

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM VIGILÂNCIA SANITÁRIA
INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

Bianca Gonçalves Medina

**VALIDAÇÃO E APLICAÇÃO DE UM MÉTODO ANALÍTICO PARA DETERMINAÇÃO DE
MICOTOXINAS EM BISCOITO *CRACKER***

Rio de Janeiro

2017

Bianca Gonçalves Medina

**VALIDAÇÃO E APLICAÇÃO DE UM MÉTODO ANALÍTICO PARA DETERMINAÇÃO DE
MICOTOXINAS EM BISCOITO *CRACKER***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz como requisito para obtenção do título de Mestre em Vigilância Sanitária

Orientadores: Silvana do Couto Jacob
Maria Helena Wohlers Morelli Cardoso

Rio de Janeiro

2017

Catálogo na fonte

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Biblioteca

Medina, Bianca Gonçalves

Validação e aplicação de um método analítico para determinação de micotoxinas em crackers / Bianca Gonçalves Medina. Rio de Janeiro: INCQS /FIOCRUZ, 2017.

75 p., il., tab.

Dissertação (Mestrado em Vigilância Sanitária) – Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária. Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde. Fundação Oswaldo Cruz 2017.

Orientadoras: Silvana do Couto Jacob, Maria Helena Wohlers Morelli Cardoso

1. Contaminação de Alimentos. 2. Micotoxinas. 3. Biscoitos. 4. Cromatografia Líquida. 5. Controle de Qualidade I. Título.

Validation and application of an analytical method for the determination of mycotoxins in crackers

Bianca Gonçalves Medina

**VALIDAÇÃO E APLICAÇÃO DE UM MÉTODO ANALÍTICO PARA DETERMINAÇÃO DE
MICOTOXINAS EM CRACKERS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz como requisito para obtenção do título de Mestre em Vigilância Sanitária

Aprovado em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Helena Pereira da Silva Zamith (Doutora)
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS)

Maria de Lourdes Mendes de Souza (Doutora)
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa)

Lucia Helena Pinto Bastos (Doutora)
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS)

Silvana do Couto Jacob (Doutora) - Orientadora
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS)

Silvana do Couto Jacob (Doutora) - Orientadora
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS)

*Dedico esse trabalho aos meus pais,
Biano e Odiléa, que nunca mediram
esforços para que eu buscasse meus
sonhos.*

AGRADECIMENTOS

Ao meu marido Gabriel sempre com uma palavra de conforto e de incentivo nas horas de desânimo.

Às minhas irmãs, Natália e Laura, que sempre estiveram ao meu lado me apoiando nos momentos difíceis e me alegrando nos momentos de tristeza.

Às minhas orientadoras, Silvana e Helena, por toda paciência e confiança durante o Mestrado.

Ao André Sartori por todos os ensinamentos e toda ajuda no desenvolvimento desse trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Micotoxinas do INCQS por todos os ensinamentos e companhia durante o desenvolvimento desse trabalho.

RESUMO

Micotoxinas são substâncias tóxicas produzidas como metabólitos secundários de diversos fungos filamentosos os quais podem causar diversos efeitos tóxicos em humanos quando presentes nos alimentos. Estes além de afetar a saúde pública podem causar implicações econômicas. O trigo e seus subprodutos podem ser acometidos por fungos toxigênicos capazes de produzir micotoxinas. O Brasil é um importante produtor e consumidor de trigo. O trigo é a matéria prima para a fabricação de muitos produtos consumidos diariamente pela população, como por exemplo, o biscoito do tipo *cracker* e água e sal. O biscoito *cracker* é o segundo tipo de biscoito industrializado mais consumido pelos brasileiros de diferentes faixas etárias. Assim é importante a pesquisa da contaminação por micotoxinas nesse produto já que é consumido em grande escala pela população e por grupos de diferentes idades. O presente estudo teve o objetivo de validar um método analítico para determinação de micotoxinas em biscoito *crackers* e em água e sal. O método analítico foi validado para a determinação de aflatoxinas M2, M1, G2, G1, B2, B1, desoxinivalenol, ocratoxina A, fumonisinas B1 e B2, fumonisinas B1 e B2 hidrolisadas, zearalenona e esterigmatocistina em biscoitos por CLUE-EM/EM. A recuperação foi satisfatória variando de 70 a 110 % e foi obtido um desvio padrão relativo inferior a 13 %. O método foi considerado sensível com limites de quantificação entre $0,20 \mu\text{g kg}^{-1}$ e $12,27 \mu\text{g kg}^{-1}$. O método validado foi utilizado para determinar micotoxinas em 60 amostras de biscoitos cracker e água e sal coletados na região metropolitana do Rio de Janeiro, RJ. Desoxinivalenol, zearalenona e fumonisina B1 foram encontradas respectivamente em 100, 50 e 28 % das amostras analisadas.

