

## MÉTODO QuEChERS PARA DETERMINAÇÃO DE OCHRATOXINA A E CITRININA EM ARROZ E FARELO DE ARROZ

Helen C. dos S. Hackbart\*, Michele Moraes de Souza, Priscila Tessmer Scaglioni, Ednei G. Primel, Jaqueline Garda-Bufferon e Eliana Badiale-Furlong

Escola de Química e Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande, Alfredo Huck 475, 96200-270 Rio Grande - RS, Brasil

Recebido em 23/11/11; aceito em 18/5/12; publicado na web em 24/8/12

THE QuEChERS METHOD FOR DETERMINATION OF OCHRATOXIN A AND CITRININ IN RICE AND RICE BRAN. The present study was carried out to establish the optimal conditions for performing ochratoxin A (OTA) and citrinin (CIT) extraction using the QuEChERS method in rice. Employing the factorial experimental design, variables that significantly influenced the extraction stages were determined. The following variables were analyzed: addition of water, acidification of acetonitrile with glacial acetic acid, as well as amounts of magnesium sulfate, sodium acetate, sodium citrate and diatomaceous earth. The best combining procedure resulted in a predictive model using more water and less diatomaceous earth. Recoveries of CIT and OTA were 78-105%.

Keywords: ochratoxin A; citrinin; QuEChERS method.

### INTRODUÇÃO

As micotoxinas compreendem uma mistura de compostos resultantes da atividade metabólica de fungos toxigênicos cujos efeitos, além de outros sintomas clássicos de intoxicação, variam entre carcinogenicidade e mutagenicidade.<sup>1</sup> Estes compostos são resistentes e dificilmente são degradados durante o processamento ou preparo de alimentos e rações.<sup>2-4</sup>

A ocratoxina A e a citrinina são micotoxinas produzidas por fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*,<sup>5,6</sup> que podem infestar grãos especialmente durante o armazenamento em ambientes com atividade de água superiores a 70% e temperaturas inferiores a 25 °C.<sup>7</sup> Estas variáveis abióticas são frequentes nas regiões produtoras de cereais, como é o caso do Rio Grande do Sul.

A ocratoxina A (OTA), fórmula molecular  $C_{20}H_{18}ClNO_6$  e massa molecular de 403,82 g/mol, é constituída por uma isocumarina, a ocratoxina (OTa), ligada em um grupo amida, L-b fenilalanina.<sup>8,9</sup> Este composto vem sendo detectado em matérias-primas que foram submetidas a condições que propiciam o desenvolvimento do fungo produtor, ou seja, sob umidade elevada e temperatura de 25 a 30 °C.<sup>10-12</sup> Quando o fungo contaminante encontra condições de produzir a toxina, esta permanece estável durante o armazenamento, beneficiamento e preparo para consumo.<sup>13</sup>

A citrinina (CIT) possui fórmula molecular  $C_{13}H_{14}O_5$ , massa molecular de 250,25 g/mol e ponto de fusão de 172 °C.<sup>14</sup> Este composto tem sido detectado como contaminante em milho, arroz, trigo e outros cereais,<sup>15,16</sup> em frutas senescentes<sup>17</sup> e em queijo; esta micotoxina também é estável durante o processamento e preparo de alimentos.<sup>18</sup>

Os métodos utilizando técnicas cromatográficas são os de preferência para a análise e detecção simultânea de multirresíduos, considerando-se a possibilidade de ocorrência simultânea destas micotoxinas. No entanto, para extração simultânea de ambas as matrizes em que ocorrem, vários fatores precisam ser considerados, tais como, granulometria, solvente de extração e eliminação de interferentes.<sup>19,20</sup> Em consequência disto, as etapas para a determinação propriamente dita são exaustivas, gerando perdas de analito e resíduos para descarte. Encontrar condições adequadas para extração simultânea satisfatória pode requerer muitos experimentos devido

à sutileza do efeito das variáveis abióticas da matriz e do próprio método. Assim, o planejamento experimental e a determinação em CLAE-IEN-EM/EM é uma associação interessante para detectar e ajustar as condições para extração e clarificação.<sup>21-23</sup>

Um método de extração definido como rápido, fácil, barato, eficaz, robusto e seguro, cuja sigla é QuEChERS (*Quick, Easy, Cheap, Rugged and Safe*), vem sendo adotado para extração de pesticidas de frutas e verduras com o objetivo de superar limitações práticas de outros métodos multirresíduo.<sup>24,25</sup> Como outros procedimentos de extração ele emprega solventes e agentes clarificantes, como sais e adsorventes, que interagem com a matriz carreando o analito para um solvente e eliminando os interferentes. Sua grande vantagem reside na rapidez e nas quantidades de reagentes necessários.<sup>24</sup> No entanto, a combinação de agentes extratores, formas de contato entre amostra-extrator e a combinação de agentes de limpeza são pontos críticos para a recuperação de analitos distintos simultaneamente. Alguns autores têm mencionado a possibilidade de aplicá-lo com sucesso na determinação de multimicotoxinas, além do emprego original para pesticidas.<sup>25</sup>

