



FURG

Dissertação de Mestrado

**OTIMIZAÇÃO DE MÉTODO PARA A DETERMINAÇÃO DE
TRICOTECENOS EM AMOSTRAS DE TRIGO**

**Elisa Rosa Seus
Engenheira de Alimentos**

PPGQTA

Rio Grande, RS - Brasil

2014

OTIMIZAÇÃO DE MÉTODO PARA A DETERMINAÇÃO DE TRICOTECENOS EM AMOSTRAS DE TRIGO

por

Elisa Rosa Seus

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química Tecnológica e Ambiental da Universidade Federal do Rio Grande (RS), como requisito parcial para obtenção do título de MESTRE EM QUÍMICA.

PPGQTA

Rio Grande, RS - Brasil

2014

Universidade Federal do Rio Grande
Escola de Química e Alimentos
Programa de Pós-Graduação em Química
Tecnológica e Ambiental

A Comissão Examinadora abaixo assinada aprova a Dissertação de Mestrado

OTIMIZAÇÃO DE MÉTODO PARA A DETERMINAÇÃO DE TRICOTECENOS EM AMOSTRAS DE TRIGO

elaborada por

ELISA ROSA SEUS

Como requisito parcial para a obtenção do título de
Mestre em Química/Doutor em Química

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr^a. Célia Maria de Sylos (UNESP - SP)

Prof. Dr^a. Eliana Badiale Furlong (FURG - RS)

Prof. Dr^a. Daiane Dias (FURG - RS)

Rio Grande, 20 de maio de 2014.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, à Deus por me amparar nos momentos felizes e difíceis, dando-me forças para continuar sempre.

Aos meus pais Udo e Lúgia e ao meu irmão Vinícius, pelo apoio, dedicação, carinho e confiança em todos os momentos da minha vida. Obrigada pelo amor incondicional. Essa vitória é por vocês!!

Ao meu noivo Maicon por fazer parte da minha vida. Sempre ao meu lado nos momentos bons e ruins, incentivando-me e me fazendo acreditar que posso mais do que imagino. Devido ao seu companheirismo, amizade, paciência, amor e total apoio este trabalho pode ser realizado!! Obrigada por tudo!! Te amo muito!!

À minha cunhada Talita pelo incentivo e por toda a ajuda nesta caminhada!! Sabes que és uma irmã!

Aos demais familiares pelo apoio e incentivo!

À minha orientadora Jaqueline, exemplo de profissional dedicada, obrigada por tudo: pelas orientações, pelas conversas, pela amizade, pelo incentivo e ensinamentos durante o trabalho.

À professora Eliana agradeço pela receptividade no laboratório, por toda a ajuda e sugestões durante o desenvolvimento do trabalho e os ensinamentos durante toda a minha trajetória acadêmica.

Aos professores Daiane Dias e Carlos Andrade pelas valiosas e importantes sugestões no exame de qualificação. Obrigada!

Aos colegas e professores do Instituto de Oceanografia (IO – FURG) meu agradecimento especial, sem o apoio de vocês eu não conseguiria realizar esse trabalho. Obrigada ao prof. Nicolai, Paulo Baisch, Isabel, Manoel, Glória, Débora, Zaida e ao aluno Guilherme por toda a ajuda, amizade e incentivo nos momentos bons e ruins. Obrigada!

Às colegas de laboratório Rê, Tai e Ana pela ajuda e ensinamentos nos primeiros dias de experimentos e ao longo do mestrado! Obrigada gurias!!

À Maria de Jesus pelas palavras de carinho, pela dedicação ao laboratório e pela amizade!

Aos demais colegas de laboratório Anelise, Larine, Cris, Lú, Lidi, Adri, Náthali, Anne, Priscila, Fran, Katherine, Paula, Carol, Antônio e prof^a Leonor pela receptividade, convivência, conversas e troca de experiências!

À minha amiga Muriele pelo companheirismo no laboratório e nas disciplinas, pela amizade desenvolvida nestes dois anos de convivência, pela parceria em todos os momentos e pelas boas risadas!! Saiba que guardarei sempre essas lembranças!

Aos professores, funcionários e colegas do Programa de Pós Graduação em Química Tecnológica e Ambiental – FURG pela convivência, disponibilidade e ensinamentos desenvolvidos ao longo do curso.

Ao Laboratório de Análises de Compostos Orgânicos e Metais (LACOM) pela colaboração para a realização desse trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	iix
LISTA DE TABELAS	xii
LISTA DE APÊNDICES	xiv
LISTA DE SÍMBOLOS	xvi
RESUMO	xviii
ABSTRACT	xix
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	4
2.1 OBJETIVO GERAL	4
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	4
3. REVISÃO DA LITERATURA	5
3.1 TRIGO	5
3.2 MICOTOXINAS	7
3.3 TRICOTECENOS	14
3.4 DETERMINAÇÕES DE MICOTOXINAS	17
3.4.1 Métodos de extração	17
3.4.1.1 Método Tanaka <i>et al.</i>	18
3.4.1.2 Método QuEChERS	19
3.4.1.3 Técnica DLLME	21
3.4.1.4 Técnica MSPD	23
3.4.2 Métodos de detecção	25
3.5 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS	29
3.5.1 Curva analítica e linearidade	29
3.5.2 Limite de detecção e limite de quantificação	31

3.5.3 Exatidão.....	32
3.5.4 Precisão.....	33
3.5.5 Sensibilidade e Seletividade.....	34
3.5.6 Efeito Matriz.....	35
4. MATERIAIS E MÉTODOS	36
4.1 MATERIAIS.....	36
4.1.1 Equipamentos.....	36
4.1.2 Reagentes, solventes e materiais.....	37
4.1.3 Preparo das soluções analíticas.....	38
4.2 MÉTODOS.....	40
4.2.1 Amostragem.....	40
4.2.2 Comparação entre os métodos e as técnicas de extração.....	40
4.2.3 Otimização do procedimento de extração QuEChERS.....	42
4.2.4 Otimização do sistema cromatográfico CLAE-UV para determinação dos compostos.....	43
4.2.5 Validação do sistema CLAE-UV.....	44
4.2.5.1 Curva analítica e linearidade.....	44
4.2.5.2 Limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ).....	45
4.2.5.3 Exatidão.....	45
4.2.5.4 Precisão.....	46
4.2.5.5 Sensibilidade e Seletividade.....	47
4.2.5.6 Efeito Matriz.....	47
4.2.6 Aplicabilidade.....	47
4.2.7 Limpeza de vidraria e tratamento de resíduos.....	48
4.2.8 Análise Estatística.....	48
5. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS	49

5.1 RECUPERAÇÕES DOS ENSAIOS DE DETERMINAÇÃO DE TRICOTECENOS ATRAVÉS DOS DIFERENTES MÉTODOS E TÉCNICAS DE EXTRAÇÃO.....	49
5.2 OTIMIZAÇÃO DO PROCEDIMENTO DE EXTRAÇÃO QuEChERS.....	51
5.2.1 Procedimento QuEChERS otimizado.....	64
5.3 PARÂMETROS DO SISTEMA CROMATOGRÁFICO CLAE-UV PARA A DETERMINAÇÃO DAS MICOTOXINAS.....	65
5.4 VALIDAÇÃO DO MÉTODO.....	69
5.4.1 Curva analítica e linearidade.....	69
5.4.2 Limites de detecção e limites de quantificação.....	70
5.4.3 Exatidão e Precisão.....	71
5.4.4 Sensibilidade e Seletividade.....	72
5.4.5 Efeito Matriz.....	74
5.5 APLICABILIDADE.....	76
6. CONCLUSÕES.....	79
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	81

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Partes do grão de trigo.....	5
Figura 2. Espécie <i>Triticum aestivum</i> , <i>Triticum compactum</i> e <i>Triticum durum</i>	7
Figura 3. Espiga de trigo com sintomas de giberela.....	10
Figura 4. Grãos de trigo com fusariose.....	10
Figura 5. Esquema do ciclo de desenvolvimento da fusariose.....	11
Figura 6. Estruturas químicas de grupos de tricotecenos.....	14
Figura 7. Estruturas químicas de deoxinivalenol (DON); nivalenol (NIV); 3-acetil-deoxinivalenol (3-ADON); 15-acetil-deoxinivalenol (15-ADON)	15
Figura 8. Esquema de detector fotométrico.....	26
Figura 9. Esquema de detector de comprimento de onda múltiplo (DAD)	27
Figura 10. Superfícies de resposta geradas através do delineamento composto central 2^4 para a variável recuperação de DON (%).....	56
Figura 11. Superfícies de resposta geradas através do delineamento composto central 2^4 para a variável recuperação de ADONS (%).....	59
Figura 12. Superfícies de resposta geradas através do delineamento composto central 2^4 para a variável recuperação de NIV (%).....	62
Figura 13. Cromatograma de eluição dos tricotecenos em FM: ACN: H ₂ O (70:30/v:v) em CLAE-UV.....	67
Figura 14. Cromatograma de eluição dos tricotecenos em FM: ACN: H ₂ O (80:20/v:v) em CLAE-UV.....	68
Figura 15. Cromatograma e espectros obtidos por CLAE-DAD para os tricotecenos DON (4,919 min; 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$), ADONS (6,073 min; 4 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e NIV (11,610 min; 2 $\mu\text{g mL}^{-1}$).....	74
Figura 16. Curvas analíticas no solvente e curvas analíticas na matriz para (a) DON, (b) ADONS e (c) NIV.....	75
Figura 17. Diferentes tipos de trigo utilizados na aplicabilidade do método (A, B, C, D e E).....	76

Figura 18. Cromatograma referente à amostra E obtido através do método otimizado QuEChERS-CLAE-UV.....77

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Principais micotoxinas, espécies fúngicas produtoras e seus substratos e seus efeitos tóxicos em humanos e animais	8
Tabela 2. Limites toleráveis de DON em alimentos exigidos pela ANVISA.....	13
Tabela 3. Valores de recuperação (R), desvio padrão (RSD), limites de detecção (LOD) e limites de quantificação (LOQ) utilizando QuEChERS em amostras de pipoca.....	21
Tabela 4. Valores de recuperação (R) da técnica SLE utilizada para amostras de cevada.....	23
Tabela 5. Técnicas de preparo de amostra e métodos de detecção de analitos utilizados para diferentes matrizes.....	28
Tabela 6. Absortividades molares e comprimentos de onda de máxima absorbância de cada tricoteceno em estudo.....	39
Tabela 7. Níveis codificados e reais avaliados no delineamento composto central 2 ⁴ na etapa de separação de fases e na etapa de <i>clean-up</i> no método QuEChERS.....	43
Tabela 8. Resultados das recuperações e RSD dos tricotecenos para os diferentes métodos e técnicas de extração.....	49
Tabela 9. Matriz do DCC 2 ⁴ , com variáveis e níveis avaliados em função da recuperação (%) dos tricotecenos utilizando o método QuEChERS modificado.....	52
Tabela 10. Resultados dos efeitos, desvio padrão e coeficientes de regressão provenientes do DCC 2 ⁴ para as variáveis estudadas e suas interações em relação à recuperação de DON (%).....	54
Tabela 11. Dados da ANOVA para a variável resposta recuperação de DON (%).....	55
Tabela 12. Resultados dos efeitos, desvio padrão e coeficientes de regressão provenientes do DCC 2 ⁴ para as variáveis estudadas e suas interações em relação à recuperação de ADONS (%).....	57
Tabela 13. Dados da ANOVA para a variável resposta recuperação de ADONS (%).....	58
Tabela 14. Resultados dos efeitos, desvio padrão e coeficientes de regressão provenientes do DCC 2 ⁴ para as variáveis estudadas e suas interações em relação à recuperação de NIV (%).....	60

Tabela 15. Dados da ANOVA para a variável resposta recuperação de NIV (%).....	61
Tabela 16. Condições empregadas no sistema cromatográfico.....	65
Tabela 17. Tempos de retenção (t_r) dos analitos e valores de k para cada composição da fase móvel a uma vazão de $0,5 \text{ mL min}^{-1}$	67
Tabela 18. Valores do fator de separação (α) dos analitos para cada composição da fase móvel.....	68
Tabela 19. Resultados obtidos para calibração dos tricotecenos, empregando QuEChERS no sistema CLAE-UV.....	69
Tabela 20. Limites de detecção e quantificação instrumental (LOD_i ; LOQ_i) e do método QuEChERS (LOD_m ; LOQ_m).....	70
Tabela 21. Recuperação, RSD_r e RSD_{pi} do método empregando QuEChERS modificado e CLAE-UV para os tricotecenos em amostras de trigo fortificadas em diferentes níveis.....	72
Tabela 22. Valores de parâmetros analíticos para validação da sensibilidade.....	73
Tabela 23. Resultado da aplicabilidade do método QuEChERS adaptado em amostras de grãos de trigo comerciais.....	77

LISTA DE APÊNDICES

Apêndice 1. Fluxograma do método proposto por Tanaka <i>et al.</i> (2000).....	97
Apêndice 2. Fluxograma do método QuEChERS modificado por Bemvenuti <i>et al.</i> (2012).....	98
Apêndice 3. Fluxograma da Técnica SLE (Extração Sólido – Líquido) acoplada à (Microextração Dispersiva Líquido – Líquido) desenvolvida por Rezaee (2006).....	99
Apêndice 4. Fluxograma da técnica MSPD (Dispersão da matriz em Fase Sólida) validada por Rubert <i>et al.</i> (2011).....	100
Apêndice 5. Fluxograma do método QuEChERS adaptado por Ferreira (2012).....	101
Apêndice 6. Fluxograma do procedimento QuEChERS otimizado.....	102

LISTA DE SÍMBOLOS

ABITRIGO – Associação Brasileira da Indústria do Trigo

ACN – Acetonitrila

AF – Aflatoxina

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

AOAC – *Association of Official Analytical Chemists*

APPCC – Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle

C₁₈ – Sílica modificada com hidrocarboneto linear C₁₈

CG – Cromatografia Gasosa

CIT – Citrinina

CL – Cromatografia Líquida

CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

CODEX – *Codex Alimentarius*

DAD – Detector por Arranjo de Diodos

DCC – Delineamento Composto Central

DLLME – Micro Extração Líquido-Líquido Dispersiva, do inglês *Dispersive Liquid-Liquid Extraction*

DOM -1 – Deepóxi-deoxinivalenol

DON – Deoxinivalenol

D3G – Deoxinivalenol-3-D-Glicosídico

EM – Espectrometria de massas

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

F – Fumonisina

FAO – Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação, do inglês *Food and Agriculture Organization*

FID – Detector com Ionização de Chama, do inglês *Flame Ionization Detector*

Hz – Hertz

IARC – Agência Internacional para Pesquisa sobre o Câncer, do inglês *International Agency for Research on Cancer*

k – Fator de Retenção

LC – Cromatografia Líquida, do inglês *Liquid Chromatography*

LLE – Extração Líquido-Líquido, do inglês *Liquid-Liquid Extraction*

LMT – Limite Máximo Tolerado

LOD – Limite de Detecção, do inglês *Limit of Detection*

LOQ – Limite de Quantificação, do inglês *Limit of Quantification*

MS – Espectrometria de Massas, do inglês *Mass Spectrometry*

MSPD – Dispersão da Matriz em Fase Sólida, do inglês *Matrix Solid-Phase Dispersion*

NIV – Nivalenol

NTP – Programa Nacional de Toxicologia, do inglês *National Toxicology Program*

OTA – Ocratoxina

PAT – Patulina

pH – Potencial hidrogeniônico

QuEChERS – Rápido, Fácil, Barato, Eficiente, Robusto e Seguro, do inglês *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*

R – Recuperação

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

SLE – Extração Sólido-Líquido, do inglês *Solid-Liquid Extraction*

SPE – Extração em Fase Sólida, do inglês *Solid Phase Extraction*

t_R – Tempo de Retenção

UHPLC – Cromatografia Líquida de Ultra-Alta Pressão, do inglês *Ultra High Pressure Liquid Chromatography*

USDA – Departamento de Agricultura dos Estados Unidos, do inglês *United States Department of Agriculture*

UV – Ultravioleta

ZON – Zearalenona

3-ADON – 3-acetil-deoxinivalenol

15-ADON – 15-acetil-deoxinivalenol

RESUMO

Título: Otimização de método para a determinação de tricotecenos em amostras de trigo

Autor: Elisa Rosa Seus

Orientador: Prof^a. Dr^a. Jaqueline Garda Buffon

O trigo é um dos principais cereais consumidos no mundo e vários fatores podem afetar a sua produção, como as condições climáticas e a susceptibilidade dos cultivares a patógenos. Além dos danos diretos à cultura, os grãos infectados podem apresentar contaminação micotoxicológica. Os tricotecenos são micotoxinas produzidas por algumas espécies fúngicas do gênero *Fusarium* e o de maior destaque pela ocorrência é o deoxinivalenol (DON). O objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento de um método analítico de extração e quantificação otimizado para a determinação simultânea dos tricotecenos: deoxinivalenol, 3-acetil-deoxinivalenol, 15-acetil-deoxinivalenol e nivalenol em amostras de grãos de trigo. A extração dos tricotecenos nas amostras de trigo foi realizada através do método QuEChERS adaptado e separação e quantificação por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detector Ultra-Violeta (CLAE-UV). Para adequar a etapa de extração foi realizado o delineamento composto central 2⁴ verificando a influência das variáveis quantidades de sulfato de magnésio (2, 4 e 6 g) e cloreto de sódio (0,5, 1 e 1,5 g) na etapa de separação de fases e quantidades de sulfato de magnésio (0,3, 0,6 e 0,9 g) e sorvente C₁₈ (0,1, 0,3 e 0,5 g) na etapa de *clean-up*. As análises foram realizadas em triplicata em três níveis de fortificação (400, 1000 e 2000 µg kg⁻¹). Como resultado da adaptação do método QuEChERS foi definido a utilização de 10 g de amostra, 20 mL de água destilada, 20 mL de acetonitrila, sendo que 6 g de sulfato de magnésio e 1,5 g de cloreto de sódio foram utilizados para a separação de fases. Na etapa de *clean up* foram utilizados 0,3 g de sulfato de magnésio e 0,1 g de C₁₈. Após a otimização das etapas de extração e separação dos compostos, o método foi validado através dos seguintes parâmetros: curva analítica e linearidade, limites de detecção e quantificação, precisão, exatidão, sensibilidade e seletividade. Todas as curvas analíticas apresentaram valores de r maiores que 0,99. Os limites de quantificação (LOQs) para o método ficaram na faixa de 55,5 – 110,9 µg kg⁻¹. Foram encontradas recuperações entre 75 e 90 % para todos os compostos com RSD para a repetibilidade de 3,1 a 9,8 % e para a precisão intermediária de 7,9 a 10,5 %. O efeito matriz no método apresentou um enriquecimento de sinal para todos os tricotecenos e foi compensado com calibração por superposição na matriz. O método mostrou-se adequado à análise de tricotecenos em amostras de grãos de trigo comerciais, sendo que DON foi detectado em quatro das cinco amostras analisadas, variando de 163,5 a 1329,1 µg kg⁻¹. A co-ocorrência de DON (1329,1 µg kg⁻¹) e ADONS (186,5 µg kg⁻¹) foi observada em uma única amostra.

Palavras-chave: trigo, tricotecenos, método analítico, validação.

ABSTRACT

Title: Optimization method for the determination of trichothecenes in wheat samples

Author: Elisa Rosa Seus

Advisor: Prof. Dr. Jaqueline Garda Buffon

Wheat is one of the most consumed cereals in the world and many factors can affect its production, such as climatic conditions and susceptibility to pathogens. In addition to the direct damage to the crop, the infected grains may present mycotoxicologic contamination. The trichothecenes are mycotoxins produced by some fungal species of the genus *Fusarium* and the most prominent occurrence is deoxynivalenol (DON). The objective of this work was to develop an analytical method of extraction and optimized quantification for the simultaneous determination of trichothecenes: deoxynivalenol, 3-acetyl-deoxynivalenol, 15-acetyl-deoxynivalenol and nivalenol in wheat grain samples. The extraction of trichothecenes in wheat samples was performed using the adapted QuEChERS method and quantifications by High Performance Liquid Chromatography with Ultraviolet detection (HPLC-UV) in order to adapt the mycotoxicological extraction. It was performed the central composite design 2⁴ to verify the influence of different quantities of magnesium sulfate (2, 4 e 6 g) and sodium chloride (0.5, 1 e 1.5 g) during the stage of phases separation and quantities of magnesium sulfate (0.3, 0.6 e 0.9 g) and C₁₈ sorbent (0.1, 0.3 e 0.5 g) during the clean-up stage. The analyses were performed in triplicate in three fortification levels (400, 1000 and 2000 µg kg⁻¹). As a result of the adaptation of the QuEChERS method 10 g of sample, 20 mL of distilled water, 20 mL of acetonitrile, and 6 g of magnesium sulfate and 1.5 g of sodium chloride were used for the separation phases. In the clean-up phase 0.3 g of magnesium sulfate and 0.1 g of C₁₈ were used. After the optimization of the compounds extraction and separation stages, the method was validated by the following parameters: calibration curve and linearity, limits of detection and quantification, precision, accuracy, sensitivity and selectivity. All calibration curves showed “r” values greater than 0.99. The limits of quantification (LQ) for the extraction method ranged from 55.5 to 110.9 µg kg⁻¹. Recoveries between 75 and 90% were found for all compounds with RSD for repeatability from 3.1 to 9.8 % and for intermediate precision from 7.9 to 10.5 %. The matrix effect in the method showed an enrichment of signal for all trichothecenes and it was compensated by calibration through the matrix overlapping. The method proved to be suitable for the analysis of the trichothecenes in samples of commercial wheat grains, and DON was detected in four of five samples tested, ranging from 163.5 to 1329.1 µg kg⁻¹. The co-occurrence of DON (1329.1 µg kg⁻¹) and ADONS (186.5 µg kg⁻¹) was observed in a single sample.

Keywords: wheat, trichothecenes, analytical method validation.

1. INTRODUÇÃO

O trigo (*Triticum aestivum*) é uma planta de ciclo anual, cultivada durante o inverno e a primavera. O grão é consumido na forma de pão, massa alimentícia, bolo e biscoito, também usado também como ração animal, quando não atinge a qualidade exigida para consumo humano. O trigo ocupa o primeiro lugar em volume de produção mundial, enquanto no Brasil, a produção anual oscila entre 5 e 6 milhões de toneladas, cultivado principalmente nas regiões Sul (RS, SC e PR), onde concentra em torno de 90 % da produção, Sudeste (MG e SP) e Centro-oeste (MS, GO e DF). No entanto, esta produção não satisfaz o consumo anual do país, que tem se mantido em torno de 11 milhões de toneladas (EMBRAPA, 2013).

Vários fatores podem afetar a produção deste cereal, envolvendo, principalmente, o cultivo do grão. Durante esta etapa é que pode se desenvolver a fusariose, também conhecida como giberela ("*Fusarium headblight ou Scab*"). Esta é uma doença que ocorre frequentemente em trigo, devido às condições climáticas, às práticas culturais e à susceptibilidade dos cultivares. Ela é causada por fungos do gênero *Fusarium*, sendo mais freqüentes, *F. graminearum*, *F. culmorum* e *F. avenaceum*. (CALORI *et al.*, 2007). No Brasil, a fusariose tornou-se, nos últimos anos, a principal doença nas regiões tritícolas, principalmente na região Sul do País (DEL PONTE *et al.*, 2004). Além dos danos diretos à cultura causados pela doença, os grãos infectados podem apresentar contaminação micotoxicológica, sendo tóxicas tanto para o homem quanto para os animais (CREPPY, 2002).

Micotoxinas são metabólitos fúngicos secundários, onde estes compostos compreendem uma grande variedade de estruturas, inclusive algumas relativamente simples (FONSECA, 1996). Eles são produzidos em micélios de fungos filamentosos de uma ampla variedade de espécies, normalmente após uma fase de crescimento balanceado (MELLO & MACDONALD, 1997). Em comum com outros compostos fisiologicamente ativos, as micotoxinas de *Fusarium* são capazes de induzir efeitos agudos e crônicos, como alterações no intestino, sistema nervoso central e imunológico, desencadeando doenças caracterizadas por vômitos, anorexia, dor abdominal, diarréias, desnutrição, dor de cabeça e tonturas (PESTKA, 2010; PESTKA, 2010; BRYDEN, 2007). Entre as principais toxinas fúngicas produzidas por esse gênero

toxigênico destacam-se as zearalenonas, fumonisinas e os tricotecenos (D`MELLO *et al.*, 1999; BENEDETTI, 2006; VARGA *et al.*, 2006; MOSSA, THRAME, 2004).

Os tricotecenos são micotoxinas constituídas por anéis tricotecanos que apresentam uma ligação dupla entre os carbonos 9 e 10 e um grupamento epóxido nas posições 12 e 13 da estrutura, principal responsável por sua toxicidade (LANGSETH, RUNDBERGET, 1998). Os átomos de carbono ligados a um grupo hidroxila, acetil ou cetônico podem sofrer reações químicas características destes grupamentos. Estas reações são principalmente realizadas para estudo da estrutura e detecção destes compostos em alimentos e rações (BADIALE-FURLONG, 1992).

Os tricotecenos estão divididos em 4 grupos (HE *et al.*, 2010) classificados de acordo com sua estrutura química: tipos A, B, C e D (SHAMS *et al.*, 2011; BAERE *et al.*, 2011; TURKER, GUMUS, 2009). Essas micotoxinas são frequentemente detectadas em grãos, destacando o trigo, como também em cevada, aveia, centeio e milho.

A diversidade dos tipos de tricotecenos conduz a uma vasta gama de efeitos tóxicos em animais e humanos, tais como irritação da pele, recusa de alimentação, náuseas, vômitos, diarréia, anemia, hemorragia, imunossupressão da medula e inibição da síntese de proteínas (STECHEER *et al.*, 2007).

No Brasil, estudos limitam-se somente à ocorrência de DON em trigo e derivados utilizando técnicas cromatográficas (OLIVEIRA *et al.*, 2002; LAMARDO; NAVAS; SABINO, 2006; CALORI-DOMINGUES *et al.*, 2007). Em um estudo realizado nos Estados do Paraná e do Rio Grande do Sul foram avaliadas 36 amostras de trigo, onde DON foi detectado em 72 % das amostras, variando de não detectável a 1592 $\mu\text{g kg}^{-1}$, nível médio de 322 $\mu\text{g kg}^{-1}$, analisados por CLAE-DAD (SANTOS *et al.*, 2011).

Derivados monoacetilados de DON também foram registrados, juntamente com DON em alguns estudos, e eles frequentemente ocorrem em 10 – 20 % do teor de DON, como por exemplo pães no mercado alemão que apresentaram uma incidência de 8 % de 3-acetil-deoxinivalenol (CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION, 2007).

Devido a grande variedade e, muitas vezes, complexidade das estruturas das micotoxinas, tornou-se difícil utilizar uma técnica padrão para análise e detecção destes compostos. Muitos métodos de extração e detecção de micotoxinas já estão sendo aplicados em diversos países do mundo. No pré-tratamento das amostras destacam-se técnicas como extrações líquido-líquido (LLE) e extrações em fase sólida (SPE). Os

métodos de separação que tem ganhado destaque ao longo do tempo são a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e a cromatografia gasosa (CG) (TURNER, SUBRAHMANYAM, PILETSKY, 2009).

Várias técnicas de detecção de um amplo espectro de micotoxinas já estão disponíveis e, embora tenham ocorridos muitos sucessos recentes na detecção de micotoxinas, novos métodos são ainda necessários com o objetivo de alcançar maior sensibilidade, sendo que, perspectivas futuras se concentram em ensaios rápidos e técnicas de análise de múltiplas toxinas de uma única matriz.

O conhecimento da alta produção, da oscilação das condições ambientais que possibilitam a contaminação fúngica e conseqüentemente micotoxicológica do trigo, gera a necessidade do desenvolvimento de métodos analíticos precisos, que demonstrem dados sobre a ocorrência e os níveis de contaminação, bem como o risco toxicológico que humanos e animais estão submetidos devido ao alto consumo deste cereal e seus derivados.

Portanto, este trabalho pretende contribuir com um método analítico otimizado e validado para a determinação simultânea de tricotecenos em amostras de trigo.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Otimizar, desenvolver e validar método analítico para a determinação simultânea de deoxinivalenol, 3-acetil-deoxinivalenol, 15-acetil-deoxinivalenol e nivalenol em amostras de grãos de trigo.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar e comparar os diferentes métodos de extração Tanaka, QuEChERS e as técnicas MSPD (Dispersão da Matriz em Fase Sólida) e SLE (Extração Sólido-Líquido) acoplada a DLLME (Microextração Dispersiva Líquido-Líquido) para a extração simultânea dos tricotecenos.

Validar metodologia de quantificação das toxinas por CLAE-UV, através dos parâmetros de linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, precisão, exatidão, sensibilidade e seletividade.

Demonstrar aplicabilidade da metodologia adaptada através da avaliação da ocorrência de tricotecenos em amostras comerciais de grãos de trigo.

