

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

Juliano Kobs Vidal

**PREDIÇÃO DE MICOTOXINAS VIA ESPECTROSCOPIA NO
INFRAVERMELHO PRÓXIMO (NIRS) PARA GERENCIAMENTO
MICOTOXICOLÓGICO EM MILHO**

Santa Maria, RS
2020

Juliano Kobs Vidal

PREDIÇÃO DE MICOTOXINAS VIA ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO PRÓXIMO (NIRs) PARA GERENCIAMENTO MICOTOXICOLÓGICO EM MILHO

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração Sanidade e Reprodução Animal, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciência Animal**.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Augusto Mallmann

Santa Maria, RS
2020

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001

Vidal, Juliano Kobs
PREDIÇÃO DE MICOTOXINAS VIA ESPECTROSCOPIA NO
INFRAVERMELHO PRÓXIMO (NIRs) PARA GERENCIAMENTO
MICOTOXICOLÓGICO EM MILHO / Juliano Kobs Vidal.- 2020.
40 p.; 30 cm

Orientador: Carlos Augusto Mallmann
Coorientador: Luis Antonio Sangioni
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós
Graduação em Medicina Veterinária, RS, 2020

1. Aflatoxinas 2. Zearalenona 3. Deoxinivalenol 4.
Quimiometria 5. Zea mays I. Mallmann, Carlos Augusto
II. Sangioni, Luis Antonio III. Título.

Sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFSM. Dados fornecidos pelo autor(a). Sob supervisão da Direção da Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central. Bibliotecária responsável Paula Schoenfeldt Patta CRB 10/1728.

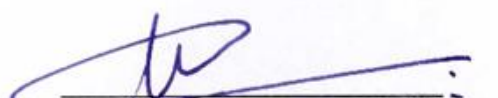
Declaro, JULIANO KOB'S VIDAL, para os devidos fins e sob as penas da lei, que a pesquisa constante neste trabalho de conclusão de curso (Dissertação) foi por mim elaborada e que as informações necessárias objeto de consulta em literatura e outras fontes estão devidamente referenciadas. Declaro, ainda, que este trabalho ou parte dele não foi apresentado anteriormente para obtenção de qualquer outro grau acadêmico, estando ciente de que a inveracidade da presente declaração poderá resultar na anulação da titulação pela Universidade, entre outras consequências legais.


Juliano Kobs Vidal

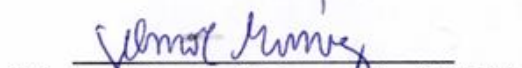
PREDIÇÃO DE MICOTOXINAS VIA ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO PRÓXIMO (NIRS) PARA GERENCIAMENTO MICOTOXICOLÓGICO EM MILHO

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração Sanidade e Reprodução Animal, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciência Animal**.

Aprovado em 28 de fevereiro de 2020:


Prof. Dr. Carlos Augusto Mallmann
(Presidente/Orientador)


Luciana Pötter, Dr. (UFSM)


Gilmar Roberto Meinerz, Dr. (UFFS)

Santa Maria, RS
2020

*Dedico este trabalho à minha filha Ágata, à minha mãe
Eideli, à minha avó Engeli, aos meus irmãos Juarez e
Jardel, à minha irmã Simone, aos meus tios Mareli e
Vanderlei e à minha noiva Vandrieli.*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por me abençoar em cada passo da minha vida, sempre me mostrando o caminho certo a seguir!

À minha família, por todo o apoio, confiança e exemplo de honestidade e humildade, especialmente à minha mãe Eideli e minha avó Engeli. Aos meus irmãos Juarez, Jardel e Simone, pela companhia e amizade durante toda a minha infância. Aos meus tios e tias, especialmente à Mareli e o Vanderlei que estiveram do meu lado em todas as minhas escolhas e que, por muitas vezes, assumiram o papel de pais. Amo vocês demais!

À minha noiva, amiga e companheira Vandrieli, por sempre estar do meu lado, me apoiar nos meus projetos e por me proporcionar o melhor presente da minha vida, nossa filha Ágata! Amo vocês sempre, para sempre!

Aos meus amigos que considero irmãos: Michael, Rafael, Bruno A., Bruno S., Mateu, Marton (*in memoriam*) e Ícaro, obrigado pelos churrascos, momentos de descontração e amizade. Vocês são incríveis!

Ao Prof. Carlos Augusto Mallmann, que me auxiliou, incentivou, desafiou e me ajudou demais para minha formação profissional, não só durante o mestrado, mas também durante toda a graduação. Obrigado pela confiança, conselhos e apoio.

Ao Adriano Mallmann, que muito contribuiu para o meu crescimento profissional, obrigado pelos teus ensinamentos, paciência e principalmente pela tua amizade!

À Universidade Federal de Santa Maria por me permitir formar parte do seu corpo discente e à CAPES pela bolsa de estudo. Aos professores do Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, pela ajuda neste período de minha formação.

À Prof^a. Luciane Gressler, pelas excelentes contribuições em cada resumo, apresentações, projeto, artigo e dissertação. A todo o pessoal do LAMIC, aos pós-graduandos, bolsistas e residentes, pela ajuda em cada discussão científica, conversa e descontração. Principalmente ao Dr. Carlos, Cristiane, Mara Luciane, Denize, Vinícius, Francis, Dima, Fernanda e Camila por todos os momentos que compartilhamos juntos. Levarei vocês para sempre em meu coração!

À todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para o meu desenvolvimento profissional, o meu muito obrigado!

RESUMO

PREDIÇÃO DE MICOTOXINAS VIA ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO PRÓXIMO (NIRs) PARA GERENCIAMENTO MICOTOXICOLÓGICO EM MILHO

AUTOR: Juliano Kobs Vidal

ORIENTADOR: Prof. Dr. Carlos Augusto Mallmann

O objetivo do presente estudo foi avaliar o desempenho da espectroscopia no infravermelho próximo (NIRs) na predição de micotoxinas em lotes de milho armazenados em silos. Foram analisadas 240 amostras armazenadas em 4 silos, coletadas com auxílio de uma sonda pneumática utilizando 2 processos de amostragem: A e B. No processo A foram coletadas três amostras coletivas (terço superior, médio e inferior da profundidade do silo). No processo B foi coletada apenas uma amostra, composta pelos grãos de toda profundidade do silo. Cinco pontos foram coletados de cada silo: centro da superfície e centro de cada quadrante da superfície (norte, sul, leste e oeste). As análises de Aflatoxina B₁ (AFB₁), Zearalenona (ZEA) e Deoxinivalenol (DON) foram feitas por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas (LC-MS/MS), utilizando HPLC Infinity 1200 Series (Agilent, Palo Alto, EUA), acoplado a um espectrômetro de massas 5500 QTRAP (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Os espectros foram obtidos utilizando equipamento NIRs, modelo XDS (Foss, Hilleroed, Copenhagen, DK). O espectro de cada amostra foi enviado para a plataforma Olimpo da Pegasus Science para obtenção dos resultados de predição micotoxicológica. As amostras analisadas para DON apresentaram valor menor que o limite de quantificação de NIRs que é de 350 µg.kg⁻¹). Foram determinadas faixas de contaminação aceitáveis para cada micotoxina, e o resultado via NIRs foi considerado correto quando estava dentro dessas faixas em comparação com o resultado de LC-MS/MS. A variabilidade aceita, para cima ou para baixo (±), foi de ±10 µg.kg⁻¹ para AFB₁ e ±100 µg.kg⁻¹ para ZEA. Além disso, foram comparados os processos de amostragem para cada ponto de coleta de amostras no silo: a média da predição de três amostras via NIRs (plano de amostragem A) foi comparada com o resultado de uma análise via LC-MS/MS (plano de amostragem B). A análise de uma amostra via LC-MS/MS versus a predição de uma amostra via NIRs apresentou 91, 95 e 100% de precisão para AFB₁, ZEA e DON, respectivamente. Ao comparar a média da predição de três amostras via NIRs com a análise de uma amostra via LC-MS/MS, houve precisão de 100% para AFB₁, ZEA e DON. Para a avaliação quantitativa foi calculado o Z-Score dos resultados via NIRs, tomando os resultados de LC-MS/MS como padrão. Os dados foram classificados em: satisfatório, questionável e insatisfatório, sendo satisfatórios em 81%, 90% e 100% das amostras para AFB₁, ZEA e DON, respectivamente. A concentração média de cada silo para as análises via LC-MS/MS e para predição via NIRs foram, respectivamente: silo 1= AFB₁: 0,6 e 2,2 µg.kg⁻¹ e ZEA: 13 e 26 µg.kg⁻¹; silo 2= AFB₁: 0,5 e 2,7 µg.kg⁻¹ e ZEA: 18 e 18 µg.kg⁻¹; silo 3= AFB₁: 5,3 e 6,1 µg.kg⁻¹ e ZEA: 38 e 57 µg.kg⁻¹; e silo 4= AFB₁: 2,1 e 4 µg.kg⁻¹ e ZEA: 46 e 39 µg.kg⁻¹. Concluímos que a metodologia NIRs pode ser utilizada como uma ferramenta de monitoramento micotoxicológico prática, precisa, rápida e não destrutiva para lotes de milho estocados em silos.