Este trabalho teve como principal objetivo disponibilizar um método acessível para extração simultânea da ocratoxina A e citrinina em arroz e farelo de arroz, empregando a técnica de planejamento experimental para estabelecer condições de extração do método QuEChERS, visando posterior quantificação dessas toxinas em arroz e farelo de arroz.

### PARTE EXPERIMENTAL

#### Padrões analíticos, reagentes e solventes

Os padrões analíticos da ocratoxina A e a citrinina foram adquiridas da Sigma Aldrich (São Paulo, Brasil), com pureza  $\geq 98\%$ . O metanol (pureza  $\geq 99,95\%$ ) e acetonitrila (pureza  $\geq 99,98\%$ ) de grau cromatográfico foram adquiridos da Mallinckrodt (Phillipsburg, NJ, USA). O ácido fosfórico (pureza  $\geq 85\%$ ) grau analítico, ácido acético glacial (pureza  $\geq 98\%$ ), hexano (pureza  $\geq 96\%$ ) e benzeno (pureza  $\geq 99\%$ ) foram adquiridos da Merck (Darmstadt, Alemanha). Clorofórmio, cloreto de potássio, cloreto de sódio, sulfato de amônio e sulfato de magnésio foram obtidos da Synth (São Paulo, Brasil). Acetato de sódio e citrato de sódio foram obtidos da Vetec (Rio de

\*e-mail: helenhackbart@gmail.com

Janeiro, Brasil) e a terra diatomácea foi obtida da Nuclear (Celite 545, São Paulo, Brasil).

A água ultrapura utilizada no preparo da fase móvel foi obtida por sistema de purificação e filtração Direct-Q UV3<sup>®</sup> de resistividade 18  $\Omega$  cm<sup>-1</sup> (Millipore, Bedford, MA, USA).

### Preparo das soluções estoque e de trabalho

Os padrões das micotoxinas foram dissolvidos em benzeno:acetoneitrila (98:2 v/v), resultando em concentração de 100  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>. As soluções estoque foram diluídas de modo a resultar em soluções de trabalho cujas concentrações (10 e 50  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>) foram determinadas através de espectrofotômetro modelo Cary 100 da Varian (EUA). Os valores da absorvidade molar ( $\epsilon$ ) foram 5440 e 5490 mol cm<sup>-1</sup> e os respectivos comprimentos de onda monitorados foram de 333 e 321 nm para ocratoxina A e citrinina, respectivamente.<sup>26</sup> Todas as soluções foram secas e acondicionadas em frascos âmbar a 4-8 °C.

### Amostras

Foram utilizadas 38 amostras de arroz (*Oryza sativa*, L.) sendo 36 provenientes de grãos cultivados em campos experimentais do Instituto Riograndense do Arroz (IRGA), unidade de Cachoeirinha, Rio Grande do Sul, e outras 2 foram coletadas em silos da região sul do Rio Grande do Sul.

As amostras pertenciam à variedade BR IRGA 417. Após a colheita foram beneficiadas separando-se as frações arroz branco, arroz branco em casca, arroz parboilizado e arroz parboilizado em casca. As amostras provenientes de silos foram beneficiadas separando-se em farelo de arroz e arroz em casca.

### CLAE-IEN-EM/EM

As análises foram realizadas usando um sistema de cromatografia líquida acoplado a um espectrômetro de massas com analisador do tipo triplo quadrupolo (CLAE-EM/EM), cromatógrafo Alliance Separations modelo 2695 (Waters, Milford, MA, USA) equipado com amostrador automático, bomba quaternária, forno para coluna e sistema de degaseificação; detector MS, Micromass<sup>®</sup> Quatro Micro™ API (Waters, Inglaterra) com fonte API. Sistema gerador de nitrogênio Peak Scientifics (Instruments Ltda., Escócia) e coluna X Terra<sup>®</sup> MS C18 (50  $\times$  3 mm, 3,5  $\mu$ m, Milford, MA, USA). A fase móvel empregada para separação foi constituída por uma mistura de acetoneitrila:água ultrapura 60:40 (v/v), eluição no modo isocrático com fluxo de 0,4 mL/min e alça de injeção com *loop* de 10  $\mu$ L. Para otimização dos sinais das razões massa/carga foi injetada uma solução de cada micotoxina na concentração de 1  $\mu$ g/mL. O espectrômetro de massas foi operado em modo de ionização por eletronebulização no modo positivo (IEN +) para ocratoxina A e negativo (IEN -) para citrinina utilizando monitoramento de múltiplas reações (MRM). O gás de colisão utilizado foi o argônio com pressão de 3,5  $\times$  10<sup>3</sup> bar, a temperatura de dessolvatação ótima foi de 350 °C, temperatura da fonte de 120 °C, voltagem do cone de 30 kV, voltagem do capilar de 4,0 kV e tempo total de corrida de 7 min. A aquisição dos dados e seu processamento foram realizados através de programa computacional *MassLynx 4.0* (Waters, Inglaterra).