Correlacionar os diferentes aspectos estudados.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 TRIGO

De acordo com a legislação brasileira, através da Instrução Normativa nº 38 do MAPA, de 30 de novembro de 2010, denominada Regulamento Técnico do Trigo, considera-se trigo os grãos provenientes das espécies *Triticum aestivum* L. (trigo mole) e *Triticum durum* L. (trigo duro). Este mesmo regulamento classifica o trigo em dois grupos: o grupo I, destinado diretamente a alimentação humana e o grupo II, destinado a moagem e a outros fins. Comercialmente, o trigo do grupo II é classificado em cinco tipos: melhorador, pão, doméstico, básico e para outros usos. Esta classificação é definida em função das determinações analíticas de força de glúten da alveografia, estabilidade da farinografia e número de queda (BRASIL, 2010).

Os grãos de trigo possuem formato oval e comprimento em torno de 4 a 7 mm. Em sua estrutura existem três regiões principais: o pericarpo, a semente e o gérmen. O pericarpo é o invólucro protetor da semente, ou seja, a casca, correspondendo em torno de 12 a 15 % do grão e rico em celulose. A semente é constituída pela cobertura e endosperma rico em amido e proteínas e é desta região que é extraída a farinha de trigo correspondendo a 82 – 85 % do grão, aproximadamente. O gérmen, 3% do grão, é o embrião de uma nova planta e é rico em açúcares e lipídeos (EMBRAPA, 2009).

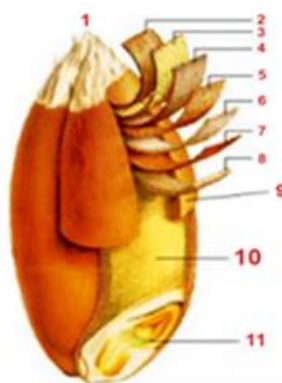


Figura 1. Partes do grão de trigo. (1) Pelos; (2) Epiderme; (3) Hipoderme; (4) Células cruzadas; (5) Células Tubulares; (6) Testa; (7) Hialina; (8) Aleurona; (9) Casca; (10) Endosperma; (11) Germe (EMBRAPA, 2006).

Na busca pela maior produtividade, maior teor de nutrientes, resistência a doenças e adaptação ao clima e solo de cada região, pesquisadores e produtores vêm testando milhares de cruzamentos, chegando a obter cerca de 30 mil variedades de trigo (ABITRIGO, 2012).

O trigo é cultivado tanto em regiões subtropicais quanto em tropicais e o rendimento de grãos e as características de qualidade tecnológica são muito influenciados pelas condições climáticas destas regiões. Excesso de chuvas e ocorrência de geadas nos períodos de maturação e colheita e déficit hídrico no florescimento são os principais riscos de perda nas regiões subtropicais. Nas regiões tropicais, a umidade e temperatura do ar elevadas durante o período de florescimento e enchimento dos grãos são os principais fatores que contribuem para a redução do rendimento nas lavouras (EMBRAPA, 2009).

No Brasil, o trigo é o cereal de inverno de maior importância, sendo cultivado principalmente nos estados da região Sul (Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul). A área de abrangência, entretanto, atinge também os estados de Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Goiás, Distrito Federal, São Paulo e Minas Gerais (EMBRAPA, 2012). Segundo a Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB, 2014) o estado do RS irá produzir mais da metade do trigo brasileiro na safra 2013/2014, sendo que a estimativa é de 2,6 milhões de toneladas do grão.

Globalmente, o trigo é a segunda-maior cultura de cereais, sendo o milho a primeira e o arroz a terceira. Atualmente, o maior produtor mundial de trigo é a China, com uma produção de aproximadamente 120 milhões de toneladas nas safras de 2012/2013 conforme dados atuais do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA, 2013).

De acordo com a EMBRAPA (2013) o Brasil consome, em média, 11 milhões de toneladas de trigo por ano e importa grãos de trigo de outros países com o objetivo de suprir as necessidades da grande demanda deste cereal no país, sendo a Argentina o maior exportador de trigo para o Brasil.

Três espécies de trigo se destacam em volume, representando mais de 90 % do trigo cultivado no mundo. Cada uma delas é mais adequada a um tipo de alimento:

- *Triticum aestivum*: é o trigo comum e o mais cultivado do planeta, sendo o mais utilizado na fabricação do pão. A espécie mais consumida no Brasil, *Triticum aestivum* L., tem um teor de proteína em torno de 15 %. (Figura 2a) (ABITRIGO, 2012).

- *Triticum compactum*: também é conhecido como tipo clube, possui um teor de proteínas da ordem de 8 % e sua utilização é para a fabricação de biscoitos e bolos mais macios e menos crocantes (Figura 2b) (ABITRIGO, 2012).

- *Triticum durum*: Indicado para a produção de massas, essa espécie forma um glúten mais resistente (Figura 2c) (ABITRIGO, 2012).

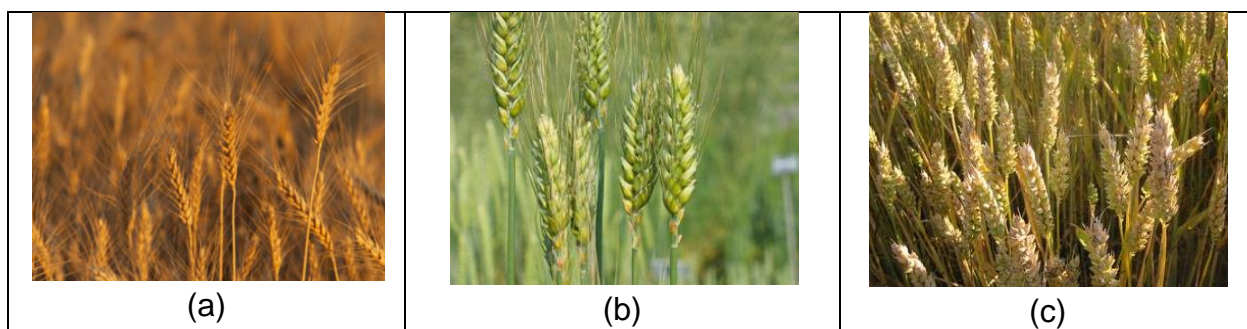


Figura 2. Espécie *Triticum aestivum* (a), *Triticum compactum* (b), *Triticum durum* (c) (ABITRIGO, 2012).

Por serem amplamente consumidos, os grãos de trigo necessitam de especial atenção quando se trata da sua qualidade sanitária. Como a contaminação de cereais por micotoxinas representa um risco significativo à saúde dos consumidores, este assunto tem recebido cada vez mais atenção das autoridades de segurança alimentar e dos legisladores em todo o mundo (ALDRED; MAGAN, 2004).

3.2 MICOTOXINAS

As micotoxinas são metabólitos fúngicos secundários produzidos por fungos toxigênicos, como algumas espécies de *Fusarium*, *Aspergillus* e *Penicillium* (MARTINS, MARTINS, 2002). Aparentemente, as micotoxinas não possuem nenhuma função positiva tão pouco negativa ao metabolismo dos fungos, diferentemente dos metabólitos primários que possuem papel essencial ao crescimento (FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2009). O crescimento fúngico, associado à produção de micotoxinas, depende de uma complexa interação de diversos fatores, como atividade de água, temperatura, oxigênio e substrato (DÖLL, S.; DÄNICKE, 2011).

Tabela 1. Principais micotoxinas, espécies fúngicas produtoras e seus substratos e seus efeitos tóxicos em humanos e animais.

Principal toxina	Principais fungos produtores	Principais substratos	Efeitos
Aflatoxina B ₁	<i>Aspergillus flavus</i> e <i>Aspergillus parasiticus</i>	Amendoim e milho	Hepatotóxica, nefrotóxica e carcinogênica
Citrinina	<i>Penicillium citrinum</i>	Trigo, aveia, cevada, milho e arroz	Nefrotóxica para suínos
Ergotamina	<i>Claviceps purpúrea</i>	Centeio e grãos em geral	Gangrena de extremidades ou convulsões
Ocratoxina	<i>Aspergillus ochraceus</i> e <i>Aspergillus carbonarius</i>	Cevada, café e vinho	Hepatotóxica, nefrotóxica e carcinogênica
Patulina	<i>Penicillium expansum</i> e <i>Penicillium griseofulvum</i>	Frutas e sucos de frutas	Toxicidade vagamente estabelecida
Tricotecenos: T ₂ , neosolaniol, fusanona x, nivalenol, deoxinivalenol	<i>Fusarium sp</i> , <i>Myrothecium sp</i> , <i>Stachybotrys sp</i> , <i>Trichothecium sp</i>	Milho, cevada, aveia, trigo e centeio	Hemorragias, vômitos e dermatites
Zearalenona	<i>Fusarium graminearum</i>	Cereais	Baixa toxicidade, masculinização e feminização em suínos

Fonte: Revista *Food Ingredients Brasil*, 2009.

Consideradas tóxicas a humanos e animais, as micotoxinas são encontradas como contaminantes de gêneros alimentícios e ração animal produzidos, principalmente, a partir de cereais, leguminosas e amendoins, como observado na Tabela 1. Entre os cereais utilizados como matéria-prima, destacam-se o trigo, centeio,

milho, aveia e arroz pela possibilidade de contaminação micotoxicológica (BATA, LÁSZTITY, 1999).

A contaminação ambiental por micotoxinas está bastante relacionada ao clima da região, no entanto fatores de desequilíbrio que provocam alterações no meio ambiente também favorecem o aparecimento de micotoxinas. Durante a pré-colheita dos grãos, períodos prolongados de secas, a presença de insetos, danos mecânicos e a deficiência de alguns minerais na planta, propiciam o aparecimento de micotoxinas. Já na pós-colheita, o transporte e armazenamento são os principais responsáveis pela disseminação destes compostos, já que é durante estes processos que grãos contaminados entram em contato com os outros, situação que pode ser agravada por ocorrer em locais de armazenagem com falta de aeração, umidade elevada acima de 14 %, amplitude térmica acentuada e temperaturas acima de 20 °C que favorecem a recontaminação micotoxicológica (RICHARD, 2007).

A contaminação por micotoxinas da cadeia alimentar humana e animal pode ocorrer de maneira direta ou indireta. Diretamente, através do consumo de cereais, oleaginosas e derivados. Os animais que se alimentam com rações previamente contaminadas podem excretar micotoxinas no leite, carne e ovos e, conseqüentemente, constituir-se em fonte de contaminação indireta para os humanos (BERSOT, MAZIERO, 2010). Além disto, a contaminação da dieta humana e animal implica em efeitos agudos e crônicos e, por vezes, letais, dependente da dose e tempo de ingestão, já que as micotoxinas são compostos quimicamente tóxicos (*FOOD INGREDIENTS* BRASIL, 2009).

Entre as micotoxinas, as produzidas pelos fungos do gênero *Fusarium*, como os tricotecenos são de especial importância, pois geralmente são formadas no campo, antes da colheita e sua ocorrência é difícil de ser evitada devido ao grande impacto das condições abióticas (IBÁÑEZ-VEA *et al.*, 2011). Micotoxinas do gênero *Fusarium* (*Fusarium graminearum*, *Fusarium sambucinum*, *Fusarium poae*, *Fusarium sporotrichioides* e *Fusarium culmorum*) causam giberela ou fusariose, doença de ocorrência frequente em trigo, cuja produção de deoxinivalenol (DON ou vomitoxina) durante o cultivo no campo depende das condições meteorológicas, práticas culturais e susceptibilidade do cultivar, entre outros (IARC, 1993). A característica visível dessa doença nos grãos é a presença de bolor que normalmente se desenvolve durante os

períodos de clima frio e úmido, resultando no crescimento de fungos brancos ou avermelhados, conforme as Figuras 3 e 4 (KNOW MYCOTOXINS, 2008).



Figura 3. Espiga de trigo com sintomas de giberela (EMBRAPA, 2009).



Figura 4. Grãos de trigo com fusariose (EMBRAPA, 2009).

O ciclo da doença pode ser observado na Figura 5. Resíduos infectados como colmos de milho, palhas de trigo e outros hospedeiros podem conter o fungo *Fusarium graminearum*. Nestes resíduos, o fungo pode disseminar esporos assexuais (macronídios) para as plantas ou para outros resíduos através da ação do vento ou por respingos de chuva. Em condições de altas temperaturas e umidade, o estágio sexual do fungo se desenvolve nos resíduos infectados e, na superfície destes, se formam peritécios negros que liberam os esporos sexuais (ascósporos) no ambiente. Estes esporos sexuais podem ser disseminados a longas distâncias através de correntes turbulentas de vento (SCHMALE; BERGSTROM, 2003).

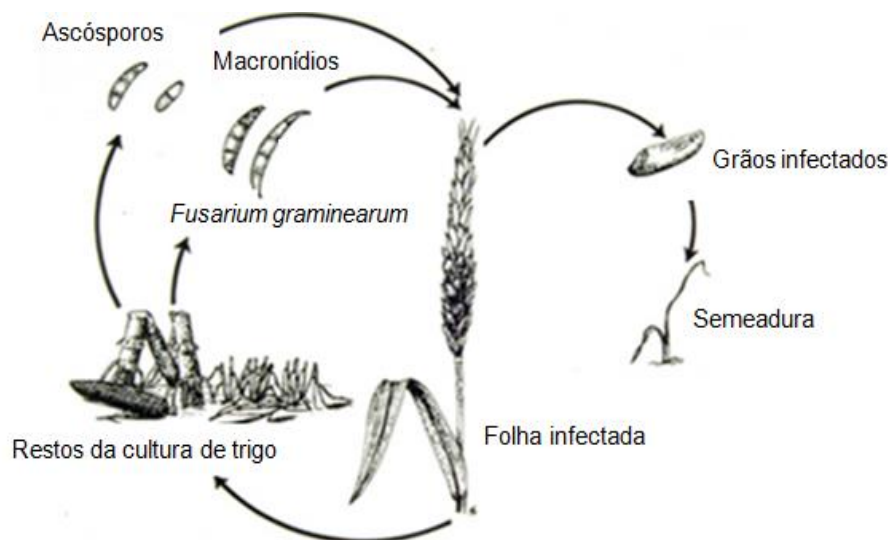


Figura 5. Esquema do ciclo de desenvolvimento da fusariose (SCHMALE; BERGSTROM, 2003).

Salienta-se que DON tem sido a toxina de *Fusarium* mais freqüentemente reportada no mundo, assim como detectada em maior concentração, sendo considerada como “indicadora” de contaminação por este fitopatógeno (PRANGE *et al.*, 2005). A exposição a níveis elevados de DON pode desencadear vômito, perda de peso, dores abdominais, diarreia e imunossupressão. DON é classificado pela *International Agency for Research on Cancer* no Grupo 3, isto é, não carcinogênico para humanos (IARC, 1993). No entanto, a literatura aponta diversas patologias relacionadas ao consumo de cereais contaminados por toxinas de *Fusarium* spp, desde *alimentary toxic aleukia* (ATA) na Rússia (STEYN, 1995) à puberdade precoce e hiperplasias (BRIONES-REYES, GOMÉZ-MARTINEZ, CUERVA-ROLÓN, 2007). A toxicidade de DON pode atravessar as barreiras biológicas, ou seja, barreiras intestinais e do sangue-cérebro, afetando as funções e a viabilidade das células formadoras de tais sistemas e órgãos (MARESCA, 2013).

Os derivados monoacetilados de DON como o 3-acetil-DON e o 15-acetil-DON também apresentam toxicidade comparada aos demais tricotecenos, sendo considerados imunossupressores e imunoestimulantes. Efeitos como redução da eficiência alimentar, redução do ganho de peso e hematotoxicidade foram apresentados em ratos expostos à ração contaminada com nivalenol, comprovando também a sua toxicidade (NTP, 2009).

Assim, tendo em vista, a grande preocupação com o aparecimento de micotoxinas nos mais diversos alimentos, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária aprovou um Regulamento Técnico sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos. Este Regulamento possui o objetivo de estabelecer os limites máximos para aflatoxinas ($AFB_1+AFB_2+AFG_1+AFG_2$ e AFM_1), ocratoxina A (OTA), deoxinivalenol (DON), fumonisinas ($FB_1 + FB_2$), patulina (PAT) e zearalenona (ZON) admissíveis em alimentos prontos para oferta ao consumidor e em matérias primas. Os limites máximos tolerados referem-se aos resultados obtidos por metodologias que atendam aos critérios de desempenho estabelecidos pelo *Codex Alimentarius*. O Regulamento aplica-se às empresas que importem, produzam, distribuam e comercializem as seguintes categorias de bebidas, alimentos e matérias primas:

I - amendoim e seus derivados; II - alimentos à base de cereais para alimentação infantil (lactentes e crianças de primeira infância); III - café torrado (moído ou em grão) e solúvel; IV - cereais e produtos de cereais; V - especiarias; VI - frutas secas e desidratadas; VII - nozes e castanhas; VIII - amêndoas de cacau e seus derivados; IX - suco de maçã e polpa de maçã; X - suco de uva e polpa de uva; XI - vinho e seus derivados; XII - fórmulas infantis para lactentes e fórmulas infantis de seguimento para lactentes e crianças de primeira infância; XIII - leite e produtos lácteos, e XIV - leguminosas e seus derivados.

A ANVISA orienta que os níveis de micotoxinas deverão ser tão baixos quanto possível, devendo ser aplicadas as melhores práticas e tecnologias na produção, manipulação, armazenamento, processamento e embalagem, de forma a evitar que um alimento contaminado seja comercializado ou consumido (ANVISA, 2011).

A Tabela 2 apresenta os limites máximos toleráveis de deoxinivalenol (DON) para o trigo e seus derivados a partir de janeiro de 2012 e com os limites toleráveis exigidos a partir de janeiro de 2017.

Tabela 2. Limites toleráveis de DON em alimentos exigidos pela ANVISA.

Aplicação em janeiro de 2012	
Alimento	Limite Máximo Tolerado ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
Trigo integral, trigo para quibe, farinha de trigo integral, farelo de trigo, farelo de arroz, grão de cevada	2000
Farinha de trigo, massas, crackers, biscoitos de água e sal, produtos de panificação, cereais e produtos de cereais exceto trigo e incluindo cevada malteada	1750
Aplicação em janeiro de 2017	
Trigo e milho em grãos para posterior processamento	3000
Trigo integral, trigo para quibe, farinha de trigo integral, farelo de trigo, farelo de arroz, grão de cevada	1000
Farinha de trigo, massas, crackers, biscoitos de água e sal, produtos de panificação, cereais e produtos de cereais exceto trigo e incluindo cevada malteada	750

Fonte: ANVISA, 2013.

Na Europa, foi estabelecido $1750 \mu\text{g kg}^{-1}$ como limite máximo permitido para trigo destinado ao consumo humano para DON (*EUROPA COMMISSION REGULATION*, 2005). Já nos Estados Unidos, a legislação estabelece para DON um limite máximo de $1000 \mu\text{g kg}^{-1}$ para alimentos prontos elaborados a partir de trigo (FAO, 2003). Para os demais tricotecenos do tipo B (NIV, 3-ADON, 15-ADON) os níveis máximos permitidos ainda não são limitados pelas agências reguladoras no Brasil.

O estudo das micotoxinas é complexo e envolve muitas áreas de conhecimentos, tendo como necessidade o inter-relacionamento. De maneira geral, o estudo das micotoxinas pode relacionar: o estudo sobre os gêneros alimentícios que abrange etapas como a produção, comercialização e utilização do alimento; a degradação que envolve muitos aspectos, entre eles os biológicos, químicos, físicos, micro e macroambientais; o conhecimento das micotoxinas também envolve aspectos relacionados com a produtividade, metabolismo, toxicologia, saúde, oferta, distribuição na natureza e aspectos analíticos. As formas de controle compreendem a prevenção, análise da micotoxina, separação do material contaminado e detoxificação, tendo a

análise de perigos e pontos críticos de controle (APPCC) como excelente ferramenta. Outro aspecto consiste na análise do sistema sócio-econômico que relaciona e envolve a conjuntura cultural, política e econômica estudada, visando identificar situações de danos de caráter epidemiológico (PATERSON, VENÂNCIO, LIMA, 2004).

3.3 TRICOTECENOS

Os tricotecenos são micotoxinas de uma família de sesquiterpenóides cíclicos, os quais são divididos em quatro grupos (tipos A, B, C e D) de acordo com as suas características de grupos funcionais, sendo o tipo A e B, os mais comuns (HE *et al*, 2010).

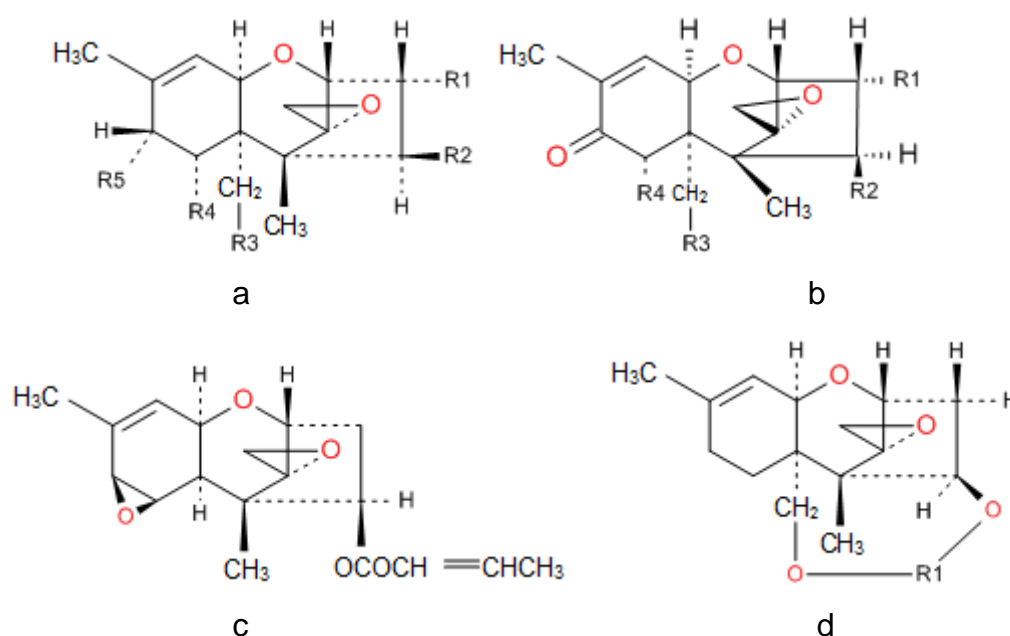
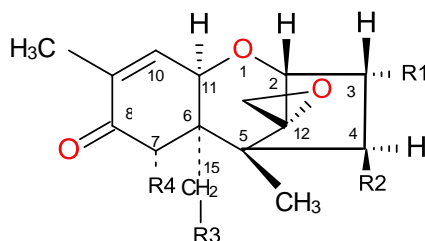


Figura 6. Estruturas químicas de grupos de tricotecenos. a: tipo A; b: tipo B; c: tipo C; d: tipo D

O tipo A é representado por HT-2 (HT₂) e toxina T-2 (T₂) e o tipo B é mais freqüentemente representado por deoxinivalenol (DON) e nivalenol (NIV) e os seus derivados acetilados 3-acetil-deoxinivalenol (3-ADON), 15-acetil-deoxinivalenol (15-ADON) (CANO-SANCHO *et al.*, 2011), conforme a Figura 6. Todos os tricotecenos compartilham de um esqueleto tricíclico comum com uma função epóxido, principal responsável pela sua toxicidade, e eles são derivados a partir do intermediário

isoprenóide pirofosfato de farnesilo, através de uma série de reações de ciclização, isomerização, oxigenação, e acetilação (ALEXANDER *et al.*, 2009; KIMURA *et al.*, 2007). Os tricotecenos diferem na estrutura por padrões de oxigenação e acetilação (ou acilação) do esqueleto (DESJARDINS, 2006).



	<u>R1</u>	<u>R2</u>	<u>R3</u>	<u>R4</u>
Nivalenol	OH	OH	OH	OH
Deoxinivalenol	OH	H	OH	OH
3-acetil-deoxinivalenol	OCOCH ₃	H	OH	OH
15-acetil-deoxinivalenol	OH	H	OCOCH ₃	OH

Figura 7. Estruturas químicas de deoxinivalenol (DON); nivalenol (NIV); 3 – acetil - deoxinivalenol (3 – ADON); 15 – acetil - deoxinivalenol (15 – ADON) (RAZZAZI-FAZELI *et al.*, 2003).

O deoxinivalenol (vomitoxina, DON) é o tricoteceno do grupo B mais importante, e é a partir deste, que surgem os seus derivados acetilados (3-ADON, 15-ADON). O DON é um sesquiterpenóide tetracíclico com sete centros estéreos, de fórmula molecular C₁₅H₂₀O₆. Além de duas hidroxilas secundárias e uma principal alcoólica, dois grupos funcionais reativos estão presentes em DON: uma cetona conjugada e um anel epóxido (BENSASSI *et al.*, 2009; MA, GUO, 2008; NAGY *et al.*, 2005).

DON tem dois ciclos de produção, um diurno em temperaturas mais elevadas e outro noturno em temperaturas mais frias; possui uma faixa ideal de produção em temperatura entre 21 e 29 °C com umidade maior que 20 %. Considerado um composto de alta estabilidade por não apresentar redução dos níveis quando exposto a uma temperatura de 120 °C, a processo de extrusão a 150 °C ou a processos de

cozimento, forneamento e moagem, esta micotoxina é conhecida por permanecer por longo período no alimento humano e animal. Autores relatam que o tratamento a temperatura de 120 °C durante 60 minutos em meio ácido e neutro não altera a concentração final de DON (FARAHANY, JINAP, 2011).

Assim, a desativação de DON, composto não volátil, pode ocorrer sob condições drásticas em soluções ácidas ou alcalinas, também na presença de hidretos de alumínio, lítio e peróxidos ou por hidratação em autoclave, o que pode levar a abertura do anel epóxido (CACCIAMANI *et al.*, 2007). Tratamentos microbiológicos e enzimáticos podem ser usados para alterar a estrutura desse tricoteceno, detoxificando-o (HE *et al.*, 2010).

O 3-acetil-deoxinivalenol é um derivado acetilado de DON que possui um grupamento acetil na posição 3 da molécula de DON enquanto que o 15-acetil-deoxinivalenol possui um grupamento acetil na posição 15 da molécula de DON (NANCY *et al.*, 2011). A produção dos derivados acetilados 3-acetil-deoxinivalenol (3-ADON) e 15-acetil-deoxinivalenol (15-ADON) é um estudo que tem se tornado importante entre algumas espécies do gênero *Fusarium*, sendo que as diferenças entre estes quimiotipos em relação à agressividade e produção global de DON têm sido recentemente demonstradas (PURI & ZHONG, 2010).

Recentemente uma pesquisa realizada no Brasil (2006 – 2008), com grãos de trigo comerciais, visou quantificar a intensidade de epidemias de *Fusarium* e relacioná-las com os níveis de deoxinivalenol e nivalenol. Amostras de grãos, obtidas a partir de 38 municípios em todo o estado do Rio Grande do Sul, foram avaliadas quimicamente utilizando cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas. A co-contaminação foi predominante em 59 das 66 amostras analisadas e os níveis médios de DON e NIV foram de 540 e 337 $\mu\text{g Kg}^{-1}$, respectivamente. Pela primeira vez, a presença de NIV em níveis comparáveis aos de DON é relatada a partir de um levantamento epidemiológico regional no país, o que deve ser motivo de preocupação para a indústria de grãos (DEL PONTE, GARDA-BUFFON, BADIALE-FURLONG, 2012).

Análises da genotipagem de *Fusarium* vêm contribuindo consideravelmente para aumentar o conhecimento sobre a distribuição de Nivalenol, 15-ADON e 3-ADON ao redor do mundo (WARD *et al.*, 2008). Os tricotecenos, especialmente o NIV e o DON,

são solúveis em solventes polares e são, portanto, rapidamente distribuídos e metabolizados após a ingestão. Eles são excretados, principalmente, pela urina e, em menor medida, pela bile (RAZZAZI-FAZELI, 2003).

3.4 DETERMINAÇÕES DE MICOTOXINAS

O controle dos níveis de micotoxinas em amostras de alimentos pode ocorrer através de determinações que utilizam métodos analíticos envolvendo técnicas de extração, com o objetivo de evitar os efeitos tóxicos das micotoxinas na população exposta. Em decorrência dos avanços da instrumentação analítica dos últimos anos, a sensibilidade, a especificidade, a rapidez e a eficiência exigidas pelos órgãos regulamentadores legais e de pesquisa que determinam os limites de tolerância para as micotoxinas vêm sendo contempladas e, cada vez mais, ocorre o uso de técnicas muito sensíveis para detecção e quantificação destes compostos (PALLARONI *et al.*, 2002; RODRIGUEZ-MOZAZ *et al.*, 2007). No entanto, o desenvolvimento de metodologia para a análise de micotoxinas é, muitas vezes, dificultado devido a fatores como: tempo, grande volume de solventes, várias etapas de extração. Normalmente, um procedimento de determinação é formado por quatro etapas: preparo da amostra, extração, *clean up* e determinação cromatográfica para identificação e quantificação (HO, DURST, 2003; PALMA *et al.*, 2007). O preparo consta de quarteamento, trituração e homogeneização da amostra, seguido de extração com solvente apropriado. A extração de micotoxinas de suas matrizes é uma etapa crítica, pois depende muito das propriedades físico-químicas e do tipo de matriz, bem como da escolha do solvente para o isolamento (SORIANO *et al.*, 2004; MEISTER, 2004; SYLOS *et al.*, 2003).