Palavras-chave: aflatoxinas, zearalenona, deoxinivalenol, quimiometria, z-score, *Zea mays*.

ABSTRACT

PREDICTION OF MYCOTOXINS VIA NEAR INFRARED SPECTROSCOPY (NIRs) FOR MYCOTOXICOLOGICAL MANAGEMENT IN MAIZE

AUTHOR: Juliano Kobs Vidal

ADVISOR: Prof. Dr. Carlos Augusto Mallmann

The present study was aimed at evaluating the performance of Near Infrared Spectroscopy (NIRs) in the prediction of mycotoxins in silo-stored lots of maize. We analyzed 240 samples from 4 silos, which were collected with the aid of a pneumatic probe using 2 sampling processes: A and B. In process A, three collective samples were taken (upper, middle and lower third of the silo depth). In process B, only one sample composed of grains from the whole depth of the silo was obtained. Five points were collected from each silo: surface center and center of each surface quadrant (north, south, east and west). Analyses of Aflatoxin B₁ (AFB₁), Zearalenone (ZON) and Deoxynivalenol (DON) were performed by high performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry (LC-MS/MS) using an Infinity 1200 Series HPLC (Agilent, Palo Alto, USA), coupled to a 5500 QTRAP mass spectrometer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Spectra were obtained via a NIRs equipment, model XDS (Foss, Hilleroed, Copenhagen, DK). The spectrum of each sample was sent to Pegasus Science Olimpo platform to obtain the results of mycotoxicological prediction. The value of the samples analyzed for DON was lower than the NIRs quantification limit, which is 350 µg.kg⁻¹. Acceptable contamination ranges were determined for each mycotoxin, and the result via NIRs was considered correct when it was within those ranges compared to the LC-MS/MS result. The accepted variability, upwards or downwards (±), was ±10 µg.kg⁻¹ for AFB₁ and ±100 µg.kg⁻¹ for ZON. In addition, the sampling processes for each sample collection point in the silo were compared: the mean of the prediction of three samples via NIRs (plan A) was compared with the result of one analysis via LC-MS/MS (plan B). The analysis of one sample via LC-MS/MS versus the prediction of one sample via NIRs showed 91, 95 and 100% accuracy for AFB₁, ZON and DON, respectively. When comparing the mean of the prediction of three samples via NIRs with the analysis of one sample via LC-MS/MS, there was 100% accuracy for AFB₁, ZON and DON. The Z-Score of the results via NIRs was calculated for the evaluation, taking the LC-MS/MS results as standard. Data were classified as satisfactory, questionable and unsatisfactory, being satisfactory in 81%, 90% and 100% of the samples for AFB₁, ZON and DON, respectively. The average concentration of each silo for the analyses through LC-MS/MS and prediction via NIRs were, respectively: silo 1= AFB₁: 0.6 and 2.2 µg.kg⁻¹; and ZON: 13 and 26 µg.kg⁻¹; silo 2= AFB₁: 0.5 and 2.7 µg.kg⁻¹ and ZON: 18 and 18 µg.kg⁻¹; silo 3= AFB₁: 5.3 and 6.1 µg.kg⁻¹ and ZON: 38 and 57 µg.kg⁻¹; and silo 4= AFB₁: 2.1 and 4 µg.kg⁻¹ and ZON: 46 and 39 µg.kg⁻¹. It may be concluded that the NIRs methodology can be used as a practical, accurate, fast and non-destructive mycotoxicological monitoring tool for lots of maize stored in silos.

Keywords: aflatoxins, zearalenone, deoxynivalenol, chemometrics, z-score, *Zea mays*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

4. ARTIGO

- Figure 1- Percentage accuracy of the prediction results via NIRs for the different levels of variation accepted (ANVISA 20 $\mu\text{g.kg}^{-1}$; 10, 7.5 and 5 $\mu\text{g.kg}^{-1}$) when comparing one result via NIRs with one analysis via LC-MS/MS (1X1) and three results via NIRs with one analysis via LC-MS/MS (3X1) for aflatoxin B₁ in the semi-quantitative assessment.....33
- Figure 2- Percentage accuracy of the prediction results via NIRs for the different levels of variation accepted (ANVISA 400 $\mu\text{g.kg}^{-1}$; 100, 75 and 50 $\mu\text{g.kg}^{-1}$) when comparing one result via NIRs with one analysis via LC-MS/MS (1X1) and three results via NIRs with one analysis via LC-MS/MS (3X1) for zearalenone in the semi-quantitative assessment.....34

LISTA DE TABELAS**3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

Tabela 1-	Limites máximos toleráveis (LMT) de micotoxinas em milho indicados na RDC nº 7 de 2011.....	18
-----------	---	----

4. ARTIGO

Table 1-	Percentage accuracy of the NIRs method through the Z-Score calculation for the evaluation of one result via NIRs versus one result via LC-MS/MS (1X1), compared with the evaluation of three results via NIRs versus one result via LC-MS/MS (3X1)	35
Table 2-	Average contamination result ($\mu\text{g.kg}^{-1}$) in each silo for analyses through LC-MS/MS versus prediction via NIRs.....	36

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAM	Aditivo antimicotoxina
AFB ₁	Aflatoxina B ₁
AFB ₂	Aflatoxina B ₂
AFG ₁	Aflatoxina G ₁
AFG ₂	Aflatoxina G ₂
AFs	Aflatoxinas (B ₁ + B ₂ + G ₁ + G ₂)
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
Aw	Activity water
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CONAB	Companhia Nacional de Abastecimento
DON	Deoxinivalenol
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
FAO	Food and Agriculture Organization
FAPAS	Food Chemistry Proficiency Test Report
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IARC	International Agency for Research on Cancer
kg	Quilogramas
LAMIC	Laboratório de Análises Micotoxicológicas
LC-MS/MS	Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry
LMT	Limite Máximo Tolerável
LQ	Limit of Quantification
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
mm	Millimeter
MS	Massa
MTL	Maximum Tolerated Levels
NIRs	Near Infrared Spectroscopy
nm	Nanometers
TD	Target Deviation
TV	Target Value
UFSM	Universidade Federal de Santa Maria
µg	Microgramas
VO	Value Obtained in the NIRs
Z	Z-Score
ZEA	Zearalenona
ZON	Zearalenone

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	15
2.1. MICOTOXINAS	15
2.1.1. Aflatoxinas:	16
2.1.2. Zearalenona	16
2.1.3. Deoxinivalenol.....	17
2.2. REGULAMENTAÇÃO DE MICOTOXINAS NO BRASIL	17
2.3. MÉTODOS DE AMOSTRAGEM PARA MICOTOXINAS.....	18
2.4. USO DA CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS NAS ANÁLISES DE MICOTOXINAS	18
2.5. USO DA ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO PRÓXIMO NA PREDIÇÃO DE MICOTOXINAS	19
3. ARTIGO.....	20
4. CONCLUSÃO	37
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	38

1. INTRODUÇÃO

Algumas linhagens de fungos filamentosos podem produzir metabólitos tóxicos para humanos e animais, chamados de micotoxinas. Há mais de 300 micotoxinas conhecidas, produzidas por cerca de 100 espécies de fungos que se desenvolvem em climas tropicais e subtropicais, pelas condições de temperatura e umidade favoráveis (MALLMANN e DILKIN, 2007). Segundo Kumar, Basu e Rajendran (2007), esses compostos causam diversos efeitos adversos à saúde, como câncer hepático, anomalias e malformações no feto de mulheres grávidas, alterações hormonais, mutações e hemorragias.

Cada país tem sua própria legislação para o controle dos níveis micotoxicológicos em alimentos para humanos, ingredientes de ração ou ração pronta para animais. As legislações baseiam-se em limites máximos permitidos, aceitando ou recusando alimentos de acordo com sua contaminação por determinada micotoxina. Esses metabólitos não possuem distribuição homogênea nos lotes de grãos e podem ser produzidos por fungos de campo ou de armazenagem. Por isso, metodologias de amostragem e de análise com alta precisão são necessárias para reduzir os riscos de erros em uma determinação micotoxicológica e agilizar a tomada de decisão.

A produção de milho no Brasil na safra 2018/2019 ultrapassou 100 milhões de toneladas, com expectativa de chegar a mais de 98 milhões de toneladas na safra 2019/2020 (CONAB, 2019). A inclusão de milho nas dietas de aves e suínos pode chegar a 60% da composição total da ração, tornando-o o principal ingrediente das fórmulas (STRINGHINI et al., 2000). Na alimentação humana, esse cereal pode ser ingerido na forma in natura, como ingrediente para fabricação de pães, geleias, cervejas, biscoitos e balas.