Os íons precursores utilizados foram  $m/z$  404 > 239 [M-C<sub>9</sub>H<sub>10</sub>NO<sub>2</sub>]<sup>+</sup> (+ 15 eV) e  $m/z$  249 > 205 [M-CHO<sub>2</sub>]<sup>+</sup> (- 12 eV) para ocratoxina A e citrinina, respectivamente.

### Parâmetros analíticos

O método utilizando cromatografia foi validado, estabelecendo-se

seletividade, linearidade, precisão, limites de detecção e quantificação, parâmetros sugeridos pelo Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial<sup>27</sup> e pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária.<sup>28</sup> A linearidade foi avaliada pelas curvas analíticas com soluções nas concentrações de 0,005; 0,010; 0,025; 0,050; 0,100; 0,250; 0,500 e 1,000  $\mu$ g/mL. Cada solução foi injetada três vezes e os dados de regressão linear foram obtidos com auxílio do software do equipamento. A seletividade foi avaliada comparando-se o sinal gerado pela injeção da matriz isenta das micotoxinas e desta adicionada de padrão.<sup>29</sup>

Os limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ) do instrumento (LOD<sub>i</sub> e LOQ<sub>i</sub>, respectivamente) para cada micotoxina foram estimados considerando-se pelo menos 3 e 10 vezes a razão entre o sinal pela linha de base (ruído), respectivamente. Os limites instrumentais foram obtidos por padronização externa com a preparação de soluções analíticas de diferentes concentrações em acetoneitrila. Os valores de LOD<sub>i</sub> e LOQ<sub>i</sub> multiplicados pelos fatores de diluição para o método de extração resultaram nos limites de detecção (LOD<sub>m</sub>) e quantificação do método (LOQ<sub>m</sub>) estimado. A precisão instrumental foi avaliada em termos de repetitividade (CV<sub>r</sub>), a partir de 9 injeções (3 níveis em triplicata) das concentrações dos padrões de 0,025; 0,1 e 0,5  $\mu$ g/mL.

### Adequação do método QuEChERS

Inicialmente foram realizados 4 ensaios, onde foram testados os efeitos das variáveis formas e tempos de agitação. Para realização dos ensaios foi utilizado o farelo de arroz fortificado com 0,5  $\mu$ g/mL de ocratoxina A. Os ensaios foram definidos de acordo com a maioria dos métodos multirresíduos de preparo de amostra que empregam agitador de tubos (vórtex), modelo Phenix<sup>®</sup> AP 56 (Brasil), mesa agitadora Orbital (*shaker*) modelo Tecnal<sup>®</sup> TE-141 (Brasil) e ultrassom modelo Unique<sup>®</sup> Ultra Cleaner 700 (Brasil), durante o método de extração, não ultrapassando um tempo de 30 min.

Escolhida a forma e o tempo de agitação, em seguida, foi realizado um planejamento fatorial, em farelo de arroz fortificado com 0,05  $\mu$ g/mL de ocratoxina A, onde as variáveis estudadas foram: adição de água, acidificação da acetoneitrila com ácido acético glacial, quantidades de: sulfato de magnésio, acetato de sódio, citrato de sódio e terra diatomácea, que foram avaliadas através de planejamento fatorial 2<sup>4</sup> completo com seis pontos centrais, resultando em 22 experimentos.

A área relativa ao sinal da concentração da ocratoxina A foi utilizada para estimar os percentuais de recuperação que constituíram as respostas das variáveis em estudo. A análise estatística dos efeitos foi realizada através do programa Statistica 7.0, utilizando um intervalo de confiança de 90%.

Por fim, na melhor condição do planejamento experimental, foram realizados 6 ensaios, utilizando farelo de arroz fortificado com 0,05  $\mu$ g/mL de ocratoxina A e citrinina, que tiveram como variáveis: acidificação com ácido acético glacial (0,1 e 0,2 mL), quantidade dos sais sulfato de magnésio (3; 1,5; 0,85; 0,5 e 0 g), acetato de sódio (1,7; 0,85 e 0 g) e citrato de sódio (1; 0,5 e 0 g).