Palavras-chave: micotoxinas, biscoito crackers, CLUE-MS/MS.

ABSTRACT

Mycotoxins are substances produced as secondary metabolites by several filamentous fungi. They can cause various toxic effects in humans when present in food. In addition to affecting public health, these compounds also cause economic implications. Wheat and its by-products can be affected by toxigenic fungi capable of producing mycotoxins. Brazil is an important wheat producer and consumer. Wheat is the raw material for the manufacture of many products consumed daily by the Brazilian population, such as crackers. These biscuits are the second most consumed type of biscuit by Brazilians. Thus, it is important to investigate mycotoxin contamination in crackers, since it is highly consumed by the population and by different age groups. In this context, the present study aims to validate an analytical method for the determination of mycotoxins in salt crackers. A suitable analytical method for the determination of aflatoxins M2, M1, G2, G1, B2, B1, deoxynivalenol, ochratoxin A, fumonisins B1 and B2, hydrolysed fumonisins B1 and B2, zearalenone and esterigmatocystin applying Ultra Efficiency Liquid Chromatography coupled to Sequential Mass Spectrometry was, thus, validated (UPLC-MS/MS). Recovery was satisfactory, ranging from 70 to 110%, with a relative standard deviation of less than 13%. The method was considered adequately sensitive, with limits of quantification ranging between $0.20 \mu\text{g kg}^{-1}$ and $12.27 \mu\text{g kg}^{-1}$. The validated method was used to determine mycotoxins in 60 salt cracker samples obtained from the metropolitan region of Rio de Janeiro, RJ, and results showed deoxynivalenol, zearalenone and fumonisin B1 contamination in 100, 50 and 28% of the analyzed samples, respectively.

Key-words: micotoxins, UPLC-MS/MS, salt cracker biscuits

LISTA DE TABELAS

Tabela 1:	Estudos de diversos países sobre a contaminação de trigo e produtos à base de trigo por micotoxinas.....	25
Tabela 2:	Estudos nacionais sobre a contaminação de trigo e produtos à base de trigo por micotoxinas.....	28
Tabela 3:	Limites máximos tolerados para DON em trigo e seus produtos ($\mu\text{g kg}^{-1}$) no Brasil.....	30
Tabela 4:	Limites máximos tolerados para ZEA em trigo e seus produtos ($\mu\text{g kg}^{-1}$) no Brasil.....	31
Tabela 5:	Limites máximos de DON e ZEA tolerados pela Comunidade Europeia em trigo e seus produtos ($\mu\text{g kg}^{-1}$).	32
Tabela 6:	Condições operacionais do espectrômetro de massas usadas na avaliação de diversas micotoxinas (Fumonisina B1 hidrolisada, Fumonisina B1, Fumonisina B2 hidrolisada, Fumonisina B2, Esterigmatocistina).....	38
Tabela 7:	Condições do espectrômetro de massas selecionadas para análise de Desoxinivalenol, Aflatoxina M2, Aflatoxina M1 Aflatoxina G2, Aflatoxina G1, Aflatoxina B2, Ocratoxina A, Zearalenona.....	39
Tabela 8:	Níveis de concentrações das fortificações utilizadas nos estudos de recuperação do método ($\mu\text{g kg}^{-1}$).....	42
Tabela 9:	Extensão do efeito da matriz sobre as micotoxinas nas matrizes estudadas.....	48
Tabela 10:	Avaliação da linearidade da curva em matriz cracker.....	50
Tabela 11:	Avaliação da linearidade da curva em matriz Água e Sal.....	50
Tabela 12:	Resultados da validação: exatidão, precisão e precisão intermediária.....	51
Tabela 13:	Critérios de recuperação estabelecidos pela Comunidade Europeia específicos para cada micotoxinas (CE, 2006).....	53
Tabela 14:	Critérios de recuperação estabelecidos pela Comunidade Europeia específicos para micotoxinas (CE, 2002).....	54
Tabela 15:	Limite de Detecção e de Quantificação ($\mu\text{g kg}^{-1}$).....	54
Tabela 16:	Contaminação por Desoxinivalenol e Zearalenona em amostras de biscoito (μgkg^{-1}).....	56

Tabela 17:	Comparação sobre a presença de DON em amostras de biscoitos em estudos realizados no Brasil e no mundo.....	58
Tabela 18:	Resultado das amostras de biscoito analisadas quanto à presença de DON, ZEA e FB1 por marca.....	60