3.4.1 Métodos de extração

Ultrapassar os inconvenientes de detecção é um dos principais problemas em multi-análise de micotoxinas, implicando em desenvolver um método rápido e simples de extração destes analitos em matrizes de alimentos diferenciados. De fato, a extração e o *clean-up* estão entre as etapas mais críticas para determinação das micotoxinas, uma vez que, ambos, determinam as recuperações para todos os compostos sob investigação (LATTANZIO *et al.*, 2007). As suas estruturas variadas e diferentes propriedades físico-químicas ocasionam as dificuldades de extração quando

se utiliza uma técnica de extração padrão. Muitos processos de extração já foram descritos na literatura, tais como extração sólido-líquido (SLE) e extração líquido-líquido (LLE). A extração sólido-líquido clássica (SLE) com ou sem etapas de limpeza têm sido aplicada, principalmente, para cereais e derivados. No entanto, as últimas tendências têm sido alternativas atraentes, como o método QuEChERS modificado e a técnica de Dispersão da Matriz em Fase Sólida (MSPD), que têm sido utilizados para cereais e derivados. Estas extrações foram demonstradas como métodos viáveis, sendo aplicados com sucesso a diferentes matrizes (RUBERT *et al.*, 2012).

O desenvolvimento de metodologias que permitem a extração simultânea de micotoxinas tem sido estimulado desde a confirmação da toxicidade destes compostos. Novas técnicas de extração que permitem diminuir o tempo de extração, o consumo de solventes, a exposição do analista, a geração de resíduos e os custos seria o ideal para a extração destes contaminantes dos alimentos, tornando mais fácil a garantia da segurança alimentar (TREUCKSESS, 2003).

3.4.1.1 Método Tanaka *et al.*

O método proposto por Tanaka *et al.* é comumente utilizado para a determinação de micotoxinas em diferentes matrizes com eficiência analítica adequada. O método consiste em uma extração sólido-líquido o qual utiliza 10 g de amostra na proporção de 1:10 com o solvente extrator. A mistura de solventes orgânicos com água é o ponto inovador desta metodologia, tendo proporção diferenciada conforme o analito desejado. A presença de água no sistema facilita a hidratação da membrana e conseqüentemente a extração do analito. A extração é feita em agitador orbital com agitação e temperatura controladas. Após, a fração líquida é separada por filtração e o extrato é desengordurado por partição líquido com solvente apropriado. Um sal é adicionado com a finalidade da remoção da água residual. O solvente extrator é evaporado sob temperatura e tempo controlados e o extrato é armazenado para posterior análise (TANAKA *et al.*, 2000).

No entanto, como desvantagem desta metodologia, tem-se o grande volume de solvente para extração, que vem a contrapor com as novas tendências. Este fato torna difícil estabelecer uma rotina de análise que possa ser acessível à maioria dos laboratórios que estão envolvidos na extração de micotoxinas, uma vez que tanto o

descarte de resíduos e o custo de solventes são desafios a ser enfrentados (HACKBART *et al.*, 2012).

Este método foi testado no Japão no ano de 2000, para extração simultânea de tricotecenos e zearalenona em amostras de milho e trigo, utilizando cromatografia gasosa e espectrometria de massas. Os limites de detecção foram de 5 – 10 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para DON e NIV e de 5 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para 3-ADON. As recuperações, com concentrações fortificadas de 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$, variaram de 83 – 88 % para estes tricotecenos (TANAKA *et al.*, 2000).

Um estudo realizado no sul do Brasil, para a determinação simultânea das micotoxinas citrinina (CIT) e ocratoxina A (OTA) em amostras de arroz apresentou recuperações de 64 % para CIT e 98 % para OTA, utilizando o método de extração proposto por Tanaka *et al.* e cromatografia líquida com detecção por arranjo de diodos. Os valores de limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ) foram de 0,7 e 2,4 mg kg^{-1} para citrinina e de 1 e 3 mg kg^{-1} para a ocratoxina A, respectivamente (HACKBART *et al.*, 2012).

3.4.1.2 Método QuEChERS

Este método foi desenvolvido em 2003 por Anastassiades *et al.* e tem como vantagens ser rápido, fácil, econômico, efetivo, robusto e seguro a partir de matrizes complexas, explorando as possibilidades oferecidas pela instrumentação analítica moderna (ANASTASSIADES *et al.*, 2003).

QuEChERS é um método que envolve o preparo da amostra, extração com solvente (acetonitrila, acetato de etila ou acetona) e partição com sulfato de magnésio isoladamente ou em combinação com outros sais, seguido de limpeza utilizando SPE (extração em fase sólida). É um método muito flexível e desde a sua criação, ocorreram várias modificações da técnica, dependendo dos tipos de analitos, matrizes, instrumentação e preferências dos analistas quanto aos compostos a extrair. Basicamente, a amostra é extraída com um solvente miscível em água (por exemplo, acetonitrila) na presença de quantidades elevadas de sais (por exemplo, cloreto de sódio e sulfato de magnésio) e de agentes tamponantes (por exemplo, citrato) para induzir a separação de líquido. Após, ocorrem as etapas de agitação e centrifugação e uma alíquota da fase orgânica é submetida a limpeza. A mistura é centrifugada e o

sobrenadante resultante pode ser analisado diretamente ou pode ser submetido a uma concentração, se necessário (MAJORS, 2008).

A utilização de $MgSO_4$ na etapa de partição de fases deve-se à sua elevada capacidade de remoção de água quando comparado aos demais sais. Além de reduzir o volume de fase aquosa, sua hidratação é uma reação exotérmica, resultando no aquecimento da amostra durante as fases de extração/separação, favorecendo a extração, principalmente de substâncias apolares (ANASTASSIADES *et al.*, 2003). O uso de NaCl com $MgSO_4$ é utilizado principalmente para favorecer a transferência de substâncias polares para a fase orgânica. Os sorventes possuem a capacidade de reter interferentes da matriz, permitindo que os analitos permaneçam na fase orgânica (extrato) (PRESTES *et al.*, 2009).

O procedimento QuEChERS vem sendo amplamente utilizado para extração de agrotóxicos, devido a seu custo acessível e sua rapidez (PRESTES *et al.*, 2009). Outra característica interessante é sua eficácia para a extração de analitos com polaridades diferentes em nível de traços em amostras complexas. Este método já foi adaptado para a extração de micotoxinas de vários cereais e derivados, como arroz, trigo e milho (HACKBART, 2012; SIRHAN, 2011). Assim, o procedimento é promissor para extração de toxinas distintas em diversas matrizes (BEMVENUTI *et al.*, 2012).

Um estudo realizado por Ferreira *et al.* (2012) aplicou o uso do método QuEChERS em 30 amostras de pipocas comercializadas em Portugal para a determinação de multimicotoxinas, utilizando para a detecção cromatografia gasosa acoplada à espectrômetro de massas. A Tabela 3 apresenta os resultados referentes à recuperação, repetibilidade, limites de detecção e quantificação para as micotoxinas em estudo. As concentrações fortificadas foram $50 \mu\text{g kg}^{-1}$ para zearalenona (ZON) e $200 \mu\text{g kg}^{-1}$ para deoxinivalenol (DON), fumonisina (FUS), 15-acetil-deoxinivalenol (15-ADON) e nivalenol (NIV).

Tabela 3. Valores de recuperação (R), desvio padrão (RSD), limites de detecção (LOD) e limites de quantificação (LOQ) utilizando QuEChERS em amostras de pipoca.

Micotoxinas	% R	% RSD	LOD ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	LOQ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
DON	75	9	14	42
FUS	85	18	18	54
15-ADON	89	8	41	125
NIV	68	15	59	179
ZON	65	12	7	20

Fonte: Ferreira *et al.*, 2012.

No Brasil, o método QuEChERS vem sendo empregado para extrações de micotoxinas em cereais. Bemvenuti *et al.* (2012) utilizou o método de extração QuEChERS seguido por quantificação por CLAE-UV para avaliar deoxinivalenol (DON) e zearalenona (ZEA) em arroz parboilizado no estado do Rio Grande do Sul. O método apresentou recuperação de 91 % para DON e 105 % para ZEA, com precisão variando de 1,5 a 18,6 %. Os limites de quantificação foram $22,2 \mu\text{g kg}^{-1}$ para DON e $4,3 \mu\text{g kg}^{-1}$ para ZEA.

Amostras de arroz também foram avaliadas através da extração por QuEChERS com detecção por cromatografia líquida com arranjo de diodos para determinação simultânea das micotoxinas citrinina (CIT) e ocratoxina A (OTA), apresentando recuperações de 78 e 105 % respectivamente. Esta extração simultânea das micotoxinas permitiu uma redução de até 25 vezes na quantidade de solventes se comparado com o procedimento de Tanaka (HACKBART *et al.*, 2012).

3.4.1.3 Técnica DLLME (Microextração Dispersiva Líquido-Líquido)

O princípio básico desta técnica é a dispersão de um solvente extrator (imiscível em água) e um solvente dispersor (miscível em água e no solvente extrator) em uma solução aquosa o que proporciona uma grande área de contato entre a fase aquosa e o solvente extrator (REZZAE *et al.*, 2006). Uma mistura apropriada de solvente dispersor e de solvente extrator é injetada na solução aquosa contendo a amostra. Após uma leve agitação forma-se uma solução turva com microgotas. Estas microgotas formadas consistem do solvente extrator mais o analito já extraído. A etapa seguinte de centrifugação permite a sedimentação das microgotas, formando uma fase

sedimentada, que é retirada para posterior análise em instrumento adequado (CALDAS, 2009).

Muitas vantagens da DLLME em relação às outras técnicas convencionais de extração com solvente são evidenciadas como: simplicidade de operação, rapidez, baixo custo devido ao baixo consumo de solventes orgânicos, fácil manipulação, alta recuperação, alto fator de enriquecimento e compatibilidade com os métodos analíticos como análise por Cromatografia Gasosa (CG) (NAGARAJU, HUANG, 2007; XIONG, HU, 2008) e por Cromatografia Líquida (CL) (WEI, WANG, 2007; MELWANKI, FUH, 2008).

Alguns parâmetros influenciam este processo de extração como o volume e o tipo de solvente extrator e de solvente dispersor, tempo de extração, força iônica e pH. A escolha de um solvente extrator apropriado é o parâmetro mais importante na DLLME. O solvente extrator deve ser selecionado dentre os que apresentarem maior densidade que a água, capacidade de extração dos compostos de interesse e bom comportamento cromatográfico. A centrifugação na DLLME é essencial para que se obtenham duas fases distinguíveis nos tubos de extração. Depois da retirada da fase sedimentada, esta pode ser injetada diretamente no equipamento ou evaporada e redissolvida em um solvente apropriado ou derivatizada conforme necessidade de detecção do analito (CALDAS *et al.*, 2011).

A DLLME tem sido muito aplicada na extração de diversos compostos orgânicos como os fármacos e os agrotóxicos. Em micotoxinas, a possibilidade de emprego está na extração quando a matriz empregada for líquida como água e bebidas, ou em extratos aquosos obtidos por outras técnicas como a SLE (Extração Sólido-Líquido).

A SLE é uma operação unitária que consiste na separação de um ou mais componentes de uma mistura sólida através de um solvente líquido (LEDOUX, 2011).

Rubert *et al.* (2012) utilizou a SLE para avaliar simultaneamente 32 micotoxinas produzidas pelos gêneros de fungos *Fusarium*, *Claviceps*, *Aspergillus*, *Penicillium* e *Alternaria* em amostras de cevada, na Espanha. Porções de 2 g de amostras foram extraídas com 10 mL de acetonitrila/água/ácido acético (79:20:1, v/v/v) sob agitação orbital durante 90 min e centrifugadas por 5 minutos a 11000 rpm. O extrato diluído e filtrado foi analisado por cromatografia líquida de ultra-alta pressão acoplada à espectrometria de massas (UHPLC-MS). Os valores de recuperação de algumas

micotoxinas produzidas por *Fusarium*, utilizando a técnica SLE, podem ser observados na tabela 4.

Tabela 4. Valores de recuperação (R) da técnica SLE utilizada para amostras de cevada.

Micotoxina produzida por <i>Fusarium</i>	R (%)
NIV	69,1
D3G	67,2
DON	83,1
3-ADON	83,2
15-ADON	88,2

Fonte: Rubert *et al.*, 2012

Além da agitação orbital mundialmente empregada, a utilização de banhos ultrassônicos também vem demonstrando grande potencial para extrações de diferentes classes de compostos analíticos, que vão desde metais à compostos orgânicos (ESCLAPEZ *et al.*, 2011). O uso de sonicação consiste na aplicação de ondas sonoras com frequências acima de 20 Hz, que viajam pela matéria/líquido, focando suas energias em uma zona localizada da amostra, proporcionando uma extração rápida. Outra vantagem do uso de banhos ultrassônicos é o baixo custo (RAMOS, 2011).

3.4.1.4 Técnica MSPD (Dispersão da Matriz em Fase Sólida)

A MSPD é uma alternativa às técnicas clássicas de preparação de amostra, pois permite uma redução significativa da quantidade de amostra e de solvente utilizados para uma análise multirresíduo (DÓREA, LANÇAS, 1999). A dispersão da matriz em fase sólida consiste na homogeneização de uma pequena quantidade de amostra (0,1 a 5 g) com um material adsorvente. Esta mistura é transferida para uma coluna ou cartucho. Os analitos são extraídos com solventes orgânicos que percolam pela coluna. O mecanismo de MSPD apresenta as seguintes etapas: homogeneização da amostra, rompimento celular, extração, fracionamento e purificação em um simples processo (TEKEL, HATRIK, 1996; TORRES, PICO, 1997).

A técnica MSPD envolve a dispersão da amostra sobre um suporte sólido, seguida de eluição. Os suportes sólidos podem ser constituídos de um único material, como florissil, sílica ou alumina ou podem ser suportes recobertos por uma fase orgânica como C₁₈, amino, ciano etc. Neste último caso, é adicionada uma nova dimensão ao processo: a fase orgânica ligada age como um solvente ou detergente que dissolve e dispersa os componentes da amostra na fase ligada, além de promover a dispersão na superfície do suporte sólido (BARKER, 2000).

Os fatores que afetam a dispersão da matriz na fase sólida são os seguintes: a natureza do suporte sólido (tamanho do poro, base de sílica ou polimérica), a natureza da fase ligada ao suporte (fase reversa, fase normal e com ou sem pré-condicionamento da fase), a natureza da amostra, modificações na matriz e a natureza e a ordem dos solventes de eluição (BARKER, 2002).

Um método baseado na técnica MSPD foi desenvolvido recentemente na Espanha para a determinação de cinco micotoxinas (aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂ e ocratoxina A) em três matrizes diferentes (café, malte e cevada) adquiridas no comércio local. Diversos dispersantes e eluentes foram testados durante a otimização do processo, sendo que os melhores resultados foram obtidos utilizando-se C₁₈ como suporte sólido e acetonitrila como solvente extrator. As análises foram realizadas por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas. As recuperações do processo variaram de 64 % a 91 % com desvio padrão relativo inferior a 19 % em todos os casos. Os limites de detecção foram de 0,3 µg kg⁻¹ para as aflatoxinas a 2 µg kg⁻¹ para a ocratoxina A (SOLER *et al.*, 2010).

Rubert *et al.* (2011) também na Espanha, investigou a presença dos tricotecenos DON e NIV em amostras de farinhas de trigo coletadas nos mercados de Valência através da técnica MSPD, utilizando como suporte sólido C₁₈ e a mistura de metanol e acetonitrila 50:50 (v/v) como solvente extrator e quantificação por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas. Os limites de detecção foram 75 µg kg⁻¹ para NIV e 20 µg kg⁻¹ para DON e os limites de quantificação foram de 85 µg kg⁻¹ e 31 µg kg⁻¹ para NIV e DON, respectivamente. As recuperações foram de aproximadamente 77 % para NIV e 90 % para DON. Das 50 amostras analisadas, 9 apresentaram NIV (<LOQ – 105 µg kg⁻¹) e 5 apresentaram DON (45 – 367 µg kg⁻¹).

No Brasil, a técnica de MSPD é muito utilizada para determinação de agrotóxicos em alimentos. Rodrigues (2010) determinou resíduos de agrotóxicos em amostras de cebola empregando MSPD e cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas. Os limites de quantificação para o método ficaram na faixa de 0,01 - 0,1 mg kg⁻¹ e as recuperações entre 83 – 120 % para a repetibilidade, com desvio padrão relativo de 1,7 a 15,4 % para todos os compostos.

3.4.2 Métodos de detecção

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é a mais usada de todas as técnicas analíticas de separação. Isso ocorre devido a sua alta sensibilidade, sua adequação a separação de espécies não voláteis ou termicamente frágeis e, acima de tudo, a sua aplicabilidade (SKOOG *et al.*, 2002). Um grande número de detectores já foi descrito e desenvolvido, no entanto, grande parte das análises contemporâneas de CLAE utilizam detectores ultravioleta em alguma de suas formas como condutividade elétrica, fluorescência, índice de refração e espectrômetro de massas (FU *et al.*, 2009).

Os compostos que absorvem no UV são aquelas substâncias que absorvem luz na faixa de 180 a 350 nm. As substâncias que absorvem nessa faixa incluem as que possuem uma ou mais duplas ligações e substâncias que possuem elétrons não ligantes, como: olefinas, aromáticos, compostos que contêm bromo, iodo ou enxofre, grupo carbonila, grupo nitro, íons inorgânicos e duas duplas conjugadas (SCOTT, 2003; COLLINS *et al.*, 2006).

O detector UV associado a CLAE é bastante comum. Durante a análise, a amostra passa através de uma célula de vidro incolor, transparente, chamada cela de amostra. Quando a luz UV incide nessa célula, parte da luz é absorvida pela amostra. Assim, as intensidades da luz UV observadas para a fase móvel (sem amostra, cela de referência) e para o eluente contendo amostra serão diferentes. Medindo-se essa diferença, a quantidade de amostra pode ser determinada. Como a absorbância UV também difere, dependendo do comprimento de onda usado, é importante que este seja escolhido adequadamente, com base no tipo de analito. Um detector padrão de UV permite ao usuário escolher comprimentos de onda entre 195 e 370 nm (SKOOG, 1999).

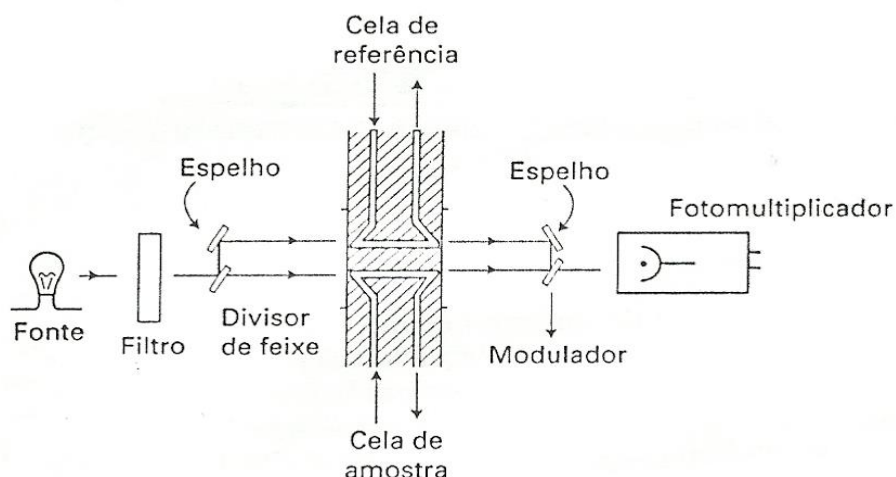


Figura 8. Esquema de detector fotométrico (SOARES, 2006).

Sendo que, entre os detectores ultravioleta mais poderosos, encontram-se os equipamentos com arranjo de diodos (DAD). Nos detectores DAD a coleta de dados é feita em um espectro inteiro, na região do ultravioleta e do visível (90 a 880 nm), em aproximadamente 1 segundo. Dessa forma, dados espectrais podem ser coletados e armazenados para cada pico cromatográfico que aparecem na saída da coluna (SKOOG *et al.*, 2002). Um DAD permite checar a identidade do composto e a pureza do pico, a qual é examinada comparando os espectros em diversos pontos do pico cromatográfico, como no início, no ápice e no fim. Se ocorrer a sobreposição desses espectros, o pico é puro e isto fornecerá um dado extra ao analista que assim saberá se há ou não interferentes eluindo juntamente com o analito (SOARES, 2001; COLLINS *et al.*, 2006). O uso de detectores acoplados a CLAE permite que o espectro de cada composto possa ser obtido, apresentando um caminho adicional para confirmar a identidade do pico (LANÇAS, 2003).

A Figura 9 ilustra um diagrama de funcionamento do DAD. A luz de uma fonte de emissão (lâmpada de deutério, por ex.) é colimada através de um sistema de espelhos sobre a amostra. A luz total que passa através da célula contendo a amostra incide sobre uma rede de difração. Esta rede irá difratar a radiação, separando os seus diferentes comprimentos de onda, sendo que cada um deles irá incidir sobre um arranjo de diodos. Estes diodos, ao serem irradiados, produzem uma corrente elétrica cuja magnitude depende da intensidade da emissão. Através de um circuito adequado, esta

corrente será transformada em absorbância nos diferentes comprimentos de onda, resultando no espectro de absorção da substância (SCOTT, 2003 a).

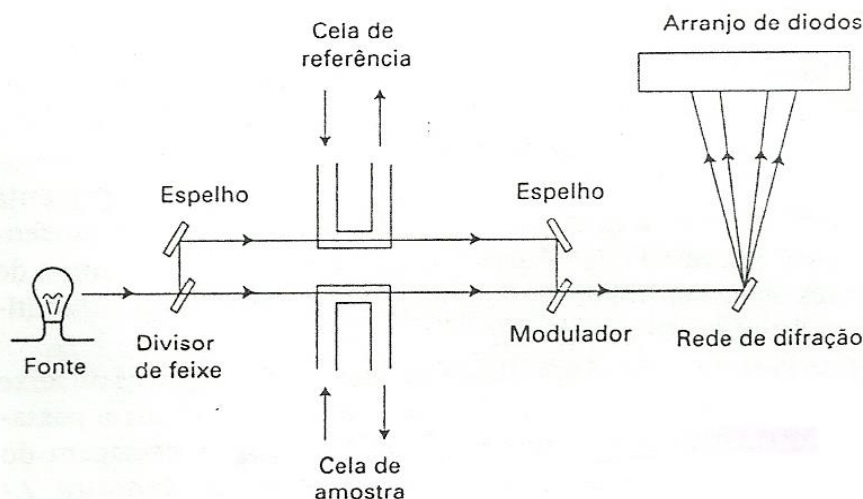


Figura 9. Esquema de detector de comprimento de onda múltiplo (DAD) (SOARES, 2006).

A cromatografia líquida acoplada a detector de espectrômetro de massas (MS) também vem sendo muito utilizada para a detecção de micotoxinas multiclasses devido a sua alta seletividade e sensibilidade (REN *et al.*, 2007). O espectrômetro de massas é um detector utilizado para o estudo das massas de átomos, moléculas ou fragmentos de moléculas. Para se obter um espectro de massa, as moléculas no estado gasoso ou as espécies dessorvidas a partir de fases condensadas são ionizadas. Os íons obtidos são acelerados por um campo elétrico e separados de acordo com a razão entre a sua massa e a sua carga elétrica (m/z) (HARRIS, 2003).

A cromatografia gasosa (CG), associada a detectores MS ou FID, é a técnica mais utilizada para a determinação dos tricotecnos em geral, por possibilitar a separação de substâncias muito semelhantes entre si no estado natural. Possui alta precisão para compostos mais voláteis e apolares, no entanto compostos polares e pouco voláteis também podem ser analisados com o auxílio de reações de derivatização, como acilação e alquilação (MENEELY *et al.*, 2011; REN *et al.*, 2007).

A Tabela 5 apresenta exemplos da aplicabilidade dos métodos de detecção por cromatografia para a análise de compostos em diferentes matrizes, utilizando diferentes métodos e técnicas de preparo de amostra.

Tabela 5. Técnicas de preparo de amostra e métodos de detecção de analitos utilizados para diferentes matrizes.

Preparo de amostra	Matriz	Analito	LOD/LOQ	Recuperação (%)	Análises	Autor
Tanaka	Trigo	DON, 3-ADON, NIV	5-10 ng g ⁻¹ (LOD)	83 – 88	CG-EM	Tanaka <i>et al.</i> , 2000
Tanaka	Arroz	OTA, CIT	2,4-3,0 µg kg ⁻¹ (LOQ)	62 – 98	CLAE-DAD	Hackbart <i>et al.</i> , 2012
QuEChERS	Arroz	DON, ZEA	4,3-22,20 µg kg ⁻¹ (LOQ)	91 – 105	CLAE-UV	Bemvenuti <i>et al.</i> , 2012
QuEChERS	Trigo	DON	50 µg kg ⁻¹ (LOQ)	92	CLAE-UV	Pussemier <i>et al.</i> , 2006
QuEChERS	Pipoca	DON, 15-ADON, NIV	135-196 µg kg ⁻¹ (LOQ)	61 – 109	CG-EM	Ferreira <i>et al.</i> , 2012
QuEChERS	Farinha de Trigo	NIV, DON, D3G	12,5 µg kg ⁻¹ (LOQ)	53 – 86	CLAE-EM	Malachova <i>et al.</i> , 2011
MSPD	Cevada	NIV, D3G, DON, 3-ADON, 15-ADON	50-100 µg kg ⁻¹ (LOD)	60 – 78	CLAE-EM	Rubert <i>et al.</i> , 2012
MSPD	Farinha de Trigo	NIV, DON	45-367 µg kg ⁻¹ (LOQ)	68,7 – 88	CLAE-EM-EM	Rubert <i>et al.</i> , 2011
SLE	Cevada	NIV, D3G, DON, 3-ADON, 15-ADON	50-100 µg kg ⁻¹ (LOD)	67 – 88	CLAE-EM	Rubert <i>et al.</i> , 2012
DLLME	Bebidas	Aminas	1,0-9,5 µg L ⁻¹ (LOQ)	72 – 113	CG-EM	Almeida <i>et al.</i> , 2012

3.5 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS

A validação de um método analítico envolve um procedimento o qual prova que o método fornece os resultados esperados com credibilidade, precisão e exatidão adequadas (LANÇAS, 2004). Essa validação é um processo contínuo que começa no planejamento da estratégia analítica e continua ao longo de todo o seu desenvolvimento e transferência. Um novo método analítico deve passar por uma validação para garantir que as informações geradas por este método forneça informações confiáveis e interpretáveis sobre a amostra (RIBANI *et al.*, 2004).

Segundo a ANVISA (2003), através dos estudos experimentais, a validação deve garantir que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, garantindo a confiabilidade dos resultados.

Muitos autores definem validação de métodos e pode-se dizer que os conceitos continuam evoluindo e estão constantemente sob consideração pelas agências reguladoras (RIBANI *et al.*, 2004).

Entre os vários trabalhos existentes na literatura que descrevem os parâmetros analíticos avaliados existe uma conformidade entre eles, sendo que os parâmetros que sempre estão presentes são: curva analítica e linearidade, limite de detecção e limite de quantificação, precisão e exatidão.

3.5.1 Curva analítica e linearidade

A curva analítica estabelece uma relação entre a resposta do equipamento e as várias concentrações do analito em estudo. Esta relação matemática pode ser expressa através de um gráfico chamado equação da reta, o qual pode ser denominado como curva analítica (LANÇAS *et al.*, 2004; RIBANI *et al.*, 2004).

Dessa forma, é necessário um número mínimo de soluções-padrão aceitos nos gráficos de calibração que varia entre cinco e seis níveis de concentração. Essas concentrações devem ser escolhidas de forma a cobrir uma faixa de 50 a 150% do valor que se espera encontrar na amostra em estudo (INMETRO, 2003)

A ANVISA especifica um mínimo de cinco pontos na curva analítica e os gráficos de calibração devem ser apresentados juntamente com um tratamento estatístico adequado, o qual deve envolver, no mínimo, a equação da função (normalmente uma

reta), a análise de regressão e os dados de correlação e determinação (ANVISA, 2003; LANÇAS *et al.*, 2004).

Assim, através do método matemático conhecido como regressão linear (Equação 1) pode-se efetuar a estimativa dos coeficientes de uma curva analítica através de um conjunto de medições experimentais (INMETRO, 2003).

$$y = ax + b \quad (1)$$

Onde:

y = variável dependente (resposta medida: altura ou área do pico)

x = variável independente (concentração)

a = coeficiente angular (inclinação da curva analítica = sensibilidade)

b = coeficiente linear (interseção com o eixo y)

A linearidade de um método analítico é definida como sendo a facilidade deste método em gerar resultados diretamente proporcionais a concentração do analito, em uma determinada faixa de concentração (INMETRO, 2003). Assim, a linearidade de um método pode ser observada através do gráfico dos resultados em função da concentração do analito ou então calculados a partir da equação da regressão linear, determinada pelo método dos mínimos quadrados. Para indicar o quanto pode ou não ser adequada a reta como modelo matemático, utiliza-se o coeficiente de correlação linear (r). O INMETRO recomenda um valor acima de 0,90 e a ANVISA um valor igual ou acima a 0,99 (INMETRO, 2003; RIBANI *et al.*, 2004).