### RESULTADOS E DISCUSSÃO

O sistema CLAE-IEN-EM/EM foi condicionado passando-se a fase móvel acetoneitrila:água ultrapura 60:40 (v/v) com eluição no modo isocrático a uma vazão de 0,4 mL/min durante alguns minutos. O método mostrou-se seletivo, pois, a eluição da matriz isenta das micotoxinas em comparação à matriz fortificada indicou que nenhum interferente eluiu no tempo de retenção destas. Na Tabela 1 estão apresentadas as curvas analíticas, linearidade e os limites de detecção e quantificação.

O modelo de regressão linear foi adequado para a determinação das micotoxinas em estudo, pois os coeficientes de correlação ( $r$ )

**Tabela 1.** Parâmetros analíticos avaliados em CLAE-EM/EM

Parâmetros analíticos	Citrinina	Ocratoxina A
Linearidade (µg/mL)	0,025 – 1	0,005 – 1
Coefficiente de correlação	0,993	0,996
Coefficiente de determinação	0,986	0,992
LOD <sub>i</sub> (µg/mL)	0,01	0,001
LOQ <sub>i</sub> (µg/mL)	0,025	0,005
LOD <sub>m</sub> (µg/kg)	2,8	0,3
LOQ <sub>m</sub> (µg/kg)	7,14	1,43

LOD<sub>i</sub> = limite de detecção do CLAE-EM/EM; LOQ<sub>i</sub> = limite de quantificação do CLAE-EM/EM; LOD<sub>m</sub> = Limite de detecção do método; LOQ<sub>m</sub> = limite de quantificação do método.

foram maiores que 0,90, conforme recomendação do INMETRO.<sup>27</sup> Os limites de quantificação permitiram determinar concentrações das micotoxinas em níveis inferiores aos estabelecidos pelos órgãos de legislação e fiscalização de diferentes países. Na legislação brasileira, esses níveis são regulados pela Resolução RDC N° 7 de 2011, sendo para ocratoxina A o limite máximo tolerável (LMT) de 10 µg/kg para cereais e produtos de cereais, incluindo cevada malteada, e 2 µg/kg para alimentos à base de cereais para alimentação infantil (lactentes e crianças de primeira infância).<sup>30</sup> Alguns autores observaram que a utilização do método QuEChERS foi ideal para obtenção de baixos limites de detecção, além da alternativa de permitir a utilização do extrato bruto para a análise em 11 principais toxinas de *Fusarium* em amostras de cereais e produtos à base de cereais.<sup>31,32</sup>

Na União Europeia, o LMT de 3 µg/kg de ocratoxina A foi estabelecido para todos os produtos feitos a partir de cereais não processados para o consumo humano.<sup>33</sup> Para a citrinina ainda não há limites máximos toleráveis estabelecidos por nenhum órgão de legislação, entre outras razões pela pequena disponibilidade de método analítico e levantamento de ocorrência. Os resultados da precisão instrumental em termos de repetitividade (CV<sub>r</sub> %) também atendem as recomendações do limite estabelecido pela ANVISA<sup>28</sup> de coeficiente de variação (CV) não superiores a 20% para as duas micotoxinas, variando entre 1,3 e 1,6% para citrinina e 0,96 e 3,2% para ocratoxina A.

Em relação à primeira etapa de adequação do método QuEChERS, os resultados apresentados na Tabela 2 mostram que a agitação contínua com a utilização da mesa agitadora orbital (*shaker*) apresentou a melhor recuperação da ocratoxina A (95%) com agitação de 10 min, a 200 rpm, à temperatura ambiente.

As variáveis estudadas no planejamento foram relativas a cada etapa da extração e representavam os pontos críticos para melhorar a extração da ocratoxina A. A adição de água foi estudada para estabelecer a hidratação do tecido celular, facilitando a migração do solvente extrator para o interior da matriz. A diferença na quantidade de sais foi estudada para que ocorresse a diminuição da solubilidade dos compostos na fase aquosa, bem como a quantidade de água na fase orgânica. A acidificação do solvente extrator (acetoneitrila) auxilia na estabilidade dos compostos antes da análise cromatográfica e a adição de terra diatomácea foi utilizada para precipitação de coextrativos na fase orgânica.

A Tabela 3 apresenta a matriz do planejamento fatorial estudado, considerando a recuperação da ocratoxina A como resposta das variáveis em estudo.

As melhores recuperações ocorreram nos experimentos 5 e 13, que se diferenciam pela quantidade de água adicionada de 10 e 20 mL, respectivamente.

