisfatoriamente apresentaram perfis cromatográficos adequados e semelhantes ao ensaio 1.

O uso de procedimentos de extração baseados no método QuEChERS, com aplicação de um grande fator de diluição e sem posterior purificação, como este procedimento aplicado no ensaio 4, é conhecido como “*dilute-and-shoot*” e é reportado

por vários autores na determinação de micotoxinas em diversas matrizes (SOLEIMANY et al., 2012; SULYOK et al., 2006; SULYOK; KRŠKA e SCHUHMACHER, 2007).

De fato, a grande diluição obtida pela técnica *dilute-and-shoot* é uma forma de obter extratos mais limpos devido à diluição dos constituintes de matriz, o que conduz à diminuição do efeito de matriz e conseqüentemente favorece a separação cromatográfica e ionização dos analitos no espectrômetro de massas (STAHNKE et al., 2012).

SULYOK et al. (2006) otimizaram e validaram um método de extração baseado no método QuEChERS para a determinação de 39 micotoxinas em trigo e milho aplicando a técnica *dilute-and-shoot*, e posteriormente estenderam o uso desse método para a determinação de 87 micotoxinas em alimentos variados (SULYOK; KRŠKA e SCHUHMACHER, 2007). O fator de diluição do procedimento usado em ambos os artigos, cujo solvente extrator foi uma mistura de acetonitrila:água:ácido acético (79:20:1), foi igual à 8, e os autores reportaram recuperações dentro da faixa recomendada para as mesmas micotoxinas deste trabalho em ambos os casos.

A diluição dos extratos ainda elimina a necessidade de posterior etapa de purificação, onde extração em fase sólida é usada na forma dispersiva, com adsorventes na forma de partículas, ou cartuchos recheados com o adsorvente, com a finalidade de remover pigmentos, lipídeos e açúcares da matriz. A aplicação da diluição é interessante não só pelo fato de eliminar uma etapa no procedimento de extração e diminuir o custo da análise, mas também porque as micotoxinas apresentam propriedades distintas, e a escolha de um procedimento de purificação em detrimento de outro pode prejudicar a recuperação de uma micotoxina específica, ou uma classe inteira dessas substâncias (SOLEIMANY et al., 2012).

4.2.5 Ensaio 5

Este ensaio foi conduzido com o solvente extrator contendo a maior concentração de ácido em comparação aos outros ensaios, e conseqüentemente com o pH mais ácido. O valor de pH medido foi igual à 2 para os extratos de feijão e milho, e 3 para o extrato de soja, conforme mostrado anteriormente na Tabela 14.

Com exceção da OCR A em soja e da CIT nas três matrizes, todas as micotoxinas ácidas apresentaram recuperação dentro da faixa recomendada pelo

SANTE (2017) para as três matrizes, como pode ser comparado com o resultado dos demais ensaios no gráfico da Figura 6, mostrado anteriormente.

Para soja, os resultados que mais chamaram a atenção foram aqueles das FMs, que pela primeira vez dentre todos os ensaios executados, apresentaram recuperação acima de 70%. Esse resultado pode ser associado a dois fatores: 1) ao pH do extrato obtido nessa matriz (inferior àqueles medidos nos demais ensaios) e 2) à maior precipitação de proteínas da matriz.

O pH obtido para soja nesse extrato foi igual à 3, ficando abaixo do valor de pKa das micotoxinas ácidas em estudo, especialmente FM B1 e B2. Como já foi discutido anteriormente, a estabilização das micotoxinas ácidas é favorecida em pH abaixo de seus respectivos valores de pKa, região na qual os analitos se encontram na forma molecular, não ionizadas, o que favorece a solubilização dessas micotoxinas no solvente extrator preferencialmente à solubilização em água ou ligação aos constituintes de matriz.

Durante a extração das amostras de soja conforme esse ensaio observou-se a formação de uma massa de aspecto denso e de difícil homogeneização após a adição do solvente extrator, o que indica a precipitação de constituintes de matriz, fato que não foi observado na execução dos outros ensaios. Após a adição de $MgSO_4$, houve a separação de fases e foi possível diferenciar matriz e solvente. Apesar da formação dessa massa densa dificultar a homogeneização, os resultados obtidos foram bastante precisos, com valores de RSD variando de 1 a 20% para todas as micotoxinas.

No entanto, apesar da maioria das micotoxinas ácidas terem sido recuperadas satisfatoriamente para todas as matrizes, algumas micotoxinas neutras (AF B1 e AF G2 em feijão preto; DAS e T-2 em milho) apresentaram menores recuperações em comparação aquelas obtidas em ensaios anteriores.

A menor recuperação de micotoxinas neutras foi observada para a AF B1 em feijão, para a qual a recuperação ficou abaixo de 70% em ambos os níveis avaliados quando comparada com os resultados dos demais ensaios, conforme dados apresentados anteriormente na Tabela 10. A AF G2 também apresentou recuperação abaixo de 50% nessa matriz no segundo nível de fortificação e com baixa precisão, verificado pelo alto RSD obtido (127%).

Também para milho observou-se menor recuperação para algumas micotoxinas neutras, como DAS e T-2 (valores abaixo de 40% para este ensaio). Para essas micotoxinas os melhores resultados foram obtidos pelo ensaio 1.

Os extratos obtidos conforme procedimento de extração do ensaio 5 apresentaram cor mais escura do que aqueles obtidos nos demais ensaios. O aumento na concentração de ácido favoreceu a extração de constituintes de matriz (pigmentos), que podem ter sido extraídos preferencialmente e que pode ter contribuído para a diminuição na recuperação observada para algumas micotoxinas.

JETTANAJIT e NHUJAK (2016) verificaram que a concentração mais alta de ácido (10% de ácido fórmico em acetonitrila) empregada por KOESUKWIWAT; SANGUANKAEW e LEEPIPATPIBOON (2014) para micotoxinas em arroz branco não favorecia a recuperação dessas mesmas micotoxinas em arroz integral, e concluíram que as recuperações abaixo de 50% obtidas com 10% de ácido fórmico para arroz integral estavam relacionadas à extração de mais constituintes de matriz (caracterizado por extratos de cor mais escura) do que quando utilizado 10% de ácido acético.

EOM et al. (2017) observaram que as micotoxinas avaliadas em diversos óleos comestíveis (AFs, FM B1 e B2, OCR A, ZEA, DON, T-2) tiveram suas recuperações melhoradas quando a concentração de ácido aumentou de 1 para 5%, no entanto, os autores reportaram diminuição na recuperação para todas as micotoxinas quando a concentração de ácido chegou em 10%, mas não concluíram o que causou essa redução.

Apesar da maioria das micotoxinas neutras (AFs B1, G1 e G2, T-2, HT-2, ZEA e DAS em soja; AFs, T-2, HT-2 e ZEA em milho; AFs G1 e B2, DON, HT-2 e ZEA em feijão preto) terem mantido a recuperação dentro da faixa recomendada pelo SANTE (2017) neste ensaio, algumas considerações a respeito da qualidade dos cromatogramas obtidos devem ser feitas.

Para AF B2 em feijão por exemplo, quando se compara o cromatograma entre o ensaio 2 e o ensaio 5 como mostra a Figura 9 (a) e (b), observa-se que a relação S/N para essa micotoxina é maior para o ensaio 5, apesar do sinal analítico ter diminuído. O aumento na relação S/N deveria facilitar a visualização do pico cromatográfico uma vez que o ruído da linha de base diminuiu, no entanto, o que se verifica na Figura 9 (b) é que o pico cromatográfico da AF B2 para o ensaio 5 aparece com baixa altura devido à abundância relativa dessa espécie no cromatograma.

Apesar disso e do fato de que a correta integração do pico cromatográfico não foi prejudicada, a região na qual a AF B2 elui pode ser ampliada (Figura 9 (c)), facilitando sua visualização e colocando em evidência o cromatograma desta micotoxina.

Por outro lado, para essa mesma micotoxina em soja observou-se uma menor relação S/N no ensaio 2 em comparação ao ensaio 5, como mostra a Figura 10 (a) e (b). O sinal analítico obtido para a AF B2 foi semelhante para os dois ensaios, no entanto, a diminuição na relação S/N indica que o ruído da linha de base aumentou, o que pode ter sido provocado pelo aumento na concentração de ácido e que, apesar de favorecer maior precipitação de proteínas do que 1% de ácido pode ter contribuído para o aumento na extração de outros constituintes da matriz. A correta integração do pico cromatográfico da AF B2 em soja não foi prejudicada, e a região na qual essa micotoxina eluiu também pode ser ampliada para facilitar a visualização, como mostra a Figura 10 (c).

Os cromatogramas para as demais micotoxinas, nas três matrizes estudadas, nesse ensaio 5, não tiveram sua qualidade ou visualização comprometidas por ruídos de linha de base.

Figura 9 - Cromatogramas comparativos para a AF B2 em feijão conforme (a) ensaio 2, (b) ensaio 5 sem ampliação do cromatograma e (c) ensaio 5 com ampliação do cromatograma.

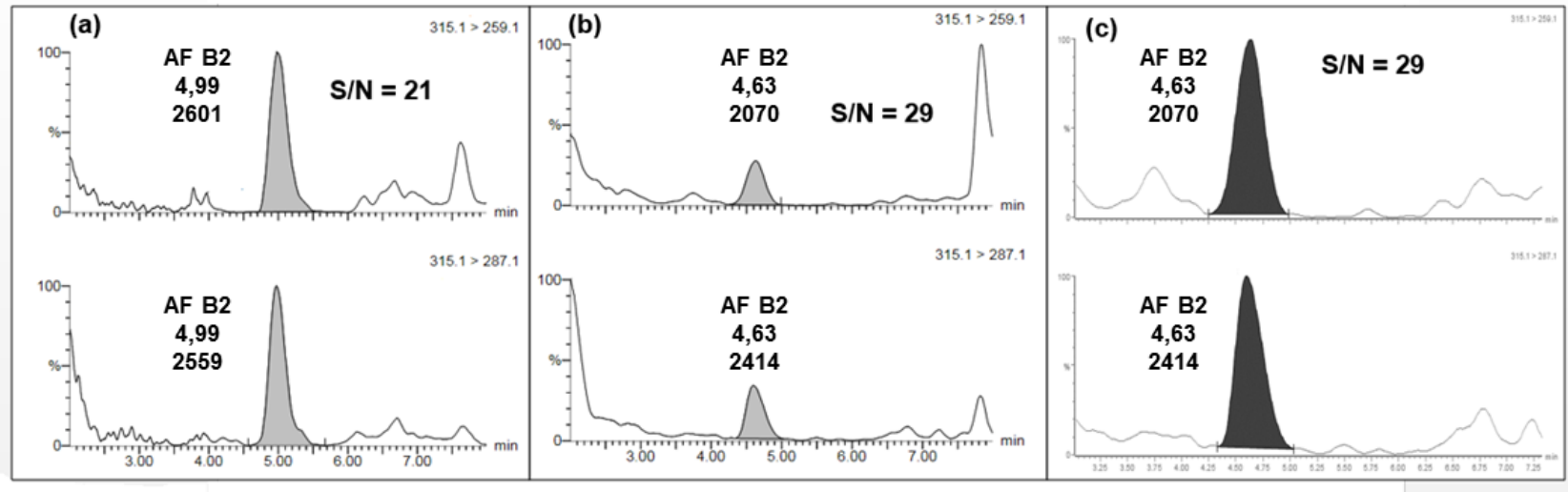
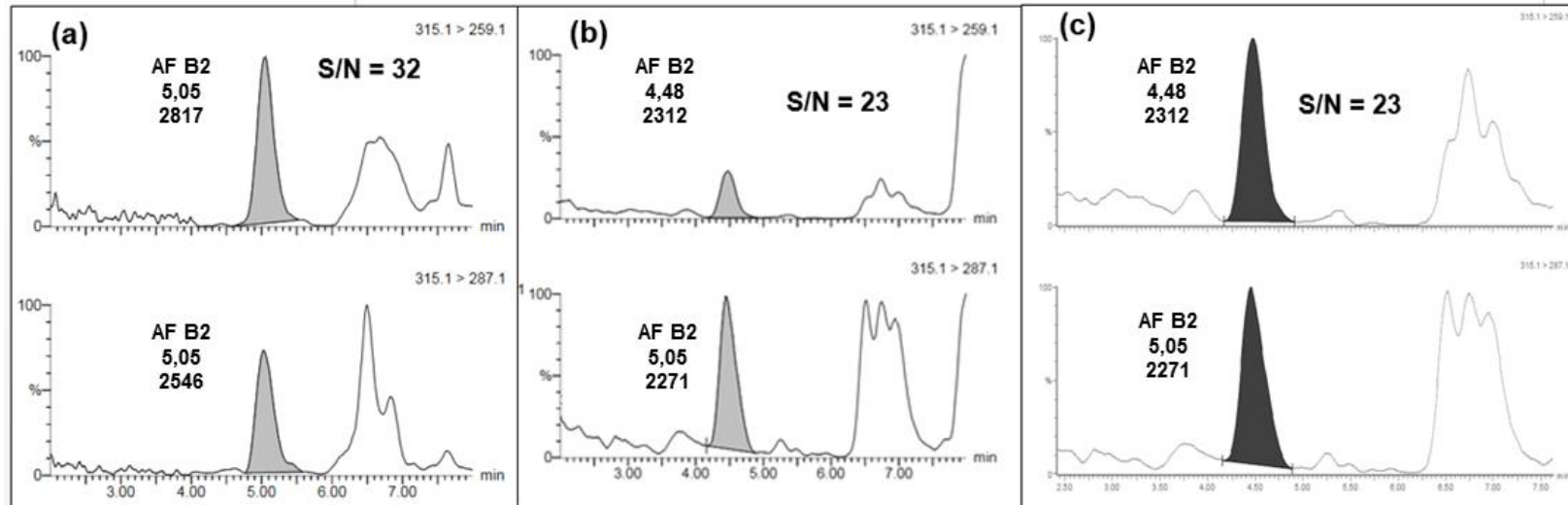


Figura 10 - Cromatogramas comparativos para a AF B2 em soja conforme (a) ensaio 2, (b) ensaio 5 sem ampliação do cromatograma e (c) ensaio 5 com ampliação do cromatograma.



4.2.6 Discussão especial – Citrinina

A CIT foi o analito menos discutido nos tópicos anteriores, visto que a recuperação para essa micotoxina foi baixa em praticamente todos os ensaios e para todas as matrizes avaliadas, com exceção do que foi obtido para o nível 2 de fortificação em milho conforme ensaio 1 e nível 1 de fortificação e também em milho, conforme ensaio 2, cujos valores de recuperação ficaram acima de 70%. E, ao aplicar-se o ensaio 5, também em milho, essa micotoxina apresentou recuperação entre 66 e 69%.

Apesar dos resultados obtidos para essa micotoxina na maioria dos ensaios e matrizes terem ficado abaixo da faixa recomendada pelo SANTE (2017) e abaixo dos requisitos específicos estipulados pela UE (2006), a recuperação para essa micotoxina sempre se apresentou com alta precisão, sendo que em nenhum ensaio os valores de RSD para esse analito ultrapassaram 10%.

KOESUKWIWAT; SANGUANKAEW e LEEPIPATPIBOON (2014) também reportaram baixa recuperação para CIT em arroz, obtendo resultados abaixo de 60%, mas com muito boa precisão (RSD < 5%).

Embora de acordo com a EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (2012) a conjugação da CIT aos maiores constituintes de alimentos (carboidratos, gordura e proteínas) não tenha sido investigada, acredita-se que as baixas recuperações obtidas para essa micotoxina na maioria dos ensaios possam estar relacionadas à ligação do analito aos constituintes da matriz, fato que é conhecido para outras micotoxinas.

4.3 VALIDAÇÃO DOS MÉTODOS ANALÍTICOS

4.3.1 Padrão interno

O padrão interno deve ter características semelhantes ou ser representativo dos analitos em estudo. Para a análise de micotoxinas, é mais adequado o uso de padrões internos que consistem em algumas micotoxinas deuteradas ou marcadas isotopicamente. Nesses casos, alguns átomos de hidrogênio prótio são substituídos por hidrogênio deutério (padrão interno deuterado) ou alguns átomos de carbono e/ou nitrogênio são substituídos por seus isótopos radioativos (padrão interno marcado

isotopicamente), dessa forma, as propriedades físico-químicas dessas substâncias são muito parecidas com as dos analitos.

No entanto, o uso de padrão interno deuterado ou marcado isotopicamente é limitado pelas quantidades disponíveis e preços, geralmente bastante altos. Uma alternativa para o uso de padrão interno deuterado ou marcado isotopicamente é buscar outras substâncias que, como pesticidas, por exemplo, que devem, preferencialmente, ser substâncias de uso proibido e cuja presença nas amostras será nula.

Neste trabalho foram usados como P.I.P. e P.I.I. os agrotóxicos quinalfós e propoxur, respectivamente, que são citados pelo MAPA (2011) como substâncias comumente utilizadas como controladores de equipamento em LC.

4.3.2 Validação de método analítico para determinação de micotoxinas em feijão e milho

O método analítico foi validado utilizando feijão preto como matriz representativa do grupo e seu uso foi estendido para o milho e demais cultivares de feijão (branco, vermelho e carioca) na etapa de monitoramento das amostras armazenadas em atmosfera controlada. De acordo com SANTE (2017), essas matrizes são classificadas no Grupo 5 (mercadorias com alto teor de amido e/ou proteína e baixo teor de água e conteúdo de gordura), na categoria de “Vegetais e frutas, cereais e alimentos de origem animal”. Esse mesmo documento prevê que o método analítico pode ser validado para uma matriz representativa do grupo e pode ser estendido às outras matrizes.

O MAPA (2011) também prevê a validação do método analítico para uma matriz representativa do grupo e instrui que o efeito matriz entre as matrizes “velha” e “nova” seja avaliado através do teste t (Student) para garantir o desempenho do método analítico na ampliação do escopo. Esse manual prevê a possibilidade de utilizar a curva analítica preparada em extrato “branco” da matriz “velha” na análise de amostras da matriz “nova” desde que seja comprovada a ausência de efeito matriz.

Durante a avaliação dos resultados da validação do método encontrou-se dificuldade em identificar e integrar corretamente o pico cromatográfico das micotoxinas AF G1 e G2 em matriz, assim, essas micotoxinas foram excluídas do estudo para a matriz feijão (todas as variedades) e milho.

4.3.2.1 Linearidade e curva analítica

Para avaliar a linearidade do método, curvas analíticas em solvente orgânico e em extrato “branco” de matriz foram preparadas conforme item 3.10.1.

De acordo com o INMETRO (2018), a linearidade de um método não pode ser avaliada apenas a partir do gráfico da resposta instrumental em função da concentração do analito, sendo necessário avaliar a homoscedasticidade dos resíduos da curva analítica antes de fazer a regressão linear.

Para a escolha da ponderação a ser usada na regressão linear, os resíduos da curva analítica foram analisados em gráficos “resíduo x concentração” para cada micotoxina e efetuou-se a soma dos valores absolutos dos resíduos para cada ponderação testada (1, $1/X^2$, $1/X$, $1/X^{0.5}$, $1/Y^2$, $1/Y$ e $1/Y^{0.5}$, conforme citado no item 3.10.1). No Apêndice B são mostrados os gráficos resíduos x concentração para as ponderações 1 (sem ponderação, regressão linear simples) e para a ponderação obtida por meio da regressão linear ponderada para cada micotoxina.

A Tabela 15 apresenta a soma dos valores absolutos dos resíduos da curva analítica em matriz para cada ponderação. A ponderação escolhida foi aquela que apresentou a menor soma dos resíduos, bem como resíduos homoscedásticos após aplicação da ponderação.