Sospedra *et al.* (2010) utilizaram uma faixa linear de 100 – 1500 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para avaliar DON e NIV em amostras de farinha de trigo, utilizando CL-EM. Em outro estudo realizado para a determinação de tricotecenos (DON, ADONS e NIV) em amostras de cevada foi utilizada a faixa de 10 – 1000 $\mu\text{g kg}^{-1}$ em UHPLC-EM (Rubert *et al.*, 2012). Ferreira *et al.* (2012) utilizaram 50 – 2000 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para estabelecer a faixa de linearidade em um estudo em que foram avaliados teores de DON, 15-ADON e NIV em amostras de pipoca por CG-EM. Na maioria dos estudos referentes a tricotecenos em cereais e derivados, a faixa de linearidade permanece em torno de 10 – 2000 $\mu\text{g kg}^{-1}$.

Em validação, a quantificação do composto de interesse pode ser obtida através de diferentes formas de padronização, de acordo com o tratamento utilizado para a amostra e o tipo de análise: padronização externa, padronização interna, adição padrão e superposição de matriz. A padronização externa compara as áreas obtidas a partir dos padrões de calibração com a área do pico do analito a ser quantificado. Já a padronização interna consiste a preparação dos padrões de calibração contendo diferentes concentrações do analito, nos quais se adiciona uma concentração fixa de padrão interno (PI). A adição padrão consiste na adição de diferentes concentrações do analito à matriz que já possui uma quantidade desconhecida do mesmo (CASSIANO *et al.*, 2009).

O método de superposição de matriz pode ser utilizado para a calibração, tanto com a padronização interna como a externa. Este método consiste na adição do padrão da substância em diversas concentrações em uma matriz semelhante à da amostra, que esteja isenta da substância. É construído um gráfico de calibração que relaciona as áreas obtidas com as concentrações dos padrões. A superposição de matriz é usada para compensar o efeito da matriz ou de possíveis interferentes e é de extrema importância quando a matriz pode interferir na pré-concentração, extração, separação ou detecção da substância de interesse. Comparando-se com o método de padronização externa, sua principal vantagem é que fornece uma melhor correspondência com a composição da amostra (RIBANI *et al.*, 2004).

3.5.2 Limite de detecção e limite de quantificação

O limite de detecção (LOD) e o limite de quantificação (LOQ) são utilizados para demonstrar se um método é capaz de detectar e quantificar baixas concentrações de um analito. O LOD corresponde à menor concentração de um analito que pode ser detectada e que o método seja capaz de diferenciar confiavelmente do ruído. O LOQ é definido como a menor quantidade de um analito que pode ser quantificada com exatidão e precisão aceitáveis (INMETRO, 2003; LANÇAS, 2004).

Tanto o LOD como o LOQ podem ser estimados através do método visual, do método relação sinal/ruído e do método baseado em parâmetros da curva analítica. Para as técnicas analíticas em geral, o método mais utilizado é o da relação sinal/ruído onde é feita a comparação entre a medição dos sinais de amostras em baixas

concentrações conhecidas do composto de interesse na matriz e um branco (matriz isenta do composto de interesse) destas amostras. Para estimar o limite de detecção e quantificação, geralmente considera-se aceitável a razão de sinal/ruído com valor 3 e 10, respectivamente (RIBANI *et al.*, 2004; CASSIANO *et al.*, 2009).

Estudos revelam que os limites de quantificação para DON estão na faixa de 5 a 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para a análise de cereais, por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas. Para a quantificação de NIV em amostras de cereais, a faixa de limite de quantificação fica em torno de 100 a 180 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e para os ADONS esta faixa é de 50 a 125 $\mu\text{g kg}^{-1}$. (SOSPEDRA *et al.*, 2010; Rubert *et al.*, 2012; Ferreira *et al.*, 2012).

3.5.3 Exatidão

A exatidão mede o quanto o valor obtido se assemelha ao valor tido como referência aceito como verdadeiro (LANÇAS, 2004). Normalmente, a exatidão é expressa em termos de percentagem e os processos mais utilizados para avaliar a exatidão de um método são o uso de materiais de referência, a comparação de métodos, os ensaios de recuperação e a adição padrão (INMETRO, 2003; RIBANI *et al.*, 2004).

Para avaliar a exatidão sempre se devem considerar certos limites, a um dado nível de significância, ou seja, a exatidão aparece sempre associada a valores de precisão. Estes valores podem ser estreitos em níveis de concentração elevados e mais amplos em níveis traços. O número de ensaios varia de acordo com a diretriz adotada, com a legislação ou com as características da pesquisa. A ANVISA recomenda ensaios em triplicata para três níveis de concentração (ANVISA, 2003; RIBANI *et al.*, 2004).

O ensaio de recuperação é o procedimento mais utilizado para avaliar a exatidão de um método e é calculado comparando-se a resposta obtida para o analito adicionado na matriz em estudo e extraído com a resposta obtida para o analito em amostras preparadas em solvente (BRITO *et al.*, 2003; CASSIANO *et al.*, 2009).

Os estudos em relação aos ensaios de recuperação para os tricotecnos em amostras de cereais demonstram que estes permanecem dentro da faixa permitida pela legislação, ou seja, em torno de 70 a 120 %. Sospedra *et al.* (2012) obtiveram

recuperações de 86 e 100 % para DON e NIV, respectivamente, em amostras de farinha de trigo extraídas por QuEChERS e analisadas por CL-EM. Ferreira *et al.* (2012) analisaram 15-ADON em amostras de pipoca e apresentaram uma recuperação que variou de 75 a 85 %, utilizando extração por QuEChERS e CG-EM. Bemvenuti *et al.* (2012) apresentou uma recuperação de 91 % para DON em amostras de arroz, com extração por QuEChERS e detecção por CLAE-UV.

Outra forma de avaliar a exatidão de um método é a utilização de materiais de referência certificados, os quais vêm acompanhados de certificados fornecidos por organismos reconhecidos e confiáveis. Comparam-se os valores obtidos pelo laboratório da mesma amostra padrão com os valores certificados do material de referência. Para a análise de resíduos, geralmente, os intervalos aceitáveis de recuperação estão entre 70 e 120 %, com precisão de até ± 20 %, porém dependendo da complexidade da amostra analítica, este valor pode ser de 50 a 120 %. (RIBANI *et al.*, 2004).

3.5.4 Precisão

A precisão representa a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, sob certas condições definidas (INMETRO, 2003).

Normalmente, a precisão é expressa como desvio padrão relativo, sendo aceitáveis valores de até 20 % para a análise de componentes traço. A precisão pode ser avaliada em três níveis: reprodutibilidade, repetibilidade e precisão intermediária (BRITO *et al.*, 2003).

A reprodutibilidade é o grau de concordância entre os resultados das medições de uma mesma amostra, efetuadas sob variação de condições como mudança de operador, local, equipamentos, etc (INMETRO, 2003). A reprodutibilidade refere-se aos resultados dos estudos de colaboração entre laboratórios e deve ser considerada quando se quer a padronização e inclusão de procedimentos analíticos (RIBANI *et al.*, 2004).

O termo repetibilidade representa a concordância entre os resultados de medições sucessivas de um mesmo método, realizadas sob as mesmas condições em um curto intervalo de tempo: mesmo procedimento, mesmo analista, mesmo

instrumento e condições, mesmo local. O termo repetitividade é adotado pelo INMETRO, por outro lado a ANVISA utiliza a mesma definição para o termo repetibilidade. A ANVISA sugere que a repetibilidade seja verificada a partir de um mínimo de nove determinações, ou seja, três níveis com três repetições cada um, ou a partir de um mínimo de seis medições a uma concentração semelhante ao valor esperado (ANVISA, 2003; INMETRO, 2003; RIBANI *et al.*, 2004).

A precisão intermediária é reconhecida como a mais representativa da variação dos resultados em um único laboratório e, assim, a mais aconselhável a ser adotada. É definida como a habilidade que o método possui em fornecer os mesmos resultados quando as análises são conduzidas no mesmo laboratório, porém em diferentes dias, por diferentes analistas e/ou diferentes equipamentos. A precisão intermediária é determinada através da mesma avaliação da repetibilidade, descrita anteriormente, seguindo as recomendações da ANVISA (CASSIANO *et al.*, 2009; RIBANI *et al.*, 2004).

3.5.5 Sensibilidade e Seletividade

A sensibilidade depende da natureza do analito e da técnica de detecção utilizada. É um parâmetro que demonstra a variação da resposta em função da concentração do analito (INMETRO, 2003). A sensibilidade pode ser determinada por intermédio da inclinação do gráfico de calibração. No caso de uma reta, quanto maior o ângulo de inclinação da reta, mais sensível será o método (LANÇAS, 2004).

A seletividade corresponde à capacidade de um método em determinar o analito de maneira inequívoca na presença de outras substâncias susceptíveis de interferirem na determinação (LANÇAS, 2004). Os interferentes podem aumentar ou reduzir o sinal, e a magnitude do efeito também pode depender da concentração (INMETRO, 2003). No caso de amostras alimentícias, o principal interferente é o teor de gordura (WALORCZYK, 2007).

A cromatografia é um poderoso método de separação de compostos mas não de identificação e, apenas, fornece dados auxiliares na identificação de compostos. Para comprovar a identificação de um composto com tempo de retenção definido pode ser comparado o seu tempo de retenção com o dos padrões de referência, ou utilizar a co-cromatografia, que consiste em adicionar uma quantidade de padrão na amostra e verificar aumento da área do pico ou surgimento de outro pico (SOARES, 2001).

3.5.6 Efeito Matriz

O efeito matriz ocorre quando substâncias da matriz co-eluem com as substâncias de interesse, suprimindo ou enriquecendo o sinal dos analitos (TAYLOR, 2005; RODRIGUES, 2010). O exato mecanismo pelo qual ocorre o efeito matriz é desconhecido, mas, provavelmente, é originado da competição entre um analito e a co-eluição de um componente da matriz não-monitorado (RODRIGUES, 2010).

Assim, existem procedimentos que promovem a compensação da ocorrência do efeito de matriz como a utilização de analitos protetores, função de correção, adição de padrão e curva analítica preparada pela dissolução dos padrões em extratos da matriz (PINHO *et al.*, 2010).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

O desenvolvimento experimental consistiu em avaliar um procedimento de extração simultânea dos tricotecenos em amostras de grãos de trigo. Foi realizada a comparação de métodos e técnicas de extração: QuEChERS (Bemvenuti, 2012), extração sólido-líquida descrita pelo método de Tanaka *et al.* (2000), MSPD (Rubert *et al.*, 2011) e DLLME (Rezaee *et al.*, 2006) e, após este estudo, foi padronizado um procedimento de extração QuEChERS utilizando como referência o método QuEChERS modificado proposto por Ferreira *et al.* (2012) e Bemvenuti (2012).

As técnicas CLAE-UV e CLAE-DAD foram empregadas para a separação e identificação dos compostos. O tempo de retenção dos padrões das micotoxinas, bem como o tempo total de eluição foram utilizados para se estabelecer as condições de separação cromatográfica. Para a validação do método foram adotados os seguintes parâmetros: curva analítica e linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, precisão, exatidão, sensibilidade, seletividade e efeito matriz.

Os experimentos do trabalho foram realizados no Laboratório de Micotoxinas e Ciência de Alimentos e com parceria no Laboratório de Análises de Compostos Orgânicos e Metais (LACOM), todos pertencentes à Escola de Química e Alimentos (EQA) da Universidade Federal do Rio Grande (FURG).

4.1 MATERIAIS

4.1.1 Equipamentos

- Balança analítica de precisão FA2104N BIOPRECISA (São Paulo, Brasil);
- Banho ultrassônico 25 mHz UNIQUE (São Paulo, Brasil);
- Banho ultrassônico UNIQUE Ultra Cleaner 700 (Brasil);
- Banho maria BIOPAR COEL TLK 48 (Brasil);
- Bomba de vácuo PRISMATEC (São Paulo, Brasil);
- Microcentrífuga MINISPIN (Brasil);
- Centrífuga refrigerada CIENTEC CT-5000R (São Paulo, Brasil);
- Coluna analítica Gemini C₁₈ (250 x 4,5 mm, 5 µm) PHENOMENEX (EUA);

- Concentrador TECNAL TE-019 (São Paulo, Brasil);
- Cromatógrafo Líquido SHIMADZU (Quioto, Japão) equipado com sistema administrador CBM-20A módulo LC-20AT, degaseificador DGU-20A₅ e detector UV-VIS SPD-20A, conectado em *software LC solution data acquisition*, injetor Rheodyne loop 20 MI;
- Cromatógrafo Líquido WATERS (Miliford, MA, EUA) equipado com detector por arranjo de diodo 2996 (PDA), com bomba quaternária modelo 600, alça de injeção de 20 µL, sistema de aquisição de dados software Empower PDA;
- Destilador de água QUIMIS 341-25 (Brasil);
- Espectrofotômetro modelo Cary 100 – UV-VISIBLE VARIAN (Walnut Creek, EUA);
- Evaporador Rotativo QUIMIS Q-344B2 (Brasil);
- Micropipetadores automáticos com capacidade variável de 10 – 1000 µL;
- Moinho TECNAL TE-631 (São Paulo, Brasil);
- Shaker incubadora TECNAL TE-420 (São Paulo, Brasil);
- Sistema de purificação de água Mili-Q Direct-Q UV3 MILLIPORE (EUA);
- Vórtex Mixer VIXAR (Coreia).

4.1.2 Reagentes, solventes e materiais

- Acetato de sódio P.A. VETEC (Brasil);
- Acetonitrila grau HPLC PANREAC (Espanha);
- Acetonitrila P.A. VETEC (Brasil);
- Água destilada;
- Água ultrapura purificada em sistema Direct-Q UV3 MILLIPORE (resistividade de 18,2 MΩ cm);
- Celite NUCLEAR (Brasil);
- C₁₈ HEXIS (Brasil);
- Cloreto de sódio SYNTH (Brasil);
- Clorofórmio P.A. SYNTH (Brasil);
- Frascos de vidro âmbar, capacidade de 10 a 50 mL;
- Gás nitrogênio;

- Hexano P.A. SYNTH (Brasil);
- Membrana de acetato de celulose de 47 mm de diâmetro e 0,45 µm de diâmetro de poro MILLIPORE (São Paulo, Brasil);
- Metanol P.A. SYNTH (Brasil);
- Padrões analíticos: Deoxinivalenol, 3-acetil-deoxinivalenol, 15-acetil-deoxinivalenol, Nivalenol SYGMA-ALDRICH (EUA);
- Material de referência certificado DON em trigo BIOPURE (EUA);
- Vidraria comum de rotina (béquer, erlenmeyer, pipetas volumétricas, balões volumétricos etc...).

4.1.3 Preparo das soluções analíticas

As soluções analíticas estoque das micotoxinas foram preparadas a partir de recipientes comerciais que continham 1 mg de cada micotoxina. Cada uma das micotoxinas foi dissolvida em benzeno:acetonitrila (95:5 v/v) até uma concentração de 100 µg mL⁻¹. Após, cada uma destas soluções estoque foi diluída de modo a se obter soluções padrão cujas concentrações corresponderiam a 50 µg mL⁻¹ segundo relação massa/volume e confirmada por espectrofotometria, de acordo com metodologia descrita por Bennett e Shotwell (1990) e Krska *et al.* (2007).

Foram utilizados os valores da absorvidade molar (ϵ) e comprimentos de onda de máxima absorbância, de acordo com a Tabela 6, para estimar a concentração das soluções trabalho, conforme a Equação 2.

Tabela 6. Absortividades molares e comprimentos de onda de máxima absorbância de cada tricoteceno em estudo (KRSKA *et al.*, 2007).

Micotoxinas	Absortividades molares* (ϵ)	Comprimentos de onda de máxima absorbância (nm)
Deoxinivalenol	6808	220
3-acetil-deoxinivalenol	6911	220
15-acetil-deoxinivalenol	6895	220
Nivalenol	6836	220

*Em acetonitrila

A quantificação das soluções padrão de cada uma das micotoxinas foi realizada após a varredura no espectro ultravioleta e verificação da pureza de cada composto.

$$\mu\text{g mL}^{-1} = \text{Abs.} \times \text{M.M.} \times 1000 \times \text{F.C.} \times \epsilon^{-1} \times \text{C}^{-1} \quad (2)$$

Onde:

Abs = valor da absorbância da solução padrão

M.M. = massa molecular da micotoxina

FC = fator de correção do instrumento

ϵ = absortividade molar da micotoxina no comprimento de onda de máxima absorbância em acetonitrila

C = largura da cubeta (1 cm)

A solução trabalho contendo a mistura das quatro micotoxinas foi preparada na concentração de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ e diluições foram realizadas para o preparo das curvas analíticas. A solução trabalho foi preparada mensalmente e as diluições utilizadas foram preparadas diariamente.

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Amostragem

Uma amostra de grãos de trigo adquirida no comércio local (500 g) foi empregada para os procedimentos de extração das micotoxinas. Esta amostra foi moída em moinho de facas e peneirada em malha de 32 mesh. A fração obtida foi submetida a homogeneização e posterior quarteamento. O quarteamento foi realizado manualmente até se obter a quantidade correspondente a amostra analítica, sendo fortificada com diferentes níveis de concentração dos tricotecenos em estudo e, posteriormente, extraída pelos métodos Tanaka e QuEChERS e pelas técnicas DLLME e MSPD.

4.2.2 Comparação entre os métodos e as técnicas de extração

Primeiramente, dois métodos e duas técnicas de extração foram testados quanto a capacidade de extrair simultaneamente os tricotecenos de amostras de grãos de trigo adquiridas comercialmente. Os métodos foram: Tanaka *et al.* (2000); QuEChERS modificado por Bemvenuti (2012); Técnica SLE (Extração Sólido-Líquido) acoplada à DLLME (Microextração Dispersiva Líquido-Líquido) desenvolvida por Rezaee *et al.* (2006) e a Técnica MSPD (Dispersão da Matriz em Fase Sólida) validada por Rubert *et al.* (2011).

As amostras foram fortificadas com 1000 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de cada micotoxina, para posterior avaliação da recuperação. Os resíduos secos obtidos após cada extração foram ressuspensos em 1 mL de acetonitrila, agitados em banho de ultrassom por 30 seg e centrifugados durante 5 min a 1200 xg . As micotoxinas foram identificadas e quantificadas através da cromatografia líquida de alta eficiência com detector ultravioleta (CLAE-UV).

- Extração sólido-líquido segundo Tanaka *et al.* (2000), conforme Apêndice 1: a 10 g de amostra foram adicionados 100 mL da mistura acetonitrila:água (3:1). A mistura foi homogeneizada em agitador orbital (30 min / 800 xg) e filtrada para um balão de separação. A limpeza do extrato foi realizada adicionando 3 porções de 10 mL de hexano. Após foi adicionado 1 g de NaCl e agitado para a separação de fases. A fração orgânica foi recolhida em balão de fundo chato e rotaevaporada a 70 °C até a secura.

No balão foram adicionados 30 mL da mistura clorofórmio:metanol (9:1), agitado em banho ultrassônico e centrifugado (10 min / 3220 xg). O sobrenadante foi seco em banho-maria a 60 °C. Para a quantificação, o resíduo seco foi ressuspenso em 1 mL de acetonitrila.

- QuEChERS modificado por Bemvenuti (2012), conforme Apêndice 2: a 10 g de amostra foram adicionados 20 mL de água destilada e 20 mL de acetonitrila. A mistura foi homogeneizada em agitador orbital (5 min /800 xg) e, após, adicionados 1,5 g de sulfato de magnésio e 0,85 g de acetato de sódio, sendo agitada por 5 min em vortex. O extrato foi centrifugado (10 min / 3220 xg) e adicionados 0,3 g de sulfato de magnésio e 0,2 g de celite em 6 mL do sobrenadante, seguida de agitação por 1 min. O sobrenadante (3 mL) foi seco sob nitrogênio. Para a quantificação, o resíduo seco foi ressuspenso em 1 mL de acetonitrila.

- Técnica SLE (Extração Sólido-Líquido) acoplada à DLLME (Microextração Dispersiva Líquido-Líquido) desenvolvida por Rezaee *et al.* (2006), conforme Apêndice 3: primeiramente, foi realizada a extração por SLE. 10 g de amostra foram homogeneizadas com 40 mL da mistura acetonitrila:água (3:1) em agitador orbital (5 min / 800 xg), após o extrato foi filtrado. Na técnica DLLME, foi adicionado 440 µL de clorofórmio à uma alíquota de 2 mL de extrato, obtido pela técnica SLE, em um tubo de centrífuga contendo 6 mL de água. O tubo foi agitado em vortex (30 seg). A solução turva formada foi centrifugada (5 min / 3220 xg). A maior parte do sobrenadante foi removida e transferidos 300 µL da fase sedimentada de clorofórmio para um frasco. O extrato obtido foi seco sob um fluxo de nitrogênio. Para a quantificação, o resíduo seco foi ressuspenso em 1 mL de acetonitrila.

- Técnica MSPD (Dispersão da Matriz em Fase Sólida) validada por Rubert *et al.* (2011), conforme Apêndice 4: 1 g de amostra foi homogeneizada em almofariz e misturada a 1 g de C₁₈ durante 5 min. A mistura foi transferida para um tubo juntamente com 20 mL de acetonitrila/metanol (50/50,v/v), agitada em vortex por 1 min, colocada em banho ultrassônico (25 MHz) por 10 min e centrifugada (5 min / 3220 xg). O extrato obtido foi evaporado até à secura. Para a quantificação, o resíduo seco foi ressuspenso em 1 mL de acetonitrila.

Após o estudo envolvendo os quatro métodos de extração, foi realizado um outro teste utilizando um método QuEChERS modificado por Ferreira *et al.* (2012).

- QuEChERS adaptado de Ferreira *et al.* (2012), conforme Apêndice 5: a 10 g de amostra foi adicionado 20 mL de água destilada. Para a limpeza do extrato, foi realizada a partição líquida adicionando à mistura 10 mL de hexano por 3 vezes. Foi adicionado 20 mL de acetonitrila e a mistura foi agitada em agitador orbital por 20 min a 800 *xg*. Após, foram adicionados 4,0 g de sulfato de magnésio e 1,0 g de cloreto de sódio e a mistura foi agitada por 5 min em vortex. O extrato foi centrifugado (10 min / 3220 *xg*) e ao sobrenadante (10 mL) foi adicionado 0,9 g de sulfato de magnésio e 0,3 g de C₁₈, este foi agitado por 30 seg em vortex. A mistura foi centrifugada novamente por 5 min a 3220 *xg*. O sobrenadante (3 mL) foi seco sob nitrogênio. Para a quantificação, o resíduo seco foi ressuspenso em 1 mL de acetonitrila.

4.2.3 Otimização do procedimento de extração QuEChERS

Com base nos dados obtidos da avaliação da extração de micotoxinas, foi otimizado o método descrito por Ferreira e colaboradores (2012) que desenvolveram um método para a determinação de tricotecenos em amostras de pipoca empregando QuEChERS modificado. As modificações avaliadas se basearam no método QuEChERS original (ANASTASIADIS *et al.*, 2003). Assim, foram realizados ensaios para avaliar a influência dos sais na etapa de separação de fases e adição de sal e sorvente na etapa de *clean-up*.

Um delineamento composto central (DCC) 2⁴, foi realizado para otimizar o método QuEChERS quanto à extração simultânea dos tricotecenos em amostras de grãos de trigo. As variáveis avaliadas foram as quantidades de sulfato de magnésio (MgSO₄) e cloreto de sódio (NaCl) na etapa de separação de fases e as quantidades de sulfato de magnésio e sorvente C₁₈ na etapa de *clean-up*, apresentadas na Tabela 7.

Tabela 7. Níveis codificados e reais avaliados no delineamento composto central 2⁴ na etapa de separação de fases e na etapa de *clean-up* no método QuEChERS.

Variáveis	Etapas	-1	0	+1
MgSO ₄	separação de fases	2 g	4 g	6 g
NaCl		0,5 g	1 g	1,5 g
MgSO ₄	<i>clean-up</i>	0,3 g	0,9 g	1,5 g
C ₁₈		0,1 g	0,3 g	0,5 g

As áreas relativas das micotoxinas foram utilizadas para avaliar os percentuais de recuperação, os quais constituíram as respostas das variáveis em estudo.

4.2.4 Otimização do sistema cromatográfico CLAE-UV para determinação dos compostos

Para a otimização do sistema cromatográfico foi utilizada a coluna Gemini C₁₈ 5,0 µm (250 x 4,6 mm), operando no modo de eluição isocrático. Com um fluxo de injeção de 0,5 mL min⁻¹ e tempo de corrida total de 15 minutos, foram realizados testes em relação à fase móvel:

1º Teste: Fase móvel: Acetonitrila: Tampão Acetato de amônio 20 mM pH 4,5 (80:20, v/v);

2º Teste: Fase móvel: Acetonitrila: Água (60:40, v/v);

3º Teste: Fase móvel: Acetonitrila: Água (70:30, v/v);

4º Teste: Fase móvel: Acetonitrila: Água (80:20, v/v).

Para avaliar a separação dos tricotecenos foram utilizados o tempo de retenção (t_r) de cada analito, o fator de retenção (k) e o fator de separação (α) (COLLINS *et al.*, 2006). Através das Equações 3 e 4 foram determinados o k e o α , respectivamente.

$$k = \frac{t_r - t_m}{t_m} \quad (3)$$

Onde:

k = fator de retenção;

t_r = tempo de retenção de um analito, tempo transcorrido desde a injeção até o ponto de máximo pico;

t_m = tempo de retenção de um analito não retido.

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1} \quad (4)$$

Onde:

α = fator de separação;

k_2 = fator de retenção do segundo composto a eluir na corrida cromatográfica;

k_1 = fator de retenção do primeiro composto a eluir na corrida cromatográfica

4.2.5 Validação do sistema CLAE-UV

Após a definição das melhores condições de separação dos tricotecenos em CLAE-UV, foi realizada a validação da técnica cromatográfica para a análise das micotoxinas, seguindo os indicativos de mérito descritos abaixo, indicados pelo INMETRO e ANVISA (INMETRO, 2003; ANVISA, 2003; *EUROPA COMMISSION REGULATION (EC)*, 2006).

4.2.5.1 Curva analítica e linearidade

Foram construídas curvas analíticas através de padronização externa no solvente e por superposição de matriz com o objetivo de avaliar a linearidade do instrumento e do método. As concentrações das soluções analíticas utilizadas para a construção das curvas foram: 1 – 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para DON e NIV; 0,5 – 4,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para ADONS.

A padronização externa no solvente foi realizada por diluições da solução trabalho com acetonitrila. Para a padronização externa por superposição da matriz as soluções analíticas foram preparadas através de diluições da solução trabalho com o extrato da matriz, extraído pelo método em uso. Os procedimentos foram realizados com a matriz isenta de micotoxinas, ou seja, o branco do experimento.

Cada solução foi injetada três vezes, obtendo-se os dados de regressão linear através do *software* do equipamento. Assim, foi avaliado o coeficiente de correlação linear de cada padronização, obtendo-se a linearidade do instrumento e do método.

4.2.5.2 Limite de detecção (LOD) e Limite de quantificação (LOQ)

O LOD e o LOQ foram estimados através da relação sinal/ruído, considerando a concentração que gerou no mínimo um sinal de 3 e 10 vezes maior que a razão do sinal pela linha de base (ruído), respectivamente. Os limites instrumentais (LOD_i e LOQ_i) foram obtidos pela calibração externa no solvente em uma solução padrão contendo a mistura dos tricotecenos em estudo (LANÇAS, 2009).

Os limites de detecção (LOD_m) e quantificação (LOQ_m) do método empregando QuEChERS modificado foram obtidos pela injeção de soluções analíticas de diferentes concentrações preparadas através de diluições da solução padrão trabalho com o extrato da matriz, branco, extraído por QuEChERS modificado neste trabalho.

4.2.5.3 Exatidão

A exatidão foi avaliada com base em ensaios de recuperação. As amostras de trigo (isentas de micotoxinas) foram fortificadas nos níveis de 400; 1000 e 2000 µg kg⁻¹, a partir da adição de um volume conhecido de solução trabalho de cada tricoteceno a 10 g de amostra. Foi realizado o método de extração QuEChERS modificado e o extrato final foi injetado no CLAE-UV. Cada nível de fortificação foi extraído em triplicata.

A exatidão do método ainda foi avaliada através do uso de material de referência certificado para DON em trigo. Os valores obtidos no laboratório foram comparados com o valor certificado do material. Para os demais tricotecenos foi realizado somente o ensaio de recuperação, pois ainda não existem materiais de referência certificados para ADONS e NIV em trigo.