As análises estatísticas dos efeitos estudados no planejamento<sup>24</sup> confirmaram o efeito das associações das variáveis estudadas, demonstrando a importância do estudo detalhado de suas combinações para a confiabilidade do método. O índice de recuperação indicou a

**Tabela 2.** Efeito das condições de agitação na recuperação da ocratoxina A

Agitação	Tempo (min)	Coefficiente de variação (%)	Recuperação (%)
Manual	0,5	8,04	43
	1	7,07	54
	1,5	1,08	37
Agitador tubos	5	1,31	36
	10	5,94	40
	15	2,77	73
	30	1,71	63
Agitador orbital	5	1,06	95
	10	3,15	88
	30	3,15	88
Ultrassom	5	3,21	84
	10	0,85	90
	30	5,09	87

variável adição de água como significativa, aumentando o efeito da recuperação em 24,6% ( $p < 0,10$ ) quando foi utilizado o maior volume de água adicionada (20 mL). Estes dados sugerem que a maior eficiência da extração decorreu da hidratação do tecido celular, que deve ter propiciado a migração do solvente extrator para o interior da matriz.

Considerando estas interações de variáveis significativas para a eficiência da extração (maior recuperação), foi possível construir modelo preditivo dentro da faixa avaliada. Estes resultados significativos e preditivos destes parâmetros no percentual de recuperação estão apresentados na Tabela 4 e originaram a Equação 1 e Figura 1.

$$\text{Recuperação (\%)} = 72,8 + 12,3 A - 6,1 A.S - 15,3 a.t + 6,5 A.a.t \quad (1)$$

onde: A = água; S = sais; a = acidificação e t = terra diatomácea

Os resultados do teste F, no qual o F calculado foi de 9,7, foi 4 vezes maior do que o F tabelado, 2,31 (Tabela 4), permitindo que o modelo expresso na Equação 1 fosse utilizado para gerar a superfície de resposta para a recuperação da ocratoxina A. A Figura 1 mostra que a recuperação foi maior quando se aumentou a quantidade de água adicionada e diminuiu a quantidade de terra diatomácea.

Dos seis ensaios realizados na melhor condição do planejamento, ou seja, o ponto de maior recuperação da ocratoxina A, o ensaio com a maior acidificação (0,2 mL), maior quantidade de sulfato de magnésio (1,5 g) e menor quantidade de acetato de sódio (0,85 g) foi o que apresentou a melhor recuperação da ocratoxina A e citrinina, sendo igual a 105 e 78%, respectivamente.

A acidificação da acetoneitrila para extração teve como objetivo minimizar a instabilidade dos compostos estudados em meio básico, ficando demonstrado seu efeito benéfico nos resultados do terceiro ensaio. A menor instabilidade também foi observada com o tamponamento decorrente da adição de 0,2 mL de ácido acético glacial e acetato de sódio no mesmo ensaio. As adições de sulfato de magnésio e citrato de sódio promoveram uma eficiente partição líquido-líquido, facilitando a remoção de componentes polares da matriz.<sup>34</sup> No entanto, não foi observada diferença significativa quando da adição do citrato de sódio.

A centrifugação forneceu uma separação física das fases orgânica e aquosa, além de simultaneamente separar a fase sólida dispersiva. Estas etapas são empregadas por autores que determinaram pesticidas<sup>24</sup> e a centrifugação foi também determinante para a eficiência da extração neste caso. Extratos mais limpos foram verificados após a adição de terra diatomácea,<sup>35</sup> que atua limitando a interferência de açúcares e lipídios.<sup>36</sup>

O método QuEChERS adequado neste estudo para extração simultânea de ocratoxina A e citrinina consistiu nas seguintes etapas:

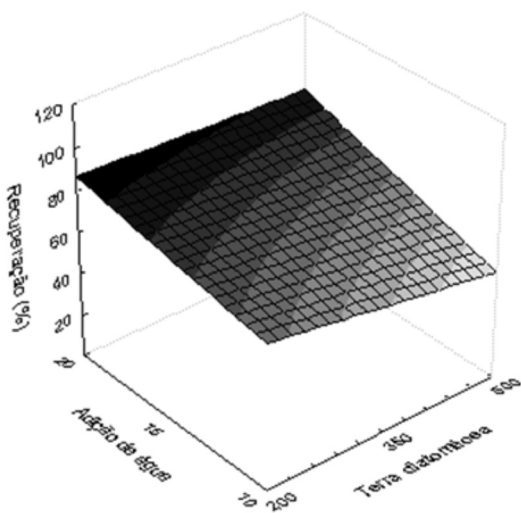
**Tabela 3.** Variáveis e recuperação da ocratoxina A para o planejamento fatorial  $2^4$  completo