O milho é um dos cereais com maior prevalência de micotoxinas. De 2008 a 2017, Mallmann et al. (2017) encontraram contaminação média ($\mu\text{g.kg}^{-1}$) e positividade (%), respectivamente, de 9 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ de aflatoxinas (AFs) e 47%; 91 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ de zearalenona (ZEA) e 50%; 78 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ de deoxinivalenol (DON) e 21% em amostras de milho. Os níveis micotoxicológicos encontrados no milho têm importância para a saúde pública, já que esse cereal e seus respectivos subprodutos são utilizados para a alimentação humana. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária estabeleceu legislação com Limites Máximos Tolerados (LMT) de micotoxinas em alimentos, na qual o limite em vigência para AFs, ZEA e DON no milho é de 20, 400 e 3.000 $\mu\text{g kg}^{-1}$, respectivamente (ANVISA, 2011, 2013).

Os elevados custos de análise, tempo para obtenção do resultado e precisão de alguns métodos de avaliação micotoxicológica são fatores que dificultam o processo de gerenciamento

de lotes de milho armazenados. Em vista disso, é necessário o estabelecimento de um método de avaliação micotoxicológica rápido com resultados precisos para realização de um monitoramento completo e gerenciamento desses grãos. Isso facilita o direcionamento dos lotes contaminados para utilização para outros fins, na alimentação de espécies menos susceptíveis ou até mesmo a não utilização desses grãos pelas perdas econômicas e prejuízos à saúde humana e animal que as micotoxinas podem acarretar.

A tecnologia NIR consiste basicamente em incidir um raio de luz em comprimento de onda na região do infravermelho sobre uma amostra, medindo-se depois a quantidade de luz absorvida pelo material. A técnica mede os valores de absorbância, em diferentes números de onda da região espectral utilizada, gerando, assim um espectro. Esses valores de absorbância refletem as características químicas e estruturais de cada amostra (STUART, 2004). Atualmente a técnica tem sido muito estudada na detecção de micotoxinas em produtos agrícolas, principalmente o milho, que é um grão amplamente acometido por esses metabólitos (MAZIERO e BERSOT, 2010).

Este estudo apresenta os resultados da avaliação da espectroscopia no infravermelho próximo (NIRs) para a predição de micotoxinas em lotes de milho armazenado em silos. Os resultados de predição via NIRs foram comparados com os resultados de análise via cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas (LC-MS/MS) de duas formas: quantitativa e semi-quantitativa.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. MICOTOXINAS

Os cereais produzidos para alimentação humana e animal estão sob risco de infestações por fungos. Algumas linhagens de fungos filamentosos são produtores de micotoxinas, as quais são metabólitos secundários tóxicos. Esses fungos têm ocorrência mundial, predominando em climas tropicais e subtropicais, onde seu desenvolvimento é favorecido por fatores como condições de umidade e temperatura (MALLMANN e DILKIN, 2007). Além da produção desse contaminante tóxico a humanos e animais, esses fungos causam deterioração do grão, reduzindo consideravelmente seu valor químico e nutricional (HERMANNNS et al., 2006).

A Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura (FAO) estima que cerca de 25% das cultivares produzidas no mundo apresentam alguma micotoxina. As perdas mundiais desses produtos devido à contaminação por esses metabólitos tóxicos estão em torno de 1 bilhão de toneladas por ano (FAO, 2019).

As principais micotoxinas encontradas em cereais são as AFs, produzidas por *Aspergillus spp.*; ocratoxinas, produzidas por *Penicillium spp.*; DON; toxina T-2; ZEA; ergotoxinas; e fumonisinas, produzidas por *Fusarium spp.* (ABRUNHOSA et al., 2012). Esses fungos podem se desenvolver e produzir metabólitos secundários tanto em nível de campo (pré e pós-colheita) quanto de estoque e armazenamento (ROCHA et al., 2012).

Esses compostos causam diversos danos à saúde humana e animal, como por exemplo, efeitos anabolizantes, estrogênicos, carcinogênicos, mutagênicos e teratogênicos. São muitos os fatores que levam a uma maior ou menor prejudicialidade quando ocorre um quadro de micotoxicose. Os efeitos adversos observados nos animais estão diretamente relacionados com o tipo de micotoxina ingerida, dose, raça, sexo, idade, fatores ambientais, manejo e condições nutricionais (MALLMANN et al., 2017).

A utilização de ingredientes contaminados com micotoxinas onera o custo final da fórmula de ração para aves e suínos, seja pela inclusão de aditivo antimicotoxina (AAM) ou de nutrientes sintéticos devido à baixa disponibilidade nos ingredientes naturais, causados pela presença de fungos nos grãos (HERMANNNS et al., 2006). Vidal et al., (2016) encontraram uma diferença de R\$ 15,00 por tonelada na fórmula de ração para frangos de corte a partir dos dados nutricionais e micotoxicológicos do milho utilizado nas fórmulas.

2.1.1. Aflatoxinas:

As principais AFs conhecidas são B₁, B₂, G₁ e G₂ (AFB₁, AFB₂, AFG₁ e AFG₂). Esses metabólitos secundários são produzidos por cepas de fungos do gênero *Aspergillus*, principalmente das espécies *A. flavus* e *A. parasiticus* (HUONG et al., 2016). A Agência Internacional de Pesquisa de Câncer (IARC) classificou a AFB₁ como cancerígena – grupo I (IARC, 2002).

As AFs afetam o metabolismo dos carboidratos, lipídeos, ácidos nucleicos e proteínas. Além disso, possuem efeito mutagênico, teratogênico, carcinogênico e hepatotóxico (ELLIS et al., 1991). Um dos efeitos mais importantes das AFs é a inibição da síntese proteica, que causa redução no nível de proteína plasmática, principalmente α e β globulinas e albumina (ESPADA et al., 1997).

Em frangos de corte, as AFs afetam a função hepática pelo aumento dos níveis séricos de aspartato amino-transferase e, quando combinadas com outras micotoxinas, ocorre um efeito aditivo (ELIANA et al., 2010). Em todas as espécies animal, as AFs causam diminuição da imunidade, redução do ganho de peso, desordens digestivas, hepatopatias, anorexia, ataxia, tremores e podem levar a óbito (MALLMANN et al., 2017).

Mallmann et al. (2017) encontraram uma positividade de 47% de AFs em amostras de milho analisadas no período de 2008 a 2017. Os autores verificaram uma contaminação média de 9 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ e uma média de 19 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ considerando apenas as amostras contaminadas.

2.1.2. Zearalenona

A ZEA é uma micotoxina que ocorre em praticamente todos os cereais, especialmente em culturas de inverno, como aveia, cevada, trigo, centeio e milho, contaminadas por fungos do gênero *Fusarium*, principalmente *F. graminearum*. Essa micotoxina é produzida em temperatura de 24 a 26 °C, com Aw de 0,90 (DILKIN, 2002; IANAMAKA, OLIVEIRA e TANIWAKI, 2010).

Considerada uma micotoxina estrogênica, a ZEA possui afinidade com os receptores de estrogênio (17- β -estradiol), atuando como um disruptor endócrino. Em humanos, a ingestão de ZEA tem sido associada à puberdade precoce em meninas e ao aumento do tamanho dos órgãos reprodutores em crianças (DUARTE-VOGEL e VILLAMIL-JIMÉNEZ, 2005). Em suínos, os principais sinais clínicos e lesões causadas pela ZEA são a síndrome de hiperestrogenismo (vulvovaginite) e *splayleg* em leitões recém-nascidos (MALLMANN et al., 2017).

Mallmann et al. (2017) encontraram uma positividade de 50% em amostras de milho analisadas no período de 2008 a 2017. Os autores verificaram uma contaminação média de $91 \mu\text{g.kg}^{-1}$ e uma média de $180 \mu\text{g.kg}^{-1}$ considerando apenas as amostras contaminadas.

2.1.3. Deoxinivalenol

DON é uma micotoxina do grupo B dos tricotecenos conhecida como vomitoxina, sendo constantemente relacionada com distúrbios gastrointestinais (PINTON e OSWALD, 2014). Essa toxina é produzida por fungos do gênero *Fusarium*, principalmente *F. graminearum* e *F. culmorum*. Possui alta prevalência em amostras de trigo, cevada e milho (IANAMAKA, OLIVEIRA e TANIWAKI, 2010).

Entre os principais efeitos deletérios de DON em suínos estão: vômito, diarreia e recusa de alimento (MALLMANN e DILKIN, 2007). Essa problemática pode levar à comprometimento nos dados zootécnicos dos animais, como perda de peso e redução do crescimento. As funções neurológicas e imunológicas podem ser igualmente afetadas, assim como a integridade intestinal (ALI et al., 2015), comprometendo a absorção dos nutrientes fornecidos na dieta dos animais.