Para a quantificação dos tricotecenos foi utilizada a padronização por superposição de matriz e os cálculos para expressar a porcentagem de recuperação foram realizados de acordo com a Equação 5.

$$R(\%) = \left[\frac{C_1 - C_2}{C_3} \right] \times 100 \quad (5)$$

Onde:

C_1 = concentração determinada após a fortificação

C_2 = concentração determinada na amostra não fortificada (branco)

C_3 = concentração esperada para o nível de fortificação

4.2.5.4 Precisão

A precisão foi avaliada através da precisão instrumental e precisão do método. Para avaliar a precisão instrumental foram feitas injeções sucessivas de solução padrão na concentração de $3,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($n = 10$) e estimada através do desvio padrão relativo percentual (RSD %) com relação a média das áreas de todas as injeções.

A precisão do método foi avaliada em função da repetibilidade e da precisão intermediária. Para o estudo da repetibilidade foi realizada a extração por QuEChERS modificado em três níveis de fortificação, em triplicata, e estes níveis foram injetados também em triplicata. A partir de nove determinações realizadas foi calculado o RSD % para a repetibilidade. Para o estudo da precisão intermediária, as nove determinações foram avaliadas em função de diferentes analistas e em diferentes dias e, após, também foi calculado o RSD %.

4.2.5.5 Sensibilidade e Seletividade

A sensibilidade do método foi determinada pela inclinação da reta obtida através da curva analítica, correspondendo ao coeficiente angular da equação linear.

A avaliação da seletividade foi realizada através do sinal do analito gerado em CLAE-DAD através do espectro eletrônico do sinal do analito comparado ao do padrão analítico.

4.2.5.6 Efeito matriz

O efeito matriz foi determinado a partir de curvas analíticas no solvente e curvas analíticas na matriz, em que foram avaliadas as inclinações das retas. O cálculo foi efetuado através da Equação 6:

$$EfM\% = \frac{X_1 - X_2}{X_2} \times 100 \quad (6)$$

Onde:

X_1 = inclinação da curva obtida pela injeção das soluções analíticas de cada analito, preparada no extrato da matriz (trigo);

X_2 = inclinação da curva obtida pela injeção das soluções analíticas de cada analito, preparada no solvente (acetonitrila).

4.2.6 Aplicabilidade

Amostras de grãos de trigo foram coletadas em estabelecimentos comerciais na cidade de Pelotas (RS), sendo escolhidos cinco estabelecimentos que comercializam grãos de trigo para consumo humano. Durante a amostragem foram coletadas embalagens de 500 g. Neste momento foram formados lotes brutos de 1 % do produto disponível na prateleira dos estabelecimentos comerciais de maneira aleatória para cada marca. As embalagens da mesma marca foram abertas, transferidas para um recipiente e homogeneizadas. Após, cada uma das amostras foi triturada em moinho de facas e peneiradas em malha de 32 mesh. A fração obtida foi submetida a homogeneização e posterior quarteamento. O quarteamento foi realizado manualmente

até se obter a quantidade correspondente a amostra analítica. Após, aplicou-se o método QuEChERS otimizado e validado para a determinação dos tricotecenos. Cada uma das amostras foi identificada com as letras A, B, C, D e E de acordo com o estabelecimento comercial em que foram adquiridas.

4.2.7 Limpeza de vidraria e tratamento de resíduos

A limpeza do material utilizado nos experimentos e os resíduos de ensaios foram tratados através da imersão do material em soluções contendo a concentração de 3 % de hipoclorito de sódio. Esta solução garante a degradação da estrutura química dos compostos, impossibilitando a recontaminação ambiental pelo descarte do material. Os resíduos de solventes orgânicos foram armazenados em frascos adequados para posterior tratamento e destilação.

4.2.8 Análise Estatística

A análise estatística dos dados foi realizada utilizando o programa “ Statistica” (versão 5.0, Statsoft, Inc., Tulsa, EUA), através da análise de variância (ANOVA) considerando as médias de triplicatas dos ensaios por teste de Tuckey, tendo os valores de recuperações dos tricotecenos (%) como as variáveis resposta no estudo. O nível de significância foi fixado em 95 % para o modelo matemático e para a superfície de resposta. Os coeficientes de regressão $p(t)$ foram determinados por meio do teste t de Student, a significância do modelo descrito pela equação foi determinada pelo teste de Fisher. Através do coeficiente de múltiplas determinações (R^2) foi observada a variância explicada pelo modelo.

5. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

5.1 RECUPERAÇÕES DOS ENSAIOS DE DETERMINAÇÃO DE TRICOTECENOS ATRAVÉS DOS DIFERENTES MÉTODOS E TÉCNICAS DE EXTRAÇÃO

Nesta etapa, foi feita a comparação entre os resultados obtidos para as recuperações dos tricotecenos utilizando as quatro extrações propostas: Tanaka *et al.* (2000), QuEChERS modificado por Bemvenuti (2012), MSPD validada por Rubert *et al.* (2011) e DLLME desenvolvida por Rezaee *et al.* (2006). A Tabela 8 apresenta os valores das recuperações dos tricotecenos para os diferentes métodos e técnicas de extração, sendo que nas amostras de trigo foram adicionados $1000 \mu\text{g kg}^{-1}$ de cada micotoxina, com base no permitido pela legislação brasileira.

Tabela 8. Resultados das recuperações e RSD dos tricotecenos para os diferentes métodos e técnicas de extração.

Extrações	Recuperação (%) / RSD(%)		
	DON	ADONS	NIV
QuEChERS	89 / 10,8	78 / 5,5	87 / 14,8
DLLME	62 / 19,2	50 / 20,1	61 / 17,6
Tanaka	118 / 11,3	110 / 8,4	117 / 9,6
MSPD	164 / 9,8	136 / 7,5	128 / 6,3

Os compostos adjacentes 15-ADON e 3-ADON, quando extraídos da matriz, apresentaram picos cromatográficos que co-eluíram, ficando difícil a visualização separadamente. Dessa forma, neste trabalho, foi considerado um único pico para representar os ADONS em todos os estudos de extração. Este mesmo sistema de quantificação já foi utilizado por Krska *et al.*, 2007.

Para todos os tricotecenos em estudo, os métodos QuEChERS e Tanaka apresentaram os melhores resultados das recuperações, aproximadamente entre 70 e 120 %, valores estes aceitos quando se trabalha com matrizes complexas (Ribani *et al.*, 2004). Também foi verificado que o *clean up* utilizado no método de extração QuEChERS foi eficiente, apresentando menor número de picos, não ocorrendo co-

eluição de compostos quando comparados aos outros procedimentos de extração testados. Nesta etapa, também pode-se avaliar as extrações pelas técnicas DLLME e MSPD, no entanto estas técnicas não apresentaram bons valores de recuperação, os quais podem estar relacionados com os interferentes da matriz ou com a otimização mais específica da técnica para a extração desses tricotecenos em trigo. Assim, tendo em vista valores de recuperação promissores do método QuEChERS e suas vantagens em relação à geração de resíduos e tempo de exposição do analista, este método foi escolhido para a otimização.

Visando um aumento da recuperação das concentrações das micotoxinas estudadas pelo método de extração QuEChERS, a avaliação da quantidade de sais tanto na etapa de separação de fases como na limpeza do extrato, pontos críticos da extração quando se refere a recuperação de analitos, foi estudada.

A extração utilizando acetonitrila (ACN) se caracteriza por possuir miscibilidade com a água e proporcionar a extração em uma única fase quando em contato com a matriz. Quando uma extração é realizada com acetona é necessário a adição de solventes apolares para que ocorra a separação entre as fases orgânica e aquosa, tendo como consequência mais uma etapa adicionada ao processo (MAŠTOVSKÁ, LEHOTAY, 2004). Além disso, o uso de ACN também tem como vantagem a extração de uma menor quantidade de coextrativos lipofílicos provenientes da amostra (LEHOTAY, 2001).

O estudo do método neste trabalho foi direcionado às variações das quantidades de sais e sorvente utilizados no método proposto por Ferreira *et al.* (2012) e do método QuEChERS original, uma vez que a quantidade do solvente (ACN) empregada na extração das micotoxinas utilizando este método já foi otimizada por Hackbart (2009).

5.2 OTIMIZAÇÃO DO PROCEDIMENTO DE EXTRAÇÃO QuEChERS

Nesta etapa, foi realizado um delineamento composto central 2^4 com o objetivo de validar o método de extração QuEChERS. Foram variadas as quantidades de sais e sorventes conforme indicações da literatura. No método QuEChERS original, proposto por Anastassiades *et al.* (2003), foram utilizados 4 g de $MgSO_4$ e 1 g de NaCl, base para a variação da quantidade utilizada neste trabalho. Na etapa de *clean up*, as variações do sal $MgSO_4$ e do sorvente C_{18} foram de acordo com o método proposto por Ferreira *et al.* (2012), onde estes utilizaram 0,9 g de $MgSO_4$ e 0,3 g de C_{18} .

Os valores de recuperação dos tricotecenos obtidos segundo as modificações realizadas na etapa de separação de fases e *clean up* no DCC 2^4 estão apresentados na Tabela 9. A fortificação das amostras de trigo realizada para esta avaliação foi de $1000 \mu g kg^{-1}$ de cada micotoxina.

Tabela 9. Matriz do DCC 2⁴, com variáveis e níveis avaliados em função da recuperação (%) dos tricotecenos utilizando o método QuEChERS modificado.

Ensaio	Separação de fases		<i>Clean up</i>		Recuperação (%)		
	MgSO ₄ (g)	NaCl (g)	MgSO ₄ (g)	C ₁₈ (g)	DON	ADONS	NIV
1	-1(2)	-1(0,5)	-1(0,3)	-1(0,1)	66	59	52
2	-1(2)	-1(0,5)	-1(0,3)	+1(0,5)	55	48	54
3	-1(2)	-1(0,5)	+1(1,5)	-1(0,1)	55	51	56
4	-1(2)	-1(0,5)	+1(1,5)	+1(0,5)	53	76	62
5	-1(2)	+1(1,5)	-1(0,3)	-1(0,1)	61	90	105
6	-1(2)	+1(1,5)	-1(0,3)	+1(0,5)	52	60	103
7	-1(2)	+1(1,5)	+1(1,5)	-1(0,1)	50	102	110
8	-1(2)	+1(1,5)	+1(1,5)	+1(0,5)	63	76	106
9	+1(6)	-1(0,5)	-1(0,3)	-1(0,1)	76	72	67
10	+1(6)	-1(0,5)	-1(0,3)	+1(0,5)	68	62	54
11	+1(6)	-1(0,5)	+1(1,5)	-1(0,1)	69	64	75
12	+1(6)	-1(0,5)	+1(1,5)	+1(0,5)	73	61	63
13	+1(6)	+1(1,5)	-1(0,3)	-1(0,1)	89	78	72
14	+1(6)	+1(1,5)	-1(0,3)	+1(0,5)	77	79	61
15	+1(6)	+1(1,5)	+1(1,5)	-1(0,1)	75	77	78
16	+1(6)	+1(1,5)	+1(1,5)	+1(0,5)	80	75	77
17	0(4)	0(1)	0(0,9)	0(0,3)	83	81	107
18	0(4)	0(1)	0(0,9)	0(0,3)	84	79	110
19	0(4)	0(1)	0(0,9)	0(0,3)	85	80	105

Os resultados obtidos das recuperações de cada tricoteceno foram tratados estatisticamente por análise de variância (ANOVA), utilizando um intervalo de confiança

de 95 %. A ANOVA foi utilizada para determinar a adequacidade do modelo gerado pelas variáveis significativas, ou seja, para descobrir os efeitos principais e as interações das variáveis independentes em relação a variável dependente (variável resposta). Através do teste estatístico de Fischer (F), o valor de F foi obtido de acordo com a razão entre a média dos quadrados da regressão e a média dos quadrados do resíduo, indicando o significado de cada um dos fatores controlados sobre o modelo testado. Se o valor de $F_{\text{calculado}}$ for maior que o valor de F_{tabelado} o modelo é dito preditivo.

Após a obtenção dos resultados referentes a recuperação de DON, foi realizado o cálculo do efeito de cada variável ($\text{MgSO}_{4(\text{SF})}$, NaCl , $\text{MgSO}_{4(\text{Clean up})}$ e C_{18}) e da interação das mesmas sobre a variável resposta (recuperação de DON). A Tabela 10 apresenta os coeficientes e os efeitos das variáveis estudadas e de suas interações.

Tabela 10. Resultados dos efeitos, desvio padrão e coeficientes de regressão provenientes do DCC 2⁴ para as variáveis estudadas e suas interações em relação à recuperação de DON (%).

Etapas	Fatores	Efeito (%)	Desvio Padrão	Coeficientes de regressão	Nível de significância (p)
	Média	69,3	2,52	69,32	0,0000
Separação de fases	MgSO _{4(SF*)} **	19,0	5,49	9,5	0,0085
	NaCl	4,0	5,49	2,00	0,4869
Clean up	MgSO _{4(Clean up)}	-3,3	5,49	1,63	0,5701
	C ₁₈	-2,5	5,49	1,25	0,6609
Interação das variáveis	MgSO _{4(SF*)} x NaCl	4,8	5,49	2,38	0,4120
	MgSO _{4(SF*)} x MgSO _{4(Clean up)}	0,0	5,49	0,00	1,0000
	MgSO _{4(Clean up)} x C ₁₈	-0,3	5,49	-0,13	0,9648
	NaCl x MgSO _{4(Clean up)}	0,5	5,49	0,25	0,9297
	NaCl x C ₁₈	1,8	5,49	0,88	0,7580
	MgSO _{4(Clean up)} x C ₁₈	7,5	5,49	3,75	0,2090

*SF(Separação de fases)

**Fatores estatisticamente significativos (p<0,05)

Os coeficientes de regressão representam as contribuições de cada variável independente à predição da variável dependente. De acordo com a Tabela 10, pode-se observar que o valor da recuperação de DON ($p < 0,05$) foi influenciado somente pela quantidade de sulfato de magnésio adicionado na etapa de separação de fases, apresentado um efeito positivo. O efeito observado foi de um aumento em 19 % ($p = 0,0085$) na recuperação de DON quando utilizadas 6 g de sal na etapa de separação das fases orgânica e aquosa.

Tabela 11. Dados da ANOVA para avaliar a variável resposta recuperação de DON (%)

Fontes de variação	Soma Quadrática (SS)	Graus de Liberdade (GL)	Média Quadrática (MS)	F _{calculado}	(p)
Regressão	1444,000	1	1444,00	17,24	0,0007
Resíduo	1424,105	17	83,771		
Total	2868,105	18			

Onde:

Regressão = total - resíduo

Media Quadrática = Soma Quadrática/GL

F_{calculado} = média quadrática regressão/média quadrática do resíduo

Com o objetivo de determinar se a equação de regressão, representativa do modelo, é estatisticamente significativa, foi realizado o teste F (Fischer) através da ANOVA. De acordo com a Tabela 11, a recuperação de DON apresentou um coeficiente de correlação (R) igual a 0,81, indicando que o modelo é considerado significativo. O valor do teste F_{calculado} foi de 17,24, sendo 3,87 vezes maior que o valor de F_{tabelado} (4,45), influenciada pela quantidade de MgSO₄ adicionada. Assim, estes dados resultaram em um modelo preditivo e significativo, o qual pode ser representado pela Equação 7.

$$\text{Recuperação de DON (\%)} = 69,32 + 9,5 \text{ MgSO}_{4(\text{SF})} \quad (7)$$

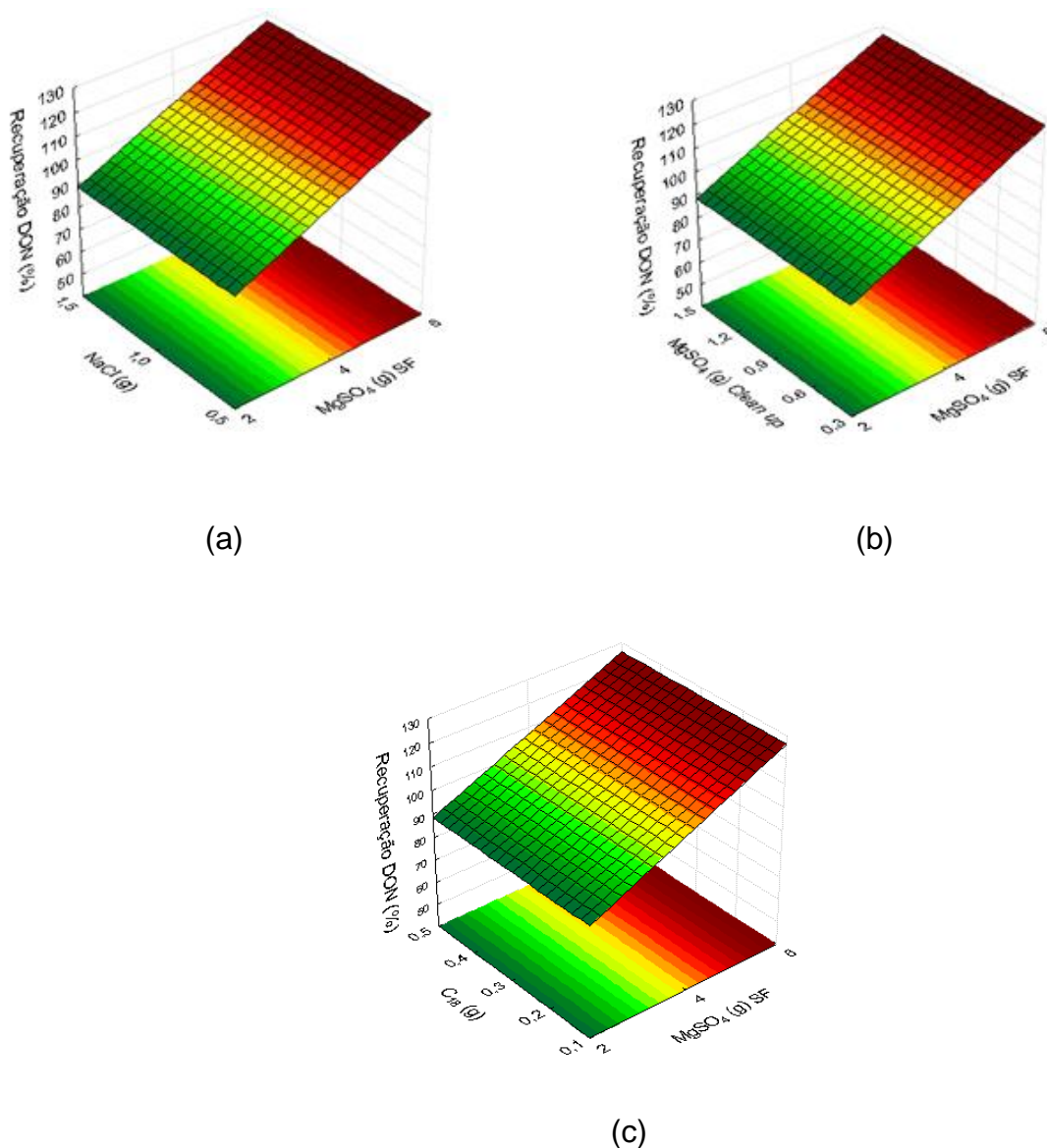


Figura 10. Superfícies de resposta geradas através do delineamento composto central 2^4 para a variável recuperação de DON (%).

Após verificar a predição do modelo, foram geradas as superfícies de resposta para a variável recuperação de DON em relação à quantidade de $MgSO_4$ adicionado na etapa de separação de fases. De acordo com a Figura 10, pode-se constatar que os valores máximos para a variável resposta Rec DON (%) são obtidos quando se utiliza a máxima quantidade de $MgSO_4$ na separação de fases (6 g) para todas as outras quantidades de sais e sorvente.

Tabela 12. Resultados dos efeitos, desvio padrão e coeficientes de regressão provenientes do DCC 2⁴ para as variáveis estudadas e suas interações em relação à recuperação de ADONS (%).

Etapas	Fatores	Efeito (%)	Desvio Padrão	Coeficientes de regressão	Nível de significância (p)
	Média	72,1	2,39	72,11	0,0000
Separação de fases	MgSO ₄ (SF*)	0,8	5,20	0,38	0,8890
	NaCl**	18,0	5,20	9,00	0,0086
Clean up	MgSO ₄ (Clean up)	4,3	5,20	2,13	0,4378
	C ₁₈	7,0	5,20	-3,50	0,2155
Interação das variáveis	MgSO ₄ (SF*) x NaCl	-5,5	5,20	-2,75	0,3215
	MgSO ₄ (SF*) x MgSO ₄ (Clean up)	-7,8	5,20	-3,88	0,1748
	MgSO ₄ (Clean up) x C ₁₈	3,5	5,20	1,75	0,5202
	NaCl x MgSO ₄ (Clean up)	1,5	5,20	0,75	0,7805
	NaCl x C ₁₈	-7,3	5,20	-3,63	0,2011
	MgSO ₄ (Clean up) x C ₁₈	5,5	5,20	2,75	0,3215

*SF(Separação de fases)

**Fatores estatisticamente significativos (p<0,05)

Na avaliação da recuperação de ADONS a única variável que influenciou significativamente (p < 0,05) foi a quantidade de NaCl na etapa de separação de fases, apresentando um efeito positivo, conforme apresentado na Tabela 12. A maior quantidade de NaCl testada (1,5 g) na etapa de separação das fases orgânica e aquosa aumenta o efeito da recuperação de ADONS em 18 % (p = 0,008).

Tabela 13. Dados da ANOVA para a variável resposta recuperação de ADONS (%).

Fontes de variação	Soma Quadrática (SS)	Graus de Liberdade (GL)	Média Quadrática (MS)	$F_{\text{calculado}}$	(p)
Regressão	1296,001	1	1296,001	11,67	0,0033
Resíduo	1887,789	17	111,05		
Total	3183,79	18			

Onde:

Regressão = total - resíduo

Media Quadrática = Soma Quadrática/GL

$F_{\text{calculado}}$ = média quadrática regressão/média quadrática do resíduo

De acordo com a Tabela 13, a ANOVA para a recuperação de ADONS apresentou um coeficiente de correlação (R) igual a 0,85 e o valor do teste $F_{\text{calculado}}$ foi de 11,67, sendo 2,62 vezes maior que o valor de F_{tabelado} (4,45). Assim, estes dados resultaram em um modelo preditivo e significativo, o qual pode ser representado pela Equação 8.

$$\text{Recuperação de ADONS} = 72,11 + 9 \text{ NaCl} \quad (8)$$

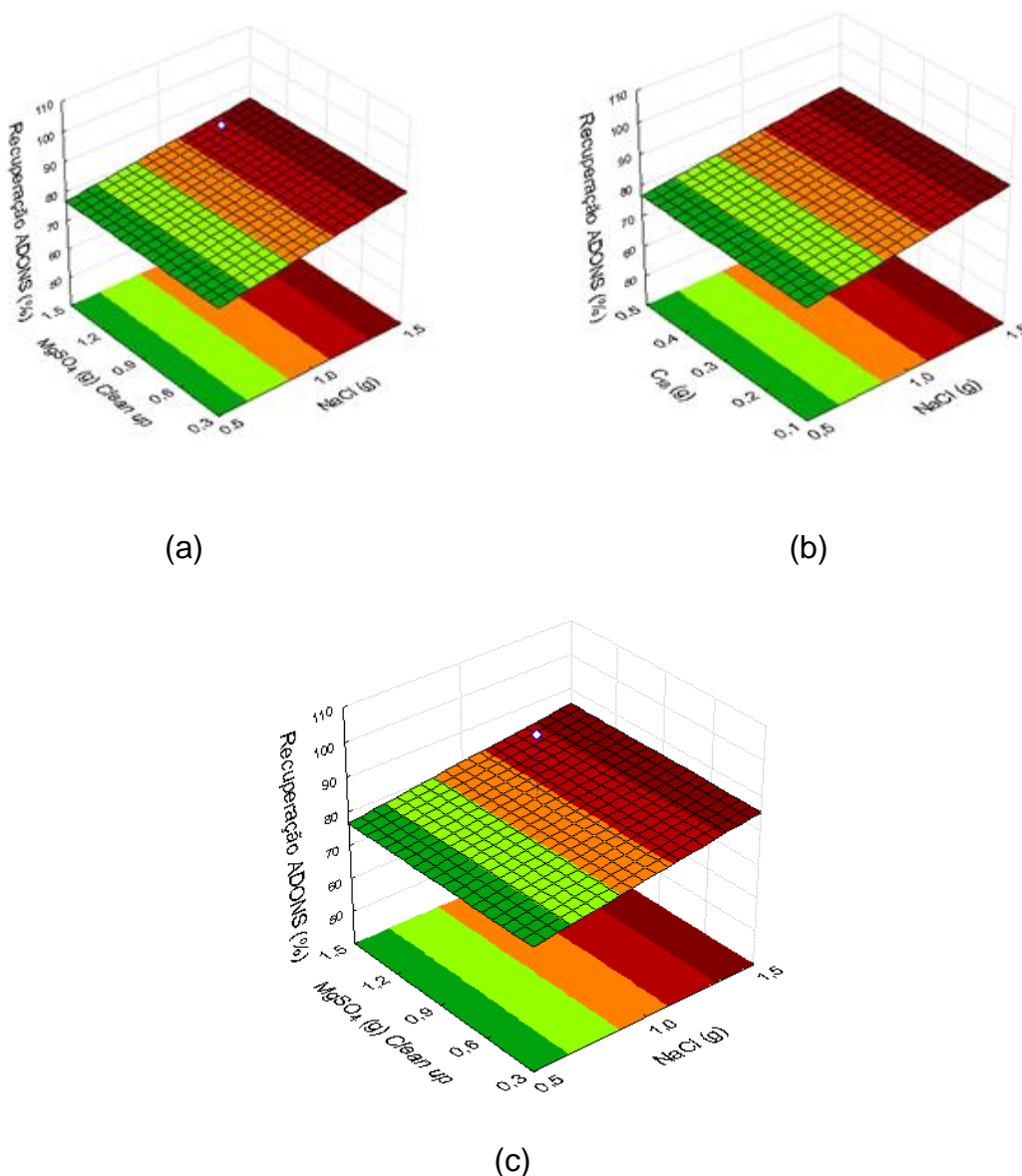


Figura 11. Superfícies de resposta geradas através do delineamento composto central 2^4 para a variável recuperação de ADONS (%).

Após verificar que o modelo é preditivo e significativo para a variável resposta recuperação de ADONS, pode-se gerar as superfícies de resposta referentes a variável significativa NaCl (g) na etapa de separação de fases. Assim, de acordo com a Figura 11, observou-se que valores máximos para a recuperação de ADONS são obtidos quando se utiliza a maior quantidade de NaCl (1,5 g), verificando-se também que as outras variáveis independentes não influenciam na variável resposta.

Tabela 14. Resultados dos efeitos, desvio padrão e coeficientes de regressão provenientes do DCC 2⁴ para as variáveis estudadas e suas interações em relação à recuperação de NIV (%).

Etapas	Fatores	Efeito (%)	Desvio Padrão	Coeficientes de regressão	Nível de significância (p)
	Média	79,8	4,27	79,84	0,0000
Separação de fases	MgSO ₄ (SF*)	-12,6	9,31	-6,31	0,2122
	NaCl**	28,6	9,31	14,31	0,0152
Clean up	MgSO ₄ (Clean up)	7,4	9,31	3,69	0,4513
	C ₁₈	-4,4	9,31	-2,19	0,6511
Interação das variáveis	MgSO ₄ (SF*) x NaCl	-21,4	9,31	-10,69	0,0519
	MgSO ₄ (SF*) x MgSO ₄ (Clean up)	2,4	9,31	1,19	0,8151
	MgSO ₄ (Clean up) x C ₁₈	-4,9	9,31	-2,44	0,6148
	NaCl x MgSO ₄ (Clean up)	0,1	9,31	0,063	0,9896
	NaCl x C ₁₈	-0,1	9,31	-0,063	0,9896
	MgSO ₄ (Clean up) x C ₁₈	1,6	9,31	0,81	0,8658

*SF(Separação de fases)

**Fatores estatisticamente significativos (p<0,05)

Através da Tabela 14 pode-se observar que, mais uma vez, o único fator que influenciou significativamente na recuperação de NIV ($p < 0,05$) foi a quantidade de NaCl adicionado na etapa de separação de fases apresentado um efeito positivo. O NaCl aumenta o efeito do valor da recuperação de NIV em 28,6 % ($p = 0,015$) quando utilizada a maior quantidade de sal (1,5 g) na etapa de separação das fases orgânica e aquosa.

Tabela 15. Dados da ANOVA para a variável resposta recuperação de NIV (%).