Experimentos	Adição de água (mL)	Ácido acético (mL)	Sulfato, acetato e citrato (g)	Terra diatomácea (mg)	Recuperação (%)
1	-1 (10)	-1 (0)	-1 (3 + 1,7 + 1)	-1 (200)	42
2	-1 (10)	-1 (0)	-1 (3 + 1,7 + 1)	+1 (500)	70
3	-1 (10)	-1 (0)	+1 (6 + 3,4 + 2)	-1 (200)	59
4	-1 (10)	-1 (0)	+1 (6 + 3,4 + 2)	+1 (500)	82
5	-1 (10)	+1 (0,1)	-1 (3 + 1,7 + 1)	-1 (200)	105
6	-1 (10)	+1 (0,1)	-1 (3 + 1,7 + 1)	+1 (500)	16
7	-1 (10)	+1 (0,1)	+1 (6 + 3,4 + 2)	-1 (200)	73
8	-1 (10)	+1 (0,1)	+1 (6 + 3,4 + 2)	+1 (500)	38
9	+1 (20)	-1 (0)	-1 (3 + 1,7 + 1)	-1 (200)	83
10	+1 (20)	-1 (0)	-1 (3 + 1,7 + 1)	+1 (500)	92
11	+1 (20)	-1 (0)	+1 (6 + 3,4 + 2)	-1 (200)	72
12	+1 (20)	-1 (0)	+1 (6 + 3,4 + 2)	+1 (500)	91
13	+1 (20)	+1 (0,1)	-1 (3 + 1,7 + 1)	-1 (200)	105
14	+1 (20)	+1 (0,1)	-1 (3 + 1,7 + 1)	+1 (500)	100
15	+1 (20)	+1 (0,1)	+1 (6 + 3,4 + 2)	-1 (200)	88
16	+1 (20)	+1 (0,1)	+1 (6 + 3,4 + 2)	+1 (500)	51
17	0 (15)	0 (0,05)	0 (4,5 + 2,6 + 1,5)	0 (200)	60
18	0 (15)	0 (0,05)	0 (4,5 + 2,6 + 1,5)	0 (200)	69
19	0 (15)	0 (0,05)	0 (4,5 + 2,6 + 1,5)	0 (200)	58
20	0 (15)	0 (0,05)	0 (4,5 + 2,6 + 1,5)	0 (500)	86
21	0 (15)	0 (0,05)	0 (4,5 + 2,6 + 1,5)	0 (500)	78
22	0 (15)	0 (0,05)	0 (4,5 + 2,6 + 1,5)	0 (500)	84

-1 e +1: Níveis estudados e 0: pontos centrais.

**Tabela 4.** Dados de ANOVA para planejamento experimental avaliando as variáveis significativas no intervalo de confiança de 90%

Fonte de variação	Soma quadrática	Grau de liberdade	Média quadrática	Teste F	F <sub>tab(95%)</sub>	Fcal/Ftab
Regressão	7454,3	4	1863,5	9,7	2,31	4,2
Resíduo	3263,0	17	191,9			
Falta de ajuste	2539,5					
Erro puro	723,5					
Total	10717,3	21				

**Figura 1.** Superfície de resposta obtida para a recuperação no intervalo de confiança de 90%

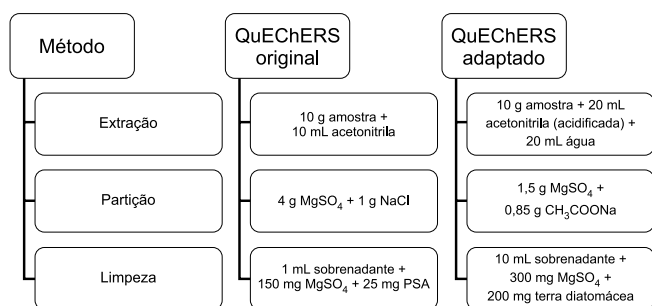
foram tomadas 10,00 g da fração de amostra de arroz triturado em moinho de facas e proveniente da fração granulométrica 0,5 mm, colocadas em um erlenmeyer ao qual foram adicionados 20 mL de água destilada e 20 mL de acetonitrila acidificada com 0,2 mL de ácido

acético glacial. A homogeneização da mistura foi realizada em mesa agitadora orbital durante 10 min, a 200 rpm, com adição de 1,50 g de sulfato de magnésio e 0,85 g de acetato de sódio e nova agitação durante 10 min, a 200 rpm. O material foi centrifugado por 8 min, a 3220 ´g, ao sobrenadante foram adicionados 0,30 g de sulfato de magnésio e 0,20 g de terra diatomácea, agitados manualmente durante 1 min e nova centrifugação por 8 min a 3220 ´g. O sobrenadante foi seco em concentrador sob nitrogênio. Todas as extrações foram realizadas em triplicata. Na Figura 2 são apresentadas as condições estabelecidas para o método QuEChERS neste estudo em comparação com o método original.<sup>24</sup>