Nota-se que nem todas as micotoxinas apresentaram a mesma ponderação, isso porque a linearidade de um método para cada analito é dependente dos constituintes de matriz.

A partir da escolha da ponderação adequada para cada micotoxina, a regressão linear ponderada foi efetuada por meio do método dos mínimos quadrados ordinários ponderados. Os coeficientes angular, linear, r e r^2 para cada micotoxina (em solvente orgânico e em extrato “branco” de matriz) foram calculados pelas equações 3, 4 e 5, respectivamente, apresentadas no item 3.10.1. A Tabela 16 reúne as equações de reta obtidas, bem como a faixa linear de cada micotoxina em solvente orgânico e extrato “branco” de matriz.

Tabela 15 - Soma dos valores absolutos dos resíduos da curva analítica para escolha da ponderação para cada micotoxina em feijão.

Micotoxina	Soma dos valores absolutos dos resíduos da curva analítica em matriz							Ponderação escolhida
	Ponderação							
	1	1/X	1/X ²	1/X ^{0,5}	1/Y	1/Y ²	1/Y ^{0,5}	
OCR A	305,2	137,6	93,3	207,4	130,4	87,6	199,6	1/Y ²
AF B1	470,3	603,1	193,0	483,4	1278,6	1671,6	497,7	1/X ²
AF B2	351,9	338,6	325,9	357,5	355,1	336,4	369,6	1/X ²
DON	282,8	42,9	30,6	70,0	25,8	11,1	82,3	1/Y ²
FM B1	202,4	192,9	232,8	217,6	179,1	437,0	231,4	1/Y
FM B2	149,4	114,8	209,0	195,3	185,3	356,1	221,9	1/X
HT-2	290,9	30,5	25,9	108,9	30,4	26,6	107,6	1/X ²
T-2	315,3	59,3	22,6	164,7	61,5	23,5	168,7	1/X ²
ZEA	321,3	62,0	35,1	171,2	67,7	38,4	181,0	1/X ²
DAS	397,6	131,5	53,4	257,1	143,2	60,3	266,0	1/X ²
CIT	379,7	93,4	35,3	225,9	106,2	38,8	238,7	1/X ²

É possível observar que, para algumas micotoxinas, a faixa linear do método é ligeiramente diferente quando se compara a curva analítica em solvente orgânico com a curva em extrato “branco” da matriz. Esse é o caso da OCR A, AF B1 e AF B2, que são micotoxinas pertencentes ao grupo 1 e cuja faixa de concentração da curva analítica é mais baixa que para as micotoxinas do grupo 2. A diferença observada na faixa linear entre as curvas preparadas em solvente orgânico e em extrato “branco” de matriz é associada à interferência causada por constituintes de matriz, visto que a linearidade de um método é dependente da constituição da amostra (INMETRO, 2018).

Todas as micotoxinas avaliadas em feijão apresentaram correlação linear fortíssima, conforme critério apresentado por BRITO et al. (2003), com $0,91 \leq r \leq 0,99$. Considerando o r^2 para cada micotoxina, coeficiente que expressa o quanto o sinal analítico observado é explicado pelo modelo linear e sendo, portanto, um indicativo da adequabilidade do modelo linear aplicado, observou-se que 75% das micotoxinas em solvente orgânico apresentaram r^2 maior ou igual à 0,96, enquanto em matriz 92% das micotoxinas apresentaram r^2 maior ou igual à 0,96.

4.3.2.2 Limite de detecção e quantificação

O LOD e LOQ instrumental (LOD_i e LOQ_i , respectivamente) e do método (LOD_m e LOQ_m , respectivamente) foram estimados a partir das curvas analíticas em solvente orgânico e extrato “branco” de matriz, sendo calculados a partir das equações 6 e 7, apresentadas no item 3.10.2. Os valores estimados são apresentados na Tabela 17.

As equações apresentadas no item 3.10.2 foram usadas para calcular os LOD e LOQ instrumentais, enquanto os LOD e LOQ do método foram obtidos pela multiplicação de LOD_i e LOQ_i pelo fator de diluição do método que é 4, como demonstrado na Tabela 5 no item 3.10.5.

O LOD_i real em solvente orgânico para as micotoxinas foi determinado a partir da injeção de soluções analíticas de baixa concentração, preparadas em solvente orgânico, obtendo-se valores iguais à $0,1 \text{ ng mL}^{-1}$ para OCR A, AF B1 e AF B2 (correspondente à $0,4 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$) e igual à 5 ng mL^{-1} para DON, FM B1, FM B2, HT-2, T-2, ZEA, DAS e CIT (correspondente à $20 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$).

Já o LOD_i real em matriz para essas micotoxinas foi determinado por meio da injeção de soluções analíticas de baixa concentração em extrato “branco” de matriz, obtendo-se valores iguais à $0,1 \text{ ng mL}^{-1}$ para OCR A, AF B1 e AF B2 (correspondente à $0,4 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$) e igual à 5 ng mL^{-1} para DON, FM B1, FM B2, HT-2, T-2, ZEA, DAS e CIT (correspondente à $20 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$).

O LOQ_m real deve ser determinado pelos ensaios de fortificação e recuperação e deve atender aos requisitos específicos, como orienta INMETRO (2018), SANTE (2017) e MAPA (2011).

Tabela 16 - Dados de linearidade das micotoxinas em feijão: equação da reta, coeficiente de correlação (r), coeficiente de determinação (r^2) e faixa linear das curvas analíticas preparadas em solvente orgânico e extrato “branco” da matriz.

Micotoxina	Curva analítica em solvente orgânico				Curva analítica em extrato “branco” da matriz			
	Equação da reta	r	r^2	Faixa linear (ng mL ⁻¹)	Equação da reta	r	r^2	Faixa linear (ng mL ⁻¹)
OCR A	$Y = 6757,06x + 240,21$	0,9890	0,9781	0,1 – 50	$Y = 3856,00x - 607,92$	0,9966	0,9932	0,2 - 50
AF B1	$Y = 7033,70x + 796,71$	0,9841	0,9685	0,2 – 50	$Y = 3087,64x - 1658,64$	0,9620	0,9254	1 – 50
AF B2	$Y = 409,68x + 2,37$	0,9928	0,9857	0,2 – 50	$Y = 318,84x + 1039,13$	0,9957	0,9913	1 – 50
DON	$Y = 946,00x + 3153,13$	0,9784	0,9573	5 – 2500	$Y = 462,41x + 2263,52$	0,9997	0,9993	5 – 2500
FM B1	$Y = 363,30x - 2020,25$	0,9952	0,9904	10 – 2500	$Y = 545,12x - 9789,87$	0,9939	0,9879	10 – 2500
FM B2	$Y = 1473,86x - 6684,80$	0,9977	0,9955	10 – 2500	$Y = 1853,26x - 9802,08$	0,9976	0,9953	10 – 2500
HT-2	$Y = 636,52x + 1879,45$	0,9787	0,9579	5 – 2500	$Y = 339,72x - 11,90$	0,9972	0,9944	5 – 2500
T-2	$Y = 5561,76x + 11664,71$	0,9836	0,9674	5 – 2500	$Y = 2962,57x + 1396,25$	0,9989	0,9977	5 – 2500
ZEA	$Y = 2329,28x + 2517,66$	0,9953	0,9905	5 – 2500	$Y = 1325,11x + 3871,87$	0,9976	0,9952	5 – 2500
DAS	$Y = 5302,41x + 15954,89$	0,9767	0,9540	5 – 2500	$Y = 3386,02x + 4277,57$	0,9950	0,9901	5 – 2500
CIT	$Y = 4185,19x + 4152,00$	0,9935	0,9870	5 – 2500	$Y = 3050,23x + 7670,09$	0,9972	0,9943	5 – 2500

Tabela 17 - Valores de LOD e LOQ do instrumento e do método para cada micotoxina, estimados a partir das curvas analíticas em solvente orgânico e em extrato “branco” de feijão.

Micotoxina	Solvente orgânico				Extrato “branco” de matriz			
	LOD _i (ng mL ⁻¹)	LOQ _i (ng mL ⁻¹)	LOD _m (µg/kg)	LOQ _m (µg/kg)	LOD _i (ng mL ⁻¹)	LOQ _i (ng mL ⁻¹)	LOD _m (µg/kg)	LOQ _m (µg/kg)
OCR A	0,06	0,2	0,2	0,6	0,2	0,6	0,8	2,6
AF B1	0,05	0,1	0,2	0,5	0,4	1,1	1,5	4,9
AF B2	0,1	0,4	0,5	1,3	0,7	2,1	2,7	9,0
DON	0,7	2,1	2,8	7,1	0,6	1,9	2,5	8,1
FM B1	1,3	3,9	5,1	12,7	1,2	3,5	4,6	15,2
FM B2	0,9	2,8	3,7	9,1	0,9	2,8	3,7	12,3
HT-2	1,9	5,7	7,6	18,9	2,5	7,5	9,8	32,5
T-2	0,7	2,1	2,7	6,8	0,7	2,2	2,9	9,4
ZEA	0,9	2,6	3,5	8,6	1,4	4,4	5,8	19,1
DAS	0,7	2,0	2,7	6,7	0,7	2,2	2,9	9,4
CIT	0,8	2,5	3,3	8,2	1,7	5,2	6,9	22,7

4.3.2.3 Seletividade

Nenhuma interferência foi observada no tempo de retenção das micotoxinas em estudo, nem em solvente orgânico nem em extrato “branco” de matriz. Esse resultado comprova a seletividade do método e demonstra que este é adequado para a finalidade proposta.

Também para os dois padrões internos usados (quinalfós, usado como P.I.P., e propoxur, usado como P.I.I.) não foram observadas interferências em seus respectivos tempos de retenção.

4.3.2.4 Efeito matriz

As equações das curvas analíticas em solvente orgânico e em extrato “branco” de matriz foram obtidas pelo método dos mínimos quadrados ordinários, e seus coeficientes foram calculados pelas equações 3, 4 e 5 (item 3.10.1). Os cálculos foram feitos em planilha de Excel.

O teste *t* (Student) foi aplicado para determinar se o efeito matriz era significativo ou não para as micotoxinas em feijão. O *t_{calc}* foi calculado conforme a Equação 9 (item 3.10.4) tanto para comparação da inclinação das curvas analíticas em solvente orgânico e em extrato “branco” de matriz quanto para comparação dos

interceptos. Para encontrar o valor de t_{tab} em um nível de significância de 95%, o número de graus de liberdade foi calculado conforme a Equação 10 (item 3.10.4).

Na Tabela 18 foram reunidos os valores de t_{calc} e t_{tab} obtidos para a comparação dos pares de inclinação e intercepto das curvas analíticas para cada micotoxina, bem como a significância e a estimativa do efeito matriz (%) para cada analito. A estimativa do efeito matriz (%) foi calculada pela Equação 11 (item 3.10.4).

Como pode ser observado pelos resultados mostrados na Tabela 19, os valores de t_{calc} para as inclinações e interceptos das curvas analíticas, para todas as micotoxinas, foram maiores que os valores de t_{tab} . De acordo com o MAPA (2011), esse resultado leva a concluir que os pares de inclinação e intercepto das curvas analíticas em solvente orgânico e em extrato “branco” de matriz não são estatisticamente iguais e, com isso, o efeito matriz é significativo.

Ainda de acordo com o MAPA (2011), quando o efeito matriz é significativo, as amostras em estudo devem obrigatoriamente ser analisadas com curva analítica preparada em extrato “branco” de matriz, e não com curva analítica preparada em solvente orgânico.

SANTE (2017) também orienta que uma curva analítica preparada em extrato “branco” de matriz seja usada para analisar amostras sob investigação quando o efeito matriz for significativo, porém essa guia não instrui quanto à aplicação de teste estatístico para verificar a significância do efeito matriz. Esse guia apenas informa que o efeito matriz é significativo quando o resultado está acima de $\pm 20\%$.

O resultado do teste estatístico, indicando efeito matriz significativo para todas as micotoxinas avaliadas, foi reforçado pela estimativa do efeito matriz (%) a partir da inclinação das curvas analíticas em solvente orgânico e em extrato “branco” de matriz. Com exceção das FMs, cujo sinal analítico foi melhorado na presença de constituintes de matriz, as demais micotoxinas sofreram supressão de sinal quando avaliadas em extrato “branco” de matriz. Esse resultado era esperado, tendo em vista que nenhuma etapa de purificação do extrato foi efetuada para eliminar ou minimizar a presença (e os efeitos) dos constituintes de matriz.

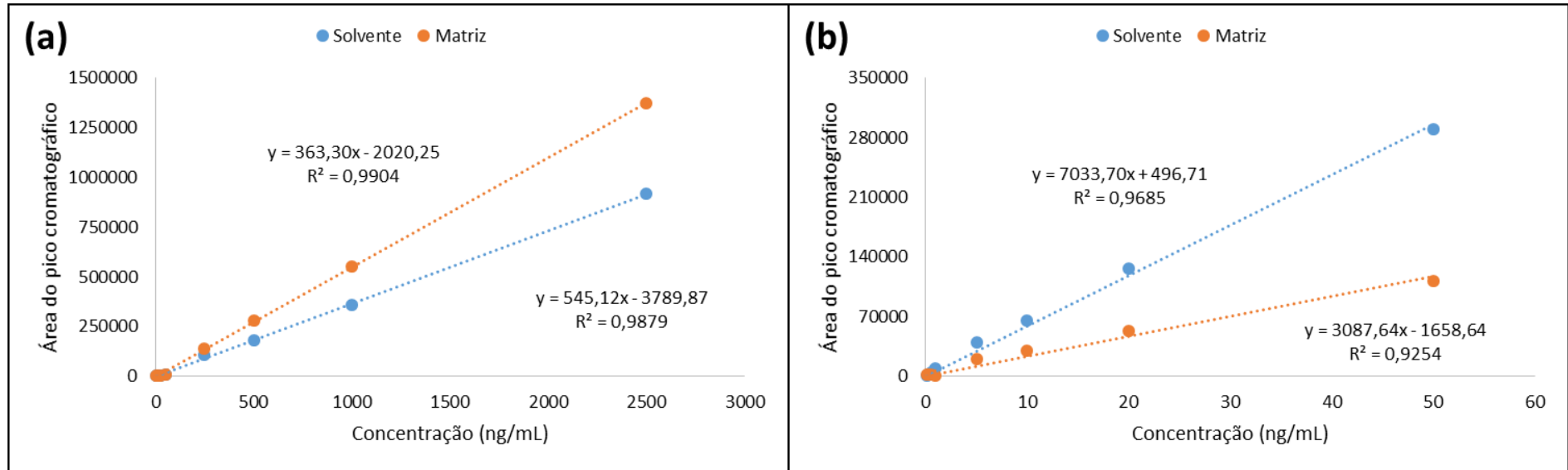
Tabela 18 - Resultado do teste t (Student) para verificar a significância do efeito matriz e estimativa do efeito matriz (%) para cada micotoxina em feijão.

Micotoxina	Inclinação		Intercepto		Significância do efeito matriz	Efeito matriz (%)
	t_{calc}	t_{tab}	t_{calc}	t_{tab}		
OCR A	98,967	2,000	25,838	1,980	Significativo	-43
AF B1	263,845	2,021	53,310	1,096	Significativo	-56
AF B2	22,894	2,000	62,886	2,000	Significativo	-22
DON	211,317	2,000	36,922	2,000	Significativo	-51
FM B1	392,655	1,980	87,708	1,960	Significativo	50
FM B2	102,425	2,000	32,849	2,000	Significativo	26
HT-2	143,109	2,000	47,382	2,000	Significativo	-47
T-2	195,291	2,021	49,670	2,000	Significativo	-47
ZEA	479,837	2,021	21,323	2,000	Significativo	-43
DAS	231,095	2,000	217,525	1,096	Significativo	-36
CIT	356,259	2,000	14,847	2,000	Significativo	-27

Na Figura 11 são mostrados os gráficos combinados das curvas analíticas em solvente orgânico e em extrato “branco” de matriz para as micotoxinas com o maior efeito matriz positivo e com o maior efeito matriz negativo (FM B1 e AF B1, respectivamente).

O efeito matriz também foi calculado para os dois padrões internos. Para o quinalfós (P.I.P.), o efeito matriz observado foi de -43% e para o propoxur (P.I.I.), o efeito matriz foi igual à 3744%. Apesar do efeito matriz estimado para o propoxur ser tão alto, o sinal analítico desse padrão interno foi bastante preciso, tanto em extrato “branco” de matriz quanto em solvente orgânico, com RSD menor que 10% em ambas as situações. Dessa forma, o efeito matriz para o P.I.I. não deve comprometer o uso dessa substância para a finalidade proposta.

Figura 11 - (a) Efeito matriz positivo para FM B1 e (b) efeito matriz negativo para AF B1 em feijão.



4.3.2.5 Precisão e Exatidão (ensaios de fortificação e recuperação)

A precisão intracorrida (repetitividade) e a exatidão foram avaliadas por meio dos ensaios de fortificação e recuperação, conforme descrito nos itens 3.10.5 e 3.10.6.1. A recuperação média para cada nível de fortificação foi calculada, bem como o desvio padrão e o RSD. A média dos percentuais de recuperação e RSD (%) para cada micotoxina, nos quatro níveis de fortificação, são apresentados na Tabela 19.

Tabela 19 - Média dos percentuais de recuperação e RSD (%) nos quatro níveis de fortificação, e LOQ_m para cada micotoxina em feijão.

Micotoxina	Níveis de fortificação ¹								LOQ _m (µg kg ⁻¹)
	1		2		3		4		
	Rec. Média (%)	RSD (%)	Rec. Média (%)	RSD (%)	Rec. Média (%)	RSD (%)	Rec. Média (%)	RSD (%)	
OCR A	-	-	77	5	74	3	70	3	5
AF B1	-	-	70	19	72	20	66	14	5
AF B2	-	-	97	10	76	14	79	14	5
DON	70	6	71	8	74	4	70	4	100
FM B1	90	7	78	4	77	6	74	3	100
FM B2	92	3	82	4	80	4	75	2	100
HT-2	109	14	107	16	116	8	102	5	100
T-2	46	14	27	10	33	11	42	14	-
ZEA	79	6	78	6	86	4	76	3	100
DAS	33	31	27	5	33	13	43	14	-
CIT	27	5	26	5	25	2	26	3	-

¹Nível 1: 2 µg kg⁻¹ para OCR A e AFs; 100 µg kg⁻¹ para DON, FMs, HT-2, T-2, ZEA, DAS e CIT. Nível 2: 5 µg kg⁻¹ para OCR A e AFs; 250 µg kg⁻¹ para DON, FMs, HT-2, T-2, ZEA, DAS e CIT. Nível 3: 10 µg kg⁻¹ para OCR A e AFs; 500 µg kg⁻¹ para DON, FMs, HT-2, T-2, ZEA, DAS e CIT. Nível 4: 20 µg kg⁻¹ para OCR A e AFs; 1000 µg kg⁻¹ para DON, FMs, HT-2, T-2, ZEA, DAS e CIT.

Com exceção da T-2, DAS e CIT, todas as demais micotoxinas apresentaram recuperação e RSD dentro da faixa recomendada pelo MAPA (2011), conforme Tabela 6 mostrada no item 3.10.5, em pelo menos um dos quatro níveis de fortificação avaliados, tendo sido possível, assim, definir o LOQ_m para cada uma.

Apesar da recuperação abaixo de 50% em todos os níveis de fortificação, a recuperação das micotoxinas T-2, DAS e CIT foi obtida com precisão aceitável, o que pode ser observado pelos baixos valores de RSD (%).