Fontes de variação	Soma Quadrática (SS)	Graus de Liberdade (GL)	Média Quadrática (MS)	$F_{\text{calculado}}$	(p)
Regressão	3277,57	1	3277,57	9,83	0,0060
Resíduo	5662,964	17	333,12		
Total	8940,53	18			

Onde:

Regressão = total - resíduo

Media Quadrática = Soma Quadrática/GL

$F_{\text{calculado}}$ = média quadrática regressão/média quadrática do resíduo

De acordo com a Tabela 15, a ANOVA para a variável resposta recuperação de NIV apresentou um coeficiente de correlação (R) igual a 0,83. O valor do teste $F_{\text{calculado}}$ foi de 9,83, sendo 2,21 vezes maior que o valor de F_{tabelado} (4,45). Assim, estes dados resultaram em um modelo preditivo e significativo, o qual pode ser representado pela Equação 9.

$$\text{Recuperação de NIV (\%)} = 79,84 + 14,31 \text{ NaCl} \quad (9)$$

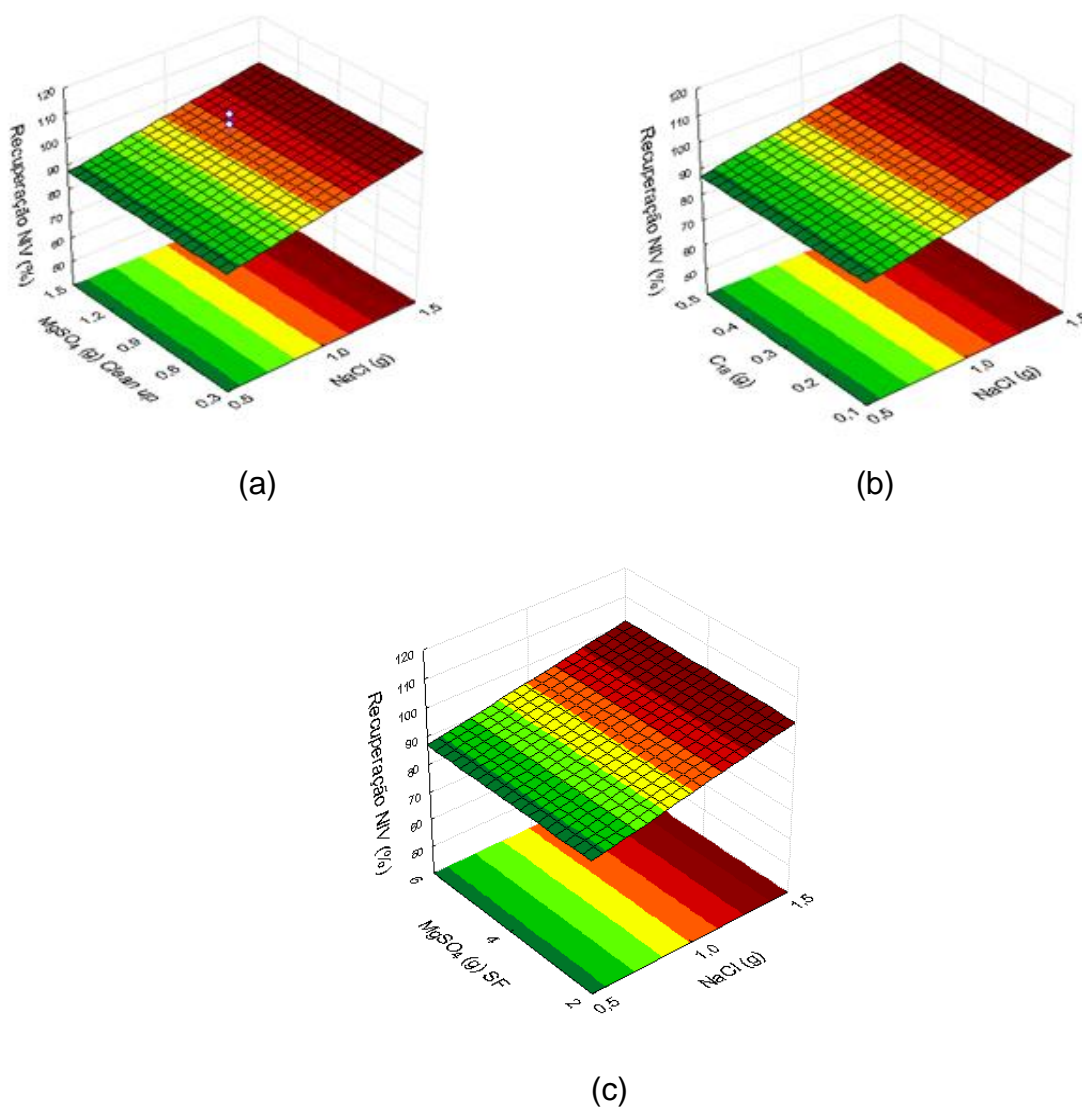


Figura 12. Superfícies de resposta geradas através do delineamento composto central 2^4 para a variável recuperação de NIV (%).

A Figura 12 comprova que a variável independente quantidade de NaCl aumenta os valores de recuperação de NIV durante a etapa de separação de fases. Também verifica-se que as demais variáveis independentes não influenciam significativamente na obtenção de valores maiores para a variável resposta recuperação de NIV.

Após a análise estatística dos efeitos das variáveis independentes em relação às variáveis resposta recuperação de DON (%), recuperação de ADONS (%) e recuperação de NIV (%), separadamente, pode-se concluir que as quantidades de sais na etapa de separação de fases são as que possuem efeitos significativos positivos

para a recuperação dos tricotecenos em estudo. Dessa forma, optou-se por utilizar as quantidades máximas de sais testadas nessa etapa de separação e as quantidades mínimas de sulfato de magnésio e C₁₈ na etapa de *clean up*, já que estas, apesar de necessárias, não apresentaram efeitos significativos que pudessem influenciar nas recuperações dos tricotecenos.

Vários métodos multirresíduo têm utilizado a adição de sais com o objetivo de promover o efeito *salting out*. Nas extrações com acetonitrila, a adição de sais é muito conveniente uma vez que é rápida, fácil, apresenta baixo custo, tem a grande vantagem de não diluir o extrato da amostra e proporciona a separação das fases orgânica e aquosa através do aumento da constante dielétrica do sistema (STAN, 2000).

Sospedra *et al.* (2010) utilizaram um método QuEChERS modificado, para a mesma proporção de quantidade de amostra (10 g), 4 g de MgSO₄ e 1,5 g de NaCl para determinar DON e NIV em amostras de farinha de trigo, demonstrando bons valores de recuperação (86 – 108 %), utilizando para a quantificação CL-EM.

Rubert *et al.* (2012) validaram uma metodologia por QuEChERS para avaliar 32 micotoxinas, entre elas, DON, 3-ADON, 15-ADON e NIV, em amostras de cevada e também utilizaram quantidades elevadas de sais (4 g de MgSO₄ e 1 g de NaCl) para uma quantidade de amostra de 2 g, apresentando recuperações entre 65 – 85 % e quantificação por UHPLC-EM.

De acordo com os resultados encontrados para as recuperações simultâneas dos tricotecenos em estudo (72 – 89 %), experimento 13, conforme a Tabela 9, pode-se observar que estes resultados são satisfatórios quando comparados a trabalhos que utilizaram para quantificação detectores de maior sensibilidade e especificidade acoplados ao cromatógrafo líquido, como o EM.

A etapa de *clean up* é essencial para promover robustez e confiabilidade aos resultados obtidos pelo sistema cromatográfico, já que é capaz de reduzir a água residual, proporcionando um extrato final de menor polaridade, facilitando assim a precipitação de coextrativos polares. O sorvente possui a capacidade de reter as interferências da matriz, sendo que depois da agitação manual e centrifugação o extrato está pronto para ser injetado no sistema cromatográfico (SAITO *et al.*, 2004). A utilização de C₁₈ como sorvente na etapa de *clean up* do método QuEChERS tem sido

demonstrada para amostras contendo teores de gordura maiores ou iguais a 2 % como, por exemplo, arroz, cevada, trigo, óleos vegetais entre outras (WALORCZYK, 2007).

Ferreira *et al.* (2012) utilizaram na etapa de *clean up* 0,9 g de $MgSO_4$ e 0,3 g de C_{18} e obtiveram recuperações entre 61 – 118 % para análise de alguns tricotecenos do grupo B em amostras de pipoca quantificadas por CG-EM.

Testes prévios realizados neste trabalho sem a etapa de *clean up*, resultaram em extratos turvos quando solubilizados em ACN prévia a injeção cromatográfica, necessitando de filtração em membrana 0,45 μm .

5.2.1 Procedimento QuEChERS otimizado

O método QuEChERS otimizado para a extração simultânea dos tricotecenos em estudo consistiu no procedimento descrito a seguir, conforme Apêndice 6: 10 g de amostra de grãos de trigo, trituradas em moinho de facas e peneiradas em malha de 32 mesh, foram homogeneizadas manualmente com 20 mL de água destilada. Após, a mistura foi lavada com 10 mL de hexano por duas vezes. O hexano foi retirado com o uso de uma pipeta. Foram adicionados 20 mL de acetonitrila e a mistura foi homogeneizada em agitador orbital por 20 min a 800 *xg*. Após, o material foi agitado em vortex por 2 min com 6 g de sulfato de magnésio e 1,5 g de cloreto de sódio. Em seguida, a mistura foi centrifugada por 10 min a 3220 *xg*. Foram retirados 10 mL do sobrenadante e adicionados 0,3 g de sulfato de magnésio e 0,1 g de C_{18} . A mistura foi homogeneizada em vortex por 30 seg e centrifugada novamente por 5 min a 3220 *xg*. Foram recolhidos 3 mL de sobrenadante, o qual foi seco sob corrente de N_2 .

5.3 PARÂMETROS DO SISTEMA CROMATOGRÁFICO CLAE-UV PARA DETERMINAÇÃO DAS MICOTOXINAS

A Tabela 16 apresenta as condições estabelecidas empregadas no sistema cromatográfico CLAE-UV para a determinação dos tricotecenos deoxinivalenol, 15-acetil-deoxinivalenol, 3-acetil-deoxinivalenol e nivalenol. Para se obter as melhores condições cromatográficas para a detecção e separação das micotoxinas foram realizadas seis injeções da mistura de padrões e o comprimento de onda escolhido foi 219 nm.

Tabela 16. Condições empregadas no sistema cromatográfico.

Parâmetros	CLAE-UV
Coluna analítica	Gemini 5 μm C ₁₈ – 250 x 4,6 mm
Eluição no modo isocrático	0,5 mL min ⁻¹
Detector	UV
Volume de injeção	10 μL

A utilização de uma coluna cromatográfica composta por C₁₈ como fase estacionária e a fase móvel constituída por solventes de maior polaridade caracterizam a aplicação de um método cromatográfico em fase reversa, na qual analitos de polaridade intermediária são analisados (COLLINS *et al.*, 2006). Neste caso, o mecanismo de separação é classificado como partição líquido-líquido, a retenção é proporcional ao caráter hidrofóbico do soluto e as fases móveis usam água e solventes miscíveis em água, como acetonitrila e metanol (SOARES, 2006). Assim, devido ao fato de que os tricotecenos analisados são considerados de polaridade intermediária, ocasionada pela presença de alguns grupos polares, como hidroxilas, optou-se por utilizar uma fase estacionária apolar (C₁₈) e fase móvel com solventes polares como a mistura de acetonitrila e água.

A acetonitrila é o solvente orgânico mais utilizado em CLAE devido as suas características únicas como baixa viscosidade, baixa absorção de luz ultravioleta e alta miscibilidade com solventes apolares e água (PACHECO, 2010). Devido a sua força

eluente, medida de energia de adsorção do solvente, a ACN consegue deslocar o soluto mais facilmente ao longo da coluna de separação.

O volume de injeção utilizado já estava estabelecido no laboratório. Os testes seguintes foram realizados com vazão de fase móvel de $0,5 \text{ mL min}^{-1}$, a qual estava indicada no manual de instruções da coluna.

Primeiramente, foi utilizada a fase móvel acetonitrila:tampão acetato de amônio 20 mM pH 4,5 (80:20, v/v). No entanto, nesta fase móvel, a utilização do tampão desestabilizou a interação entre os analitos e a fase estacionária, possivelmente decorrente pela presença de íons na fase móvel. Buscando a repetibilidade dos tempos de retenção e uma boa separação dos picos cromatográficos, foram avaliadas outras composições de fase móvel, em que se substituiu a utilização de tampão por água.

A proporção de fase móvel acetonitrila:água (60:40, v/v) foi a condição que proporcionou uma melhor separação dos compostos quando comparado DON e ADONS, mas o composto NIV não foi detectado no tempo de análise de 15 minutos. De acordo com a Figura 14, a proporção acetonitrila:água (80:20, v/v), que tem como característica o aumento da força de eluição através do aumento da quantidade de ACN, apresentou uma redução do tempo de eluição de NIV, mas em contrapartida a co-eluição de ADONS. Portanto, a melhor condição de fase móvel: acetonitrila:água testada foi a de 70:30 (v/v), resultando na separação de ADONS, detecção de NIV e DON em um tempo de análise cromatográfica de até 11 minutos, conforme a Figura 13.

As condições cromatográficas avaliadas nesse estudo através do uso da coluna Gemini C₁₈, bem como os fatores de retenção e separação das micotoxinas, estão expressos nas Tabelas 17 e 18. O tempo de saída do analito não retido (t_M), nas condições selecionadas foi de 2,5 min.

Pode-se ressaltar que os valores para a determinação de k são muito importantes, pois o fator de retenção é um parâmetro amplamente utilizado para descrever as velocidades de migração dos analitos nas colunas (COLLINS *et al.*, 2006). Os valores ideais de k para dois componentes devem variar entre 1 e 10, e para múltiplos componentes são aceitos valores entre 0,5 e 20 (HARRIS, 2003; COLLINS *et al.*, 2006). De acordo com a Tabela 17, pode ser observado que os resultados encontrados para o parâmetro k são aceitáveis para os testes 2 e 3, uma vez que os valores ficaram na faixa de 0,5 a 20.

Tabela 17. Tempos de retenção (t_r) dos analitos e valores de k para cada composição da fase móvel a uma vazão de $0,5 \text{ mL min}^{-1}$.

Analitos	Testes					
	(1)		(2)		(3)	
	FM ACN:H ₂ O (60:40, v:v)		FM ACN:H ₂ O (70:30, v:v)		FM ACN:H ₂ O (80:20, v:v)	
	tr (min)	k	tr (min)	K	tr (min)	k
DON	5,4	-	4,8	0,92	4,9	1,4
15-ADON	6,1	-	5,8	1,32	6,0	1,4
3-ADON	6,2	-	6,0	1,4	6,0	1,4
NIV	-	-	10,3	3,12	10,0	3,00

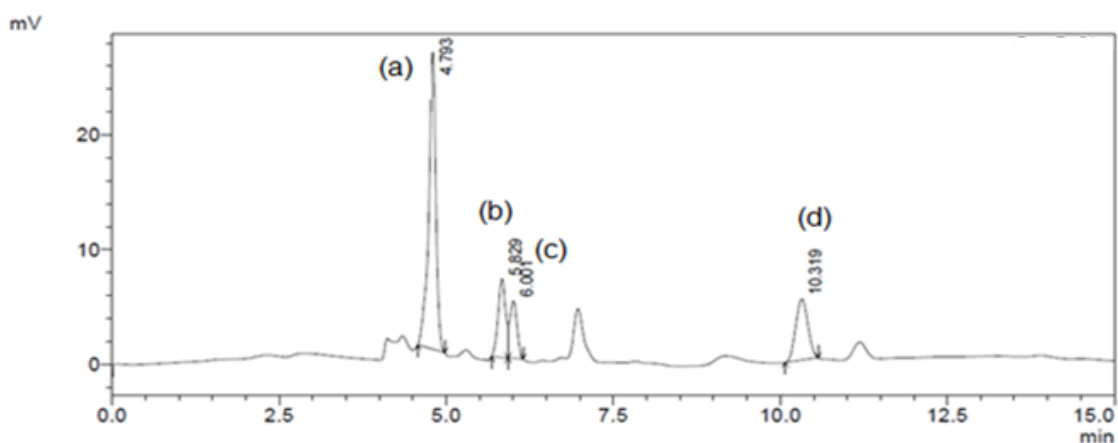


Figura 13. Cromatograma de eluição dos tricotecenos em FM: ACN: H₂O (70:30/ v:v) em CLAE-UV. (a) DON ($5 \mu\text{g mL}^{-1}$); (b) 15-ADON ($2 \mu\text{g mL}^{-1}$); (c) 3-ADON ($2 \mu\text{g mL}^{-1}$) e (d) NIV ($5 \mu\text{g mL}^{-1}$).

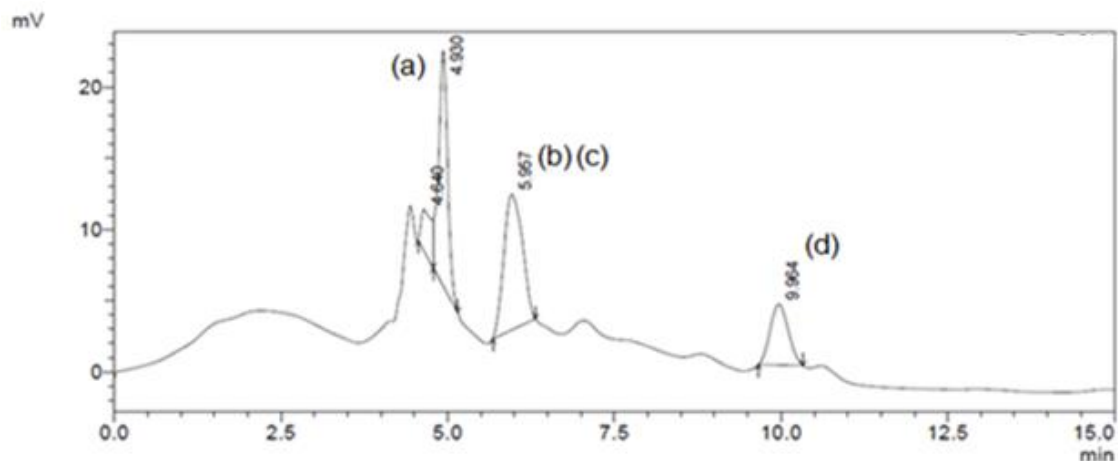


Figura 14. Cromatograma de eluição dos tricotecenos em FM: ACN: H₂O (80:20/v:v) em CLAE-UV. (a) DON (5 µg mL⁻¹); (b) 15-ADON (2 µg mL⁻¹); (c) 3-ADON (2 µg mL⁻¹) e (d) NIV (5 µg mL⁻¹).

O fator de separação mede a seletividade de um sistema cromatográfico. Assim, se $\alpha = 1$, os picos não estão separados e um valor de $\alpha > 1$ implica em boa separação (COLLINS *et al.*, 2006). Para os valores de α , a Tabela 18 mostra que, somente na fase móvel Acetonitrila: Água (80:20), o valor de α foi igual a 1 para os compostos 15-ADON e 3-ADON, concluindo-se que estes co-eluíram e não obtiveram separação.

Tabela 18. Valores do fator de separação (α) dos analitos para cada composição da fase móvel.

Micotoxinas	Fase móvel		
	(α)	(ACN:H ₂ O) 70:30(v:v)	(ACN:H ₂ O) 80:20 (v:v)
15-ADON/DON		1,43	1,67
3-ADON/15-ADON		1,06	1,00
NIV/3-ADON		2,23	2,4

Os compostos 15-ADON e 3-ADON possuem fórmula estrutural muito parecida, diferindo entre si por uma posição do grupo acetil, por isso sua separação cromatográfica torna-se muito difícil.

Assim, a proporção de fase móvel acetonitrila:água (70:30, v/v) foi a que apresentou melhores valores de α , permitindo uma melhor resolução entre os sinais cromatográficos dos compostos e economia de solvente ACN na fase móvel. Dessa forma, foi selecionada como fase móvel para a separação dos tricotecenos em estudo a razão acetonitrila:água (70:30, v/v).

5.4 VALIDAÇÃO DO MÉTODO

5.4.1 Curva analítica e linearidade

Os parâmetros de linearidade obtidos através da calibração externa e superposição de matriz para o método empregando QuEChERS estão apresentados na Tabela 19.

Tabela 19. Resultados obtidos para calibração dos tricotecenos, empregando QuEChERS no sistema CLAE-UV.

Tricotecenos	Curva analítica no solvente	r	Curva analítica na matriz	r
DON	$y=24071,33x - 465,06$	0,9903	$y=26524x - 707,5$	0,9897
ADONS	$y=27585,18x - 258,81$	0,9995	$y=31154x - 2304$	0,9982
NIV	$y=18003,08x + 1692,96$	0,9985	$y=19431x + 7087$	0,9941

Com os resultados obtidos para a construção das curvas analíticas e da análise das equações das retas no CLAE-UV é possível concluir que o modelo de regressão linear se mostra adequado para as determinações analíticas em estudo. Os coeficientes de correlação (r) foram maiores que 0,99, estando de acordo com as orientações do INMETRO e da ANVISA que recomendam r acima de 0,90 e igual a 0,99, respectivamente.

5.4.2 Limites de detecção e limites de quantificação

Na Tabela 20 estão apresentados o limite de detecção (LOD_i) e o limite de quantificação (LOQ_i) do instrumento, em $\mu\text{g L}^{-1}$, e os limites de detecção (LOD_m) e quantificação (LOQ_m) do método QuEChERS, apresentados em $\mu\text{g kg}^{-1}$, para os tricotecenos estudados.

Tabela 20. Limites de detecção e quantificação instrumental (LOD_i ; LOQ_i) e do método QuEChERS (LOD_m ; LOQ_m).

Tricotecenos	LOD_i ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LOQ_i ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LOD_m ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	LOQ_m ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
DON	25	83,3	16,7	55,5
ADONS	50	167	33,3	110,9
NIV	50	167	33,3	110,9

O limite de quantificação do método QuEChERS modificado apresenta valor menor que os limites máximos de DON para amostras de trigo estabelecidos pela ANVISA, União Européia e Estados Unidos que são respectivamente $1500 \mu\text{g kg}^{-1}$ (2014), $1750 \mu\text{g kg}^{-1}$ (2005) e $1000 \mu\text{g kg}^{-1}$ (2003). Para os demais tricotecenos ainda não há legislação específica para trigo.

Sospedra *et al.* (2010) ao aplicarem QuEChERS para a extração de DON e NIV em amostras de farinha de trigo obtiveram como limites de quantificação por CL-EM $10 \mu\text{g kg}^{-1}$ e $100 \mu\text{g kg}^{-1}$ para DON e NIV, respectivamente.

Rubert *et al.* (2012) ao determinarem NIV, DON, 3-ADON e 15-ADON através de um método QuEChERS e quantificação por UHPLC-EM em amostras de cevada, obtiveram como limites de quantificação 100 , 5 , 50 e $50 \mu\text{g kg}^{-1}$ para NIV, DON, 3-ADON e 15-ADON, respectivamente.

Isso evidencia que os valores obtidos neste trabalho, através da utilização de um detector UV, são comparáveis aos valores obtidos quando se utiliza detectores de maior sensibilidade como o espectrômetro de massas, o qual possui um custo operacional bem mais elevado em relação ao detector UV.

5.4.3 Exatidão e Precisão

Como a eficácia do método pode variar em função da quantidade de substância adicionada, foram empregados três níveis de concentração de cada analito para realizar os ensaios de recuperação. O processo de extração dos analitos foi realizado através do método QuEChERS modificado.

O indicado para a validação de métodos cromatográficos é que o intervalo de recuperação aceitável seja entre 70 e 120 % (RIBANI *et al.*, 2004). Esses valores devem ser levados em consideração uma vez que o tipo de matriz, o procedimento de extração e a concentração do analito são fatores que influenciam na recuperação (GONÇALVES, 2007; KURZ, 2007).

Os valores obtidos para a recuperação e para o RSD através das determinações por QuEChERS modificado em amostras de trigo são apresentados na Tabela 21. Pode-se observar que os resultados foram adequados para a determinação dos tricotecenos em trigo.

A exatidão do método também foi obtida através da utilização de material de referência certificado para DON em trigo. O valor encontrado no laboratório foi de $824 \mu\text{g kg}^{-1}$ com RSD de 6,0 % e o valor certificado do padrão de DON é de $877 \mu\text{g kg}^{-1} \pm 23 \mu\text{g kg}^{-1}$, concluindo-se que ocorreu um valor de exatidão de 94 % para o método com RSD de 3,0%.

A precisão foi avaliada através da precisão instrumental e precisão do método. Em matrizes complexas, em que elementos traços são quantificados, a precisão deverá apresentar valores de RSD menores que 20 % (RIBANI *et al.*, 2004).

Para avaliar a precisão instrumental foram feitas injeções sucessivas de solução padrão na concentração de $3,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($n = 10$). Os valores de RSD % foram 8,6 % para DON, 9,1 % para ADONS e 8,3 % para NIV.

De acordo com as recomendações da ANVISA, a precisão do método QuEChERS modificado foi avaliado em função da repetibilidade e da precisão intermediária. Os valores de RSD (%) para os estudos de repetibilidade (RSD_r) e precisão intermediária (RSD_{pi}) para o método empregando QuEChERS modificado são apresentados na Tabela 21.

Pode-se concluir que a precisão instrumental e a precisão do método empregado foram adequadas, uma vez que apresentaram valores de RSD < 20 %.

Tabela 21. Recuperação, RSD_r e RSD_{pi} do método empregando QuEChERS modificado e CLAE-UV para os tricotecenos em amostras de trigo fortificadas em diferentes níveis.

Tricoteceno	Nível de fortificação ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Recuperação (%)	RSD _r * (%)	RSD _{pi} ** (%)
DON	400	88	3,1	9,2
	1000	90	4,2	8,7
	2000	89	5,9	10,5
ADONS	400	75	6,0	8,7
	1000	77	4,8	7,9
	2000	76	9,8	9,2
NIV	400	78	3,7	8,8
	1000	74	5,5	8,3
	2000	75	4,8	9,7

*RSD_r: estimativa do desvio padrão para a repetibilidade

**RSD_{pi}: estimativa do desvio padrão para a precisão intermediária

5.4.4 Sensibilidade e Seletividade

Através dos coeficientes angulares das curvas analíticas, pode-se demonstrar a sensibilidade dos sistemas CLAE-UV e CLAE-DAD. Pode-se observar, através da Tabela 22, pelos coeficientes angulares das curvas analíticas, que o sistema CLAE-UV demonstra maior sensibilidade para todos os compostos, 1,43 vezes para DON, 1,81 vezes para ADONS e 1,12 para NIV. O sistema CLAE-UV apresenta para todas as retas um maior ângulo de inclinação, fornecendo um sinal analítico maior em relação ao aumento da concentração quando comparado ao CLAE-DAD.

Tabela 22. Valores de parâmetros analíticos para validação da sensibilidade.

Método	Linearidade ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	(r)	Curva analítica
DON – CLAE-UV	1,00 – 10,00	0,9903	$y = 24071,33x - 465,06$
DON – CLAE-DAD	1,00 – 10,00	0,9975	$y = 16844x - 2708$
ADONS – CLAE-UV	0,50 – 4,00	0,9995	$y = 27585,18x - 258,81$
ADONS – CLAE-DAD	0,50 – 4,00	0,9910	$y = 15209x - 4068$
NIV – CLAE-UV	1,00 – 10,00	0,9985	$y = 18003,08x + 1692,96$
NIV – CLAE-DAD	1,00 – 10,00	0,9980	$y = 16115x - 4588$

A seletividade do método foi obtida através da verificação da pureza dos picos cromatográficos com o emprego da cromatografia líquida com detector de arranjo de diodos (DAD), de acordo com a Figura 15, onde pode-se observar os espectros dos tricotecnos a 220 nm.

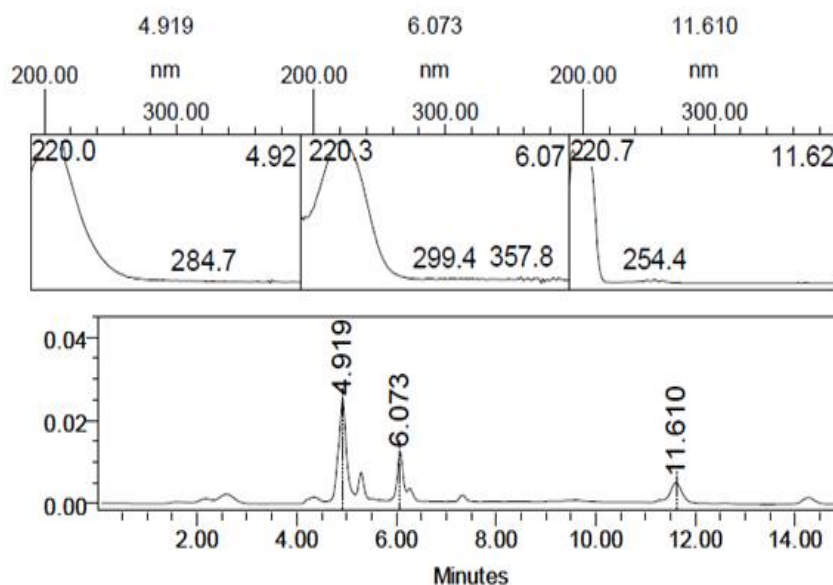


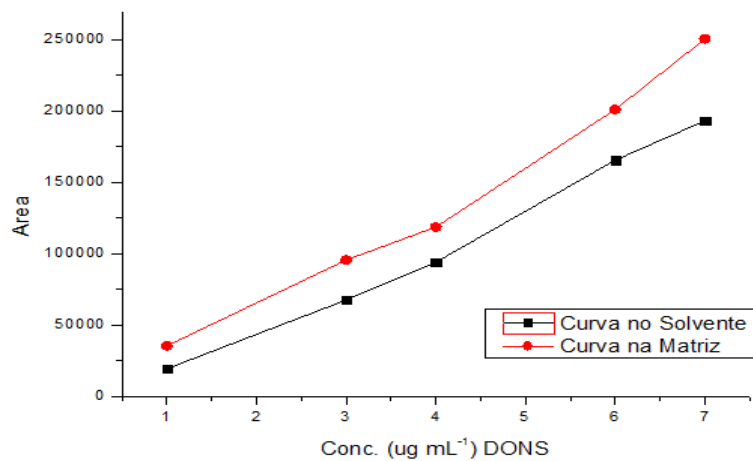
Figura 15. Cromatograma e espectros obtidos por CLAE-DAD para os tricotecenos DON (4,919 min; $5 \mu\text{g mL}^{-1}$), ADONS (6,073 min; $4 \mu\text{g mL}^{-1}$) e NIV (11,61 min; $2 \mu\text{g mL}^{-1}$).