Alguns autores avaliaram a modificação do método QuEChERS para extração de micotoxinas de *Fusarium* em amostras de trigo. A otimização foi alcançada com a utilização de diferentes solventes, chegando-se a uma recuperação de 86-108% para uma mistura de metanol/acetonitrila 85/15 (v/v).<sup>37</sup>

As condições cromatográficas, conforme esperado, permitiram a recuperação acima de 70% para as duas micotoxinas, com limites de quantificação inferiores aos estabelecidos em legislações distintas.

Nestas condições, o método QuEChERS foi aplicado a 38 amostras que já haviam sido determinadas por CLAE-DAD com 5% de amostras contaminadas.<sup>38</sup> Associando QuEChERS ao CLAE-IEN-EM/EM foi possível detectar que das 38 amostras 16% apresentaram contaminação com ocratoxina A, sendo que 3 estavam com níveis abaixo do limite estabelecido pela União Europeia (5 µg/kg). Em



**Figura 2.** Representação das etapas do método QuEChERS original e adaptado neste estudo

uma única amostra o nível alcançou 560 µg/kg, estando 112 vezes acima do LMT estabelecido.<sup>30</sup> Duas outras amostras apresentaram contaminação por citrinina, nos níveis de 12 e 129 µg/kg a contaminação em co-ocorrência das duas micotoxinas não foi verificada em nenhuma das amostras analisadas; nenhuma amostra apresentou contaminação simultânea com ambas as micotoxinas.

Foram estudados três métodos para extração simultânea de 136 pesticidas, 36 toxinas naturais e 86 medicamentos veterinários em alimentos para consumo animal e mel. Os três procedimentos, incluindo o método QuEChERS, apresentaram recuperações que variaram de 70 a 120% para todos os analitos.<sup>39</sup> O método QuEChERS e o procedimento de extração acelerada por solvente (ASE - *Accelerated Solvent Extraction*) foram estudados para extração de 17 micotoxinas, incluindo ocratoxina A, em alimentos à base de cereais. Ambos tiveram desempenhos semelhantes em relação à linearidade, precisão e limite de quantificação, no entanto o método QuEChERS mostrou-se mais fácil, com uma recuperação que variou de 73-130% e ainda teve um maior rendimento de amostra se comparado com ASE.<sup>40</sup>

Apesar da ampla ênfase que vem sendo dada ao emprego do método QuEChERS, poucos pesquisadores empregaram planejamento experimental para otimizar a combinação de variáveis do método.

## CONCLUSÃO

O planejamento experimental realizado mostrou-se uma ferramenta importante para otimizar e construir o modelo preditivo dentro da faixa ótima para a extração das duas micotoxinas simultaneamente. As condições otimizadas ocorreram quando foi utilizada a maior quantidade de água (20 mL) e menor quantidade de terra diatomácea (200 mg). As recuperações de citrinina e ocratoxina A foram de 78-105%. Os resultados encontrados mostram a importância do avanço da pesquisa na avaliação da ocorrência e co-ocorrência simultânea de ocratoxina A e citrinina em amostras de arroz, pois, estas estavam presentes em aproximadamente 16% das amostras.

## AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pelo apoio financeiro e ao Instituto Rio Grandense do Arroz pelas amostras.

## REFERÊNCIAS

- Bräse, S.; Encinas, A.; Keck, J.; Nising, C. F.; *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 3903.
- Clark, H. A.; Snedeker, S. M.; *J. Toxicol. Environ. Health, Part B* **2006**, *9*, 265.
- Richard, J. J.; *Int. J. Food Microbiol.* **2007**, *119*, 3.
- Paterson, R. P. M.; Lima, N.; *J. Appl. Microbiol.* **2009**, *106*, 1070.