Mallmann et al. (2017) encontraram uma positividade de 21% de DON em amostras de milho analisadas no período de 2008 a 2017. Os autores verificaram uma contaminação média de $78 \mu\text{g.kg}^{-1}$ e uma média de $367 \mu\text{g.kg}^{-1}$ considerando apenas as amostras contaminadas.

2.2. REGULAMENTAÇÃO DE MICOTOXINAS NO BRASIL

A legislação para os LMTs de micotoxinas em alimentos no Brasil está estabelecido pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) na Resolução nº 7, de 18 de fevereiro de 2011 (ANVISA, 2011; ANVISA, 2013) (Tabela 1). O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) regulamenta a contaminação por AFs, que têm seus LMTs em alimentos previstos na portaria MA/SNAD/SFA Nº. 07, de 09/11/88 - publicada no Diário Oficial da União de 09 de novembro de 1988 - Seção I, página 21.968, 1988: para qualquer matéria-prima a ser utilizada diretamente ou como ingrediente para rações destinadas ao consumo animal: AFs (máximo)= $50 \mu\text{g.kg}^{-1}$ (BRASIL, 1988).

Tabela 1. Limites máximos toleráveis (LMT) de micotoxinas em milho indicados na RDC nº 7 de 2011.

Micotoxina	Alimento	LMT ($\mu\text{g.kg}^{-1}$)	Situação
Aflatoxinas (B₁+B₂+G₁+G₂)	Milho, milho em grão (Inteiro, partido, amassado, moído).	20	Em vigência
Zearalenona	Milho em grão e trigo para posterior processamento.	400	Em vigência
Deoxinivalenol	Trigo e milho em grãos para posterior processamento	3000	Em vigência

Fonte: Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2011; ANVISA, 2013).

2.3. MÉTODOS DE AMOSTRAGEM PARA MICOTOXINAS

Existem duas estratégias de amostragem normalmente sugeridas: estática e dinâmica. Para amostras armazenadas em silos, armazéns ou containers utiliza-se a amostragem estática através da coleta mecânica das amostras (WHITAKER, 2006). Para a amostragem estática são utilizados equipamentos que podem ser caladores, pás, conchas de bordos retangulares ou equipamentos pneumáticos. No caso da amostragem dinâmica, geralmente emprega-se a amostragem automática em grãos que estão sendo transferidos de um local para outro, seja pela esteira transportadora ou tubulações de rosca sem fim (caracóis). Durante o processo, pequenos incrementos são coletados ao longo do transporte deste material.

2.4. USO DA CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS NAS ANÁLISES DE MICOTOXINAS

A determinação das micotoxinas em baixas concentrações depende da cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC) acoplado com um detector ultravioleta ou de fluorescência e atualmente a detecção por espectrometria de massa (MS). Essa técnica oferece o efeito de alta sensibilidade, exatidão e seletividade na identificação do analito, além de quantificação precisa (BOUSIADOU-THEURILLAT, MEIER e RICHARD, 2014). Na análise de micotoxinas por LC-MS/MS, a ferramenta principal é o uso de processos de extração, purificação e derivatização, concluindo com a detecção e quantificação.

2.5. USO DA ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO PRÓXIMO NA PREDIÇÃO DE MICOTOXINAS

A espectroscopia no infravermelho próximo (NIRs) é uma técnica analítica rápida e não destrutiva que pode ser aplicada à caracterização de amostras de alimentos com precisão. Os métodos baseados em infravermelho próximo exigem pouca preparação de amostra e mão-de-obra (McMULLIN, MIZAIKOFF e KRŠKA, 2015). Essa técnica é comumente utilizada na indústria de controle de qualidade de alimentos para monitorar os atributos físicos dos grãos de cereais para conteúdo de proteínas, carboidratos e lipídios.

O NIRs é um equipamento altamente preciso que efetua análises de componentes orgânicos através do princípio de emissão de radiação eletromagnética (EMBRAPA, 2010). O espectrofotômetro se baseia na aplicação da matemática à química analítica (quimiometria). A técnica é uma integração de espectroscopia e computação de dados. A região do espectro eletromagnético compreendida pelo infravermelho próximo varia entre 750 a 2500 nm. O potencial do espectrofotômetro de detecção no NIRs tem sido relatado como uma ferramenta na detecção fúngica micotoxigênica em produtos agrícolas (BERARDO et al., 2005; FERNÁNDEZ-IBÁÑEZ et al., 2009). Os fungos infectam o germe rico em lipídios e os hidrolisam, influenciando as mudanças no espectro NIRs. Com a utilização da tecnologia NIRs pode-se buscar substituir alguns dos métodos tradicionais de caracterização, já que esta é uma técnica rápida, de simples aplicação e não destrutiva (RAMBO, FERREIRA, e AMORIM, 2016).

A tecnologia NIRs tem sido amplamente utilizada em indústrias, postos de recebimento de grãos, fábricas de ração e em portos. Garcia e Kleiber (2015) avaliaram a viabilidade da utilização do NIRs na triagem de milho para os teores de DON e constataram que a abordagem qualitativa foi uma boa ferramenta para distribuição e utilização do cereal.

3. ARTIGO

**INVESTIGATION INTO THE PERFORMANCE OF NEAR INFRARED
SPECTROSCOPY (NIRS) IN THE PREDICTION OF MYCOTOXINS IN SILO-
STORED LOTS OF MAIZE**

J.K. Vidal, A.O. Mallmann, D. Tyska, C.A.A. Almeida, G.R. Meinerz and C.A. Mallmann

(Artigo submetido à revista Journal of Cereal Science)

Investigation into the performance of near infrared spectroscopy (NIRs) in the prediction of mycotoxins in silo-stored lots of maize

J.K. Vidal^a, A.O. Mallmann^b, D. Tyska^a, C.A.A. Almeida^a, G.R. Meinerz^c and C.A. Mallmann^{a*}

^aLaboratory of Mycotoxicological Analysis (LAMIC), Federal University of Santa Maria (UFSM), P.O. Box 5011, 97105-970 Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil; ^bPegasus Science, RST 287, Km 227, Palma District, 97105-030 Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil; ^cDepartment of Agronomy, Federal University of Southern Border (UFFS), 97900-000 Cerro Largo, Rio Grande do Sul, Brazil; *mallmann@lamic.ufsm.br

Abstract

The aim of the present study was to evaluate the performance of near infrared spectroscopy (NIRs) in the prediction of mycotoxins in silo-stored lots of maize. This research was based on two sampling plans, A and B, and 240 samples of maize were collected in four silos. A spectrum was generated for each sample, and predictions were made for aflatoxin B₁ (AFB₁), zearalenone (ZON) and deoxynivalenol (DON). The semi-quantitative and quantitative methods were used to verify the results. Prediction of one sample via NIRs versus one analysis via high performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry (LC-MS/MS) presented 91%, 95% and 100% accuracy for AFB₁, ZON and DON, respectively. When three predictions were evaluated via NIRs versus one analysis via LC-MS/MS, the results were 100% accurate for all the investigated mycotoxins. The Z-Score of the results was calculated via NIRs for the quantitative evaluation using the LC-MS/MS results as standard. The results were satisfactory in 81%, 90% and 100% of the samples for AFB₁, ZON and DON, respectively. It may be concluded that the NIRs technique can be used as a practical, accurate, fast and non-destructive mycotoxicological monitoring tool for maize grains stored in silos.

Keywords: aflatoxins, zearalenone, chemometry, Z-Score.

1. Introduction

Products of plant origin are at risk of infestations by mycotoxin-producing filamentous fungi. These fungi occur all over the world, predominantly in tropical and subtropical climates, where their development is favored by factors such as high humidity and temperature conditions (Rocha et al., 2014). In addition to the production of mycotoxins, which are toxic to humans and animals, these fungi cause deterioration of the grain; as a result, its nutritional value is considerably reduced (Hermanns et al., 2006). According to the United Nations Food and Agriculture Organization (FAO), about 25% of the cultivars produced worldwide present some mycotoxin. Because of that, the global losses related to such products are close to 1 billion tons per year (FAO, 2019).

The chief mycotoxins found in cereals are: aflatoxins (AFs), produced by *Aspergillus spp.*; ochratoxins, produced by *Penicillium spp.*; and deoxynivalenol (DON), toxin T-2; zearalenone (ZON), ergotoxins, and fumonisins, produced by *Fusarium spp.* (Abrunhosa et al., 2012). Fungi can develop and produce secondary metabolites at the field level as well as during stocking and storing (Rocha et al., 2012). The most important AFs are B₁, B₂, G₁ and G₂ (AFB₁, AFB₂, AFG₁ and AFG₂); they are produced by strains of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus* (Huong et al., 2016). ZON and DON occur especially in winter crops such as oats, barley, wheat, rye and maize, which are mainly contaminated by *Fusarium graminearum* (Krska et al., 2003). The International Agency for Research on Cancer (IARC) classifies mycotoxins according to their carcinogenic potential for humans: AFB₁ is classified as a carcinogen in humans - group 1 (IARC, 2002).