5.4.5 Efeito Matriz

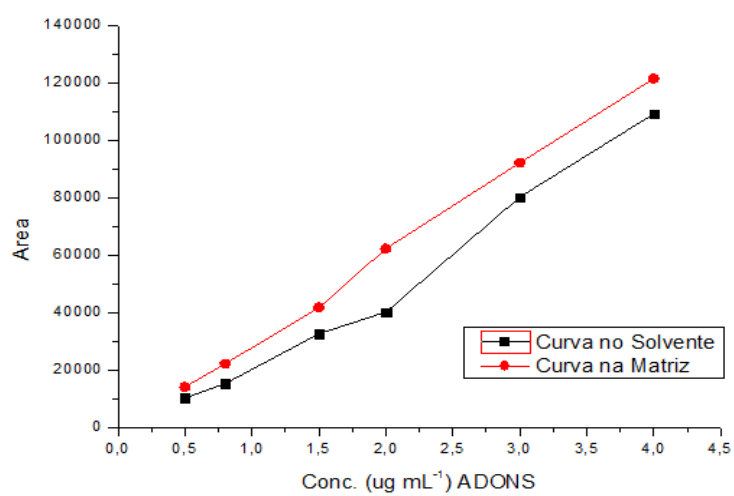
O efeito matriz pode ser observado através da inclinação das curvas preparadas no solvente e no extrato da matriz. Quando há sobreposição de curvas, não é observado efeito de matriz; se a inclinação da curva no extrato for menor, indica supressão de sinal; e se a inclinação da curva no extrato for maior, indica enriquecimento de sinal (GOSETTI et al.; 2010).

Quando os valores encontrados para o cálculo do efeito matriz estiverem entre -20 e +20 %, considera-se que o efeito matriz é baixo; se estiverem entre -50 e -20 % ou entre +20 e +50 % é considerado médio; e se os valores encontrados forem abaixo de -50 % ou acima de +50%, o efeito matriz é considerado alto (ECONOMOU, 2009).

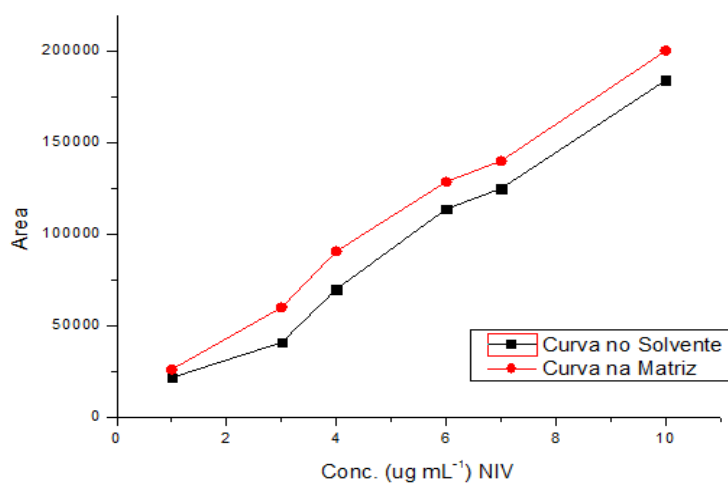
Na Figura 16 são apresentadas as curvas para os analitos: DON; ADONS e NIV.



(a) DON



(b) ADONS



(c) NIV

Figura 16. Curvas analíticas no solvente e curvas analíticas na matriz para (a) DON, (b) ADONS e (c) NIV.

Os três analitos apresentaram enriquecimento de sinal, já que a curva na matriz apresentou maior inclinação. O efeito de matriz para DON foi de 10,2 %, para os ADONS foi de 12,9 % e para NIV foi de 7,9 %, calculados de acordo com a Equação 6, do item 4.2.5.6. Estes efeitos são considerados baixos, no entanto, para compensá-los, foi realizada a calibração com o extrato branco da matriz correspondente.

5.5 APLICABILIDADE

Após a realização da validação, o método foi aplicado para 5 amostras de trigo diferentes para consumo humano, adquiridos no comércio local de Pelotas - RS, com o objetivo de verificar ou não a presença dos tricotecenos em estudo. As letras A, B, C, D e E foram utilizadas para identificar cada amostra, conforme a Figura 17.



Figura 17: Diferentes tipos de trigo utilizados na aplicabilidade do método (A, B, C, D e E).

A presença de DON foi detectada em quatro das cinco amostras de trigo analisadas. A co-ocorrência de DON e ADONS também foi observada em uma única amostra. Em todas as amostras NIV ficou abaixo do limite de detecção, conforme a Tabela 23. A Figura 18 apresenta o cromatograma referente a amostra E.

A amostra E apresentou a maior quantidade de DON entre as amostras, sendo que nesta foram observados alguns grãos de milho misturados aos grãos de trigo, evidenciando uma qualidade inferior em relação ao armazenamento destes grãos. Esta quantidade de DON encontrada na amostra E é considerada elevada, visto que, a partir de janeiro de 2017, de acordo com a legislação brasileira, o limite máximo tolerável será de $1000 \mu\text{g kg}^{-1}$ para trigo em grão. Nos Estados Unidos, a legislação também estabelece para DON em trigo um limite máximo de $1000 \mu\text{g kg}^{-1}$. Já na Europa, este limite é de $1750 \mu\text{g kg}^{-1}$ para DON em trigo destinado ao consumo humano.

Tabela 23. Resultado da aplicabilidade do método QuEChERS adaptado em amostras de grãos de trigo comerciais.

Amostras	DON ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	ADONS ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	NIV ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
	RSD (%)	RSD (%)	RSD (%)
A	630,0 7,4	-	-
B	770,3 5,2	-	-
C	-	-	-
D	163,5 10,8	-	-
E	1329,1 4,8	186,5 9,7	-

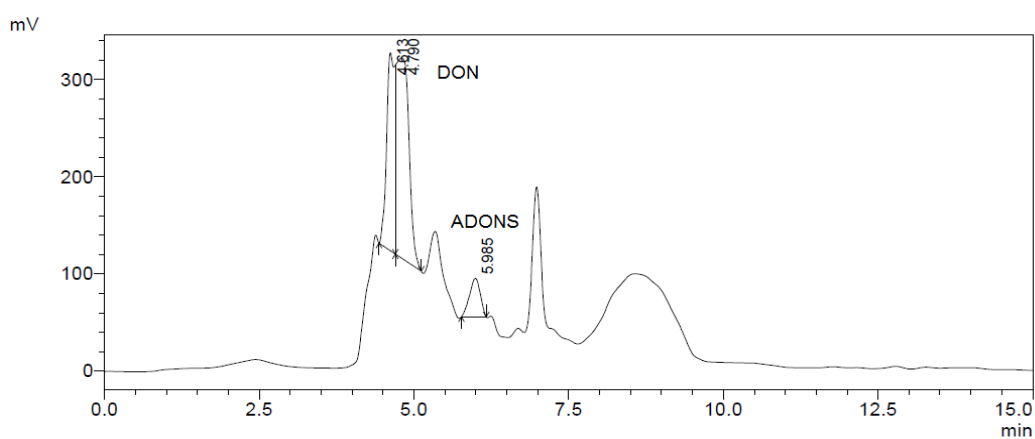


Figura 18. Cromatograma referente à amostra E obtido pelo método otimizado QuEChERS-CLAE-UV.

Santos *et al.* (2011) analisaram 36 amostras provenientes de estados do sul do Brasil e DON foi detectado em 72,2 % das amostras, em níveis que variaram de não-detectável a $1592 \mu\text{g kg}^{-1}$, com média de $321 \mu\text{g kg}^{-1}$.

Um estudo realizado com 19 amostras de trigos argentinos detectou DON em 13 amostras (300 a $7000 \mu\text{g kg}^{-1}$) e em 2 amostras ocorreu o aparecimento de DON ($7500 \mu\text{g kg}^{-1}$ e $6700 \mu\text{g kg}^{-1}$) e NIV ($50 \mu\text{g kg}^{-1}$ e $100 \mu\text{g kg}^{-1}$), respectivamente (PINTO *et al.*, 2008).

Ennouari *et al.* (2013) investigaram a presença de DON em 81 amostras de trigo provenientes do Marrocos e os resultados analíticos mostraram que 9 amostras estavam contaminadas com DON em níveis que variaram de 65 e $1310 \mu\text{g kg}^{-1}$.

Entre os estudos realizados, comprovou-se que o DON é o tricoteceno mais largamente distribuído entre os grãos de trigo e derivados e sua ocorrência está fortemente relacionada à suscetibilidade dos cultivares a fungos, etapas de cultivo e armazenamento dos grãos.

6. CONCLUSÕES

Os métodos Tanaka e QuEChERS foram os que apresentaram valores de recuperação entre 78 – 118 %, ficando dentro da faixa aceitável que é de 70 – 120 %. Visando a economia de reagentes e a diminuição do tempo de preparo e exposição do analista, o método QuEChERS foi escolhido para a otimização.

Com os resultados obtidos, pode-se concluir que as adaptações empregadas no método de extração QuEChERS comprovaram suas vantagens principais como rapidez, simplicidade, confiabilidade, baixo custo e baixo consumo de solventes, não requerendo o uso de equipamentos e vidrarias especiais quando comparado aos outros métodos de extração.

O método QuEChERS elimina ou substitui algumas etapas analíticas mais complicadas empregadas geralmente em métodos tradicionais, como o método proposto por Tanaka *et al.* (2000). A etapa de extração foi otimizada na partição através das quantidades de sais sulfato de magnésio (6 g) e cloreto de sódio (1,5 g) utilizados, bem como a adição de sulfato de magnésio (0,3 g) e C₁₈ (0,1 g) na etapa de *clean up* onde estes são misturados diretamente com o extrato. Deste modo, pode-se afirmar que o método mostrou-se muito eficiente para os compostos estudados, não necessitando de nenhum tipo de pré-concentração da amostra para a determinação das micotoxinas.

A calibração realizada na matriz foi utilizada para corrigir alguns efeitos de matriz menores que ainda permanecem para algumas combinações analito-matriz. As condições cromatográficas otimizadas para o CLAE-UV permitiram a identificação e quantificação dos compostos em estudo, em um tempo de análise de 15 minutos, com uma vazão de 0,5 mL min⁻¹ e fase móvel acetonitrila:água (70:30). A separação cromatográfica dos compostos pode ser avaliada visualmente e através dos parâmetros cromatográficos *k* e α .

O uso dos sistema CLAE-UV proporcionou grande especificidade, precisão e sensibilidade, de modo que os limites de detecção (16,7 – 33,3 µg kg⁻¹) e quantificação (55,9 – 110,9 µg kg⁻¹), obtivessem valores inferiores ao limite máximo estabelecido por órgãos reguladores (ANVISA – 1500 µg kg⁻¹ para DON em trigo; *EUROPA*

COMMISSION REGULATION (EC) – 1750 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para DON em trigo), permitindo assim a identificação e quantificação dos compostos em estudo.

As curvas analíticas apresentaram valores de r maiores que 0,99 para as faixas de concentração que variaram de 1 – 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para DON e NIV e de 0,5 – 4 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para os ADONS, necessárias às aplicações.

A detecção por DAD também foi adequada pois possibilitou a confirmação da identidade dos compostos pelo espectro molecular, permitindo correlacioná-la aos dados obtidos pos CLAE-UV.

O desenvolvimento deste trabalho pode auxiliar para estabelecer limites máximos tolerados na legislação brasileira para os tricotecenos 3-ADON, 15-ADON e NIV, pois não há limites estabelecidos em trigo e derivados para estes analitos, apesar da importância, devido às suas formas de utilização e toxicidade.

A análise de cinco tipos de grãos de trigo comerciais foi realizada e foi possível verificar a ocorrência dos tricotecenos, sendo que quatro das cinco amostras apresentaram a presença de DON e uma amostra apresentou a presença de ADONS. NIV não foi detectado em nenhuma das amostras.

Assim, tendo em vista a possibilidade de contaminação micotoxicológica do trigo em que humanos e animais possam estar submetidos, os resultados desta pesquisa vem contribuir com uma metodologia adequada e validada para investigar as quantidades presentes de DON, ADONS e NIV em grãos de trigo, proporcionando maiores subsídios de controle para as agências reguladores no que diz respeito ao cultivo, armazenamento e beneficiamento deste cereal.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABITRIGO – **Associação Brasileira da Indústria do Trigo**. Disponível em: <<http://www.abitrigo.com.br>> Acesso em janeiro, 2014.

ALDRED, D.; MAGAN, N. Prevention strategies for trichothecenes. **Toxicology Letters**, v. 153, p. 165-171, 2004.

ALEXANDER, N.J., PROCTOR, R.H., MCCORMICK, S.P. Genes, gene clusters, and biosynthesis of trichothecenes and fumonisins in *Fusarium*. **Toxin Reviews**, v. 28, p. 198-215, 2009.

ALMEIDA, C.; FERNANDES, J. O.; CUNHA, S. C. A novel dispersive liquid-liquid microextraction (DLLME) gas chromatography-mass spectrometry (GC/MS) method for the determination of eighteen biogenic amines in beer. **Food Control**, v. 25, p. 380-388, 2012.

ANASTASSIADES, M.; LEHOTAY, S.; STAJNBAHER, D.; SCHENCK, F. J. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and dispersive solid-phase extraction for the determination of pesticide residues in produce. **Journal of AOAC International**, v. 86, p. 412-431, 2003.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Resolução RE nº 899, de 29/05/2003. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>> Acesso em dezembro, 2013.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Resolução RDC nº 59, de 26/12/2013. Dispõe sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>> Acesso em maio, 2014.

BADIALE – FURLONG, E. **Tricotecenos em trigo: Um estudo de metodologia analítica, incidência, contaminação simultânea por outras micotoxinas e de alguns fatores que influem na produção do campo**. 1992. Tese de doutorado em Ciência de Alimentos – UNICAMP, Campinas, SP.

BAERE,S.DE; GOOSSENS, J.; OSSELAERE, A.; DEVREESE, M.; VANDENBROUKE, V.; BACKER, P. DE; CROUBELS, S. Quantitative determination of T-2 toxin, HT-2 toxin, deoxynivalenol and deepoxy-deoxynivalenol in animal body fluids using LC-MS/MS detection. **Journal of Chromatography B**, v. 879, p. 2403-2415, 2011.

BARKER, S.A.; Applications of matrix solid-phase dispersion in food analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 880, p. 63-68, 2000.

BARKER, S.A.; Matrix solid-phase dispersion. **Journal of Chromatography A**, v. 885, p. 115-127, 2002.

BATA, A.; LÁSZTITY, R. Detoxification of mycotoxin-contaminated food and feed by microorganisms. **Trends in Food Science & Technology**, v. 10, p. 223-228, 1999.

BEMVENUTI, R. H.; HACKBART, H. C. S.; SOUZA,M. M.; BADIALE-FURLONG, E.; DORS, G. C.; FAGUNDES, C. A. Determinação de deoxinivalenol e zearalenona em arroz natural e parboilizado e suas frações utilizando quechers e hplc/uv-fl. **Química Nova**, v XY, nº 0, p. 1-6, 2012.

BENEDETTI, R.; NAZZI, F.; LOCCI, R.; FIRRAO, G. Degradation of fumonisin B1 by a bacterial strain isolated from soil. **Biodegradation**, v. 17, p. 31-38, 2006.

BENNETT, G. A.; SHOTWELL, O. L. Criteria for determining purity of Fusarium mycotoxins. **Journal of Association of Official Analytical Chemistry**, v. 73, p. 270-275, 1990.

BENSASSI, F.; GOLLI-BENNOUR, E.; ABID-ESSEFI, S.; BOUAZIZ, C.; HAJLAOUI, M. R.; BACHA, H. Pathway of deoxynivalenol-induced apoptosis in human colon carcinoma cells. **Toxicology**, v. 264, p. 104-109, 2009.

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

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 38, de 30/11/2010. Regulamento Técnico do Trigo.

BRIONES-REYES, D.; GOMÉZ-MARTINEZ, L.; CUERVA-ROLÓN, R. Zearalenone contamination in corn for human consumption in the state of Tlaxcala, México. **Food Chemistry**, v. 100, p. 693-698, 2007.

BRITO, N. M. *et al.* Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. **Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 13, p. 129-146, 2003.

BRYDEN, W.L. Mycotoxins in the food chain: Human health implications. **Asia Pac. J. Clin. Nutr.**, v. 16, p. 95-101, 2007.

CACCIAMANI, J. L. M.; PERES, G. L.; GARDA-BUFFON, J.; BADIALE-FURLONG, E. Efeito dos tratamentos térmicos seco e úmido nos níveis de aflatoxina b1 e ocratoxina a presentes em farelo e farinhas cereais. **Boletim CEPPA**, v. 25, p.157-164, 2007.

CALDAS, S.S.; **Otimização e Validação de métodos empregando DLLME, SPE, HPLC – DAD e LC – ESI – MS/MS para determinação de agrotóxicos em água subterrânea.** 2009. Dissertação de Mestrado em Química – FURG, Rio Grande.

CALDAS, S.S.; GONÇALVES, F.F.; PRIMEL, E.G.; PRESTES, O.D.; MARTINS, M. L.; ZANELLA, R. Principais técnicas de preparo de amostra para a determinação de resíduos de agrotóxicos em água por cromatografia líquida com detecção por arranjo de diodos e por espectrometria de massas. **Química Nova**, v. 34, nº 9, p. 1604-1617, 2011.

CALORI – DOMINGUES, M.A.; ALMEIDA, R.R.; TOMIKAWA, M.M.; GALLO,C.R.; GLORIA,E. M.; DIAS, C.T.S. Ocorrência de deoxinivalenol em trigo nacional e importado utilizado no Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, p.181-185, 2007.

CANO-SANCHO, F.M. VALLE-ALGARRA, M. JIMÉNEZ, P. BURDASPAL, T.M. LEGARDA, A.J. RAMOS, V. SANCHIS, S. MARÍN. Presence of trichothecenes and co-occurrence in cereal-based food from Catalonia (Spain). **Food Control**, v. 22, p. 490-495, 2011.

CASSIANO, M. N. *et al.* Validação em métodos cromatográficos para análises de pequenas moléculas em matrizes biológicas. **Química Nova**, v. 32, p. 1021-1030, 2009.

CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION. Joint FAO/WHO Food Standards programme; **Codex Committee on Contaminants in Foods**; First Session; Beijing, China, 2007.

COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. **Fundamentos de Cromatografia**. Campinas: Editora da Unicamp, 456 p., 2006.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. Cronograma de divulgação de safras – grãos, café, cana-de-açúcar e laranja - 2013/2014. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>> Acesso em fevereiro, 2014.

CREPPY, E. E. Update of survey, regulation and toxic effects on mycotoxins in Europe. **Toxicology Letters**, v. 127, p. 1-3, p. 19-28, 2002.

DEL PONTE, E. M. *et al.* Giberela do trigo – aspectos epidemiológicos e modelos de previsão. **Fitopatologia Brasileira**, v. 29, p. 587-606, 2004.

DEL PONTE, E. M.; GARDA-BUFFON, J.; BADIALE-FURLONG, E. Deoxynivalenol and nivalenol in commercial wheat grain related to *Fusarium* head blight epidemics in southern Brazil. **Food Chemistry**, v. 132, p. 1087-1091, 2012.

DESJARDINS, A. E. *Fusarium Mycotoxins Chemistry, Genetics and Biology*. **APS Press**, St. Paul. p. 1-260, 2006.

D`MELLO, J. P. F.; PLACINTA, C. M.; MACDONALD, A. M. C. *Fusarium mycotoxins: a review of global implications for animal health, welfare and productivity*. **Animal Feed Science and Technology**, v. 80, p. 183-205, 1999.

DÖLL, S.; DÄNICKE, S. The *Fusarium* toxins deoxynivalenol (DON) and zearalenone (ZON) in animal feeding. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 102, p. 132-145, 2011.

DÓREA, H.S.; LANÇAS, F.M. Matrix Solid-Phase Dispersion (MSPD) Extraction of Organophosphorus and Synthetic Pyrethroid Pesticides in Cashew nut and Passion Fruits. **Journal of Microcolumn Separations**, v. 11, p. 367-375, 1999.

ECONOMOU, A.; BOTITSI, H.; ANTONIOU, S.; TSIPI, D. Determination of multiclass pesticides in wines by solid-phase extraction and liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, p. 5856-5867, 2009.

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – **Trigo**. Passo Fundo, 2009. Disponível em: <<http://www.cnpt.embrapa.br/culturas/trigo/index.htm/>>. Acesso em agosto, 2012.

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – **Trigo**. Passo Fundo, 2013. Disponível em: <<http://www.cnpt.embrapa.br/culturas/trigo/index.htm/>>. Acesso em janeiro, 2014.

ENNOUARI, A.; SANCHIS, V.; MARÍN, S.; RAHOUTI, M.; ZINEDINE, A. Occurrence of deoxynivalenol in durum wheat from Morocco. **Food Control**, v. 32, p. 115-118, 2013.

ESCLAPEZ, M.D.; GARCÍA-PÉREZ, J.V.; MULET, A.; CARCEL, J. A. Ultrasound-assisted extraction of natural products. **Food Engineering Reviews**, v. 3, p. 108-120, 2011.

EUROPA, COMMISSION REGULATION (EC) n° 856/2005, 6/6/2005, Official Journal of the European Union, of 07/06/2005.

EUROPA, COMMISSION REGULATION N° 1881/2006. Official Journal of the European Union, v. 364, p. 5-24, 2006.

FAO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **Worldwide regulations for mycotoxins in food and feed in 2003**. FAO FOOD AND NUTRITION PAPER 81, 2003.

FARAHANY, E. M.; JINAP, S. Influence of noodle processing (industrial protocol) on deoxynivalenol. **Food Control**, v. 22, p. 1765-1769, 2011.

FERREIRA, I.; FERNANDES, J.O.; CUNHA, S.C. Optimization and validation of a method based in a QuEChERS procedure and gas chromatography e mass spectrometry for the determination of multi-mycotoxins in popcorn. **Food Control**, v. 27 p. 188-193, 2012.

FONSECA, H. **Micotoxinas: perspectiva latinoamericana**. Rio de Janeiro: Editora da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, v. 261, 1996.

FOOD INGREDIENTES BRASIL. **As Micotoxinas**, v. 7, p. 34-40, 2009.

FU, L. *et al.* Application of dispersive liquid-liquid microextraction for the analysis of triazophos and carbaryl pesticides in water and fruit juice samples. **Analytica Chimica Acta**, v. 632, p. 285-289, 2009.

GONÇALVES, F. F. **Estudo de métodos empregando HPLC – DAD e LC – MS/MS para a determinação de resíduos de herbicidas em água e solo do cultivo do arroz irrigado**. 2007. 148 p. Tese (Doutorado em Química) – UFSM, Santa Maria, RS.

GOSETTI, F.; MAZZUCO, E.; ZAMPIERI, D.; GENNARO, M.C. Signal supression/enhancement in high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, p. 3929-3937, 2010.

HACKBART, H.C.S.; PRIETTO, L.; PRIMEL, E.G.; GARDA-BUFFON, J.; BADIALE-FURLONG, E. Simultaneous Extraction and Detection of Ochratoxin A and Citrinin in Rice. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 23, nº1, p. 103-109, 2012.

HAJSLOVA, J.; MALACHOVA, A.; DZUMAN, Z.; VEPRIKOVA, Z.; VACLAVIKOVA, M.; ZACHARIASOVA, M. Deoxynivalenol, Deoxynivalenol-3-glucoside, and Enniatins: The Major Mycotoxins Found in Cereal-Based Products on the Czech Market. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, p.12990-12997, 2011.

HARRIS, D.C.; **Análise Química Quantitativa**. 6 Edição. Rio de Janeiro: LTC Editora, 876 p., 2003.

HE, J.; ZHOU, T.; YOUNG, J. C.; BOLAND, G. J.; SCOTT, T. Chemical and biological transformations for detoxification of trichothecene mycotoxins in human and animal food chains: a review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 21, p. 67-76, 2010.

HO, J.A.; DURST, R.A. Detection of fumonisin B1: Comparison of flow-injection liposome immunoanalysis with high-performance liquid chromatography. **Analytical Biochemistry**, v. 6, p. 7-13, 2003.

IBÁÑEZ-VEA, M.; MARTINEZ, R.; GONZÁLEZ-PEÑAS, E.; LIZARRAGA, E.; CERAIN, A. L. Co-occurrence of aflatoxins, ochratoxin A and zearalenone in breakfast cereals from spanish market. **Food Control**, v. 22, p. 1949-1955, 2011.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Produção Agrícola Municipal, 2011. Disponível em <<http://www.seplag.rs.gov.br>> Acesso em janeiro, 2014.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER - IARC. Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. **Some naturally occurring substances, food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins**. World Health Organization, v. 56, p. 397-333, 1993.

INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. DOQ – CGCRE – 008: Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos. Brasília, p. 1-19, 2003.

KIMURA, M., TOKAI, T., TAKAHASHI-ANDO, N., OHSATO, S., FUJIMURA, M. Molecular and genetic studies of Fusarium trichothecene biosynthesis pathways, genes, and evolution. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 71, p. 2105-2123, 2007.

KNOW MYCOTOXINS. **Tricotecenos**, 2008. Disponível em: <<http://www.knowmycotoxins.com>>. Acesso em julho, 2012.

KRSKA, R.; SCHUBERT-ULLRICH, P.; JOSEPHS, R. D.; EMTEBORG, H.; BUTTINGER, G.; PETERSON, H.; EGMOND, H. P. V.; SHOTHORST, R. C.; MACDONALD, S.; CHAN, D. Determination of molar absorptivity coefficients or major

type-B trichothecenes and certification of calibrators for deoxynivalenol and nivalenol. **Analytical Bioanalytical Chemistry**, v. 338, p. 1215-1226, 2007.

KRSKA, R.; WELZIG, E.; BOUDRA, H. Analysis of Fusarium toxins in feed. **Animal Feed Science and Technology**, v. 137, p. 241-264, 2007.

KURZ, M. H. S. **Estudo de métodos empregando extração em fase sólida e análise por HPLC – DAD e GC – ECD para determinação de resíduos de pesticidas em águas e degradação a campo**. 2007. 161 p. Tese (Doutorado em Química) – UFSM, Santa Maria, RS.

KUSHIRO, M. Effects of milling and cooking processes on the Deoxynivalenol content in wheat. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 9, p. 2127-2145, 2008.

LAMARDO, L. C. A.; NAVAS, S.; SABINO, M. Desoxinivalenol (DON) em trigo e farinha de trigo comercializados na cidade de São Paulo. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 65, nº 1, p. 32-35, 2006.

LANÇAS, F.M. The Role of the Separation Sciences in the 21th Century. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 14, p. 183-197, 2003.

LANÇAS, F. M. **Validação de Métodos Cromatográficos de Análise**. São Carlos: RiMa, 2004b, 62 p.

LANÇAS, M. F. *et al.* A Cromatografia Líquida Moderna e a Espectrometria de Massas: finalmente “compatíveis” ? **Scientia Chromatographica**, v. 1, p. 35-61, 2009.

LANCOVA, K., HAJŠLOVA, J., POUŠTKA, J., KRPLŮVA, A., ZACHARIASOVÁ, M., DOSTÁLEK, P., *et al.* Transfer of Fusarium mycotoxins and ‘masked’ Deoxynivalenol (Deoxynivalenol-3-glucoside) from field barley through malt to beer. **Food Additives and Contaminants**, v. 25, p. 732-744, 2008.

LANGSETH, W.; RUNDBERGET, T. Instrumental methods for determination of nonmacrocylic trichothecenes in cereals, foodstuffs and cultures. **Journal of Chromatography A**, v. 815, p. 103-121, 1998.

LATTANZIO, V.M.T; SOLFRIZZO, M.; POWERS, S.; VISCONTI, A. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 21, p. 3253-3261, 2007.