- Martins, M. L.; Gimeno, H. M.; Martins, H. M.; Bernardo, F.; *Food Addit. Contam.* **2002**, *19*, 568.
- Speijers, G. J. A.; Speijers, M. H. M.; *Toxicol. Lett.* **2004**, *153*, 91.
- Nielsen, K. F.; Smedsgaard, J.; *J. Chromatogr.* **2003**, *1002*, 111.
- Li, S.; Marquardt, R. R.; Frohlich, A. A.; *Food. Chem. Toxicol.* **2000**, *38*, 141.
- Amezqueta, S.; Gonzalez-Penas, E.; Murillo-Arbizu, E.; De Cerain, A. L.; *Food Control* **2009**, *20*, 326.
- FAO - Food and Agriculture Organization; *Food and Nutrition Paper*, (2001), Nº 64, 357 Roma, 1997.
- Curtui, V. G.; Gareis, M.; *Food Addit. Contam.* **2001**, *18*, 635.
- Almela, L.; Robe, V.; Sanchez, B.; Torella, F.; Perez-Lopez, J.; Gabaldon, J. A.; *Food Microbiol.* **2007**, *24*, 319.
- Ribeiro, J. M.; Cavaglieri, L. R.; Fraga, M. E.; Direito, G. M.; Dalcero, A. M.; Rosa, C. A.; *Lett. Appl. Microbiol.* **2006**, *42*, 179.
- Xu, B.; Jia, X.; Gu, L.; Sung, C.; *Food Control* **2006**, *17*, 271.
- Shu, P. Y.; Lin, C. H.; *Anal. Sci.* **2002**, *18*, 283.
- Meister, U.; *Eur. Food Res. Technol.* **2004**, *218*, 394.
- Aziz, N. H.; Moussa, L. A. A.; *Food Control* **2002**, *13*, 281.
- Bailly, J. D.; Querin, A.; Le Bars-Bailly, S.; Benard, G.; Guerre, P.; *J. Food Prot.* **2002**, *65*, 1317.
- Ren, Y.; Zhang, Y.; Shao, S.; Cai, Z.; Feng, L.; Pan, H.; Wang, Z.; *J. Chromatogr., A* **2007**, *1143*, 48.
- Gobel, R.; Lusky, K.; *J. AOAC Int.* **2004**, *87*, 411.
- Saint-Marcoux, F.; Lachatre, G.; *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2003**, *14*, 14.
- Rahmani, A.; Jinap, S.; Soleimany, F.; *Compr. Rev. Food Sci. F.* **2009**, *8*, 202.
- Sulyok, M.; Krska, R.; Schuhmacher, R.; *Food Chem.* **2010**, *119*, 408.
- Anastassiades, M.; Lehotay, S. J.; Stajnbaher, D.; Schenck, F. J.; *J. AOAC Int.* **2003**, *86*, 412.
- Prestes, O. P.; Friggi, C. A.; Adaime, M. B.; Zanella, R.; *Quim. Nova* **2009**, *32*, 1620.
- AOAC - Association Official Analytical Chemists; *Official methods of analysis of AOAC international*, 17<sup>th</sup> ed., AOAC: Arlington, 2000.
- INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial; *Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos*, DOQ-CGCRE-008, Revisão 01, 2003.
- ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária; *Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos*, RE nº 889, de 29/05/2003.
- Ribani, M.; Bottoli, C. B. G.; Collins, C. H.; Jardim, I. C. S. F.; Melo, L. F. C.; *Quim. Nova* **2004**, *27*, 771.
- ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária; *RE nº 7*, de 02/02/2011.
- Zachariasova, M.; Lacina, O.; Malachova, A.; Kostelanska, M.; Poustka, J.; Godula, M.; Hajslova, J.; *Anal. Chim. Acta* **2010**, *662*, 51.
- Cunha, F.; Fernandes, J. O.; *J. Sep. Sci.* **2010**, *33*, 600.
- EU (Commission regulation (EC) Nº 1881/2006, de 19/12/2006, que fixa os teores máximos de determinadas quantidades de gêneros alimentícios), *Jornal Oficial da União Europeia*, publicado em 20/12/2006.
- Lehotay, S. J.; Mastovska, K.; Lightfield, A. R.; *J. AOAC Int.* **2005**, *88*, 615.
- Caldas, E. D.; Silva, S. C.; Oliveira, J. N.; *Revista Saúde Pública* **2002**, *36*, 319.
- Badiale-Furlong, E.; Soares, L. M. V.; *J. AOAC Int.* **1995**, *78*, 386.
- Sospedra, I.; Blesa, J.; Soriano, J. M.; Mañes, J.; *J. Chromatogr., A* **2010**, *1217*, 1437.
- Hackbart, H. C. S.; Prietto, L.; Primel, E. G.; Garda-Bufferon, J.; Badiale-Furlong, E.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2012**, *23*, 103.
- Mol, H. G. J.; Plaza-Bolaños, P.; Zomer, P.; Rijk, T. C.; Stolker, A. A. M.; Mulder, P. P. J.; *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 9450.
- Desmarchelier, A.; Oberson, J.; Tella, P.; Gremaud, E.; Seefelder, W.; Mottier P.; *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58*, 7510.