Conventional methods for the determination of mycotoxins depend on High Performance Liquid Chromatography (HPLC) coupled with an ultraviolet or fluorescence detector, and currently the detection by mass spectrometry (MS) (Wei et al., 2013). The MS detector offers high sensitivity, selectivity and accuracy in the identification of the analyte as well as a precise quantification (Boutsiadou-Theurillat et al., 2014). Analysis of mycotoxins via high performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry (LC-MS/MS) employs extraction and purification processes, finalizing with detection and quantification. Thus, besides being destructive, such method is expensive and time-consuming. This prompts the search for faster, simpler and more accurate techniques for safe decision-making, and that can be applied closer to the site of grains production or use, eliminating, therefore, the transport of samples for analysis in external laboratories.

Near infrared spectroscopy (NIRs) is a fast and non-destructive analytical system which can be applied to characterize food samples with precision. It is commonly used in the food quality control industry, grain reception stations, feed mills and ports to monitor physical attributes as proteins, carbohydrates and lipids (Balastreri et al., 2016). Near infrared-based methods require little sample preparation and manpower (McMullin et al., 2015). The NIRs is a highly accurate equipment that performs analyses of organic components through the principle of emission of electromagnetic radiation (EMBRAPA, 2010). The spectrophotometer is based on the application of mathematics to analytical chemistry (chemometrics), integrating spectroscopy and data computing. NIRs has been reported as a tool with the potential to detect mycotoxigenic fungi in agricultural products (Gaspardo et al., 2012; Jongguk et al., 2017). Fungi infect the lipid-rich germ by hydrolyzing them, influencing changes in the NIRs spectrum. As it is quick and simple, this technology can be used as a replacement of traditional methods of characterization (Rambo et al., 2016).

When investigating the feasibility of using NIRs for screening maize for DON levels, Garcia and Kleiber (2015) found that the qualitative approach was a robust tool for segregation and cereal use. Typically, evaluation of the viability of using an NIRs equipment is directed towards the levels of contamination, that is, quantification, or in a qualitative/semi-quantitative way, taking into account the maximum tolerated levels (MTL) proposed in the legislation. Thus, the current study was aimed at assessing the NIRs performance in the prediction of mycotoxins in silo-stored lots of maize using the Z-Score for the quantitative evaluation of the results.

2. Material and methods

Obtaining the spectra of the maize samples

The maize samples were part of a previous study, Mallmann et al., (2018), which was developed at the Laboratory of Mycotoxicological Analyses (LAMIC) at the Federal University of Santa Maria (UFSM, Santa Maria, Brazil). Thus, the analytical results of LC-MS/MS for AFB₁, ZON and DON were already known and the spectrum of each sample had already been generated in the NIRs for nutritional prediction of the samples.

In brief, Mallmann et al., (2018) collected samples from four maize silos following two sampling processes: A and B. Samples were taken at five points in each silo, that is, center of the silo surface and center of each quadrant of the silo surface (north, south, east and west). In process A, three composite samples were collected at each point of introduction of the probe

(upper third, middle third and lower third of the depth of the silos). In process B, only one sample was collected at each point of introduction of the probe; the sample was composed of the grains collected from all depth of the silos. Following the sampling processes A and B, 15 and 5 samples were collected in each silo, respectively. Both processes were performed in triplicate, totaling 60 maize samples per silo; thus, the sample size of this research was 240. Each sample was ground in a ZM200 ultra-centrifugal mill (Retsch GmbH, Haan, Germany) equipped with a 1 mm diameter sieve; next, it was scanned in the NIRs and then analyzed by LC-MS/MS for detection of mycotoxins.

Two hundred and forty spectra were obtained using a NIRs equipment, model XDS (Foss, Hilleroed, Copenhagen, Denmark), with a spectral range between 400 and 2500 nm, and 0.5 nm resolution. The ground sample was homogenized and an aliquot was used to fill the *ring* quartz cell in its totality, without lumps or flaws that could impair the reading. The spectrum reading time was approximately 60 seconds for each sample. The spectrophotometer was connected to a computer that stored the data of the spectra collected via the *Software ISIScan™* (Foss, Hilleroed, Copenhagen, Denmark).

Prediction of aflatoxin B₁, zearalenone and deoxynivalenol

Each spectrum was sent to Olimpo platform (Pegasus Science, Santa Maria, Brazil) for the prediction of AFB₁, ZON and DON; the system read it and reported its mycotoxicological concentration. Each spectrum was identified with a code according to the silo, point of collection, height and sample repetition. The limit of quantification (LQ) of the NIRs was 5, 30 and 350 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ for AFB₁, ZON and DON, respectively. Samples with a result <LQ of the NIRs were considered equal to zero (0 $\mu\text{g.kg}^{-1}$) for the purposes of calculation and statistical evaluation.

Extraction and quantification of aflatoxin B₁, zearalenone and deoxynivalenol by LC-MS/MS

AFB₁ analysis was performed through a method proposed by Sulyok et al. (2007) and adapted at LAMIC. For DON and ZON analyses, an adaptation of the method described by Berthiller et al. (2005) was employed. Both methods are described in Mallmann et al., (2018).

Semi-quantitative assessment

Acceptable contamination ranges were determined for each mycotoxin, and the result via NIRs was considered correct when it was within those ranges compared to the LC-MS/MS result. The accepted variability, upwards or downwards (\pm), was $\pm 10 \mu\text{g.kg}^{-1}$ for AFB₁ and $\pm 100 \mu\text{g.kg}^{-1}$ for ZON. An evaluation was also carried out for lower levels of acceptable variation for each mycotoxin: ± 7.5 and $\pm 5 \mu\text{g.kg}^{-1}$ for AFB₁, and ± 75 and $\pm 50 \mu\text{g.kg}^{-1}$ for ZON. Furthermore, NIRs performance was evaluated in relation to the MTL set in the Brazilian legislation (ANVISA, 2011; 2013). No contamination range was determined for DON because all samples showed results $< \text{LQ}$ in both the NIRs and the LC-MS/MS methodologies. In addition, a comparison was made between the result of the prediction via NIRs and the result of the reference method for each sample ($n = 240$). Lastly, the sampling processes for each sample collection point in the silo (north, south, east, west and center) were compared: the mean of the prediction of three samples via NIRs (sampling plan A) was compared with the result of one analysis via LC-MS/MS (sampling plan B), totaling five samples per silo (total $n = 20$).

Quantitative assessment

The quantitative assessment was calculated based on the Z-Score of the results generated by the NIRs, taking the results obtained via LC-MS/MS as standard. When applying the formula, the result of the subtraction between the value obtained in the NIRs and the result given by LC-MS/MS is divided by the standard deviation of the triplicates analyzed via LC-MS/MS. Z-Score is the number of standard deviations above or below the population average. To calculate it, it is necessary to obtain the population mean and standard deviation. Therefore, the equation applied was: $Z = \text{VO} - \text{TV} / \text{TD}$, where:

$Z =$ Z-Score; $\text{VO} =$ Value obtained in the NIRs; $\text{TV} =$ Target Value (Average value obtained via LC-MS/MS); and $\text{TD} =$ Target Deviation (Standard Deviation obtained from the repetitions of the TV).

Thus, for the development of the equation, the standard deviation and the average of the results of the LC-MS/MS triplicates were calculated; the mean was used as TV and the standard deviation as TD for the calculation of Z. The calculation was performed from the triplicates for 20 samples per silo, 15 of which were from the process A and 5 from process B (total $n = 80$). The results of three samples obtained via NIRs (sampling process A) were also calculated and compared with the results of a sample analyzed via LC-MS/MS (sampling process B), totaling five samples per silo (total $n = 20$). Data were considered satisfactory when $-2 \leq Z \leq 2$, questionable if $2 < Z \leq 3$ or $-3 \leq Z < -2$, and unsatisfactory if $-3 > Z > 3$ (FAPAS, 2017).

Statistical analyses

Statistical analyses were performed using the Statgraphics Centurion XV software (Manugistics Inc., Rockville, USA). Descriptive statistical analysis of the data was applied (mean, standard deviation and coefficient of variation).

3. Results

Mycotoxins contamination in the positive samples showed the following variation of results for the analyses via LC-MS/MS: 5 - 26 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ for AFB₁ and 30 - 418 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ for ZON. For predictions via NIRs, the variability in the contamination of the positive samples was: 5 - 17 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ for AFB₁ and 30 - 107 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ for ZON. All samples analyzed for DON showed a value <LQ of NIRs.