O LOQ_m obtido experimentalmente pelo ensaio de fortificação e recuperação para a AF B2 foi menor do que aquele estimado. Para as demais micotoxinas, o LOQ_m

obtido experimentalmente foi igual (AF B1) ou maior (OCR A, DON, FM B1 e B2, HT-2 e ZEA) do que aquele estimado a partir da curva analítica.

Para a OCR A, a diferença entre o LOQ_m estimado e o determinado experimentalmente pode ser explicada pelo fato de que, em níveis de concentração muito baixos, os constituintes de matriz estão presentes em maior quantidade em relação à quantidade de analito na amostra. Isso faz com que o efeito matriz seja mais pronunciado em níveis de concentração mais baixos, isso dificulta a recuperação dessa micotoxina em níveis de concentração tão baixos, só sendo possível a extração com precisão e exatidão aceitáveis em níveis pouco mais altos.

Já para as micotoxinas DON, FMs, HT-2 e ZEA a diferença observada entre o LOQ_m estimado e o determinado experimentalmente é simplesmente pelo fato de que a menor concentração testada no ensaio de fortificação ter sido 100 µg kg⁻¹.

De acordo com SANTE (2017), o LOQ_m para cada micotoxina deve ser igual ou menor que o LMT para cada uma a matriz em estudo, o que foi alcançado para as micotoxinas avaliadas em feijão (exceto T-2, DAS e CIT).

Do total de micotoxinas estudadas para feijão, 42% apresentaram LOQ_m igual ao primeiro nível de fortificação (DON, FMs e ZEA), 33% igual ao segundo nível de fortificação (OCR A, AF B1 e B2) e para 25% não foi possível determinar experimentalmente o LOQ_m.

Nem todas as micotoxinas têm LMT estipulado para todas as mercadorias, como mostra a Tabela 1 (item 2.2.3). Pelos valores indicados nesta tabela, é possível comprovar que os valores de LOQ_m obtidos experimentalmente contemplam o LMT para cada micotoxina, como exigido por SANTE (2017).

A recuperação para o quinalfós (P.I.P.) em feijão também foi avaliada, tendo sido obtida recuperação média igual à 37%, com RSD igual à 20%. Não há critério de aceitação estabelecido para recuperação e precisão de padrão interno. Esse parâmetro não foi avaliado para o propoxur (P.I.I.) pois este só é adicionado ao final do procedimento, na etapa de diluição, de forma igual para todas as amostras, não passando pelo processo de extração como o quinalfós.

4.3.2.5.1 Precisão intermediária

A precisão intermediária, também denominada reprodutibilidade intralaboratorial, foi avaliada por meio de ensaios de fortificação e recuperação, cujo procedimento de fortificação das amostras de matriz “branco” e extração das amostras foi realizado do início ao fim por um segundo analista, em um intervalo de tempo superior à 24 h após a primeira precisão.

A Tabela 21 reúne os dados obtidos pelos analistas 1 e 2, bem como os dados da precisão intermediária, obtidos pela média das recuperações médias e RSD (%) entre os dois analistas.

Pelos dados mostrados na Tabela 20, observa-se que a maioria das micotoxinas (OCR A, AF B1, DON, FM B1 e B2 e ZEA) avaliadas apresentou RSD (%) de precisão intermediária dentro do limite permitido pelo MAPA (2011) em todos os níveis de fortificação, conforme critérios de desempenho mostrados na Tabela 6 (item 3.10.6.2). Esses dados mostram que a variabilidade dos resultados para essas micotoxinas é pequena, mesmo quando avaliadas em dias diferentes e por analistas diferentes, refletindo maior confiabilidade dos resultados.

Observou-se também que o RSD (%) de precisão intermediária para as micotoxinas DAS e CIT apresentou-se dentro da faixa recomendada pelo MAPA (2011) para esse parâmetro (Tabela 6, item 3.10.6.2), nos quatro níveis de fortificação, embora para essas micotoxinas não se tenha obtido valores de recuperação dentro da faixa recomendada pelo mesmo órgão (Tabela 5 item 3.10.5). Isso demonstra que, apesar do método proposto não ser exato para essas duas micotoxinas, a precisão em termos de repetitividade é reprodutível, o que é confirmado pelos dados de reprodutibilidade intralaboratorial.

Tabela 20 - Dados de precisão intermediária para cada micotoxina em feijão.

Micotoxina	Nível de fortificação ($\mu\text{g kg}^{-1}$) ¹	Recuperação média (%)		Média das recuperações médias dos dois analistas (%)	RSD de precisão intermediária (%)
		Analista 1	Analista 2		
OCR A	1	-	-	-	-
	2	77	73	75	4
	3	74	70	72	4
	4	70	60	65	11
AF B1	1	-	-	-	-
	2	70	109	90	30
	3	72	82	77	9
	4	66	78	72	12
AF B2	1	-	-	-	-
	2	97	82	90	12
	3	76	43	60	39
	4	79	60	70	19
DON	1	70	71	71	1
	2	71	70	71	1
	3	74	72	73	2
	4	70	71	71	1
FM B1	1	90	76	93	12
	2	78	77	78	1
	3	77	73	75	4
	4	74	68	71	6
FM B2	1	92	80	86	10
	2	82	77	80	4
	3	80	75	78	5
	4	75	72	74	3
HT-2	1	109	100	105	6
	2	107	138	123	18
	3	116	140	128	13
	4	102	129	116	17
T-2	1	46	27	37	37
	2	27	25	26	5
	3	33	26	30	17
	4	42	37	40	9
ZEA	1	79	86	83	6
	2	78	83	81	4
	3	86	84	85	2
	4	76	82	79	5
DAS	1	33	29	31	9
	2	27	26	27	3
	3	33	27	30	14
	4	43	36	40	13
CIT	1	27	22	25	14
	2	26	22	24	12
	3	25	22	24	9
	4	26	23	25	9

¹ Nível 1: $2 \mu\text{g kg}^{-1}$ para OCR A e AFs; $100 \mu\text{g kg}^{-1}$ para DON, FMs, HT-2, T-2, ZEA, DAS e CIT. Nível 2: $5 \mu\text{g kg}^{-1}$ para OCR A e AFs; $250 \mu\text{g kg}^{-1}$ para DON, FMs, HT-2, T-2, ZEA, DAS e CIT. Nível 3: $10 \mu\text{g kg}^{-1}$ para OCR A e AFs; $500 \mu\text{g kg}^{-1}$ para DON, FMs, HT-2, T-2, ZEA, DAS e CIT. Nível 4: $20 \mu\text{g kg}^{-1}$ para OCR A e AFs; $1000 \mu\text{g kg}^{-1}$ para DON, FMs, HT-2, T-2, ZEA, DAS e CIT.

Para a T-2, o RSD de precisão intermediária ficou acima do valor permitido pelo MAPA (2011) apenas no primeiro nível de fortificação, atendendo os critérios de desempenho de precisão intermediária nos outros três níveis de concentração. Essa micotoxina, da mesma forma que DAS e CIT, não atendeu os critérios de aceitação definidos pelo MAPA (2011) para recuperação, e ainda assim o resultado é consistente e com pouca variabilidade.

4.3.3 Validação de método analítico para determinação de micotoxinas em soja

O método analítico para determinação de micotoxinas em soja foi validado de acordo com o resultado da etapa de desenvolvimento e otimização do procedimento, tendo sido escolhido o Ensaio 5 para essa finalidade. As amostras foram extraídas conforme descrito no item 3.9.2 e avaliados conforme critérios estabelecidos por SANTE (2017), INMETRO (2018) e MAPA (2011).

Durante a avaliação dos resultados da validação do método, encontrou-se dificuldade em identificar e integrar corretamente os picos cromatográficos das micotoxinas AF G1 e G2 em matriz, dessa forma, essas micotoxinas foram excluídas do estudo em soja.

4.3.3.1 Linearidade e curva analítica

A linearidade do método analítico para determinação de micotoxinas em soja foi avaliada conforme descrito no item 3.10.1. Da mesma forma que para feijão, a escolha da ponderação das curvas analíticas em extrato “branco” de soja foi avaliada com base nos gráficos “resíduos x concentração” para cada analito e na soma dos valores absolutos dos resíduos da curva analítica, para cada ponderação testada (1, $1/X^2$, $1/X$, $1/X^{0,5}$, $1/Y^2$, $1/Y$ e $1/Y^{0,5}$). No Apêndice C são mostrados os gráficos resíduos x concentração para as ponderações 1 (sem ponderação, regressão linear simples) e para a ponderação obtida por meio da regressão linear ponderada para cada micotoxina.

A Tabela 21 apresenta a soma dos valores absolutos dos resíduos da curva analítica em matriz para cada ponderação. A ponderação escolhida foi aquela que

apresentou a menor soma dos resíduos, bem como resíduos homoscedásticos após aplicação da ponderação.

Semelhantemente ao que foi observado para a matriz feijão, em soja as micotoxinas também apresentaram diferentes ponderações umas das outras, e diferentes ainda do que foi determinado para feijão. Tal resultado é compreensível, tendo em vista que a linearidade é dependente da constituição da amostra e diferentes modelos lineares podem ser necessários para ajustar o gráfico da resposta em função da concentração dos analitos.

Após a definição da ponderação para cada micotoxina, efetuou-se a regressão linear pelo método dos mínimos quadrados ordinários ponderados, utilizando as equações 3, 4 e 5 (item 3.10.1) para definir os coeficientes a , b e r para as curvas analíticas em solvente orgânico e em extrato “branco” de matriz.

Tabela 21 - Soma dos valores absolutos dos resíduos da curva analítica para escolha da ponderação para cada micotoxina em soja.

Micotoxina	Soma dos valores absolutos dos resíduos da curva analítica							Ponderação escolhida
	Ponderação							
	1	1/X	1/X ²	1/X ^{0,5}	1/Y	1/Y ²	1/Y ^{0,5}	
OCR A	196,3	51,9	70,3	50,8	42,4	63,1	68,4	1/Y
AF B1	188,2	112,1	112,6	106,0	109,7	104,0	118,1	1/Y ²
AF B2	68,1	48,6	39,5	64,6	79,5	72,9	82,1	1/X ²
DON	6,4	6,9	4,7	7,0	6,8	7,7	7,0	1/X ²
FM B1	213,2	131,0	164,7	164,9	128,9	292,6	149,2	1/Y
FM B2	449,9	139,8	159,8	207,2	137,9	237,9	190,9	1/Y
HT-2	246,8	117,7	122,5	134,6	121,5	125,2	148,7	1/Y
T-2	164,2	17,3	9,3	39,4	17,2	9,2	39,4	1/Y ²
ZEA	121,8	146,1	48,5	43,5	43,0	62,1	342,3	1/Y
DAS	332,5	87,7	41,9	346,8	151,0	62,5	371,9	1/X ²
CIT	335,0	76,0	33,4	241,5	117,7	34,2	250,6	1/X ²

Apenas as micotoxinas OCR A, AF B1 e B2 apresentaram faixa linear ligeiramente diferente em solvente orgânico e em extrato “branco” de matriz, como mostram os resultados da regressão linear ponderada para cada micotoxina na Tabela 22. Isso é explicado pelo fato de que são micotoxinas cuja faixa de concentração da curva analítica é baixa, e quanto mais baixa é a concentração, maior é a influência causada por constituintes de matriz, o que pode ocasionar desvios de linearidade. Para as demais micotoxinas (DON, FM B1 e B2, HT-2, T-2, ZEA, DAS e CIT) a faixa

linear foi a mesma para as curvas analíticas preparadas em solvente orgânico e em extrato “branco” de matriz.

Todas as micotoxinas avaliadas em soja apresentaram curvas analíticas com correlação linear fortíssima, com $0,91 \leq r \leq 0,99$, conforme critério apresentado por BRITO et al. (2003). Considerando o r^2 para cada micotoxina, observou-se que 100% das micotoxinas em solvente orgânico apresentaram r^2 maior ou igual à 0,96, enquanto em matriz 91% das micotoxinas apresentaram r^2 maior ou igual à 0,96.

4.3.3.2 Limite de detecção e quantificação

O LOD e LOQ instrumental (LOD_i e LOQ_i , respectivamente) e do método (LOD_m e LOQ_m , respectivamente) foram estimados a partir das curvas analíticas em solvente orgânico e extrato “branco” de matriz, sendo calculados a partir das equações 6 e 7, apresentadas no item 3.10.2. Os valores estimados de LOD e LOQ do instrumento e do método são apresentados na Tabela 23.

As equações apresentadas no item 3.10.2 foram usadas para calcular os LOD e LOQ instrumentais, enquanto os LOD e LOQ do método foram obtidos pela multiplicação de LOD_i e LOQ_i pelo fator de diluição do método que é 4, como demonstrado na Tabela 4 no item 3.10.5.

O LOD_i real em solvente orgânico para as micotoxinas foi determinado a partir da injeção de soluções analíticas de baixa concentração, obtendo-se valores iguais à $0,1 \text{ ng mL}^{-1}$ para OCR A e AF B1, e $0,5 \text{ ng mL}^{-1}$ para AF B2 (correspondente à 0,4 e $2,0 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$, respectivamente). Para DON, FM B1, FM B2, HT-2, T-2, ZEA, DAS e CIT, o LOD_i determinado foi igual à 5 ng mL^{-1} (correspondente à $20 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$).

Tabela 22 - Dados de linearidade das micotoxinas em soja: equação da reta, coeficiente de correlação (r), coeficiente de determinação (r^2) e faixa linear das curvas analíticas preparadas em solvente orgânico e extrato “branco” da matriz.

Micotoxina	Solvente orgânico				Extrato da matriz			
	Equação da reta	r	r^2	Faixa linear (ng mL ⁻¹)	Equação da reta	r	r^2	Faixa linear (ng mL ⁻¹)
OCR A	$Y = 8469,95x - 59,78$	0,9997	0,9995	0,1 – 50	$Y = 6355,65x + 2528,48$	0,9995	0,9990	0,5 – 50
AF B1	$Y = 4794,88x - 62,74$	0,9963	0,9926	0,1 – 50	$Y = 1258,98x + 1732,98$	0,9972	0,9945	1 – 50
AF B2	$Y = 559,632x - 40,16$	0,9811	0,9627	0,1 – 50	$Y = 261,32x + 3982,17$	0,9691	0,9394	0,5 – 50
DON	$Y = 1550,90x + 97,02$	0,9986	0,9973	5 – 2500	$Y = 771,85x - 492,53$	0,9997	0,9994	5 – 2500
FM B1	$Y = 561,17x - 3468,49$	0,9971	0,9942	10 – 2500	$Y = 1148,59x - 6946,87$	0,9976	0,9952	10 – 2500
FM B2	$Y = 2221,86x - 13089,43$	0,9969	0,9938	10 – 2500	$Y = 3818,39x - 21941,53$	0,9976	0,9953	10 – 2500
HT-2	$Y = 653,45x + 3151,11$	0,9966	0,9931	10 – 2500	$Y = 278,63x - 61,63$	0,9992	0,9985	10 – 2500
T-2	$Y = 6588,54x + 1453,25$	0,9960	0,9919	5 – 2500	$Y = 3433,07x - 33,42$	0,9996	0,9992	5 – 2500
ZEA	$Y = 2808,05x + 806,19$	0,9999	0,9998	5 – 2500	$Y = 1376,30x - 11087,20$	0,9995	0,9989	10 – 2500
DAS	$Y = 6436,82x + 7020,63$	0,9926	0,9853	5 – 2500	$Y = 2730,61x + 6003,98$	0,9968	0,9935	5 – 2500
CIT	$Y = 4836,58x - 932,63$	0,9919	0,9838	5 – 2500	$Y = 3370,69x + 9424,13$	0,9973	0,9947	5 – 2500

Já o LOD_i real em matriz para essas micotoxinas foi determinado por meio da injeção de soluções analíticas de baixa concentração em extrato “branco” de matriz, obtendo-se valores iguais à 0,5 ng mL⁻¹ para OCR A, AF B1 e AF B2 (correspondente à 2,0 µg kg⁻¹), e igual à 5 ng mL⁻¹ para DON, FM B1, FM B2, HT-2, T-2, ZEA, DAS e CIT (correspondente à 20 µg kg⁻¹).

O LOQ_m real deve ser determinado pelos ensaios de fortificação e recuperação e deve atender aos requisitos específicos, como orienta INMETRO (2018), SANTE (2017) e MAPA (2011).

Tabela 23 - Valores de LOD e LOQ do instrumento e do método para cada micotoxina, estimados a partir das curvas analíticas em solvente orgânico e em extrato “branco” de soja.

Micotoxina	Solvente orgânico				Extrato “branco” de matriz			
	LOD _i (ng mL ⁻¹)	LOQ _i (ng mL ⁻¹)	LOD _m (µg/kg)	LOQ _m (µg/kg)	LOD _i (ng mL ⁻¹)	LOQ _i (ng mL ⁻¹)	LOD _m (µg/kg)	LOQ _m (µg/kg)
OCR A	0,06	0,2	0,2	0,8	1,0	3,0	3,9	12,9
AF B1	0,1	0,4	0,5	1,7	2,0	6,2	8,1	26,8
AF B2	0,2	0,5	0,7	2,3	6,5	19,8	26,2	86,4
DON	0,4	1,3	1,7	5,7	0,4	1,3	1,7	5,5
FM B1	1,0	3,0	4,0	13,1	0,8	2,6	3,4	11,2
FM B2	0,4	1,3	1,7	5,6	1,3	4,0	5,3	17,5
HT-2	2,0	6,1	8,1	26,6	3,3	10,0	13,2	43,5
T-2	0,9	2,8	3,7	12,3	0,5	1,5	2,0	6,8
ZEA	0,6	1,8	2,3	7,7	4,8	14,6	19,2	63,5
DAS	0,6	1,7	2,2	7,3	1,4	4,2	5,6	18,4
CIT	0,5	1,5	2,0	6,7	2,7	8,1	10,7	35,3

4.3.3.3 Seletividade

Nenhuma interferência foi observada no tempo de retenção das micotoxinas em estudo em solvente orgânico ou em extrato “branco” de matriz confirmando a seletividade do método.

4.3.3.4 Efeito matriz

As equações das curvas analíticas em solvente orgânico e em extrato “branco” de matriz foram obtidas pelo método dos mínimos quadrados ordinários, e seus coeficientes foram calculados pelas equações 3, 4 e 5 (item 3.10.1). Os cálculos foram feitos em planilha de Excel.

O teste t (Student) foi aplicado para determinar se o efeito matriz era significativo ou não para as micotoxinas em soja. O t_{calc} foi calculado conforme a Equação 9 (item 3.10.4), em planilha de Excel, tanto para comparação da inclinação das curvas analíticas em solvente orgânico e em extrato “branco” de matriz quanto para comparação dos interceptos. Para encontrar o valor de t_{tab} em um nível de significância de 95%, o número de graus de liberdade foi calculado conforme a Equação 10 (item 3.10.4).

Os valores de t_{calc} e t_{tab} obtidos para a comparação dos pares de inclinação e intercepto das curvas analíticas para cada micotoxina, bem como a significância e a estimativa do efeito matriz (%) para cada analito, são apresentados na Tabela 24. A estimativa do efeito matriz (%) foi calculada pela Equação 11 (item 3.10.4).

Tabela 24 - Resultado do teste t (Student) para verificar a significância do efeito matriz e estimativa do efeito matriz (%) para cada micotoxina em soja.