LATTANZIO, V. M. T.; SOLFRIZZO, M.; GIROLAMO, A.; CHULZE, S. N.; TORRES, A. M.; VISCONTI, A. LC–MS/MS characterization of the urinary excretion profile of the mycotoxin deoxynivalenol in human and rat. **Journal of Chromatography B**, v. 879, p. 707-715, 2011.

LEDOUX, M. Analytical methods applied to the determination of pesticide residues in foods of animal origin. A review of the past two decades. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, p. 1021-1036, 2011.

LEHOTAY, S. J.; LIGHTFIELD, A. R.; HARMAN-FETCHO, J. A.; DONOGHUE, D. J. Analysis of pesticide residues in eggs by direct sample introduction/gas chromatography/tandem mass spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 4589-4596, 2001.

MAJORS, R.E. QuEChERS — A New Technique for Multiresidue Analysis of Pesticides in Foods and Agricultural Samples. **LCGC Asia Pacific**, v. 11, p. 22-31, 2008.

MALACHOVA *et al.* Deoxynivalenol, Deoxynivalenol-3-glucoside, and Enniatins: The Major Mycotoxins Found in Cereal-Based Products on the Czech Market. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, p. 12990-12997, 2011.

MARESCA, M. From the Gut to the Brain: Journey and Pathophysiological Effects of the Food-Associated Trichothecene Mycotoxin Deoxynivalenol. **Toxins**, v.5, p.784-820, 2013.

MARTINS, M. L.; MARTINS, H. M.; Influence of water activity, temperature and incubation time on the simultaneous production of deoxynivalenol and zearalenone in corn (*Zea mays*) by *Fusarium graminearum*. **Food Chemistry**, v. 79, p. 331-336, 2002.

MAŠTOVSKÁ, K.; LEHOTAY, S. J. Evaluation of common organic solvents for gas chromatography analysis and stability of multiclass pesticide residues. **Journal Chromatograph A**, v. 1040, p. 259-272, 2004.

MEISTER, U.; New method of citrinin determination by HPLC after polymide column clean-up. **European Food Research and Technology**, v. 218, p. 394-399, 2004.

MELLO, J. P. F. & MACDONALD, A.M.C. Mycotoxins. **Animal Feed Science technology**, v. 69, p. 155-166, 1997.

MELWANKI, M. B.; FUH, M. Partitioned dispersive liquid–liquid microextraction: An approach for polar organic compounds extraction from aqueous samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1207, p. 24-28, 2008.

MENEELY, J. P. RICCI, F., VAN EGMOND, H.P., ELLIOTT, C.T. Current methods of analysis for the determination of trichothecene mycotoxins in food. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 30, p. 192-203, 2011.

MOSSA, M. O.; THRAME, U.; *Fusarium* taxonomy whit relation to trichothecene formation. **Toxicology Letters**, v. 153, p. 23-28, 2004.

MURPHY, P.A.; HENDRICH, S.; LANDGREN, C.; BRYANT, C. Food Mycotoxins: an update. **Journal Food Science**, v. 71, p. 51-71, 2006.

NAGARAJU, D.; HUANG, S. Determination of triazine herbicides in aqueous samples by dispersive liquid–liquid microextraction with gas chromatography–ion trap mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v.1161, p. 89-97, 2007.

NAGY, C. M.; FEJER, S. N.; BEREK, L.; MOLNAR, J.; VISKOLCZ, B. Hydrogen bondings in deoxynivalenol (DON) conformations—a density functional study. **Journal of Molecular Structure**, v. 726, p. 55-59, 2005.

NANCY *et al.* The genetic basis for 3-ADON and 15-ADON trichothecene chemotypes in *Fusarium*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 48, p. 485-495, 2011.

NTP – NATIONAL TOXICOLOGY PROGRAM. **Supporting Nomination for Toxicological Evaluation by the National Toxicology Program**, 2009.

OLIVEIRA, M. S.; PRADO, G.; ABRANTES, F. M.; SANTOS, L. G.; VELOSO, T. Incidência de aflatoxinas, desoxivalenol e zearalenona em produtos comercializados em cidades do Estado de Minas Gerais no período de 1998 - 2000. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 61, nº1, p. 1-6, 2002.

PALLARONI.; HOLST C.V.; ESKILSSON C.S.; BJORKLUND E.; Microwave-assisted extraction of zearalenone from wheat and corn. **Analytical and Bionalytical Chemistry**, v. 374, p. 161-166, 2002.

PALMA M.; LIAZID A.; BRIGUI J.; BARROSO C. G.; Investigation on Ochratoxin A stability using different extracton techiques. **Talanta**, v. 71, p. 976-980, 2007.

PATERSON, R.R.M.; VENÂNCIO, A.; LIMA, N. Solutions to Penicillium taxonomy crucial to mycotoxin research and health. **Research in Microbiology**, v. 155, p. 507-513, 2004.

PESTKA, J. J. Deoxynivalenol: Mechanisms of action, human exposure, and toxicological relevance. **Arch. Toxicol.**, v. 84, p. 663-679, 2010.

PESTKA, J. J. Deoxynivalenol induced proinflammatory gene expression: Mechanisms and pathological sequelae. **Toxins**, v. 2, p. 1300-1317, 2010.

PINHO, G.P.; NEVES, A.A.; QUEIROZ, M.E.L.R.; SILVÉRIO, F.O. Optimization of the liquid-liquid extraction method and low temperature purification (LLE-LTP) for pesticide residue analysis in honey samples by gas chromatography. **Food Control**, v. 21, p. 1307-1311, 2010.

PINTO, V. E. F.; TERMINIELLO, L. A.; BASILICO, J. C.; RITIENE, A. Natural occurrence of nivalenol and mycotoxigenic potential of *Fusarium Graminearum* strains in wheat affected by head blight in argentina. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, p.157-162, 2008.

PRANGE, A.; BIRZELE, B.; KRÄMER, J.; MEIER, A.; MODROW, H.; KÖHLER, P. Fusarium-inoculated wheat: deoxynivalenol contents and baking quality in relation to infection time. **Food Control**, v. 16, p. 739-745, 2005.

PRESTES, O.D.; FRIGGI, C.A.; ADAIME, M.B.; ZANELLA, R. QuEChERS – Um método moderno de preparo de amostra para determinação multirresíduo de pesticidas em alimentos por métodos cromatográficos acoplados à espectrometria de massas. **Química Nova**, v. 32, nº 6, p. 1620-1634, 2009.

PURI, K. D., & ZHONG, S. The 3ADON population of *Fusarium graminearum* found in North Dakota is more aggressive and produces a higher level of DON than the prevalent 15ADON population in spring wheat. **Phytopathology**, v. 100, p. 1007-1014, 2010.

PUSSEMIER, L.; PIE´RARD, J. Y.; ANSELME, M.; TANGNI, E.K.; MOTTE, J.C.; LARONDELLE, Y. Development and application of analytical methods adapted to the determination of mycotoxins in organic and conventional cereals. **Food Additives & Contaminants**, v. 23, p. 1208-1218, 2006.

RAMOS, L. Critical overview of selected contemporary sample preparation techniques. **Journal of Chromatography A**, v. 1221, p. 84-98, 2012.

RAZZAZI-FAZELI, J. BÖHM, K. JARUKAMJORN, J. ZENTEK. Simultaneous determination of major B-trichothecenes and the de-epoxy-metabolite of deoxynivalenol in pig urine and maize using high-performance liquid chromatography–mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 796, p. 21-33, 2003.

REN, Y.; ZHANG, Y.; SHAO, S.; CAI, Z.; FENG, L.; PAN, H.; WANG, Z. Simultaneous determination of multi-component mycotoxin contaminants in foods and feeds by ultra-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1143, p. 48-64, 2007.

REZZAE, M. *et al.* Determination of organic compounds in water using dispersive liquid-liquid microextraction. **Journal of Chromatography A**, v.1116, p. 1-9, 2006.

RIBANI, M., *et al.* Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, p. 771-780, 2004.

RICHARD, J. L. Some major mycotoxins and their micotoxicoses - An overview. **International Journal of Food Microbiology**, v. 119, p. 3-10, 2007.

RODRIGUES, S. **Otimização e validação de métodos empregando MSPD, QuEChERS modificado e LC-ESI-MS/MS para determinação de agrotóxicos em cebola.** 2010. Dissertação de Mestrado em Química - FURG, Rio Grande, RS.

RODRIGUEZ-MOZAZ,S.; LOPEZ DE ALDA, M.J.; BARCELÓ, D. Advantages and limitations of on-line solid phase extraction coupled to liquid chromatography-mass spectrometry technologies versus biosensors for monitoring of emerging contaminants in water. **Journal Chromatography A**, v. 1152, p. 97-115, 2007.

RUBERT, C. SOLER, J. MAÑES. Evaluation of matrix solid-phase dispersion (MSPD) extraction for multi-mycotoxin determination in different flours using LC–MS/MS. **Talanta**, v. 85, p. 206-215, 2011.

RUBERT, J. ; DZUMAN, Z.; VACLAVIKOVA, M.; ZACHARIASOVA, M.; SOLER, C.; HAJSLLOVA, J. Analysis of mycotoxins in barley using ultra high liquid chromatography high resolution mass spectrometry: Comparison of efficiency and efficacy of different extraction procedures. **Talanta**, 2012. <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2012.07.010>

SAITO, Y.; KODAMA, S.; MATSUNAGA, A.; YAMAMOTO, A.; **J. AOAC Int.** v. 87, p. 1351-1356, 2004.

SAMAR, M. M., NEIRA, M. S., RESNIK, S. L., & PACIN, A. Effect of fermentation on naturally occurring Deoxynivalenol (DON) in Argentinean bread processing technology. **Food Additives and Contaminants**, v. 18, p. 1004-1010, 2001.

SANTOS *et al.* Monitoring and ingestion of deoxynivalenol by wheat. **Ciências de Alimentos**, v. 32, nº 4, p. 1439-1450, 2011.

SASANYA, J. J., HALL, C., & WOLF-HALL, C. Analysis of Deoxynivalenol, masked Deoxynivalenol, and Fusarium graminearum pigment in wheat samples, using liquid chromatography-UV-mass spectrometry. **Journal of Food Protection**, v. 71, p. 1205-1213, 2008.

SCHMALE, D.G.; BERGSTROM G. C. Giberela ou Fusariose. **The Plant Health Instructor**, 2003. Portuguese translation by Emerson M. Del Ponte, 2006.

SCOTT, R.P.W. Liquid Chromatography Detectors. **Chrom-Ed Book Series-library4science, LLC**, 2003a. Disponível em <[http://www. Library4science.com/](http://www.Library4science.com/)> Acesso em julho de 2012.

SENAY S., KIMBERLY B., KRISTIN L. W., YAN GU, STEVEN Y. QIAN. Analysis of Deoxynivalenol and Deoxynivalenol-3-glucoside in wheat. **Food Control**, v. 26, p. 287-292, 2012.

SHAMS, M.; MITTERBAUER, R.; CORRADINI, R.; WIESENBERGER, G.; DALL'ASTA, C.; SCHUHMACHER, R.; KRŠKA, R.; ADAM, G.; BERTHILER, F. Isolation and Characterization of a New Less-Toxic Derivative of the Fusarium Mycotoxin Diacetoxyscirpenol after Thermal Treatment. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, p. 9709-9714, 2011.

SIRHAN, A. Y.; TAN, G. H.; WONG, R. C. S. Method validation in the determination of aflatoxins in noodle samples using the QuEChERS method (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe) and high performance liquid chromatography coupled to a fluorescence detector (HPLC–FLD). **Food Control**, v. 22, p. 1807-1813, 2011.

SKOOG, D. A. *et al.* **Princípios de Análise Instrumental**. 5ª Edição. Porto Alegre: Bookman, 836 p., 2002.

SOARES, L. M. V. Como obter resultados confiáveis em cromatografia. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 60, p. 79-84, 2001.

SOARES, L. V. **Curso Básico de Instrumentação para Analistas de Alimentos e Fármacos**. 1ª Edição. São Paulo: Manole, p. 200-203, 2006.

SOLER *et al.* Optimization of Matrix Solid-Phase Dispersion method for simultaneous extraction of aflatoxins and OTA in cereals and its application to commercial samples. **Talanta**, v. 82, p. 567-574, 2010.

SORIANO J.M.; BLESA J.; BERRADA H.; MOLTÓ J. C.; MAÑES J. Rapid determination of ochratoxin A in Rice cereals and cereal products by liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1046, p. 127-131, 2004.

SOSPEDRA, I.; BLESA, J.; SORIANO, J. M.; MANES, J. Use of the modified quick easy cheap effective rugged and safe sample preparation approach for the simultaneous analysis of type A- and B-trichothecenes in wheat flour. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, p. 1437-1440, 2010.

STAN, H. J. Pesticide residue analysis in foodstuffs applying capillary gas chromatography with mass spectrometry detection: State-of-the-art use of modified DFG-multimethod S19 and automated data evaluation. **Journal of Chromatography A**, v. 892, p. 347-377, 2000.

STECHER *et al.* Evaluation of extraction methods for the simultaneous analysis of simple and macrocyclic trichothecenes. **Talanta**, v.73 , p. 251-257, 2007.

STEYN, P. S. Mycotoxins, general view, chemistry and structure. **Toxicology Letters**, v. 82/83, p. 843-851, 1995.

SYLOS, C.M.; SIMIONATO, E. M. R. S.; ASTRAY, R.M. Occurrence of ochratoxin A and aflatoxins in rice. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 62, p. 123-130, 2003.

TAYLOR, P. J. Matrix effects: The Achilles heel of quantitative high-performance liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry. **Clinical Biochemistry**, v.38, p. 328-334, 2005.

TANAKA, T.; YONEDA, A.; INOUE, S.; SUGIURA, Y.; UENO, Y.; Simultaneous determination of trichothecene mycotoxins and zearalenone in cereals by gas chromatography–mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 882, 2000.

TEKEL, J.; HATRIK, S. Pesticide residue analyses in plant material by chromatographic methods: clean-up procedures and selective detectors. **Journal of Chromatography A**, v. 754, p. 397-410, 1996.

TORRES, C.M.; PICO, Y. Comparison of octadecylsilica and graphitized carbon black as materials for solid-phase extraction of fungicide and insecticide residues from fruit and vegetables. **Journal of Chromatography A**, v. 778, p.127-137, 1997.

TREUCKSESS, M. W. In *Official Methods of Analysis of AOAC International*; Horwitz, W., ed.; **AOAC International**: Gaithersburg, Md., 56, 2003.

TÜRKER, L.; GÜMÜS, S. A theoretical study on vomitoxin and its tautomers. **Journal of Hazardous Materials**, v.163, p. 285-294, 2009.

TURNER, N. W.; SUBRAHMANYAM, S.; PILETSKY, S. A. Analytical methods for determination of mycotoxins: A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 632, p. 168-180, 2009.

USDA - United States Department of Agriculture. **Food and Nutrition Information Center**, 2013.

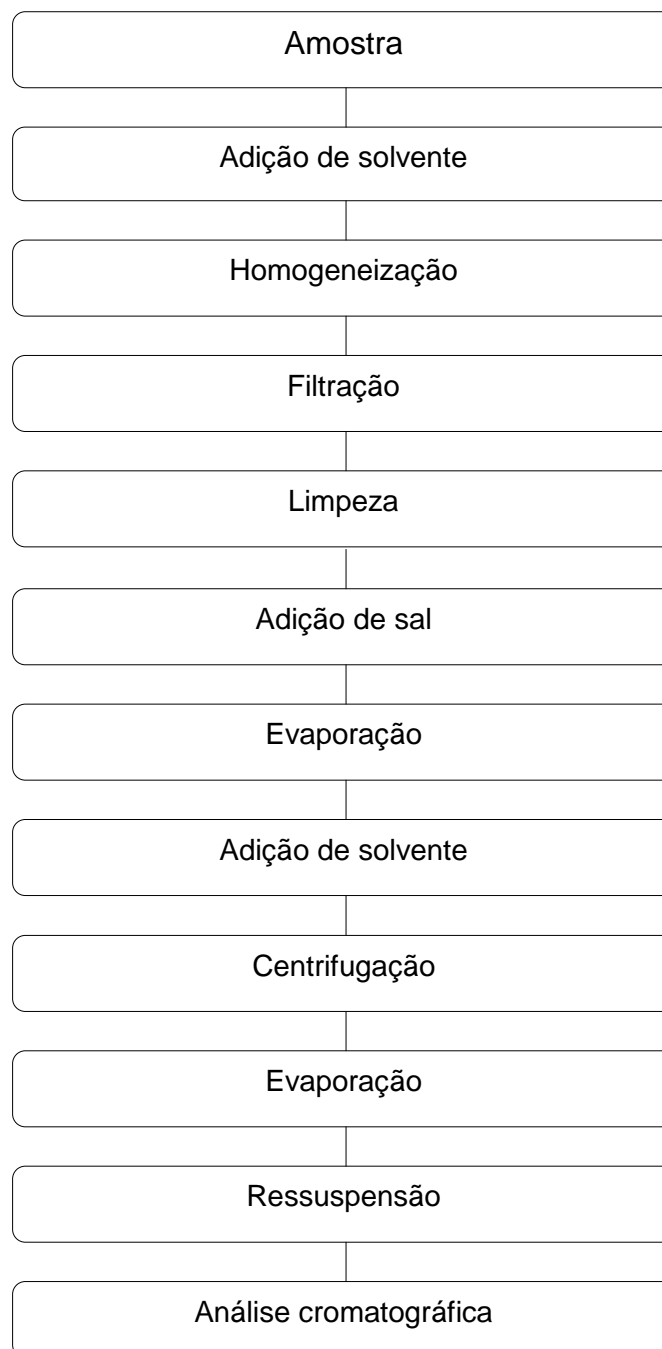
VARGA, J.; PÉTERI, Z.; TÁBORIA, K.; TÉRENB, J.; VÁGVOLGYIA, C. Degradation of ochratoxin A and other mycotoxins by *Rhizopus* isolates. **International Journal of Food Microbiology**, v. 99, p. 321-328, 2005.

WALORCZYK, S. Development of a multi-residue screening method for the determination of pesticides in cereals and dry animal feed using gas chromatography-triple quadrupole tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1165, p. 200-212, 2007.

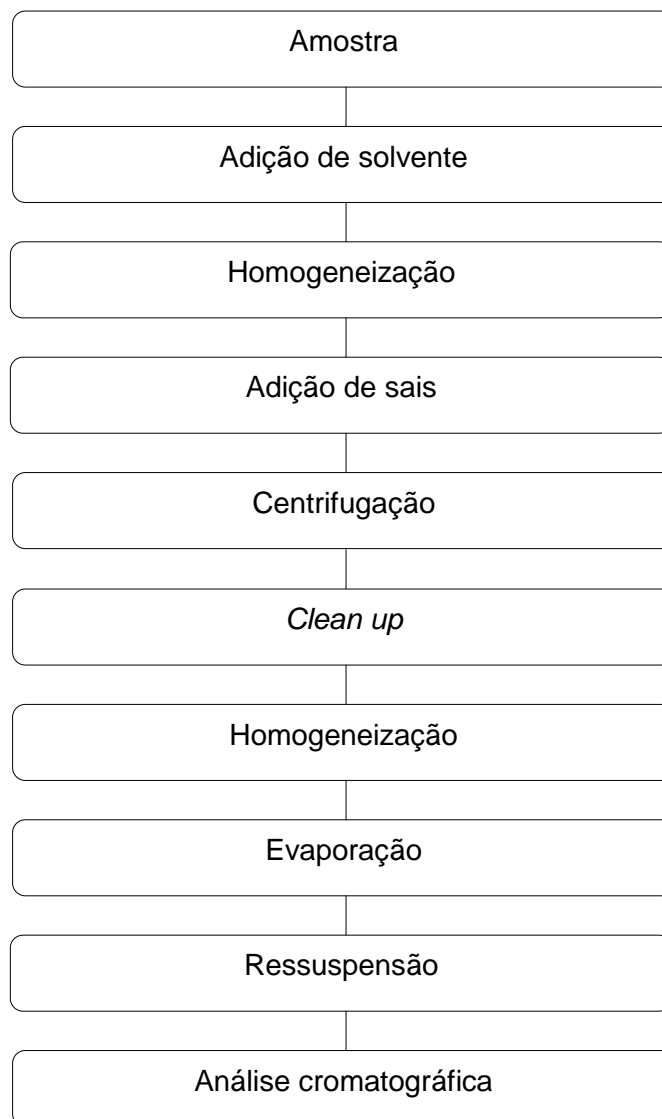
WEI, G.; LI, Y.; WANG, X. Application of dispersive liquid-liquid microextraction combined with high-performance liquid chromatography for the determination of methomyl in natural waters. **Journal of Separation Science**, v. 30, p. 3089-3095, 2007.

XIONG, J.; HU, B. Comparison of hollow fiber liquid phase microextraction and dispersive liquid-liquid microextraction for the determination of organosulfur pesticides in environmental and beverage samples by gas chromatography with flame photometric detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1193, p. 7-18, 2008.

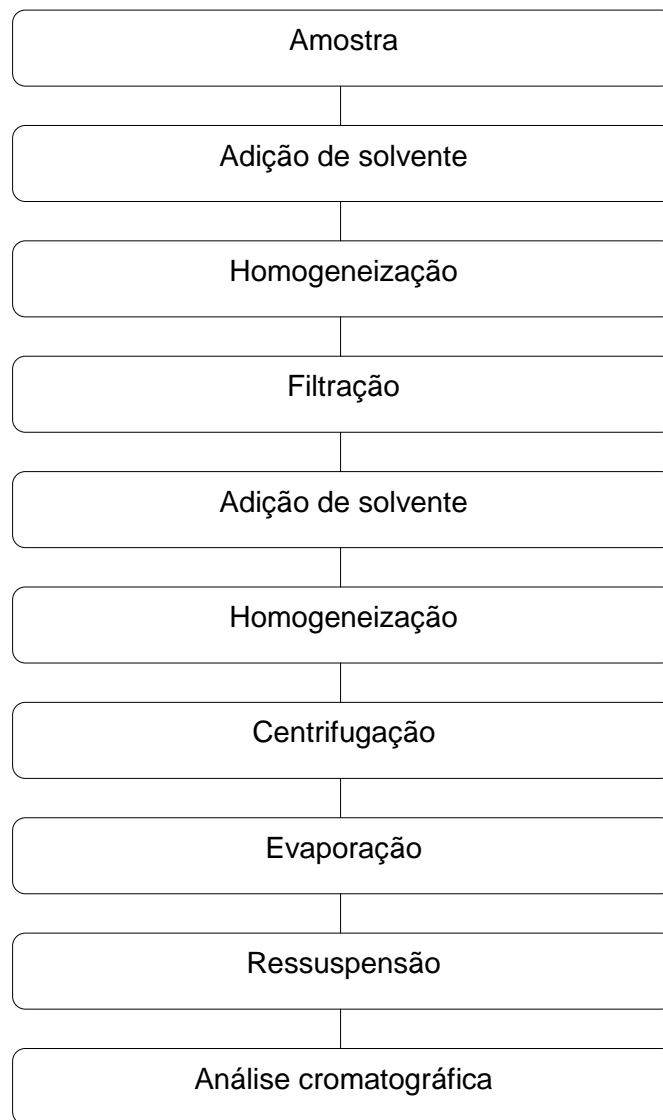
YOSHIZAWA, T.; HIROAKI, T.; OHI, T. Structure of a novel metabolite from deoxynivalenol, a trichothecene mycotoxin, in animals. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 47, p. 2133-2135, 1983.

Apêndice 1. Fluxograma do método proposto por Tanaka *et al.* (2000).

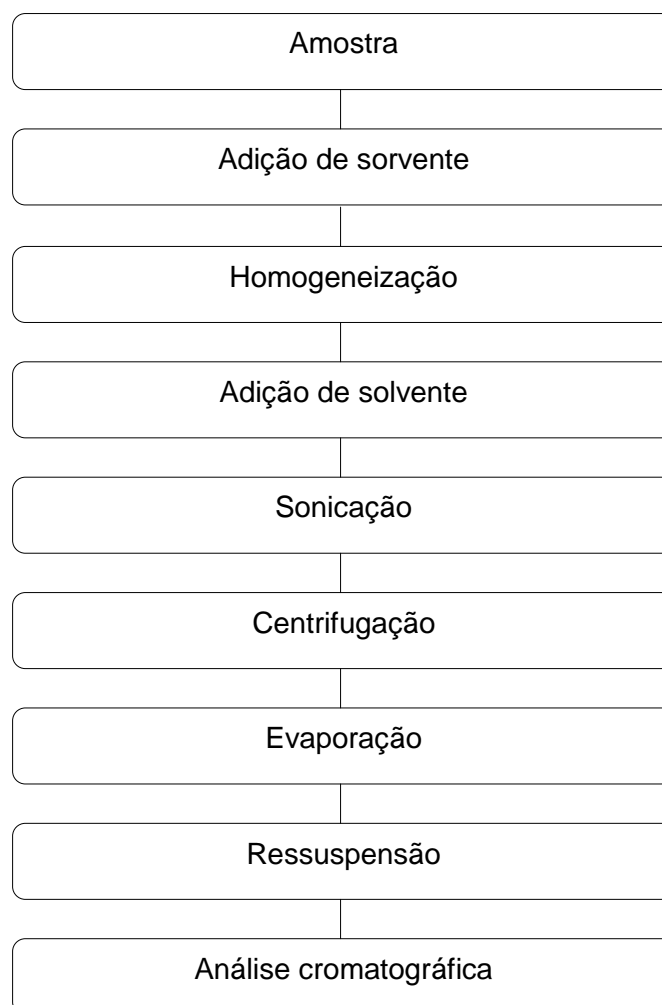
Apêndice 2. Fluxograma do método QuEChERS modificado por Bemvenuti *et al.* (2012).

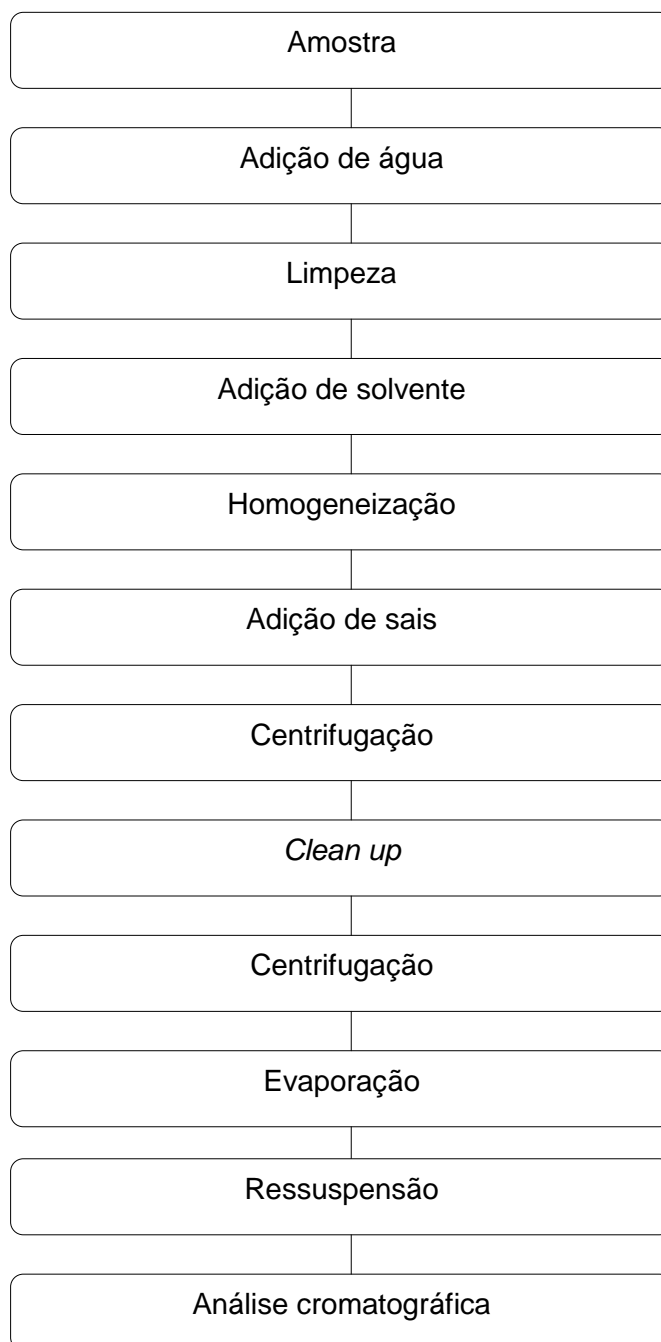


Apêndice 3. Fluxograma da Técnica SLE (Extração Sólido – Líquido) acoplada à DLLME (Microextração Dispersiva Líquido – Líquido) desenvolvida por Rezaee *et al.* (2006).



Apêndice 4. Fluxograma da técnica MSPD (Dispersão da matriz em Fase Sólida) validada por Rubert *et al.* (2011).



Apêndice 5. Fluxograma do método QuEChERS adaptado por Ferreira *et al.* (2012).

Apêndice 6. Fluxograma do procedimento QuEChERS otimizado.