Semi-quantitative assessment

Considering the pre-established contamination limits, the semi-quantitative evaluation of the analysis of one sample via LC-MS/MS versus the prediction of one sample via NIRs showed 91, 95 and 100% accuracy for AFB₁, ZON and DON, respectively. When comparing the mean of the prediction of three samples via NIRs with the analysis of one sample via LC-MS/MS, there was 100% accuracy for AFB₁ (Figure 1) and ZON (Figure 2), within the proposed levels of variability ($\pm 10 \mu\text{g.kg}^{-1}$ and $\pm 100 \mu\text{g.kg}^{-1}$).

Quantitative assessment

The percentage results of samples within the levels (satisfactory, questionable and unsatisfactory) are shown in Table 1.

Contamination of silos

The average concentration of mycotoxins in the lots of maize for each silo evaluated through LC-MS/MS and for prediction via NIRs are shown in Table 2.

4. Discussion

International bodies, such as Fapas[®] (Food Chemistry Proficiency Test Report), employ the Z-Score to assess the analytical quality of laboratories. In the current investigation, this method was used because its formula considers the standard deviation of the analysis taken as reference (LC-MS/MS). Mycotoxins contamination occurs heterogeneously, and the efficiency in the detection of these metabolites depends primarily on the sampling plan (Mallmann et. al., 2013). The efficiency of the sampling processes used to obtain the samples that generated the spectra for this survey was confirmed by Mallmann et. al., (2018). However, uncertainties with respect to sampling, sample preparation and the analytical process must be taken into account when two mycotoxins quantification methods are compared. The present study considered that uncertainties of sampling and sample preparation were the same for both NIRs and LC-MS/MS. Thus, this is the first assessment of the performance of the NIRs technique using the Z-Score for the prediction of mycotoxins in maize.

A qualitative evaluation was conducted to examine the performance of a NIRs equipment for the prediction of AFB₁ in maize, with a classification above or below 20 µg.kg⁻¹, and obtained 100% accuracy (Fernández-Ibañez et al., 2009). The present findings corroborate that outcome, since 98% accuracy (n= 240) was found in the qualitative assessment at the level of legislation (ANVISA, 2011). When comparing three results via NIRs with one result via LC-MS/MS, the accuracy was 100%. Min Lee et al. (2015) stated that the NIRs technology has a robust predictive capacity for both qualitative and quantitative assessment of AFs in maize.

Bolduan et al. (2009) found high coefficients of determination and cross-validation ($R^2=0.90-0.88$) for the prediction of DON in maize. The data presented here were similar in the quantitative evaluation, with a precision of 100%. It is important to note that all samples analyzed for DON showed contamination <LQ of NIRs. Therefore, further studies evaluating samples of maize with DON contamination >LQ are necessary.

In practice, the availability of a NIRs equipment in the grain storage unit, feed mill or port enables reanalysis. More predictions can be carried out in the same grain batch, since the sample is analyzed on the spot. This allows for an immediate result to be released, thus improving the speed of decision-making. In addition, costs with logistics and sample analysis are lower when using prediction by NIRs compared to analysis via LC-MS/MS.

5. Conclusions

The NIRs methodology is a practical, accurate, fast and non-destructive mycotoxicological monitoring tool for maize grains stored in silos. The technique can be used for both semi-quantitative and quantitative assessments for AFB₁, ZON and DON, within the precision levels established in this study. It is a green alternative to manage the problem of mycotoxins, since it does not use solvents, acids or solutions to extract mycotoxins from the samples. The Z-Score is an efficient method to compare distinct processes of mycotoxins analyses. The results demonstrated robust and accurate prediction curves for AFB₁, ZON and DON. Accuracy of the results via NIRs is improved by increasing the number of predictions via NIRs to compare with the LC-MS/MS result. Further studies must be conducted with different concentrations of contamination for these three mycotoxins.

Interest conflicts

The authors have no conflict of interest in relation to the content of this article.

Acknowledgment

We would like to thank Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for providing graduate fellowship to J.K. Vidal.

References

- Abrunhosa, L., Morales, H., Soares, C., Calado, T., Vila-Chã, A.S., Pereira, M. and Vemâncio, A., 2012. Micotoxinas detectadas en productos alimentícios en Portugal: Revisión. *Revista Bio Ciencias* 2: 5-31. Available in:
<http://repositorium.sdum.uminho.pt/bitstream/1822/21323/1/Abru-20.pdf>
- Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), 2011. Provides for the maximum tolerated limits (MTL) for mycotoxins in food (Resolution RDC n° 7, of February 18, 2011). Official Gazette of the Federative Republic of Brazil. Available in:
http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2011/res0007_18_02_2011_rep.html.
- Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), 2013. Provides for the extension of the deadlines established for the maximum tolerated limits for mycotoxins in food (Resolution RDC n° 59, of December 26, 2013). Official Gazette of the Federative Republic of Brazil. Available in:

- http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2013/rdc0059_26_12_2013.pdf.
- Balastrieri, C., Baretta, D. and Paulino, A.T., 2016. Near-Infrared Spectroscopy and Multivariate Analysis for the Determination of Nutritional Value of Soybean Meal and Maize Bran. *Analytical Letters* 49: 1548-1563.
<https://doi-org.ez47.periodicos.capes.gov.br/10.1080/00032719.2015.1118483>
- Berthiller, F., Schuhmacher, R., Buttinger, G. and Krska, R., 2005. Rapid simultaneous determination of major type A- and B-trichothecenes as well as zearalenone in maize by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1062: 209-216. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2004.11.011>
- Bolduan, C., Montes, J.M., Dhillon, B.S., Mirdita, V. and Melchinger, A.E., 2009. Determination of mycotoxin concentration by ELISA and near-infrared spectroscopy in *Fusarium* inoculated maize. *Cereal Research Communications* 37: 521-529. <https://doi.org/10.1556/crc.37.2009.4.5>
- Boutsiadou-theurillat, X., Meier, P. and Richard, C., 2014. Development and inhouse validation of a rapid LC-MS/MS method for the semi quantification of eleven mycotoxins in maize samples. *Food analyses* 68: 716-720. <https://doi.org/10.2533/chimia.2014.716>
- Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), 2010. Methodologies for assessing food for domestic ruminants. Porto Velho, RO, Brazil, 26 pp. Available in: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/884369/1/doc136alimentacaoderuminantes.pdf>
- Fernández-Ibañez, V., Soldado, A., Martínez-Fernández, A. and Roza-Delgado, B., 2009. Application of near infrared spectroscopy for rapid detection of aflatoxin B1 in maize and barley as analytical quality assessment. *Food Chemistry* 113: 629-634. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.07.049>
- Food Chemistry Proficiency Test Report (FAPAS), 2017. Protocol for Proficiency Testing Schemes. Version 6: 1-19. Available in: https://fapas.com/sites/default/files/2017-05/FeraPTSprotocol_pt1_common.pdf
- Garcia, C.L. and Kleiber, D., 2015. A method for the allotment of maize contaminated by toxins. *Journal Of Near Infrared Spectroscopy* 23: 255-265. <https://doi.org/10.1255/jnirs.1168>
- Gaspardo, B., Del Zotto, S., Torelli, E., Cividino, S.R., Firrao, G., Della Riccia, G. and Stefanon, B., 2012. A rapid method for detection of fumonisins B1 and B2 in maize meal using Fourier transform near infrared (FT-NIR) spectroscopy implemented with integrating sphere. *Food Chemistry* 135: 1608-1612. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.06.078>