Micotoxina	Inclinação		Intercepto		Significância do efeito matriz	Efeito matriz (%)
	t_{calc}	t_{tab}	t_{calc}	t_{tab}		
OCR A	77,518	1,671	18,429	1,684	Significativo	-25
AF B1	336,101	2,021	44,559	2,000	Significativo	-74
AF B2	24,021	2,021	41,662	2,021	Significativo	-53
DON	987,693	2,000	20,503	2,000	Significativo	-50
FM B1	498,170	2,000	76,266	2,000	Significativo	105
FM B2	181,971	2,021	84,443	2,021	Significativo	72
HT-2	735,353	2,000	72,807	2,000	Significativo	-57
T-2	672,777	2,000	7,280	2,021	Significativo	-48
ZEA	471,080	1,980	92,579	2,000	Significativo	-51
DAS	500,946	2,000	5,359	1,980	Significativo	-58
CIT	23,307	2,021	26,834	2,021	Significativo	-23

O resultado do teste estatístico indica efeito matriz significativo para todas as matrizes avaliadas em soja, o que foi confirmado pela estimativa do efeito matriz (%).

Semelhantemente ao que foi observado para feijão, todas as micotoxinas sofreram supressão de sinal quando avaliadas em extrato “branco” de soja, exceto as FMs, que apresentaram aumento no sinal analítico em extrato “branco” de matriz quando comparado ao sinal analítico em solvente orgânico. A supressão de sinal para 82% das micotoxinas avaliadas em soja era esperado, tendo em vista que nenhuma

etapa de purificação do extrato foi efetuada para eliminar ou minimizar a presença (e os efeitos) dos constituintes de matriz.

Também de forma semelhante ao que foi observado para feijão, as micotoxinas que apresentaram o efeito matriz mais positivo e mais negativo foram, respectivamente, FM B1 e AF B1, cujos gráficos combinados das curvas analíticas em solvente orgânico e em extrato “branco” de matriz são mostrados na Figura 12.

O efeito matriz também foi avaliado para os dois padrões internos, sendo estimado em -43% para o quinalfós (P.I.P) e em 6374% para o propoxur (P.I.I). Embora o propoxur tenha sofrido um efeito matriz muito maior que as micotoxinas, isso não deve comprometer o uso dessa substância como padrão interno, tendo em vista que o sinal analítico do propoxur se manteve preciso do início ao fim da sequência analítica, com RSD menor que 10%, tanto em solvente orgânico quanto em extrato “branco” de matriz.

4.3.3.5 *Precisão e Exatidão (ensaios de fortificação e recuperação)*

A precisão intracorrída (repetitividade) e a exatidão foram avaliadas por meio dos ensaios de fortificação e recuperação, conforme descrito nos itens 3.10.5 e 3.10.6. A recuperação média para cada nível de fortificação foi calculada, bem como o desvio padrão e o RSD. A média dos percentuais de recuperação e RSD (%) para cada micotoxina, nos quatro níveis de fortificação, são apresentados na Tabela 25.

Figura 12 - (a) Efeito matriz positivo para FM B1 e (b) efeito matriz negativo para AF B1 em soja.

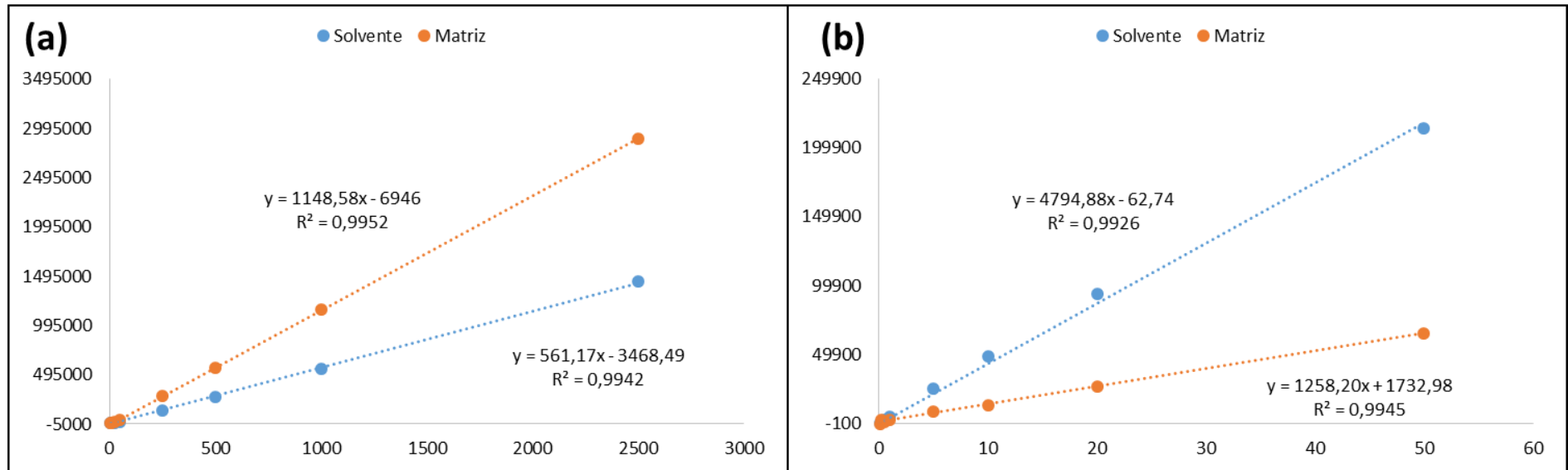


Tabela 25 - Média dos percentuais de recuperação e RSD (%) nos quatro níveis de fortificação, e LOQ_m para cada micotoxina em soja.

Micotoxina	Níveis de fortificação ¹								LOQ _m (µg kg ⁻¹)
	1		2		3		4		
	Rec. Média (%)	RSD (%)	Rec. Média (%)	RSD (%)	Rec. Média (%)	RSD (%)	Rec. Média (%)	RSD (%)	
OCR A	-	-	91	16	84	9	75	7	5
AF B1	-	-	111	20	101	16	83	14	5
AF B2	-	-	94	20	116	19	93	15	5
DON	77	5	77	2	76	3	75	2	100
FM B1	96	5	86	3	82	2	78	2	100
FM B2	94	5	85	3	77	4	75	5	100
HT-2	71	13	62	8	65	4	68	4	100
T-2	77	4	80	2	74	6	72	6	100
ZEA	73	13	75	6	75	10	72	9	100
DAS	73	5	75	2	72	3	72	3	100
CIT	32	5	28	4	28	5	27	4	-

¹ Nível 1: 2 µg/kg para OCR A e AFs; 100 µg kg⁻¹ para DON, FMs, HT-2, T-2, ZEA, DAS e CIT. Nível 2: 5 µg kg⁻¹ para OCR A e AFs; 250 µg kg⁻¹ para DON, FMs, HT-2, T-2, ZEA, DAS e CIT. Nível 3: 10 µg kg⁻¹ para OCR A e AFs; 500 µg kg⁻¹ para DON, FMs, HT-2, T-2, ZEA, DAS e CIT. Nível 4: 20 µg kg⁻¹ para OCR A e AFs; 1000 µg kg⁻¹ para DON, FMs, HT-2, T-2, ZEA, DAS e CIT.

Todas as micotoxinas apresentaram recuperação e RSD dentro da faixa recomendada pelo MAPA (2011), conforme Tabela 6 apresentada no item 3.10.5, em pelo menos um nível de fortificação avaliado, com exceção da CIT, que apresentou recuperação abaixo de 35% em todos os níveis de concentração.

Apesar da baixa recuperação para a CIT, a precisão do método para essa micotoxina foi bastante alta, com RSD menor que 10% em todos os níveis de fortificação, semelhantemente ao que foi obtido nos ensaios de fortificação e recuperação executados em feijão.

O LOQ_m obtido experimentalmente pelo ensaio de fortificação e recuperação para a OCR A, AF B1 e B2 foi menor do que aquele estimado e apresentado na Tabela 23 do item 4.3.3.2. Isso pode ser devido ao fato de que a estimativa do LOQ_m pela Equação 7 (item 3.10.2) leva em consideração o desvio padrão do menor ponto da curva analítica, e não há como prever a facilidade ou dificuldade em recuperar as micotoxinas adicionadas às amostras de matriz “branca”. Por isso o LOQ_m deve ser determinado experimentalmente, e não apenas estimado.

Para as demais micotoxinas (DON, FM B1 e B2, HT-2, T-2 e ZEA), o LOQ_m obtido experimentalmente foi maior do que aquele estimado a partir da curva analítica,

no entanto, deve-se ressaltar que a menor concentração avaliada nos ensaios de fortificação e recuperação foi igual à $100 \mu\text{g kg}^{-1}$ para essas micotoxinas.

Do total de micotoxinas avaliadas em soja, 64% apresentaram LOQ_m igual ao primeiro nível de fortificação ($100 \mu\text{g kg}^{-1}$ para DON, FMs, HT-2, T-2 e ZEA), 27% apresentaram LOQ_m igual segundo nível de fortificação ($5 \mu\text{g kg}^{-1}$ para OCR A, AF B1 e B2) e para 9% não foi possível determinar experimentalmente o LOQ_m (CIT).

As legislações atualmente em vigência no Brasil (ANVISA, 2011 e 2017) e na Europa (EUROPEAN COMMISSION, 2006) não estipulam LMT para micotoxinas em soja. Dessa forma, é necessário validar LOQ_m para essas substâncias nos menores níveis de concentração possíveis, desde que precisão e exatidão sejam obtidas dentro de critérios específicos, assim como aqueles estabelecidos pelo MAPA (2011), por exemplo.

A recuperação para o quinalfós (P.I.P) em soja também foi avaliada, tendo sido obtida recuperação média igual à 51%, com RSD igual à 7%. Não há critério de aceitação estabelecido para recuperação e precisão de padrão interno. Esse parâmetro não foi avaliado para o propoxur (P.I.I) pois este só é adicionado ao final do procedimento, na etapa de diluição, de forma igual para todas as amostras, não passando pelo processo de extração como o quinalfós.

4.3.3.5.1 Precisão intermediária

A reprodutibilidade intralaboratorial foi avaliada por meio da precisão intermediária através de ensaios de fortificação e recuperação, cujo procedimento de fortificação das amostras de matriz “branca” e extração das amostras foi realizado do início ao fim por um segundo analista, em um intervalo de tempo superior à 24 h após a primeira precisão.

A recuperação média de cada analista para cada micotoxina, em todos os níveis de fortificação, bem como a recuperação média entre os analistas e o RSD (%) de precisão intermediária são mostrados na Tabela 26.

Todas as micotoxinas em todos os níveis de fortificação apresentaram RSD (%) de precisão intermediária dentro dos critérios de aceitação estabelecidos pelo MAPA (2011), conforme apresentado anteriormente na Tabela 6 (item 3.10.6.2).

O resultado de precisão intermediária obtido para as micotoxinas em soja é interessante e de extrema importância, tendo em vista que a soja é uma matriz com

alto teor de proteínas, lipídeos e carboidratos (36,5; 19,9 e 30,2%, respectivamente, conforme dados do UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE), o que demonstra que o método desenvolvido e otimizado é adequado para a finalidade proposta, levando a resultados precisos, com pouca variabilidade intralaboratorial e consequentemente, confiáveis.

Tabela 26 - Dados de precisão intermediária para cada micotoxina em soja.

Micotoxina	Nível de fortificação ($\mu\text{g kg}^{-1}$) ¹	Recuperação média (%)		Média das recuperações médias dos dois analistas (%)	RSD de precisão intermediária (%)
		Analista 1	Analista 2		
OCR A	1	-	-	-	-
	2	91	84	88	6
	3	84	78	81	5
	4	75	76	76	1
AF B1	1	-	-	-	-
	2	111	106	109	3
	3	101	89	95	9
	4	83	71	77	11
AF B2	1	-	-	-	-
	2	94	114	104	14
	3	116	94	105	15
	4	93	71	82	19
DON	1	77	74	76	3
	2	77	77	77	0
	3	76	78	77	2
	4	75	76	76	1
FM B1	1	96	96	96	0
	2	86	83	85	3
	3	82	80	81	2
	4	78	76	77	2
FM B2	1	94	97	96	2
	2	85	84	85	1
	3	77	81	79	4
	4	75	74	75	1
HT-2	1	71	74	73	3
	2	62	70	66	9
	3	65	73	69	8
	4	68	71	70	3
T-2	1	77	82	80	4
	2	80	83	82	3
	3	74	86	80	11
	4	72	81	77	8
ZEA	1	73	78	76	5
	2	75	79	77	4
	3	75	81	78	5
	4	72	73	73	1
DAS	1	73	81	77	7
	2	75	82	79	6
	3	72	84	78	11
	4	72	82	77	9
CIT	1	32	30	31	5
	2	28	29	29	2
	3	28	27	28	3
	4	27	29	28	5

¹ Nível 1: $2 \mu\text{g kg}^{-1}$ para OCR A e AFs; $100 \mu\text{g kg}^{-1}$ para DON, FMs, HT-2, T-2, ZEA, DAS e CIT. Nível 2: $5 \mu\text{g kg}^{-1}$ para OCR A e AFs; $250 \mu\text{g kg}^{-1}$ para DON, FMs, HT-2, T-2, ZEA, DAS e CIT. Nível 3: $10 \mu\text{g kg}^{-1}$ para OCR A e AFs; $500 \mu\text{g kg}^{-1}$ para DON, FMs, HT-2, T-2, ZEA, DAS e CIT. Nível 4: $20 \mu\text{g kg}^{-1}$ para OCR A e AFs; $1000 \mu\text{g kg}^{-1}$ para DON, FMs, HT-2, T-2, ZEA, DAS e CIT.

4.4 ARMAZENAMENTO DE GRÃOS EM ATMOSFERA CONTROLADA

4.4.1 Análise dos grãos previamente ao armazenamento em atmosfera controlada

A análise dos grãos previamente ao armazenamento em AC mostrou que nenhum cultivar de feijão e soja estava contaminado por micotoxinas. Logo, as micotoxinas quantificadas nesses cultivares após o período de seis meses do estudo foram produzidas nas condições de armazenamento.

Os grãos de milho estavam contaminados por FM B1, FM B2, DON e ZEA antes do início do estudo, sendo que apenas ZEA estava presente na concentração $100 \mu\text{g kg}^{-1}$. As demais micotoxinas estavam presentes em concentrações acima de 20 e abaixo de $100 \mu\text{g kg}^{-1}$.

4.4.2 Estudo de armazenamento de feijão em atmosfera controlada

Os cultivares Fepagro 26 (feijão preto), Garapiá (feijão carioca), Caupi (feijão branco) e Caupi (feijão vermelho) foram submetidos aos 15 tratamentos descritos na Tabela 7, item 3.11.2.

As amostras de feijão foram trituradas individualmente em moinho de facas (higienizado entre cada tratamento, para cada cultivar) e foram extraídas conforme item 3.9.1.

Todas as micotoxinas validadas para feijão foram monitoradas nos quatro cultivares, sendo que apenas AF B1 foi encontrada em concentrações quantificáveis nos cultivares Fepagro 26 (feijão preto) e Garapiá (feijão carioca), conforme resultados descritos na Tabela 27. A OCR A foi detectada em concentrações abaixo do LOQ ($5 \mu\text{g kg}^{-1}$) na maioria dos tratamentos para a variedade Fepagro 26 (feijão preto). Nenhuma micotoxina foi detectada nos cultivares de feijão Caupi, tanto branco quanto vermelho.

As aflatoxinas são produzidas por fungos de armazenamento, o que justifica a ausência dessas micotoxinas no “branco” de todos os cultivares de feijão previamente ao armazenamento, e o aparecimento dessas em alguns tratamentos aplicados.

Todos os tratamentos de T1 até T5 foram conduzidos à 20 °C, sendo diferenciados um do outro na concentração dos gases da AC, onde a pressão parcial de O₂ foi reduzida e a pressão parcial de CO₂ foi aumentada, simultaneamente, de T1 para T5. Nenhuma micotoxina relacionada a fungos de armazenamento foi detectada nesses tratamentos, especialmente AF B1 (quantificada em alguns tratamentos nos cultivares Fepagro 26 e Garapiá, feijão preto e carioca, respectivamente).

Esse resultado indica que a temperatura de armazenamento ≤ 20 °C pode ter exercido maior influência no controle de crescimento fúngico e conseqüentemente produção de micotoxinas do que a própria composição da atmosfera. MOHAPATRA et al. (2017) já haviam indicado que armazenamento de grãos e cereais em temperaturas abaixo de 20 °C poderia retardar o crescimento de fungos micotoxigênicos.

A análise estatística dos resultados para Fepagro 26 e Garapia mostrou diferenças estatisticamente significativas para tratamentos sob mesma atmosfera em diferentes temperaturas.

Para comparar as concentrações médias de AF B1 dentro de cada faixa de temperatura e considerando diferentes condições de atmosfera nos cultivares Fepagro 26 e Garapiá (feijão preto e carioca, respectivamente), os valores de *F calculado* e *F crítico* foram comparados, constando-se $F \text{ calculado} < F \text{ crítico}$, o que implica em resultados estatisticamente iguais ou, que a concentração média de AF B1 em uma dada temperatura não é significativamente diferente entre as condições de atmosfera estudadas.

Por outro lado, o $F \text{ calculado} > F \text{ crítico}$ quando foram comparadas as concentrações médias dessa micotoxina em cada atmosfera específica, em diferentes temperaturas, o que leva à conclusão de que as diferenças observadas são devidas à temperatura. O teste-*t* mostrou que há diferenças significativas na concentração média de AF B1 quando o resultado para cada atmosfera é comparado em diferentes faixas de temperatura, pois o valor de *p* calculado, identificado por P (T \leq t) bi-caudal, foi menor que 0,05. Ou seja, há diferenças significativas quando os resultados são comparados entre 20 e 25 °C, entre 20 e 30 °C, e entre 25 e 30 °C.

Tabela 27 - Micotoxinas encontradas em feijão, cultivares Fepagro 26 e Garapiá (feijão preto e carioca, respectivamente).

Tratamento	Micotoxinas em Fepagro 26 ($\mu\text{g kg}^{-1}$)		Micotoxinas em Garapiá ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	
	AF B1	Outras micotoxinas ²	AF B1	Outras micotoxinas ²
Branco¹	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
T1	< LOD	< LOQ ³	< LOD	< LOD
T2	< LOD	< LOQ ³	< LOD	< LOD
T3	< LOD	< LOQ ³	< LOD	< LOD
T4	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
T5	< LOD	< LOQ ³	< LOD	< LOD
T6	< LOQ	< LOQ ³	< LOD	< LOD
T7	< LOQ	< LOQ ³	< LOQ	< LOD
T8	5	< LOQ ³	< LOQ	< LOD
T9	5	< LOQ ³	< LOQ	< LOD
T10	< LOQ	< LOQ ³	< LOQ	< LOD
T11	6	< LOQ ³	6	< LOD
T12	6	< LOQ ³	6	< LOD
T13	8	< LOQ ³	9	< LOD
T14	7	< LOQ ³	9	< LOD
T15	7	< LOD	7	< LOD

LOD: 0,4 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para AF B1, AF B2 e OCR A; 20 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para DON, FM B1, FM B2, T-2, HT-2, ZEA, DAS e CIT.

LOQ: 5 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para AF B1, AF B2 e OCR A; 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para DON, FM B1, FM B2, HT-2 e ZEA. Não foi possível determinar LOQ para T-2, DAS e CIT.

¹ Branco: amostra de grão analisada previamente ao armazenamento em AC.

² AF B2, OCR A, DON, DAS, T-2, HT-2, ZEA, CIT, FM B1, FM B2.

³ OCR A em Fepagro 26.

Os tratamentos T6 e T7 também foram eficazes no armazenamento dos quatro cultivares de feijão pois nenhuma micotoxina relacionada ao armazenamento foi quantificada, embora AF B1 tenha sido detectada no cultivar Fepagro 26 (feijão preto) em concentrações abaixo do LOQ em ambos os tratamentos, e também no cultivar Garapiá (feijão carioca) no tratamento T7, também abaixo do LOQ.

AF B1 foi quantificada nos tratamentos T8 e T9 para o cultivar Fepagro 26 (feijão preto). Esses tratamentos foram conduzidos à temperatura de 25 °C, sendo diferenciados um do outro na AC aplicada: T8 contendo 2,0 kPa de O₂, enquanto o tratamento T9 contendo 2,0 kPa de O₂ + 30 kPa de CO₂. Observou-se a ocorrência de AF B1 em ambos os tratamentos, indicando que 30 kPa de CO₂ à 25 °C não foi suficiente para impedir produção de AF B1 nesse cultivar. O tratamento T10 também foi conduzido à 25 °C, no entanto, a pressão parcial de CO₂ foi de 80 kPa mantendo-se 2,0 kPa de O₂, o que mostrou ser eficaz, pois não houve ocorrência de AF B1 em todos os cultivares de feijão.

Os tratamentos T11 até T15 foram conduzidos à 30 °C, aumentando-se a proporção de CO₂ de um tratamento para o outro. Tanto para o cultivar Fepagro 26 (feijão preto) quanto para Garapiá (feijão carioca) AF B1 foi quantificada nos tratamentos 11 a 15. Novamente a temperatura mais alta parece ter exercido maior influência na produção de AF B1, pois essa micotoxina foi quantificada mesmo em condições de atmosfera com baixa concentração de O₂ e alto teor de CO₂. Mesmo no último tratamento, com pressão parcial de CO₂ em 80 kPa, houve produção de AF B1. De fato a temperatura em torno de 30 °C é a temperatura ótima para o crescimento dos fungos produtores de aflatoxinas, conforme reportado por SWEENEY e DOBSON (1998) e GIORNI et al. (2008).

De acordo com PEREIRA, CARVALHO e PRADO (2002), o grau de oxigenação do ambiente assume papel importante no crescimento fúngico e produção de aflatoxinas, pois estes são microrganismos aeróbicos. Os autores ainda descrevem que a produção de aflatoxinas pode ser inibida mediante o aumento gradual na pressão parcial de CO₂ de 20 para 100 kPa.

Embora a OCR A também seja uma micotoxina associada ao armazenamento, esta não foi detectada e/ou quantificada nos cultivares de feijão estudados. Tal resultado pode estar associado ao crescimento mais lento da espécie *A. ochraceus* quando comparado com as espécies de fungos que produzem aflatoxinas, e também ao fato de que essa micotoxina é produzida quando os grãos são armazenados com

teor de umidade acima de 23% (MAGAN e ALDRED, 2007), o que não foi o caso desse estudo (11%).

4.4.3 Estudo de armazenamento de soja em atmosfera controlada

Os mesmos tratamentos aplicados para feijão foram estudados em quatro cultivares de soja, sendo Brasmax Bônus IPRO, Brasmax Desafio RR, Brasmax Ultra IPRO e Tec IRGA 6070. As amostras foram trituradas individualmente em moinho de facas (higienizado entre cada tratamento para cada cultivar) e foram extraídas conforme item 3.9.2.

É consenso entre vários autores que a soja é uma mercadoria pouco problemática no que diz respeito ao ataque de fungos e contaminação com micotoxinas quando comparado à contaminação sofrida por milho, trigo e amendoim, por exemplo (BULLERMAN, SCHROEDER e PARK, 1984; VALENTA et al., 2002). Segundo esses autores, isso está relacionado ao tipo de substrato oferecido pelos grãos de soja, que não oferece nutrientes suficientes para a produção de micotoxinas, especialmente carboidratos.

Em grãos de soja danificados podem ser encontradas as micotoxinas ZEA, DON, DAS, T-2 e HT-2. De acordo com BULLERMAN, SCHROEDER e PARK (1984), a soja não é um substrato adequado para a produção de aflatoxinas, embora suporte extensivo crescimento fúngico (VALENTA et al., 2002).

De fato, a presença de fungos em soja (assim como em outros tipos de grãos) não indica obrigatoriamente a contaminação por micotoxinas, pois essas substâncias são metabólitos produzidos na fase final ou estacionária do crescimento dos fungos. Se os fungos presentes nos grãos não chegaram na etapa final de crescimento ou morreram antes de chegar ao final do crescimento, não haverá produção de micotoxinas (BULLERMAN, SCHROEDER e PARK, 1984).

BULLERMAN, SCHROEDER e PARK (1984) descreveram que apenas pequenas quantidades de aflatoxinas podem ser produzidas em soja devido à baixa disponibilidade de zinco, nutriente que, juntamente com ácidos graxos e aminoácidos, parece ser essencial para a produção dessa classe de micotoxinas.

Um constituinte dos grãos de soja (também presente em feijão e milho) é o ácido fítico, cuja principal função nas plantas é atuar como reserva de fósforo e sua estrutura química apresenta 12 hidrogênios dissociáveis que, quando substituídos, conferem ao composto propriedade quelante, capaz de complexar cátions metálicos polivalentes como zinco, ferro e cálcio (FUKUJI et al., 2008).

BULLERMAN, SCHROEDER e PARK (1984) associaram a produção de pequenas quantidades de aflatoxinas em soja à presença de quantidades razoáveis ácido fítico, que seria o responsável por tornar o zinco (essencial para a produção de aflatoxinas, segundo os próprios autores) indisponível por estar complexado.

O teor de ácido fítico, por sua vez é influenciado pelo cultivar e condições climáticas (HÍDVÉGI, LÁSZTITY e RADOMIR, 2003), fazendo com que a disponibilidade de zinco, ácidos graxos e aminoácidos possa variar entre diferentes cultivares de soja, o que pode ocasionar a produção de aflatoxinas em quantidades maiores em alguns cultivares (BULLERMAN, SCHROEDER e PARK, 1984).

Embora a ocorrência de micotoxinas em soja já tenha sido relatada em vários países, cujas substâncias normalmente encontradas são DON, ZEA, DAS e HT-2 e AFs (CALORI-DOMINGUES et al., 2014), apenas a micotoxina AF B1 foi quantificada nos cultivares Brasmax Bônus IPRO e Tec IRGA 6070, cujos resultados estão reunidos na Tabela 28. Como nenhuma micotoxina foi detectada nos cultivares Brasmax Desafio RR e Brasmax Ultra IPRO, optou-se por não reunir os resultados em tabelas.

AF B1 foi quantificada nos cultivares de soja Brasmax Bônus IPRO e Tec IRGA 6070 mesmo nos tratamentos mantidos à 20 °C (T1 até T5), independente da composição da AC. Embora a faixa de temperatura ótima para o crescimento das espécies *Aspergillus* (responsáveis pela produção de aflatoxinas) estar situada entre 32 e 33 °C, o crescimento desses fungos e produção de micotoxinas também pode ocorrer em temperaturas abaixo de 15 °C (SWEENEY e DOBSON, 1998).

Tabela 28 - Micotoxinas encontradas em soja, cultivares Brasmax Bônus IPRO e Tec IRGA 6070.

Tratamento	Micotoxinas em Brasmax Bônus IPRO ($\mu\text{g kg}^{-1}$)		Micotoxinas em Tec IRGA 6070 ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	
	AF B1	Outras micotoxinas ²	AF B1	Outras micotoxinas ²
Branco ¹	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
T1	5	< LOD	5	< LOQ ⁴
T2	6	< LOD	5	< LOQ ⁴
T3	7	< LOD	8	< LOQ ⁴
T4	5	< LOD	< LOD	< LOQ ⁴
T5	6	< LOQ ³	7	< LOQ ⁴
T6	< LOD	< LOQ ³	7	< LOQ ⁴
T7	10	< LOD	6	< LOQ ⁴
T8	9	< LOD	7	< LOQ ⁴
T9	12	< LOQ ³	8	< LOQ ⁴
T10	< LOD	< LOQ ³	7	< LOD
T11	9	< LOD	6	< LOQ ⁴
T12	12	< LOD	< LOD	< LOD
T13	10	< LOD	5	< LOD
T14	17	< LOD	6	< LOQ ⁴
T15	12	< LOD	7	< LOQ ⁴

LOD: 0,4 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para AF B1, AF B2 e OCR A; 20 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para DON, FM B1, FM B2, T-2, HT-2, ZEA, DAS e CIT.

LOQ: 5 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para AF B1, AF B2 e OCR A; 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para DON, FM B1, FM B2, HT-2, T-2, DAS e ZEA. Não foi possível determinar LOQ para CIT.

¹ Branco: amostra de grão analisada previamente ao armazenamento em AC.

² AF B2, OCR A, DON, DAS, T-2, HT-2, ZEA, CIT, FM B1, FM B2.

³ ZEA em Brasmax Bônus IPRO.

⁴ OCR A em Tec IRGA 6070.

De acordo com a análise estatística dos resultados, as concentrações médias de AF B1 são estatisticamente iguais dentro de cada faixa de temperatura para as diferentes condições de atmosfera. No entanto, as concentrações médias de AF B1 para cada condição de atmosfera em diferentes temperaturas são estatisticamente diferentes. O teste-*t* aplicado mostrou que as diferenças nas concentrações médias de AF B1 são estatisticamente significantes quando se considera uma determinada condição de atmosfera à 20 e 30 °C, pois o valor de *p* calculado, identificado por *P* ($T \leq t$) bi-caudal, foi menor que 0,05. O teste-*t* para duas amostras não mostrou diferenças significativas entre os resultados obtidos nas diferentes condições de atmosfera entre as temperaturas 20 e 25 °C, e 25 e 30 °C.

Para o cultivar Tec IRGA 6070, a análise estatística mostrou que as concentrações médias de AF B1 não apresentam diferenças significativas estatisticamente, independente da combinação de condição atmosférica e temperatura estudadas.

Aspergillus flavus é a principal espécie de fungo encontrada em grãos de soja. Se a secagem dos grãos colhidos com alto teor de umidade for retardada por alguns dias, a qualidade das sementes pode ser afetada pela ação dessa espécie de fungo (GOULART, 2004).

Os cultivares de soja estudados foram secos e armazenados com 11% de umidade, o que corresponde a uma quantidade de água na massa de grãos igual à 110 g kg⁻¹. No entanto, de acordo com MOHAPATRA et al. (2017), sementes oleaginosas devem ser armazenadas com teor de água entre 50 – 80 g kg⁻¹ para que os danos provocados por fungos durante o armazenamento sejam minimizados.

A soja é uma mercadoria higroscópica, ou seja, tem a capacidade de absorver a água do ambiente. Essa característica, associada ao armazenamento dos grãos com teor de água acima do recomendado por MOHAPATRA et al. (2017) pode ter favorecido o crescimento fúngico e produção de AF B1 mesmo em temperatura mais baixa (20 °C) e elevada concentração de CO₂.

A Figura 13 é uma adaptação de GROFF (2000) e consiste em um quadro para definir o equilíbrio higroscópico para a soja em determinada temperatura e umidade relativa do ar. O equilíbrio higroscópico é a umidade que o grão apresentará efetivamente quando estiver em equilíbrio com a umidade relativa do ar, em uma certa temperatura.

Figura 13 - Equilíbrio higroscópico para soja.

Temperatura (°C)	UMIDADE RELATIVA DO AR (%)												
	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90
10	6,1	7,0	7,8	8,6	9,5	10,3	11,2	12,2	13,2	14,4	15,7	17,3	19,4
12	6,0	6,9	7,7	8,5	9,4	10,2	11,1	12,1	13,1	14,3	15,6	17,2	19,3
14	5,9	6,7	7,6	8,4	9,3	10,1	11,0	12,0	13,0	14,2	15,5	17,1	19,2
16	5,8	6,6	7,5	8,3	9,2	10,0	10,9	11,9	12,9	14,1	15,4	17,0	19,1
18	5,7	6,5	7,4	8,2	9,1	9,9	10,8	11,8	12,8	14,0	15,3	16,9	19,0
20	5,6	6,4	7,3	8,1	9,0	9,8	10,7	11,7	12,8	13,9	15,2	16,9	19,0
22	5,4	6,3	7,2	8,0	8,9	9,7	10,7	11,6	12,7	13,8	15,2	16,8	18,9
24	5,3	6,2	7,1	7,9	8,8	9,6	10,6	11,5	12,6	13,7	15,1	16,7	18,8
26	5,2	6,1	7,0	7,8	8,7	9,6	10,5	11,4	12,5	13,7	15,0	16,6	18,7
28	5,1	6,0	6,9	7,7	8,6	9,5	10,4	11,3	12,4	13,6	14,9	16,5	18,7
30	5,0	5,9	6,8	7,6	8,5	9,4	10,3	11,3	12,3	13,5	14,8	16,5	18,6
32	4,9	5,8	6,7	7,5	8,4	9,3	10,2	11,2	12,2	13,4	14,8	16,4	18,5

FONTE: adaptado de GROFF (2000).

A leitura dessa figura é feita pela intersecção das colunas Temperatura (°C) e Umidade Relativa do Ar (%). Relacionando as temperaturas avaliadas nesse estudo, a umidade relativa do ar deveria ter sido controlada próximo a 60% para os tratamentos mantidos à 20 e 25 °C, e próximo à 65% para os tratamentos à 30 °C para que o teor de umidade nos grãos fosse mantido em 11%.

Como a umidade relativa do ar não foi controlada nesse estudo, é possível que os grãos de soja tenham perdido ou absorvido umidade do ar durante o armazenamento, e assim, a variação do teor de umidade nos grãos pode ter contribuído para a produção de AF B1 nos cultivares Brasmax Bônus IPRO e Tec IRGA 6070 em praticamente todos os tratamentos.

Para ambos os cultivares Brasmax Bônus IPRO e Tec IRGA 6070, as altas pressões parciais de CO₂ (80 kPa) nos tratamentos T5, T10 e T15 parecem não ter sido suficientes para impedir o crescimento fúngico e produção de AF B1. BULLERMAN, SCHROEDER e PARK (1984) recomendam atmosfera com pressão parcial de CO₂ superior à 90 kPa para suprimir o crescimento fúngico e produção de micotoxinas, enquanto PEREIRA, CARVALHO e PRADO (2002) descreveram que a produção de micotoxinas pode ser inibida com o aumento gradual na pressão parcial de CO₂ de 20 para 100 kPa.

BULLERMAN, SCHROEDER e PARK (1984) descreveram ainda que o controle do crescimento fúngico e produção de aflatoxinas é favorecido quando, aliado à alta

pressão parcial de CO₂, a pressão parcial de O₂ seja reduzida abaixo de 1 kPa. No presente estudo, apenas os tratamentos T2, T7 e T12 foram conduzidos com 1 kPa de O₂, no entanto a pressão parcial de CO₂ nesses tratamentos não foi controlada, o que poderia ter resultado em uma atmosfera mais favorável para o controle de crescimento fúngico e produção de aflatoxinas.

Nenhuma outra micotoxina foi quantificada nos quatro cultivares de soja, embora ZEA tenha sido detectada (mas não quantificada) em alguns tratamentos para o cultivar Brasmax Bônus IPRO, o que pode estar relacionado à grãos danificados e/ou impurezas misturadas aos grãos. OLIVEIRA, LORINI e MALLMANN (2010) quantificaram ZEA em amostras de impurezas provenientes de grãos de soja e atribuíram a contaminação dos grãos por essa micotoxina às impurezas e materiais estranhos, cuja proporção aceitável nos grãos é de até 1%.

4.4.4 Estudo de armazenamento de milho em atmosfera controlada

Apenas seis tratamentos foram estudados no armazenamento de grãos de milho (descritos na Tabela 8, item 3.11.2), que consistiram em variar a temperatura de armazenamento, umidade dos grãos e pressão parcial de O₂.

O milho é uma mercadoria muito suscetível ao ataque fúngico, o que é atribuído ao ser elevado teor de carboidratos, principal componente do grão, por isso, até mesmo grãos aparentemente sadios podem ser contaminados por *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium* (MARQUES et al., 2009).

Grãos de milho podem ser infectados por fungos *Fusarium* e *Aspergillus* no período de pré-colheita e a contaminação com micotoxinas pode aumentar em condições precárias de armazenamento (NEME e MOHAMMED, 2017).

Por questões econômicas, o milho é mantido no campo até a secagem dos grãos, pois a colheita das espigas com alto teor de água torna inviável a colheita mecânica em função da dificuldade de debulha. No entanto, a espera da secagem dos grãos ainda no campo pode ocasionar a deterioração dos grãos por causa de infecção de fungos e outras pragas (MARQUES et al., 2009).

MARQUES et al. (2009) relataram um estudo que buscou avaliar a influência do retardamento na colheita do milho na incidência de fungos patogênicos e

constataram que a permanência prolongada das espigas na planta, após a maturação fisiológica, causou a redução da incidência de *Fusarium moniliforme*. No entanto, os autores observaram aumento da incidência da espécie *Fusarium graminearum* e de espécies de *Aspergillus* e *Penicillium* quando as espigas foram colhidas com menor teor de umidade.

HERMANNNS et al. (2006) identificaram pontos críticos no crescimento de fungos e produção de fumonisinas durante o período de pré-colheita de milho. Os autores procederam à determinação do teor de umidade dos grãos de milho, presença de fungos e fumonisinas nas cinco fases do desenvolvimento dos grãos: florescimento (88,1% de umidade), grão leitoso (70,7% de umidade), grão farináceo (48,3% de umidade), grão farináceo-duro (34,3% de umidade) e maturação fisiológica (24,7% de umidade). Os autores constataram que não houve incidência de fungos nas fases de florescimento e grão leitoso, pois nessas etapas a quantidade e qualidade de nutrientes não é adequada para o desenvolvimento de fungos. Nas fases de grão farináceo e grão farináceo-duro a concentração desses nutrientes diminui, iniciando-se a síntese de amido e proteínas, que atingem níveis máximos na fase de maturação fisiológica, etapa na qual maior desenvolvimento de fungos foi observada. Os autores concluíram que o desenvolvimento de fungos de campo, em especial os do gênero *Fusarium* spp., inicia-se na fase de grão farináceo e a infecção é máxima na fase final de maturação, pouco antes da colheita, onde a presença de fumonisinas foi detectada.

Os resultados obtidos no estudo de armazenamento de milho em AC encontram-se na Tabela 29.

Tabela 29 - Micotoxinas encontradas em milho.

Tratamento	Micotoxina ($\mu\text{g kg}^{-1}$)										
	AF B1	AF B2	OCR A	DON	FM B1	FM B2	T-2	HT-2	ZEA	DAS	CIT
Branco ¹	< LOD	< LOD	< LOD	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOD	< LOD	100	< LOD	< LOD
T 1	9	< LOD	< LOD	< LOD	198	140	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
T 2	7	< LOD	< LOD	< LOD	236	161	< LOD	< LOD	< LOQ	< LOD	< LOD
T 3	7	< LOD	< LOD	< LOQ	196	130	< LOD	< LOD	< LOQ	< LOD	< LOD
T 4	6	< LOD	< LOD	< LOQ	361	172	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
T 5	5	< LOD	< LOD	< LOQ	192	128	< LOD	< LOD	< LOQ	< LOD	< LOD
T 6	7	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	131	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD

¹ Branco: amostra de grão analisada previamente ao armazenamento em AC.