- Hermanns, G., Pinto, F.T., Kitazawa, S.E. and Noll, I.B., 2006. Fungos e fumonisinas no período pré-colheita do milho. *Ciência Tecnologia de Alimentos* 26: 7-10. <http://dx.doi.org/10.1590/S0101-20612006000100002>
- Huong, T., Tuyen, L.D., Do, T.T., Madsen, H., Brimer, L. and Dalsgaard, A., 2016. Aflatoxins and fumonisins in rice and maize staple cereals in Northern Vietnam and dietary exposure in different ethnic groups. *Food Control* 70: 191-200. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.05.052>
- International Agency for research on Cancer (IARC), 2002. Fumonisin B1. Monographs on the evaluation of carcinogenic risk to humans 82: 275-366. Available in: <https://monographs.iarc.fr/wp-content/uploads/2018/06/mono82.pdf>
- Jongguk, L., Giyoung, K., Changyeun, M., Kyoungmin, O., Hyeonchae, Y., Hyeonheui, H. and Moon, S.K., 2017. Classification of Fusarium-infected Korean Hulled barley using near-infrared reflectance spectroscopy and partial least squares discriminant analysis. *Sensors* 17, 2258. <https://doi.org/10.3390/s17102258>
- Krska, R., Pettersson, H., Josephs, R.D., Lemmens, M., Mac Donald, S. and Welzig, E., 2003. Zearalenone in maize: stability testing and matrix characterisation of a certified reference material. *Food Addit Contam.* 20: 1141-1152. <https://doi.org/10.1080/02652030310001615203>
- Mallmann, A.O., Marchioro, A., Oliveira, M.S., Minetto, L., Wovst, L.R.S., Rauber, R.H., Dilkin, P. and Mallmann, C.A., 2013. Dois planos de amostragem para análise de fumonisinas em milho. *Ciência Rural* 43: 551-558. <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782013000300029>
- Mallmann, A. O., Oliveira, M.S., Dilkin, P., Vidal, J.K., Meinerz, G.R., Almeida, C.A.A. and Mallmann C.A., 2018. Assessment of mycotoxin contamination in maize and wheat stored in silos using two sampling processes. *World Mycotoxin Journal* 11: 531-538. <https://doi.org/10.3920/WMJ2018.2314>
- McMullin, D., Mizaikoff, B. and Krska, R., 2015. Advancements in IR spectroscopic approaches for the determination of fungal derived contaminations in food crops. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 407: 653-660. <https://doi.org/10.1007/s00216-014-8145-5>
- Min Lee, K., Davis, J., Herrman, T.J., Murray, S.C. and Deng, Y., 2015. An empirical evaluation of three vibrational spectroscopic methods for detection of aflatoxins in maize. *Food Chemistry* 173: 629-639. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.10.099>
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y Agricultura (FAO), 2019. Available in: <http://www.fao.org/food/food-safety-quality/a-z-index/mycotoxins/es/>

- Rambo, M.K.D., Ferreira, M.M.C. and Amorim, E.P., 2016. Multi-product calibration models using NIR spectroscopy. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 151: 108-114. <https://doi.org/10.1016/j.chemolab.2015.12.013>
- Rocha, G.C., Donzele, J.L., Oliveira, R.F.M., Silva, F.C.O., Kiefer, C., Brustolini P.C., Pereira, C.M.C. and Alebrante, L., 2012. Avaliação dos níveis de zeólita em dietas para suínos em fase de crescimento e terminação. *Revista Brasileira de Zootecia* 41: 111-117. Available in: <http://www.scielo.br/pdf/rbz/v41n1/17.pdf>
- Rocha, M.E.B., Freire, F.C.O., Maia, F.E.F., Guedes, M.I.F. and Rondina, D., 2014. Mycotoxins and their effects on human and animal health. *Food Control*, 36: 159-165. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.08.021>
- Sulyok, M., Berthiller, F., Krska, R. and Schuhmacher, R., 2007. A liquid chromatography/tandem mass spectrometric multi-mycotoxin method for the quantification of 87 analytes and its application to semi-quantitative screening of moldy food samples. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 389: 1505-1523. <https://doi.org/10.1007/s00216-007-1542-2>
- Wei, R., Qiu, F., Kong, W., Wei, J., Yang, M., Luo, Z., Qin, J., and Ma, X., 2013. Co-occurrence of aflatoxin B1, B2, G1, G2 and ochrotoxin A in *Glycyrrhiza uralensis* analyzed by HPLC-MS/MS. *Food Control* 32: 216-221. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.11.028>

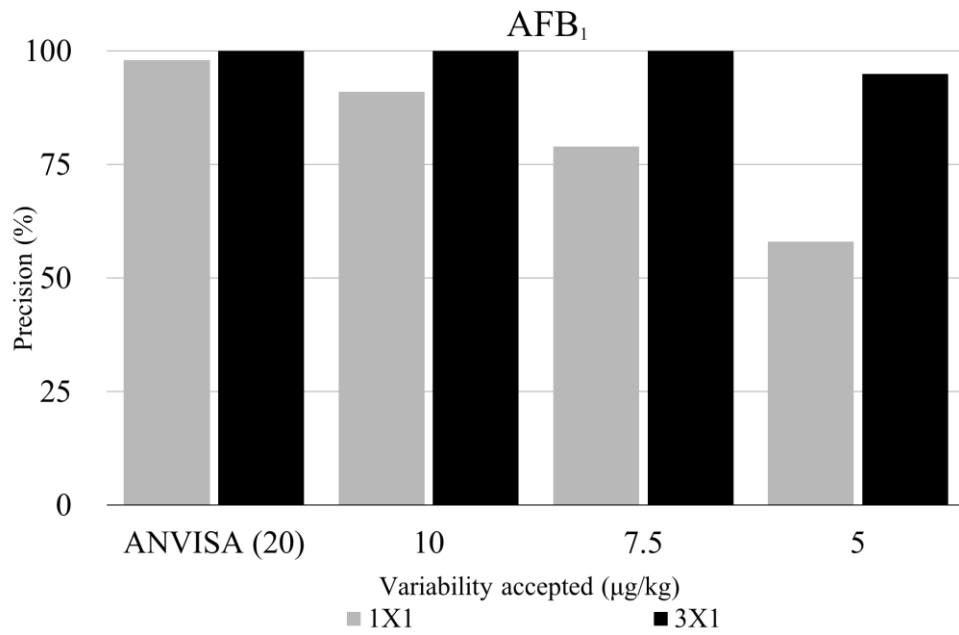


Figure 1 - Percentage accuracy of the prediction results via NIRs for the different levels of variation accepted (ANVISA $20 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$; 10, 7.5 and $5 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$) when comparing one result via NIRs with one analysis via LC-MS/MS (1X1) and three results via NIRs with one analysis via LC-MS/MS (3X1) for aflatoxin B₁ in the semi-quantitative assessment.

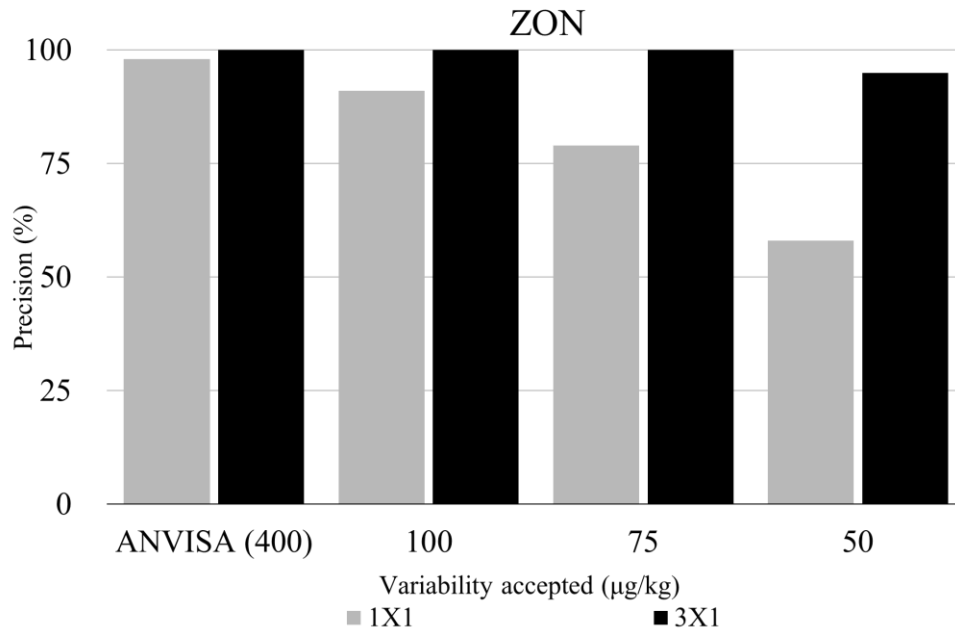


Figure 2 - Percentage accuracy of the prediction results via NIRs for the different levels of variation accepted (ANVISA $400 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$; 100, 75 and $50 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$) when comparing one result via NIRs with one analysis via LC-MS/MS (1X1) and three results via NIRs with one analysis via LC-MS/MS (3X1) for zearalenone in the semi-quantitative assessment.

Table 1 – Percentage accuracy of the NIRs method through the Z-Score calculation for the evaluation of one result via NIRs versus one result via LC-MS/MS (1X1), compared with the evaluation of three results via NIRs versus one result via LC-MS/MS (3X1).

	AFB ₁ ¹		ZON ²	
	1X1 ³	3X1 ⁴	1X1	3X1
Satisfactory ⁵ (%)	81	85	90	90
Questionable ⁶ (%)	01	10	01	00
Unsatisfactory ⁷ (%)	18	05	09	10
N sample ⁸	80	20	80	20

¹AFB₁: aflatoxin B₁. ²ZON: zearalenone. ³1X1: mean of the triplicate of the analysis in a maize sample via LC-MS/MS versus the mean of the triplicate of the mycotoxicological prediction of the spectrum of the same maize sample via NIRs. ⁴3X1: mean of the result of the mycotoxicological prediction of spectra of three maize samples via NIRs from sampling process A versus the result of mycotoxins in a maize sample via LC-MS/MS from sampling process B. ⁵Satisfactory: Percentage of samples with Z-Scores $-2 \leq Z \leq 2$. ⁶Questionable: percentage of samples with Z-Scores $2 < Z \leq 3$ or $-3 \leq Z < -2$. ⁷Unsatisfactory: percentage of samples with Z-Scores $-3 > Z > 3$. ⁸N sample: number of samples subjected to Z-Score calculation in each evaluation for each mycotoxin.