LOD: 0,4 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para AF B1, AF B2 e OCR A; 20 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para DON, FM B1, FM B2, T-2, HT-2, ZEA, DAS e CIT.

LOQ: 5 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para AF B1, AF B2 e OCR A; 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para DON, FM B1, FM B2, HT-2 e ZEA. Não foi possível determinar LOQ para T-2, DAS e CIT.

O milho utilizado no estudo já continha as micotoxinas FM B1, FM B2, DON e ZEA antes mesmo de iniciar o estudo das condições de armazenamento, embora apenas ZEA estava presente em concentração quantificável. Esse resultado é coerente com o que é encontrado na literatura: são micotoxinas produzidas por fungos do gênero *Fusarium* spp., que infestam o milho no período de pré-colheita (HERMANNNS et al., 2006; SWEENEY e DOBSON, 1988).

MOHAPATRA et al. (2017) descreveram que fungos de campo raramente sobrevivem em grãos armazenados por longos períodos, e PITT, TANIWAKI e COLE (2013) também afirmaram que fungos *Fusarium* spp. tem crescimento mínimo quando a a_w está abaixo de 0,90, logo, de acordo com esses autores, mesmo que o teor de umidade nos grãos aumente durante o armazenamento, micotoxinas como as fumonisinas devem ser produzidas em quantidades mínimas durante o armazenamento.

Diferentemente do que esses autores propuseram, as micotoxinas encontradas em maior concentração no milho neste estudo foram FM B1 e FM B2, produzidas por fungos de campo mesmo em condições de armazenamento.

Comparando-se os tratamentos mantidos à mesma temperatura (T1 e T2, T3 e T4, T5 e T6), mas em condições de atmosfera e teor de umidade nos grãos diferentes, observou-se que a maior produção de FMs ocorreu nos tratamentos onde havia maior disponibilidade de O_2 e os grãos foram armazenados com maior teor de umidade. Se SWEENEY e DOBSON (1998) estavam corretos ao descrever que a produção de FMs é favorecida em condições de crescimento anaeróbicas (o que não foi observado nesse estudo), o teor de umidade mais alto com o qual os grãos foram armazenados pode ter exercido maior influência na produção dessas micotoxinas nos tratamentos T2, T4 e T6 em relação aos tratamentos T1, T3 e T5, respectivamente. O aumento no teor de umidade dos grãos armazenados pode ter aumentado a atividade de água, assim, a composição gasosa da atmosfera teve menor influência na produção de fumonisinas do que a própria atividade de água nos grãos de milho. Essa conclusão também de acordo com WALKER et al. (2018), que indicaram que o armazenamento de milho com teores de umidade acima de 13,5% favorece a produção de micotoxinas.

Por outro lado, ao comparar os resultados obtidos para os tratamentos mantidos na mesma atmosfera com baixa disponibilidade de O_2 e teor de umidade dos grãos igual à 11% (T1, T3 e T5), observou-se que a maior produção de FMs ocorreu no tratamento conduzido em temperatura mais baixa (T1, 20°C). Esse resultado pode

estar associado ao favorecimento do crescimento da espécie *Fusarium proliferatum* em temperatura mais baixa do que *Fusarium moniliforme*, e é coerente com o que foi reportado por MARÍN et al. (1999), que concluíram que maiores quantidades de FM B1 eram produzidas por *Fusarium proliferatum* à 15 °C do que por *Fusarium moniliforme* à 30 °C.

Ao comparar os resultados dos tratamentos T2 (20 °C), T4 (25 °C) e T6 (30 °C), com alta disponibilidade de O₂ e teor de umidade dos grãos mais elevado (14%), constatou-se que a maior concentração de FM B1 e FM B2 foi encontrada no tratamento T4. Esse resultado também está de acordo com MARÍN et al. (1999), que concluíram que 25 °C é a faixa de temperatura ótima para que *Fusarium moniliforme* produza maiores quantidades de FM B1. SWEENEY e DOBSON (1998) também descreveram que a produção de toxinas a partir da espécie *Fusarium proliferatum* é maior à 25 °C do que à 30 °C.

Os resultados obtidos demonstram que grãos armazenados com maior teor de umidade em uma atmosfera rica em O₂ estão mais suscetíveis à contaminação por fumonisinas, embora a composição gasosa da atmosfera de armazenamento parece ter exercido menor influência na produção dessas micotoxinas do que o teor de umidade dos grãos.

A análise estatística dos resultados para FM B1 e FM B2 em milho mostrou que, apesar de numericamente diferentes, as concentrações dessas micotoxinas não diferem de forma significativa estatisticamente, em todas as combinações de condição atmosférica e temperatura de armazenamento. Apesar das concentrações médias não apresentarem diferenças significativas estatisticamente, a condição do tratamento T6 foi a que menos favoreceu a produção de FM B1 em milho, e a condição T5 para o controle da produção de FM B2.

A produção de fumonisinas não ocorre de forma indefinida com o aumento de temperatura para um dado teor de umidade. O resultado obtido para o tratamento T6 comprova que o aumento da temperatura, mesmo com alta disponibilidade de O₂ e água, não implica necessariamente no aumento da produção de micotoxinas. Esse tratamento, conduzido à 30 °C, foi suficiente para inibir a produção de FM B1, e esse resultado está de acordo com MARÍN et al. (1999), que descreveram que *Fusarium proliferatum* não produz essa micotoxina à 37 °C, apesar de a análise estatística

mostrar que não há diferenças estatisticamente diferentes entre os tratamentos estudados.

A contaminação de milho por aflatoxinas também é bastante comum, e apesar de ser um fungo típico de armazenamento, *Aspergillus flavus* pode contaminar o milho ainda na etapa de plantio em condições de seca, clima quente e danos causados por insetos (MOHAPATRA et al., 2017; WALKER et al., 2018). Além disso, a migração de umidade em uma massa de grãos armazenada em condições precárias pode favorecer a produção de aflatoxinas em milho (PITT, TANIWAKI e COLE, 2013).

Apesar de MAGAN e ALDRED (2007) relatarem sucesso na inibição de produção de aflatoxinas em atmosferas com pressão parcial de O₂ inferior a 5 kPa, todos os tratamentos avaliados no presente estudo para o armazenamento de milho não foram efetivos em inibir a produção de AF B1. A maior concentração dessa micotoxina foi quantificada no tratamento T1, na qual os grãos foram armazenados com 11% de umidade, mantidos à 20 °C e com baixa disponibilidade de O₂. Embora a faixa ótima de crescimento de fungos *Aspergillus*, especialmente *A. flavus* e *A. parasiticus*, esteja situada próxima à 30 °C, aflatoxinas podem ser produzidas abaixo dessa temperatura (SWEENEY e DOBSON, 1998).

A análise estatística dos resultados para AF B1 em milho mostrou que as concentrações médias dessa micotoxina não apresentam diferenças significativas estatisticamente, para todos os tratamentos. Apesar de estatisticamente iguais, a menor concentração de AF B1 em milho foi produzida no tratamento T5, que parece ter sido mais adequada para a redução na produção dessa micotoxina.

A ZEA também é uma micotoxina que costuma ocorrer no período de pré-colheita, pois também é produzida por fungos *Fusarium* spp., especialmente *F. moniliforme* e *F. graminearum*. Temperaturas relativamente baixas favorecem a produção de ZEA, cuja concentração tende a aumentar durante o período de armazenamento, especialmente se a temperatura for alternada de baixa à moderada (NEME e MOHAMMED, 2017).

A produção de ZEA em milho é favorecida por umidade alta e temperaturas baixas (COUNCIL FOR AGRICULTURAL SCIENCE AND TECHNOLOGY., 2003) e alguns autores associam a ocorrência de ZEA em milho a períodos chuvosos durante o plantio (PRADO, 2009).

ZEA não é produzida em condições de silagem anaeróbica (armazenamento de forragem para alimentação animal sem passar por secagem) e essa micotoxina,

uma vez presente, não é destruída pelo tratamento da silagem (RICHARD et al., 2003).

A concentração de ZEA, que estava presente no milho antes do armazenamento em AC, não aumentou. Dessa forma o desenvolvimento dos fungos produtores de ZEA não foi favorecido pelos tratamentos estudados. Acredita-se que o resultado foi obtido graças a uma combinação de fatores, como teor de umidade reduzido dos grãos armazenados (mesmo nos estudos T2, T4 e T6, onde os grãos foram armazenados com 14% de umidade) e possível competição entre várias espécies de fungos.

As FMs encontradas no milho são produzidas majoritariamente pelas espécies *F. moniliforme* e *F. proliferatum*, logo, a presença dessas espécies pode ser predominante em relação às espécies *F. graminearum*, *F. culmorum* e *F. sporotrichioides*, que produzem ZEA. Assim, a ausência de ZEA durante o armazenamento pode ser explicada pela possível predominância de outras espécies de fungos, devido à competição pela disponibilidade de nutrientes do substrato.

O mesmo raciocínio pode ser considerado para justificar a ausência de DON em condições de armazenamento, micotoxina que foi detectada no milho antes do início do período de armazenamento. DON também é produzida por *F. culmorum*, *F. sporotrichioides* e *F. graminearum*, cujo crescimento pode ter sido inibido devido à competição com as espécies produtoras de FMs.

A OCR A também é comumente encontrada no milho e de acordo com MAGAN e ALDRED (2007) é produzida durante o armazenamento de grãos com teor de umidade acima de 23%. Como os grãos de milho desse estudo foram armazenados com teor de umidade abaixo desse valor (11 e 14%), a ausência dessa micotoxina nos grãos provenientes dos seis tratamentos estudados é facilmente justificável. Além disso, *A. ochraceus*, uma das espécies produtoras de OCR A, tem crescimento mais lento que *A. flavus* e *A. parasiticus*, que produzem aflatoxinas.

Como esse estudo teve o objetivo de simular o armazenamento de grãos hermeticamente em silos bolsa, onde a atmosfera é modificada de forma natural pela respiração dos grãos e/ou microflora presente, e considerando os tratamentos avaliados sob a mesma temperatura, pode-se dizer que a produção de FMs, por exemplo, diminui conforme o processo respiratório dos grãos consome e O₂ (considerando que o teor de umidade nos grãos diminua durante o armazenamento).

A suposição de SWEENEY e DOBSON (1998) de que a produção de FMs parece ser favorecida em condições anaeróbicas parece ser verdadeira quando levamos em consideração a temperatura. A afirmação dos autores parece ser válida para armazenamentos acima de 25 °C, pois observou-se aumento na produção de FM B1 quando a concentração de O₂ diminuiu entre os tratamentos T6 e T5, onde os grãos foram armazenados a 30 °C.

Diferentemente, a produção de AF B1 parece ser reduzida à 30 °C quando o processo respiratório reduz a concentração de O₂ e o teor de umidade dos grãos armazenados, por algum motivo, é reduzida (concentração de AF B1 reduziu do tratamento T6 para T5). Por outro lado, a produção de AF B1 parece ser favorecida com a redução da concentração de O₂ da atmosfera e do teor de umidade dos grãos em temperaturas de armazenamento menores ou iguais à 25 °C.

5 CONCLUSÕES

Essa dissertação de mestrado teve como primeiro objetivo o desenvolvimento de métodos analíticos para determinação de micotoxinas em feijão, milho e soja. A composição do solvente extrator e os sais usados na separação de fases foram variados entre os cinco ensaios, de forma a se obter o maior número de micotoxinas extraídas com percentuais de recuperação entre 70 e 120% e RSD ≤ 20%. Foi observada forte influência do pH do solvente orgânico na recuperação das micotoxinas ácidas (OCR A, FM B1, FM B2 e CIT), e os procedimentos dos ensaios 2 e 5 foram escolhidos para a determinação de micotoxinas em feijão e soja, respectivamente.

Os parâmetros avaliados no estudo de validação foram baseados nos três documentos orientativos (SANTE, 2017; MAPA, 2012; INMETRO, 2018) e os resultados apresentaram-se dentro dos limites especificados por esses documentos.

Após a validação dos métodos, avaliou-se a ocorrência de micotoxinas em grãos de quatro cultivares de feijão e soja, e um cultivar de milho submetidos ao armazenamento em diferentes condições de temperatura e atmosfera controlada. As análises das amostras de grãos após o período armazenamento evidenciaram que os

diferentes cultivares de uma mesma cultura não estão igualmente sujeitos à contaminação por micotoxinas.

Conforme os resultados apresentados, é possível concluir que, para os cultivares Fepagro 26 e Garapiá (feijão preto e carioca, respectivamente), o armazenamento dos grãos foi efetivo e preveniu a produção de micotoxinas em qualquer condição de atmosfera à 20 °C. A temperatura mais alta na qual esses grãos foram armazenados sem que os grãos fossem contaminados por AF B1 foi 25 °C, com 2,0 kPa de O₂ e 80 kPa de CO₂.

Os resultados apresentados para soja mostraram que nenhuma condição de armazenamento foi eficaz para impedir a produção de AF B1 nos cultivares Brasmax Bônus IPRO e Tec IRGA 6070, o que pode estar associado ao teor de umidade mais elevado (11%) com o qual os grãos foram armazenados, sendo que o recomendado para esse tipo de grão é entre 5 e 8%.

Para milho, os resultados mostraram que a melhor condição de armazenamento para impedir a produção de FM B1 foi àquela na qual os grãos foram armazenados com teor de umidade 14%, em atmosfera ambiente, à 30 °C, e a produção de AF B1 e FM B2 foi menor na condição na qual os grãos foram armazenados com teor de umidade 11%, em atmosfera com 2,0 kPa de O₂, à 30°C.

6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Para trabalhos futuros, sugere-se uma otimização nos métodos de extração validados no que diz respeito a uma etapa de purificação dos extratos, a fim de minimizar o efeito matriz sofrido pelas micotoxinas. Isso pode favorecer a análise cromatográfica e pode levar a um aumento capacidade de detecção dos métodos.

Sugere-se que novo estudo com grãos de soja seja realizado, com teor de umidade recomendado por alguns autores (entre 5 e 8%), para concluir se este pode ter sido um fator decisivo para a produção de AF B1 nos dois cultivares. Também para o milho sugere-se um estudo mais detalhado, para o qual acredita-se ser interessante o controle da concentração de CO₂ nas atmosferas, além de não variar ao mesmo tempo dois fatores importantes (umidade e atmosfera). Além disso, sugere-se que seja estudado o efeito de atmosfera contendo 100 kPa de CO₂ e pressão parcial de O₂ inferior a 1 kPa, condição esta que é indicada por alguns autores como mais eficaz na inibição de produção de micotoxinas.

Estabelecer as melhores condições para armazenamento de grãos por longos períodos é importante em diversos aspectos, como para aumentar a segurança dos alimentos comercializados e para que as perdas por deterioração (e consequentemente os prejuízos dos produtores) sejam minimizadas.

7 REFERÊNCIAS

AGILENT TECHNOLOGIES. **Sample Preparation Fundamentals for Chromatography**. 2013. Disponível em: <https://www.agilent.com/cs/library/primers/public/5991-3326EN_SPHB.pdf> Acesso em: Julho, 2018.

AGROADS. **Sistema Silo-Bolsa**. Disponível em: <https://www.agroads.com.br/sistema-silo-bolsa_52250.html> Acesso em: 15/01/2019.

ALMEIDA, A. M.; CASTEL-BRANCO, M. M.; FALCÃO, A. C. Linear regression for calibration lines revisited: Weighting schemes for bioanalytical methods. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 774, n. 2, p. 215–222, 2002.

ANASTASSIADES, M. et al. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid-phase extraction” for the determination of pesticide residues in produce. **Journal of AOAC International**, v. 86, p. 412–431, 2003.

ANVISA. RDC nº 7, 18/02/11. Dispõe sobre os limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. 2011.

ANVISA. RDC nº 138, 08/02/2017. Dispõe sobre sobre os limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos, para alterar os LMT das micotoxinas deoxinivalenol (DON) em trigo e produtos de trigo prontos para oferta ao consumidor e os prazos para sua aplicação. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. 2017.

ARDREY, R. E. **Liquid Chromatography - Mass Spectrometry: An Introduction**. England: John Wiley & Sons, Ltd., pp. 288, 2003.

BENNETT, J. . W. e KLICH, M. Mycotoxins. **Clinical Microviewsbiology Re**, v. 16, n. 3, p. 497–516, 2003.

BHANOT, D. **Popular ionization techniques in mass spectrometry**. Disponível em: <http://lab-training.com/2016/01/21/popular-ionization-techniques-in-mass-spectroscopy>. Acesso em: Julho, 2018.

BRASMAX GENÉTICA. **Cultivares de soja na Região do Cerrado**. Disponível em: <http://www.brasmaxgenetica.com.br/cultivar-regiao-cerrado/> Acesso em: 1/01/2019.

BRITO, N. M. et al. Validação De Métodos Analíticos: Estratégia E Discussão. **Pesticidas: R.Ecotoxicol. e Meio Ambiente**, v. 13, p. 129–146, 2003.

BULLERMAN, L. B.; SCHROEDER, L. L.; PARK, K.-Y. Formation and Control of Mycotoxins in Food. **Journal of Food Protection**, v. 47, n. 8, p. 637–646, 1984.

CALORI-DOMINGUES, M.A. ; RODRIGUES, P. M. ; HERCOTON, G.P. ; GLÓRIA, E M ; DIAS, C. T. S. Ocorrência e Distribuição de Aflatoxina B1 e Zearalenona em Soja. **VI Conferencia Brasileira de Pós-Colheita e VIII Simpósio Paranaense de Pós-Colheita, 2014, Maringá - PR. Anais VI Conferencia Brasileira de Pós-Colheita**, p. 451–457, 2014.

CASTILLO, J. M. S. DEL et al. Micotoxinas en alimentos. 1. ed. Espanha: Ediciones Díaz de Santos, v.1, p. 1 - 16, 2007.

COÊLHO, J. . Produção de grãos: feijão, milho e soja. **Escritório Técnico de Estudos Econômicos do Nordeste - ETENE**, n. 19, p. 1–13, 2017.

CONAB. Perspectivas para a agropecuária. Safra 2017/2018 - Produtos de verão. v. 5, p. 80–94, 2017.

CONAB. Acompanhamento da safra brasileira de grãos. Safra 2018/19. v. 6, n. 4, p. 75–81, 2019.

COSTA, A. R.; FARONI, L.R.D'A.; ALENCAR, E.R. de; CARVALHO, M.C.S.; FERREIRA, L.G. Qualidade de grãos de milho armazenados em silos bolsa. **Revista Ciência Agronômica**, v. 41, n. 2, p. 200–207, 2010.

DALL'ASTA, C.; BATTILANI, P. Fumonisin and their modified forms, a matter of concern in future scenario? **World Mycotoxin Journal**, v. 9, n. 5, p. 727–739, 2016.

ELIAS, M. C.; OLIVEIRA, M. DE; VANIER, N. L. **Tecnologias de pré-armazenamento, armazenamento e conservação de grãos**. 2017. Disponível em: <<http://labgraos.com.br/manager/uploads/arquivo/material---prova-1.pdf>> Acesso em 16/01/2019.

EMBRAPA. **Soja em números (safra 2017/2018)**. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/soja/cultivos/soja1/dados-economicos>> Acesso em: 16/01/2019.

EOM, T. et al. Multiclass mycotoxin analysis in edible oils using a simple solvent extraction method and liquid chromatography with tandem mass spectrometry. **Food Additives & Contaminants: Part A**, v. 34, n. 11, p. 2011–2022, 2017.

EU REFERENCE LABORATORIES FOR RESIDUES OF PESTICIDES. **Analysis of Pymetrozine by the QuEChERS Method - Impact of pH on Recovery Rate**. Reported by EURL-SRM, Version 1, last update 2016.

Disponível em: <http://www.crl-pesticides.eu/userfiles/file/EurlSRM/EurlSrm_Observations_Pymetrozine.pdf>

Acesso em: Julho de 2018.

EUROPEAN COMMISSION. Commission Regulation (EC) No 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. **Official Journal of the European Communities**, v. L364, n. 1881, p. 5–24, 2006.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA). Scientific Opinion on the risks for public and animal health related to the presence of citrinin in food and feed. **The EFSA Journal**, v. 10, n. 3, p. 1–82, 2012.

Fermentek, making fine biochemicals. Disponível em: <<https://www.fermentek.com/product/diacetoxyscirpenol-das>> Acesso em 29 de maio 2018.

FIESP. **Safra brasileira de grãos 2018/19 – 4º levantamento da Conab**. Disponível em: <<https://www.fiesp.com.br/indices-pesquisas-e-publicacoes/safra-de->

graos-brasil/attachment/file-20190110140610-safra-graos-brasil-2018-194-levantamento/> Acesso em: 16/01/2019.

FOOD INGREDIENTS BRASIL. As micotoxinas. **Food Ingredients Brasil**, n. 7, p. 32–40, 2009

FRASELLE, S. et al. Validation of a method for the detection and confirmation of nitroimidazoles and the corresponding hydroxy metabolites in pig plasma by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 586, n. 1–2 SPEC. ISS., p. 383–393, 2007.

FREITAS, M. DE C. M. DE. A cultura da soja no Brasil: O crescimento da produção brasileira e o surgimento de uma nova fronteira agrícola. **Enciclopedia Biosfera, Centro Científico Saber**, v. 7, n. 2, p. 1–12, 2011.

FUKUJI, T. S. et al. Ácido Fítico De Híbridos De Milho E Alguns Produtos Industrializados. **Acta Scientiarum - Agronomy**, v. 30, n. 1, p. 31–35, 2008.

GILBERT J.; POHLAND A.E. Mycotoxins: Risks in plant, animal, and human systems. Ames (IA): **Council for Agricultural Science Technology**. 2003.

GIORNI, P. et al. Effect of aw and CO₂ level on *Aspergillus flavus* growth and aflatoxin production in high moisture maize post-harvest. **International Journal of Food Microbiology**, v. 122, n. 1–2, p. 109–113, 2008.

GONÇALEZ, E.; PINTO, M.M.; FELICIO J.D. Análise de micotoxinas no instituto biológico de 1989 a 1999. **Biológico**, São Paulo, v. 63, n. 1-2, p. 15-19, jan./dez., 2001.

GOULART, A. C. P. (EMBRAPA A. O. **Fungos em sementes de soja: detecção, importância e controle**. 1ª ed., Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste, pp. 74, 2004.

GROFF, R. **Estruturas de armazenagem**., 2000. Disponível em: <<http://www.oleosegorduras.org.br/site/assets/arquivo/6b91f217426c6d0e29ef7dd130dff0a7.pdf>> Acesso em 16/01/2019

HERMANN, G.; PINTO, F.T.; KITAZAMA, S.E.; NOLL, I.B.. Fungos e fumonisinas no período pré-colheita do milho. **Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas**, v. 26, n. 1, p. 7–10, 2006.

HÍDVÉGI, M.; LÁSZTITY; RADOMIR. Phytic Acid Content of Cereals and Legumes and. **Periodica Polytechnica Ser. Chem.**, v. 46, n. 1, p. 59–64, 2003.

HOFFMANN, E.; STROOBANT, V. Mass Spectrometry - Principles and Applications. 3 ed., England: John Wiley & Sons Ltd. pp. 502, 2007.

HUMPF, H.-U.; RYCHLIK, M.; CRAMER, B. Modified Mycotoxins: A New Challenge? **Reference Module in Food Science**, p. 1–8, 2018.

IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans ; v. 100F, p. 225 – 248, 2012. Disponível em:
<<http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol100F/mono100F.pdf>> Acesso em: 22 Maio 2018.

IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans ; v. 56, p. 445 – 466, 1993. Disponível em:
< <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol56/mono56-16.pdf>> Acesso em: 26 Maio 2018.

IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans ; v. 82, p. 301 – 366, 2002. Disponível em:
< <https://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol82/mono82-7B.pdf> > Acesso em: 26 Maio 2018.

INMETRO. Orientação sobre validação de métodos analíticos, **DOQ-CGCRE-008**. n. Revisão 7, p. 1–28, 2018.

IRGA. Irga e Bayer colhem frutos de parceria de seis anos. Disponível em:
<<https://irga.rs.gov.br/irga-e-bayer-colhem-frutos-de-parceria-de-seis-anos>> Acesso em: 16/01/2019.

ISMAIEL, A.; PAPENBROCK, J. Mycotoxins: Producing Fungi and Mechanisms of Phytotoxicity. **Agriculture**, v. 5, n. 3, p. 492–537, 2015.

JETTANAJIT, A.; NHUJAK, T. Determination of Mycotoxins in Brown Rice Using QuEChERS Sample Preparation and UHPLC-MS-MS. **Journal of Chromatographic Science**, v. 54, n. 5, p. 720–729, 2016.

KELLER, B. O. et al. Interferences and contaminants encountered in modern mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 627, n. Special issue on Mass Spectrometry, p. 71–81, 2008.

KIM, D. H. et al. Simultaneous determination of multi-mycotoxins in cereal grains collected from South Korea by LC/MS/MS. **Toxins**, v. 9, n. 3, p. 1–13, 2017.

KOESUKWIWAT, U.; SANGUANKAEW, K.; LEEPIPATPIBOON, N. Evaluation of a modified QuEChERS method for analysis of mycotoxins in rice. **Food Chemistry**, v. 153, p. 44–51, 2014.

KOWALSKI, J., LUPO, S., & COCHRAN, J. Mitigating Matrix Effects: Examination of Dilution, QuEChERS, and Calibration Strategies for LC-MS/MS Analysis of Pesticide Residues in Diverse Food Types. **Food Safety Applications**, p. 1 - 22, 2013.

LABUZA, T. P.; TANNEMBAUM, S. R.; KAREL, M. Water content and stability of low moisture and intermediate-moisture foods. **Food Technology**. p .543 – 550, 1970.

LANÇAS, F.M. **Cromatografia líquida moderna: HPLC/CLAE**. Campinas, SP: Editora Átomo, pp.382, 2009.

LEHOTAY, S. J. et al. 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**, v. 88, p. 595-614, 2005.

LI, Y.; WANG, Z.; BEIER, R.C.; SHEN, J.; SMET, D.D.; SAEGER, S.D.; ZHANG, S. T-2 Toxin, a Trichothecene Mycotoxin: Review of Toxicity, Metabolism, and Analytical Methods. **J.Agric. Food Chem.**, v. 59, p. 3441 – 3453, 2011.

LUCCI, P. et al. Current Trends in Sample Treatment Techniques for Environmental

and Food Analysis. In: CALDERON, L. (Ed.). . **Chromatography - The Most Versatile Method of Chemical Analysis**. [s.l.] IntechOpen, p. 128 - 164, 2012.

MAGAN, N.; ALDRED, D. Post-harvest control strategies: Minimizing mycotoxins in the food chain. **International Journal of Food Microbiology**, v. 119, n. 1–2, p. 131–139, 2007.

MAPA. **Manual de Garantia da Qualidade Analítica - Resíduos e Contaminantes em Alimentos**. 1 ed., Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, pp. 239, 2011.

MARÍN, S.; MAGAN, N.; BELLÍ, N.; RAMOS, A.J.; CANELA, R.; SANCHIS, V. Two-dimensional profiles of fumonisin B1 production by *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum* in relation to environmental factors and potential for modelling toxin formation in maize grain. **International Journal of Food Microbiology**, v. 51, n. 2–3, p. 159–167, 1999.

MARQUES, O. J.; FILHO, P.S.V.; DALPASQUALE, V.A.; SCAPIM, C.A.; PRICINOTTO, L.F.; JUNIOR, E.M.M.. Incidência fúngica e contaminações por micotoxinas em grãos de híbridos comerciais de milho em função da umidade de colheita. **Acta Scientiarum - Agronomy**, v. 31, n. 4, p. 667–675, 2009.

MOHAPATRA, D. et al. Critical factors responsible for fungi growth in stored food grains and non-Chemical approaches for their control. **Industrial Crops and Products**, v. 108, n. February, p. 162–182, 2017.

MOSTROM, M.S. RAISBECK, M.F. Trichothecenes. **Veterinary Toxicology**. Chapter 76, p. 951 – 976, 2007.

NAVARRO, S.; TIMLICK, B.; DEMIANYK, C.J.; WHITE, N.D.G. Controlled or Modified Atmospheres. In: **Stored product protection**. p. 191–201, 2012.

NEME, K.; MOHAMMED, A. Mycotoxin occurrence in grains and the role of postharvest management as a mitigation strategies. A review. **Food Control**, v. 78, p. 412–425, 2017.

OLIVEIRA, M. A. DE; LORINI, I.; MALLMANN, C. A. As micotoxinas e a segurança

alimentar na soja armazenada. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 13, n. III SSA, p. 87–91, 2010.

PEREIRA, M. M. G.; CARVALHO, E. P. DE; PRADO, G. Crescimento e produção de aflatoxinas por *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*. **B. CEPPA**, v. 20, n. 1, p. 141–156, 2002.

PEREIRA, K. C.; DOS SANTOS, C. F. Micotoxinas e seu Potencial Carcinogênico. *Ensaio e Ciências: Ciências Biológicas, Agrárias e da Saúde*, v. 15, n. 4, p. 147–165, 2011.

PHENOMENEX. **Finally an Easier Solution for Protein Precipitation Rapid Protein Precipitation without the Complications**. 2012.

PITT, J. I.; TANIWAKI, M. H.; COLE, M. B. Mycotoxin production in major crops as influenced by growing, harvesting, storage and processing, with emphasis on the achievement of Food Safety Objectives. **Food Control**, v. 32, n. 1, p. 205–215, 2013.

PIZZUTTI, I. R. et al. Development, optimization and validation of a multimethod for the determination of 36 mycotoxins in wines by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Talanta**, v. 129, p. 352–363, 2014.

PRADO, G. CONTAMINAÇÃO DE ALIMENTOS POR MICOTOXINAS NO BRASIL E NO MUNDO. **Revista de Saúde Pública do SUS/MG**, v. 2, n. 2, p. 13–26, 2009.

RAHMANI, A.; JINAP, S. e SOLEIMANY, F. Qualitative and Quantitative Mycotoxins. **Comprehensive reviews in food science and food safety**, v. 8, p. 202–251, 2009.

REICHERT, B. et al. Simultaneous determination of 117 pesticides and 30 mycotoxins in raw coffee, without clean-up, by LC-ESI-MS/MS analysis. **Analytica Chimica Acta**, p. 1–11, 2017.

RICHARD, J.; PAYSE, G.; DESJARDINS, A. E.; MARAGAS, C.; NORRED, W.; PESTKA, J. J.; PHILLIPS, T. D.; VAN EGMOND, H. P.; VARDON, P. J.; WHITAKER, T. B.; WOOD, G. Mycotoxins, risk in plant, animal and human systems. **Council for Agricultural Science and Technology**. v. 139, p. 101-103, 2003.

ROCHA, O.; ANSARI, K.; DOOHAN, F. M. Effects of trichothecene mycotoxins on eukaryotic cells: A review. *Food Additives and Contaminants*, v. 22, n. 4, p. 369–378, 2005.

SANTE. **Guidance document on identification of mycotoxins in food and feed.** Official journal of the European Union, n. Document No. SANTE/12089/2016, p. 1–4, 2016.

SANTE, **Guidance document n analytical quality control and validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed.** Document No. SANTE/11945/2017.

SEEFELDER, W.; KNECHT, A.; HUMPF, H.-U. Bound Fumonisin B1: Analysis of Fumonisin-B1 Glyco and Amino Acid Conjugates by Liquid Chromatography-Electrospray Ionization-Tandem Mass Spectrometry. *J. Agric. Food Chem*, v. 51, p. 5567–5573, 2003.

SILVA, L. C. DA. **Estruturas para armazenagem a granel.** Boletim Técnico, Universidade Federal do Espírito Santo, n. 2, p. 1–10, 2010. Disponível em: <http://www.agais.com/manuscript/ag0210_armazenagem_granel.pdf> Acesso em: 16/01/2019.

SKOOG, D.A.; WEST, D.M.; HOLLER, F.J.; CROUCH, S.R. **Fundamentos de Química Analítica.** Tradução da 8ª edição norte-americana. São Paulo: Cengage Learning, 2009.

SOLEIMANY, F. et al. A UPLC-MS/MS for simultaneous determination of aflatoxins, ochratoxin A, zearalenone, DON, fumonisins, T-2 toxin and HT-2 toxin, in cereals. *J. Agric. Food Chem*, v. 25, n. 2, p. 647–653, 2012.

SOUZA, D.M. **Micotoxinas em matrizes de milho e trigo: validação de método analítico por UPLC – MS/MS e monitoramento em diferentes pontos da cadeia produtiva e comercial.** Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Santa Maria, 2014.

STAHNKE, H. et al. Reduction of matrix effects in liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry by dilution of the sample extracts: How much dilution is needed? *Analytical Chemistry*, v. 84, n. 3, p. 1474–1482, 2012.

SULYOK, M.; BERTHILLER, F.; KRŠKA, R. SCHUMACHER, R. Development and validation of a liquid chromatography/ tandem mass spectrometric method for the determination of 39 mycotoxins in wheat and maize. **Rapid communications in mass spectrometry : RCM**, v. 22, p. 2161–2175, 2006.

SULYOK, M.; KRŠKA, R.; SCHUHMACHER, R. A liquid chromatography/tandem mass spectrometric multi-mycotoxin method for the quantification of 87 analytes and its application to semi-quantitative screening of moldy food samples. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 389, n. 5, p. 1505–1523, 2007.

SWEENEY, M. J.; DOBSON, A. D. W. Mycotoxin production by *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium* species. **International Journal of Food Microbiology**, v. 43, n. 3, p. 141–158, 1998.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. **Food composition databases**. Disponível em: < <https://ndb.nal.usda.gov/ndb/>> Acesso em: Julho de 2018.

VALENTA, H. et al. Mycotoxins in soybean feedstuff used in Germany. **Mycotoxin Res**, v. 18, n. Supplement 2, p. 208–211, 2002.

VARGA, E. et al. Development and validation of a (semi-)quantitative UHPLC-MS/MS method for the determination of 191 mycotoxins and other fungal metabolites in almonds, hazelnuts, peanuts and pistachios. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 405, n. 15, p. 5087–5104, 2013.

VAS, G.; NAGY, K.; VÉKEY, K. Biomedical sampling. **Medical Applications of Mass Spectrometry**, p. 37–59, 2008.

VECCHIA, A. D.; CASTILHO-FORTES, R. Contaminação fúngica em granola comercial. **Food Science and Technology (Campinas)**, v. 27, n. 2, p. 324–327, 2007.

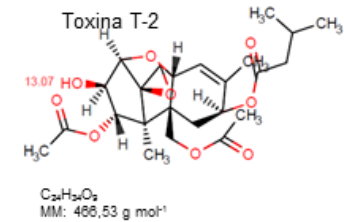
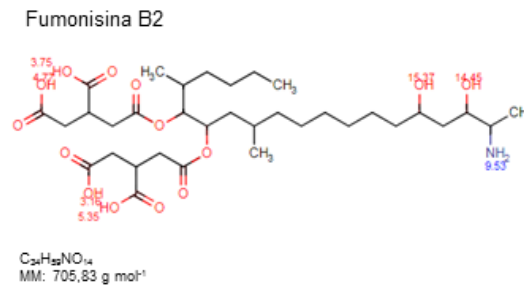
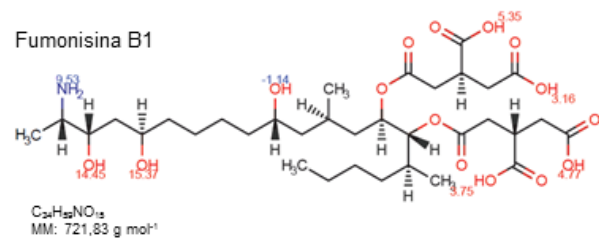
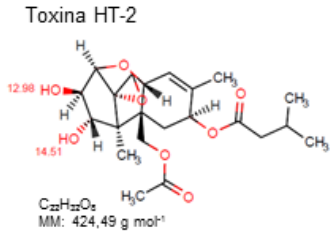
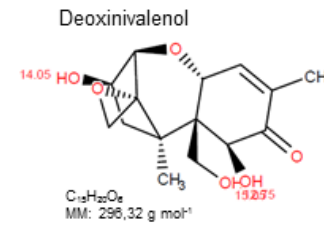
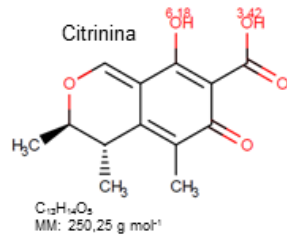
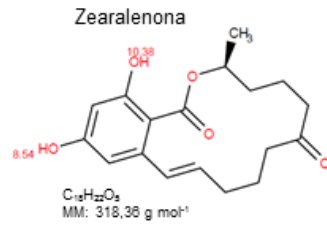
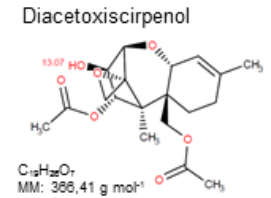
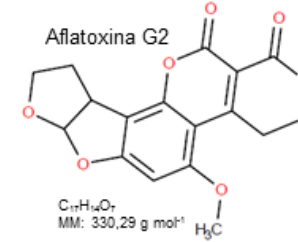
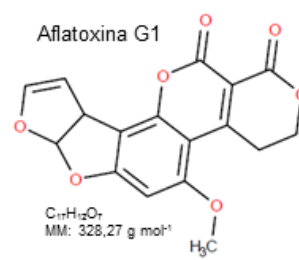
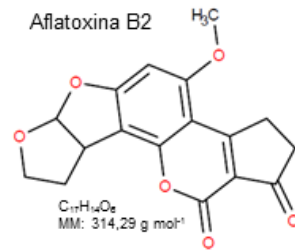
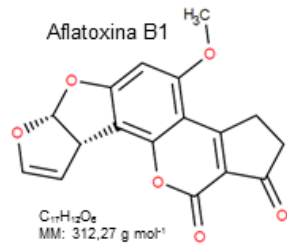
WALKER, S.; JAIME, R.; KAGOT, V.; PROBST, C.. Comparative effects of hermetic and traditional storage devices on maize grain: Mycotoxin development, insect infestation and grain quality. **Journal of Stored Products Research**, v. 77, p. 34–44, 2018.

WHAT-WHEN-HOW. **Quadrupole mass analyzers: theoretical and practical considerations (proteomics)**. Disponível em: <<http://what-when-how.com/proteomics/quadrupole-mass-analyzers-theoretical-and-practical-considerations-proteomics>> Acesso em: Julho, 2018

WHITE, N. D. G.; JAYAS, D. S. Controlled Atmosphere Storage of Grain. In: CHAKRAVERTY, A. et al. (Eds.). . **Handbook of Postharvest Technology: Cereals, Fruits, Vegetables, Tea, and Spices**. 1. ed., p. 235–251, 2003.