Table 2 – Average contamination result ($\mu\text{g.kg}^{-1}$) in each silo for analyses through LC-MS/MS versus prediction via NIRs.

	Silo 1		Silo 2		Silo 3		Silo 4	
	LC-MS/MS ¹	NIRs ²	LC-MS/MS	NIRs	LC-MS/MS	NIRs	LC-MS/MS	NIRs
AFB ₁ ³	0.6	2.2	0.5	2.7	5.3	6.1	2.1	4.0
ZON ⁴	13	26	18	18	38	57	46	39
DON ⁵	0	0	0	0	0	0	0	0

¹LC-MS/MS: high performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry. ²NIRs: near infrared spectroscopy. ³AFB₁: aflatoxin B₁ ($\mu\text{g.kg}^{-1}$). ⁴ZON: zearalenone ($\mu\text{g.kg}^{-1}$). ⁵DON: deoxynivalenol ($\mu\text{g.kg}^{-1}$).

4. CONCLUSÃO

A metodologia NIRs é uma ferramenta de gerenciamento micotoxicológico prática, precisa, rápida e não destrutiva para AFB₁, ZEA e DON em lotes de milho armazenados em silos. É uma alternativa ambientalmente correta para monitoramento das micotoxinas, uma vez que não utiliza solventes, ácidos ou soluções para extrair as micotoxinas das amostras. A tecnologia NIRs pode ser utilizada para diferentes finalidades, inclusive no gerenciamento nutricional de lotes de milho. A técnica pode ser usada para avaliação semi-quantitativa e quantitativa. O Z-Score é um método eficiente para comparar processos distintos de análises de micotoxinas. A precisão dos resultados via NIRs elevou quando do aumento do número de amostras preditas para o mesmo lote. A aplicabilidade da técnica pode ser estendida para lotes estocados em navios, armazéns ou carretas. Estudos adicionais devem ser conduzidos com diferentes concentrações de contaminação para AFB₁, ZEA e DON.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRUNHOSA, L. et al. Micotoxinas detectadas en productos alimentícios en Portugal: Revisión. **Revista Bio Ciencias**, v. 2, nº 1, p. 5-31, 2012.

ALI, N. et al. Deoxynivalenol Exposure Assessment for Pregnant Women in Bangladesh. **Toxins**, v. 7, nº 10, p. 3845-3857, 2015.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução - RDC nº 7, de 18 de fevereiro de 2011 que dispõe sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 9 de mar. 2011. Seção 1, p. 66-67, 2011.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução - RDC nº 59, de 26 de dezembro de 2013 que dispõe sobre a prorrogação dos prazos estabelecidos nos artigos 11 e 12 e respectivos anexos III e IV da Resolução da Diretoria Colegiada RDC nº 7, de 18 de fevereiro de 2011. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 30 de dez. 2013. Seção 1, p. 756, 2013.

BOUTSIADOU-THEURILLAT, X.; MEIER, P.; RICHARD, C. Development and in-house Validation of a Rapid LC-MS/MS Method for the semi quantification of eleven mycotoxins in maize samples. **Food analyses**, v. 68, nº 10, p.716-720, 2014.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Portaria MA/SNAD/SFA nº 07, de 09/11/1988. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 09 de novembro de 1988. Disponível em: <[http://sogi8.sogi.com.br/Arquivo/Modulo113.MRID109/Registro64815/documento%201%200%20\(274kb\)%20-%2027223%2007.pdf](http://sogi8.sogi.com.br/Arquivo/Modulo113.MRID109/Registro64815/documento%201%200%20(274kb)%20-%2027223%2007.pdf)> Acesso em: 20 dez. 2019.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da Safra Brasileira de Grãos**, v. 7, safra 2019/2020, nº 2 - novembro de 2019. Disponível em <<https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/graos>>. Acesso em: 27 nov. 2019.

DILKIN, P. Micotoxicose suína: aspectos preventivos, clínicos e patológicos. **Biológico**, v. 64, nº 2, p. 187-191, 2002.

DUARTE-VOGEL, S.; VILLAMIL-JIMÉNEZ, L. Micotoxinas en la salud pública. **Rev. salud pública**. Colombia, v. 8, nº 1, p. 129-135, 2005.

ELIANA, N. C. et al. Effects of Aflatoxin B1 and Fumonisin B1 on Blood Biochemical Parameters in Broilers. **Journal Toxins**. v. 2, p. 453-460, 2010.

ELLIS, W.O. et al. Aflatoxin in food: occurrence, biosynthesis, effects on organisms, detection and methods of control. **Rev. Food Sci. Nutr.** v. 30, p. 403-439, 1991.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Metodologias para avaliação de alimentos para ruminantes domésticos**. RO, Brasil, pp. 26. 2010. Disponível em: <<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/884369/1/doc136alimentacaoderuminantes.pdf>> Acesso em: 12 dez. 2019.

ESPADA, Y. et al. Fumonisin mycotoxicosis in broilers: plasma proteins and coagulation modifications. **Avian Dis.** v. 1, p. 73-79, 1997.

FAO. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y Agricultura. Disponível em <http://www.fao.org/food/food-safety-quality/a-z-index/mycotoxins/es/>. Acesso em: 25 nov. 2019.

GARCIA, C. L.; KLEIBER, D. A method for the allotment of maize contaminated by toxins. **Journal Of Near Infrared Spectroscopy.** v. 23, p. 255-265, 2015.

HERMANN, G. et al. Fungos e fumonisinas no período pré-colheita do milho. **Ciênc. Tecnol. Aliment,** v. 26, nº 1, p. 7-10, 2006.

HUONG, T. et al. Aflatoxins and fumonisins in rice and maize staple cereals in Northern Vietnam and dietary exposure in different ethnic groups. **Food control,** v.70, p. 191-200, 2016.

IANAMAKA, D.; OLIVEIRA, I.; TANIWAKI, M. Micotoxinas em alimentos. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agrônômica,** nº 7, p. 138-161, 2010.

IARC. International Agency for Research on Cancer. Fumonisin B1. **Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans,** nº 82, p. 275-366, 2002.

KUMAR, V.; BASU, M. S.; RAJENDRAN, T. P. Mycotoxin research and mycoflora in some commercially important agricultural commodities. **Crop Protection,** v. 27, p. 891-905, 2007.

MALLMANN, C. A. et al. Prevalência das micotoxinas no Brasil e impactos sobre a produção animal. Em: **XVIII Congresso da Abraves 2017.** GO. Anais... p. 215-229. 2017.

MALLMANN, C.A.; DILKIN, P. **Micotoxinas e Micotoxicoses em Suínos.** Santa Maria: Pallotti, pp. 238, 2007.

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

McMULLIN, D.; MIZAIKOFF, B.; KRASKA, R. Advancements in IR spectroscopic approaches for the determination of fungal derived contaminations in food crops. **Anal Bioanal Chem.** nº 407, p. 653-660, 2015.

PINTON, P.; OSWALD, I.P. Effect of deoxynivalenol and other type B trichothecenes on the intestine: a review. **Toxins Basel.** v. 6, p. 1615-1643, 2014.

RAMBO, M. K. D.; FERREIRA, M. M. C.; AMORIM, E. P. Multi-product calibration models using NIRs spectroscopy. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems,** v. 151, p. 108-114, 2016.

ROCHA, G. C. et al. Avaliação dos níveis de zeólita em dietas para suínos em fase de crescimento e terminação. **Revista Brasileira de Zootecia.** v. 41, nº 1, p. 111-117, 2012.

STRINGHINI, J.H. et al. Efeito da qualidade do milho no desempenho de frangos de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 29, nº 1, p. 191-198, 2000.

STUART, B. H. **Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications**. 1. Chichester, UK: 2004. 244.

VIDAL, J. K., et al. Certificação de grãos de milho armazenados em silos para níveis nutricionais. Em: **XV Seminário técnico científico de aves e suínos - AVESUI 2016**, Florianópolis/SC. Anais.... Instituto Oswaldo Gessulli, 2016.

WHITAKER et al. Sampling Almonds for Aflatoxin, Part I: Estimation of Uncertainty Associated with Sampling, Sample Preparation, and Analysis. **Journal of AOAC International**, vol. 89, n. 4, 2006.