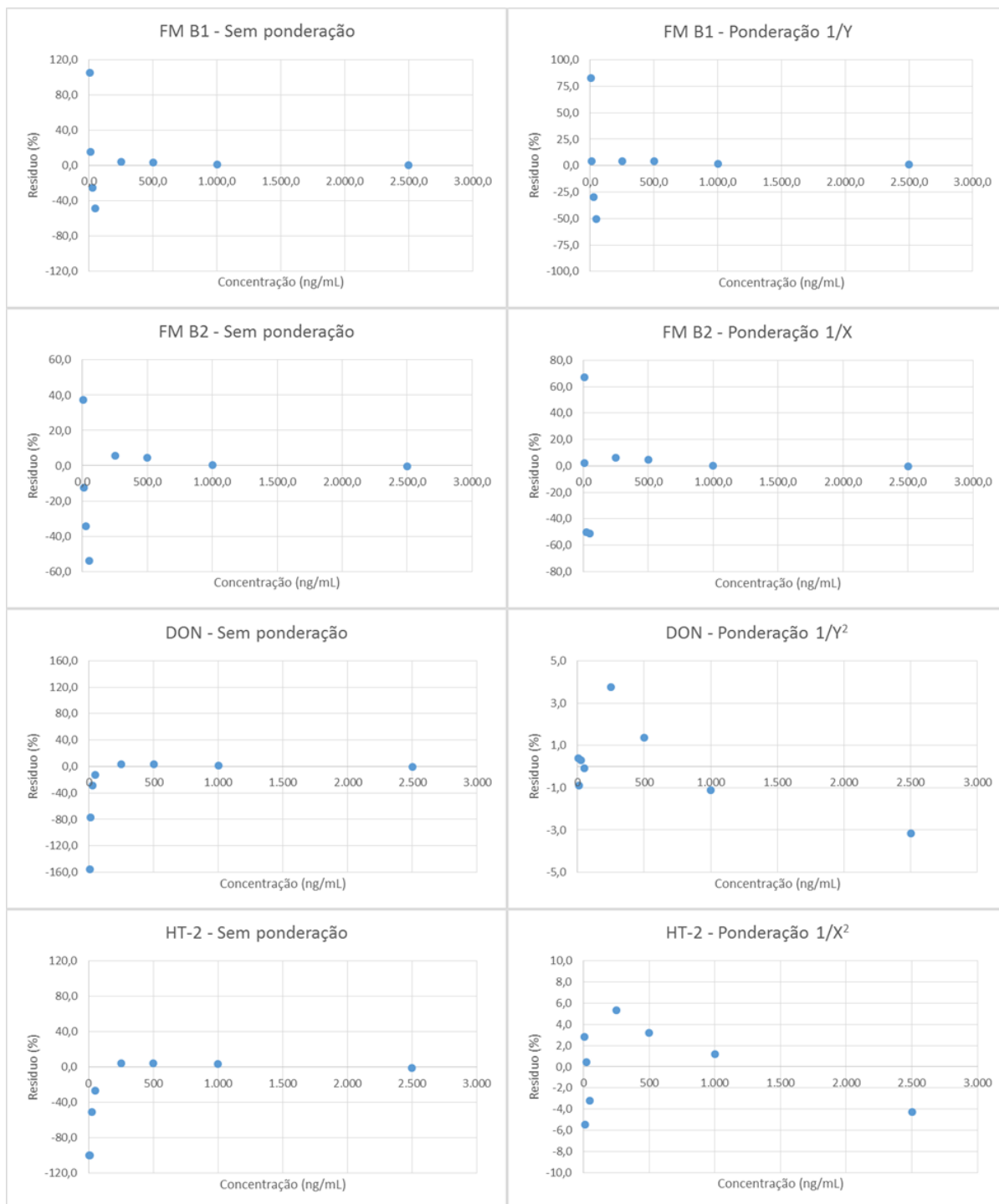
APÊNDICE A

Estrutura, fórmula molecular, massa molecular e pK_a dos grupos funcionais de cada micotoxina.



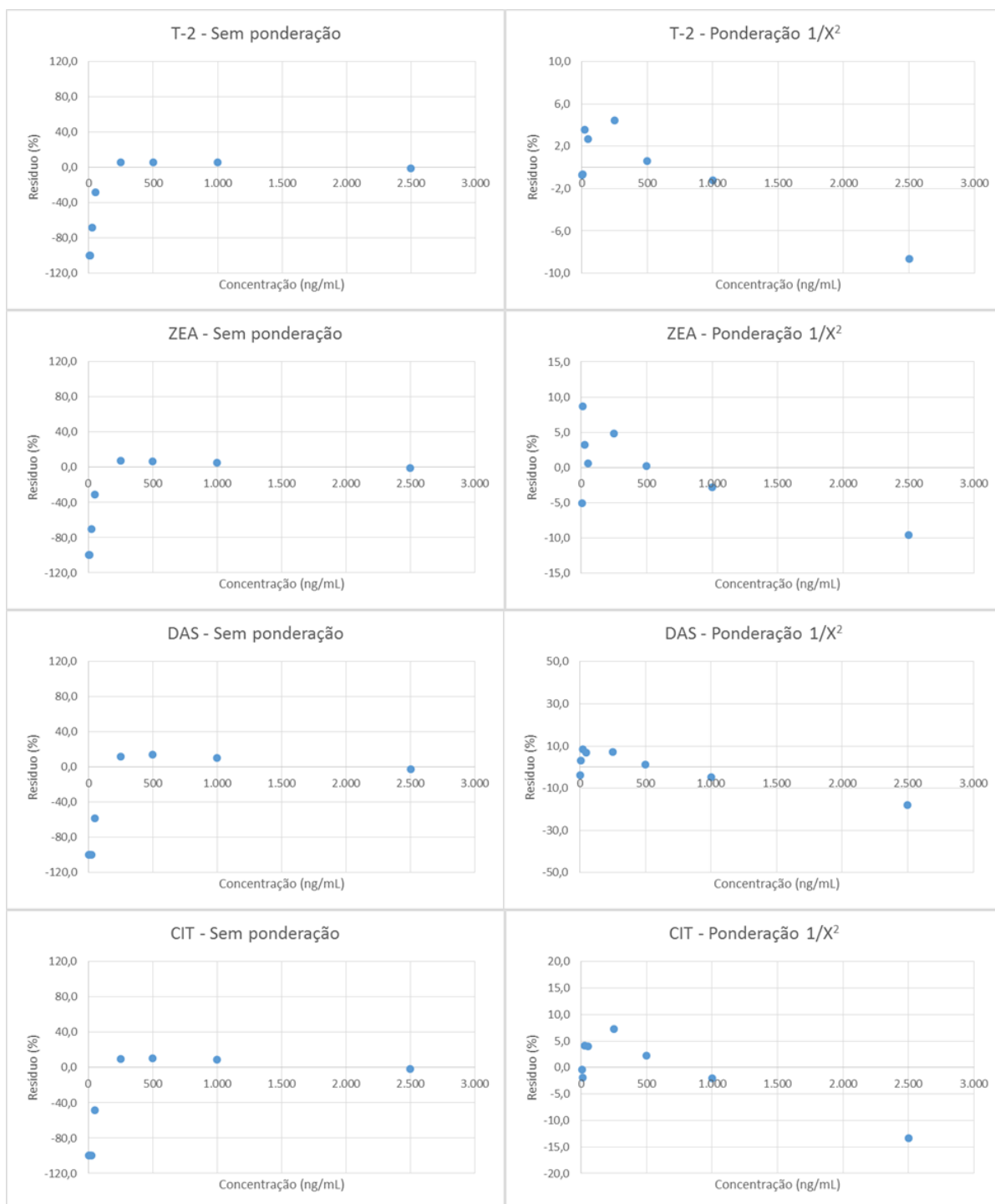
APÊNDICE B

Gráficos da distribuição dos resíduos em função da concentração para micotoxinas em feijão.



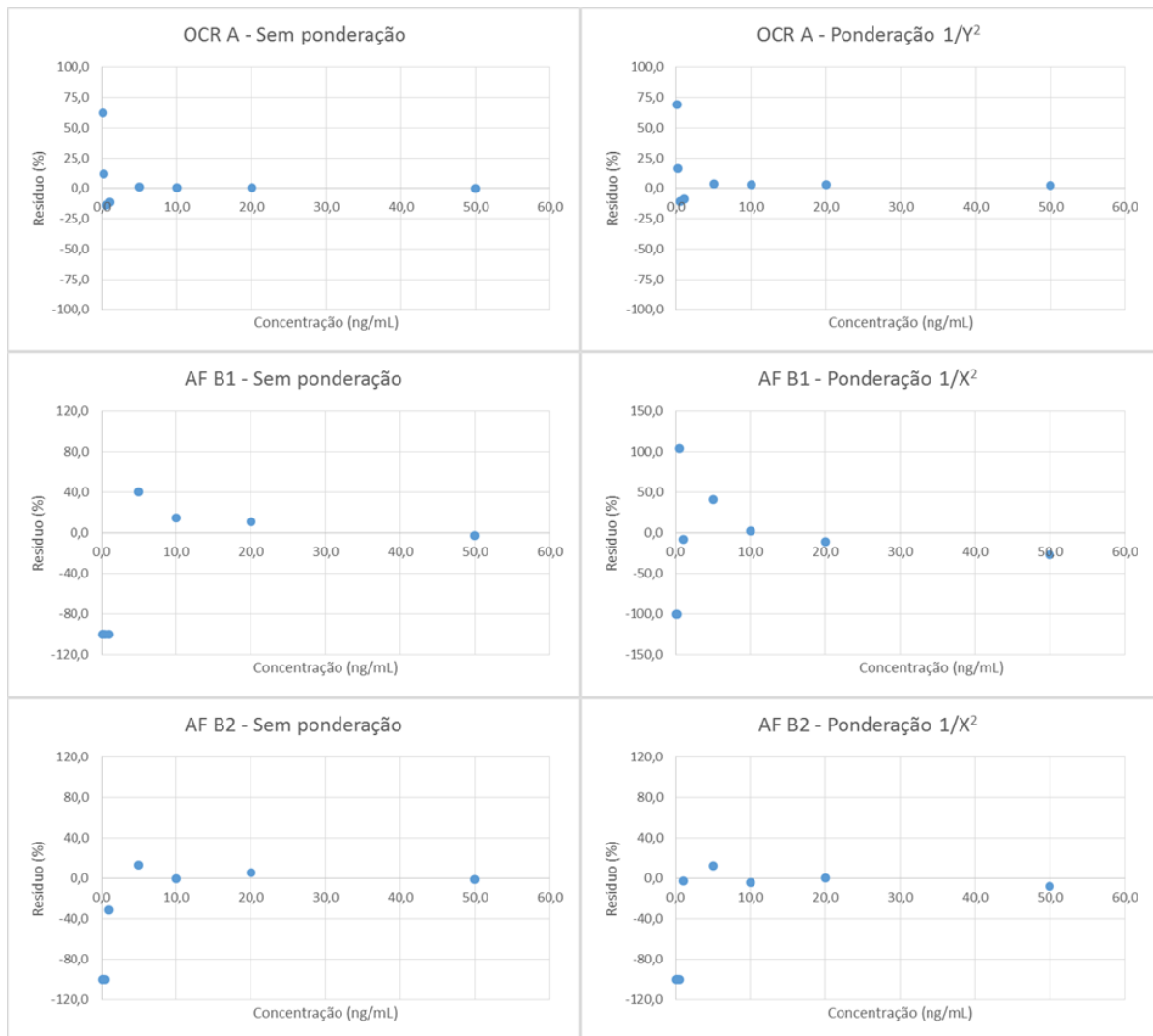
APÊNDICE B (continuação)

Gráficos da distribuição dos resíduos em função da concentração para micotoxinas em feijão.



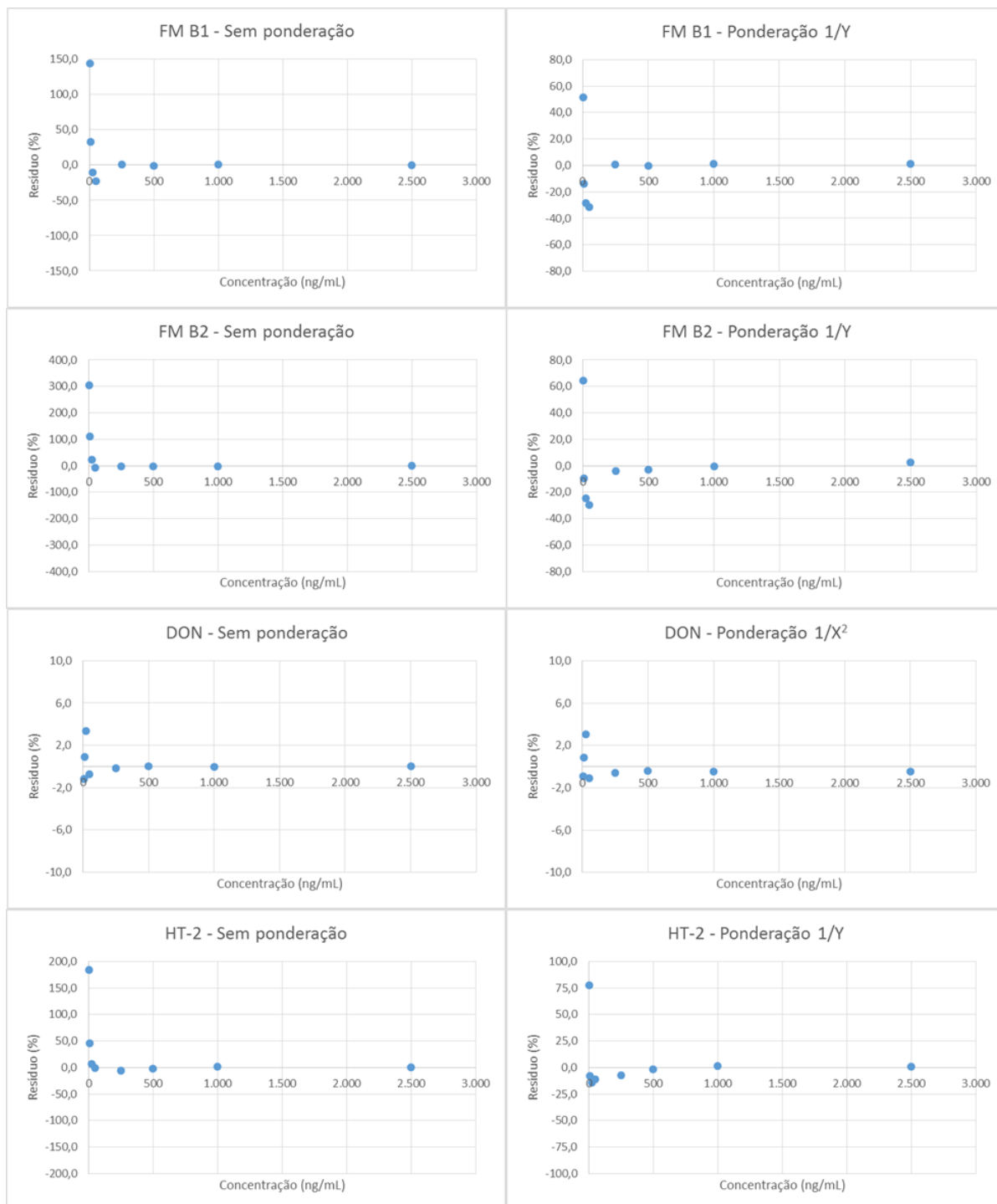
APÊNDICE B (conclusão)

Gráficos da distribuição dos resíduos em função da concentração para micotoxinas em feijão.



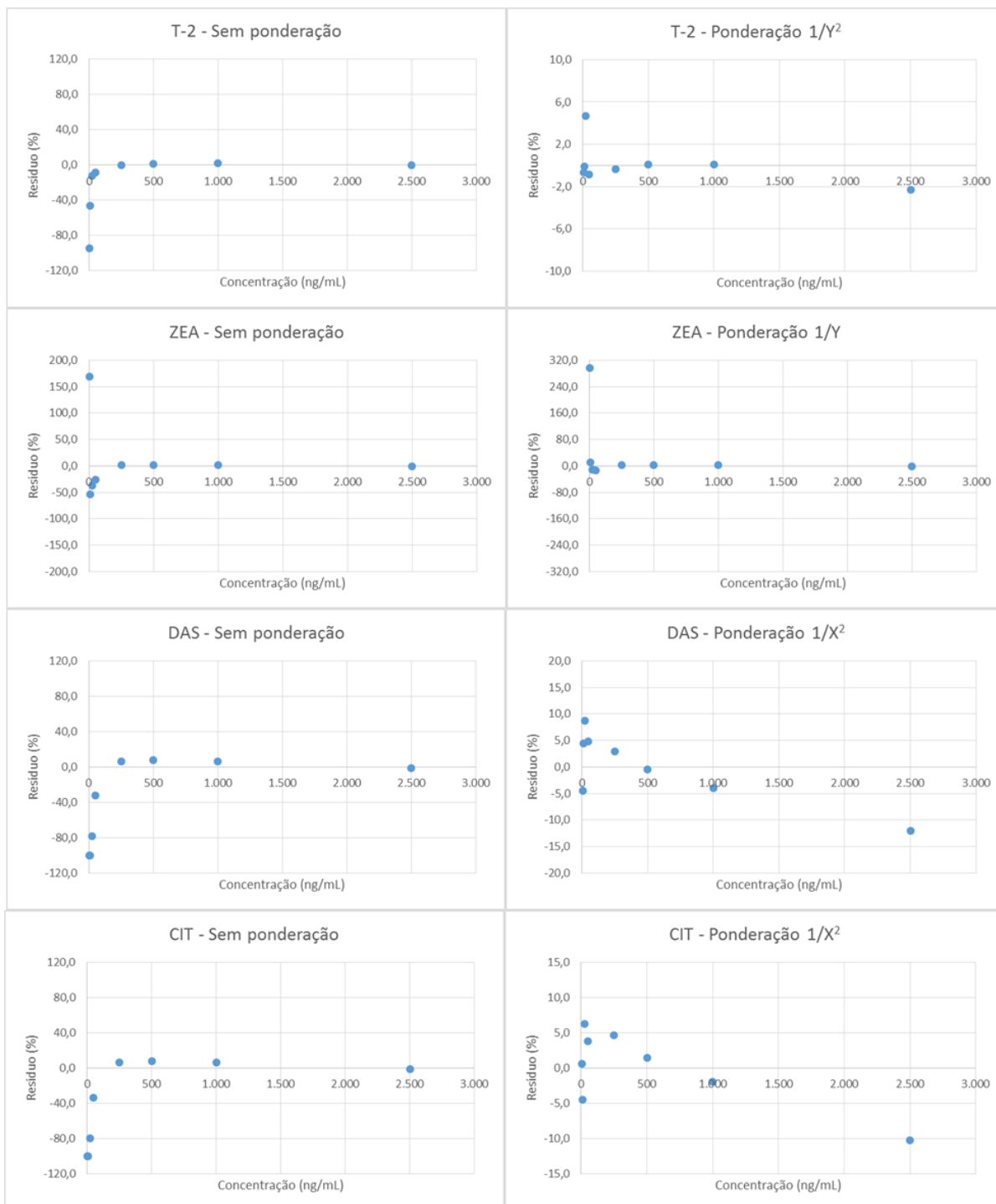
APÊNDICE C

Gráficos da distribuição dos resíduos em função da concentração para micotoxinas em soja.



APÊNDICE C (continuação)

Gráficos da distribuição dos resíduos em função da concentração para micotoxinas em soja.



APÊNDICE C (conclusão)

Gráficos da distribuição dos resíduos em função da concentração para micotoxinas em soja.