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1:	Estrutura química de desoxinivalenol.....	17
Figura 2:	Estrutura química das aflatoxinas.....	18
Figura 3:	Estrutura química de ocratoxina.....	20
Figura 4:	Estrutura química de zearalenona.....	20
Figura 5:	Estrutura química das fumonisinas.....	22
Figura 6:	Estrutura química da esterigmatocistina.....	23
Gráfico 1:	Determinação da concentração de DON de uma amostra pelo método de adição.....	44
Figura 7:	Cromatogramas obtidos de uma amostra de <i>cracker</i> fortificada com as micotoxinas alvo (nível intermediário de concentração) utilizado na validação do método.....	46
Gráfico 2:	Resultados das recuperações obtidas para cada nível estudado para as micotoxinas de interesse.....	52
Gráfico 3:	Resultados dos coeficientes de variação obtidos para cada nível estudado para as micotoxinas de interesse.....	52
Gráfico 4:	Contaminação por Desoxinivalenol em amostras de biscoito <i>cracker</i> ($\mu\text{g kg}^{-1}$).....	56
Gráfico 5:	Contaminação por Desoxinivalenol em amostras de biscoito água e sal ($\mu\text{g kg}^{-1}$).....	57
Figura 8:	Cromatograma de uma amostra naturalmente contaminada por a) desoxinivalenol ($1252,2 \mu\text{g kg}^{-1}$), b) zearalenona ($14,83 \mu\text{g kg}^{-1}$) e c) fumonisina B1 (>LD).....	59

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AFB1	Aflatoxina B1
AFB2	Aflatoxina B2
AFG1	Aflatoxina G1
AFG2	Aflatoxina G2
AFM1	Aflatoxina M1
AFM2	Aflatoxina M2
CLAE-EM/EM	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial
CLUE-EM/EM	Cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial
CG-DCE	Cromatografia a gás com detecção por captura de elétrons
DON	Desoxinivalenol
ESTG	Esterigmatocistina
FB1	Fumonisina B1
FB2	Fumonisina B2
HFB1	Fumonisina B1 hidrolisada
HFB2	Fumonisina B2 hidrolisada
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i>
JECFA	<i>Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives</i>
LD	Limite de detecção
LMT	Limite máximo tolerado
LQ	Limite de quantificação
OTA	Ocratoxina A
ZEA	Zearalenona

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 MICOTOXINAS.....	16
1.1.1 Desoxinivalenol.....	16
1.1.2 Aflatoxinas.....	17
1.1.3 Ocratoxina A.....	19
1.1.4 Zearalenona.....	20
1.1.5 Fumonisinias.....	21
1.1.6 Esterigmatocistina.....	22
1.2 OCORRÊNCIA DE MICOTOXINAS EM TRIGO PRODUTOS À BASE DE TRIGO..	23
1.2.1 Ocorrência mundial de micotoxinas.....	24
1.2.2 Ocorrência de micotoxinas no Brasil.....	26
1.3 REGULAMENTAÇÃO SOBRE MICOTOXINAS EM TRIGO E PRODUTOS À BASE DE TRIGO.....	29
1.4 MÉTODOS ANALÍTICOS PARA DETERMINAÇÃO DE MICOTOXINAS EM TRIGO E SEUS PRODUTOS.....	32
1.5 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS.....	33
1.5.1 Seletividade.....	33
1.5.2 Efeito Matriz.....	33
1.5.3 Linearidade.....	33
1.5.4 Exatidão e Precisão.....	34
1.5.5 Limite de detecção e Limite de quantificação.....	34
2 OBJETIVOS	35
2.1 OBJETIVO GERAL.....	35
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	35
3 MATERIAIS E MÉTODOS	36
3.1 PADRÕES ANALÍTICOS.....	36
3.1.1 Solução Estoque.....	36
3.1.2 Soluções Intermediárias.....	36
3.2 REAGENTES E SOLUÇÕES.....	36
3.3 EQUIPAMENTOS.....	37
3.4 INSTRUMENTAL.....	37
3.5 AMOSTRAS.....	39

3.6 TRATAMENTO DAS AMOSTRAS.....	40
3.7 VALIDAÇÃO.....	40
3.7.1 Seletividade.....	40
3.7.2 Efeito Matriz.....	41
3.7.3 Linearidade e Faixa de Trabalho.....	41
3.7.4 Exatidão e Precisão.....	42
3.7.5 Limite de detecção e Limite de quantificação.....	43
3.8 ANÁLISE DAS AMOSTRAS.....	44
3.9 ESTIMATIVA DA EXPOSIÇÃO A DON EM BISCOITOS CRACKER E ÁGUA E SAL.....	45
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	46
4.1 VALIDAÇÃO DO MÉTODO.....	46
4.1.1 Seletividade.....	46
4.1.2 Efeito Matriz.....	47
4.1.3 Linearidade.....	49
4.1.4 Exatidão e Precisão.....	51
4.1.5 Limite de detecção e Limite de quantificação.....	54
4.2 ANÁLISE DAS AMOSTRAS.....	55
4.6 ESTIMATIVA DA EXPOSIÇÃO A DON EM BISCOITOS CRACKER E ÁGUA E SAL.....	60
5 CONCLUSÕES.....	62
REFERÊNCIAS	63

1 INTRODUÇÃO

Micotoxinas são substâncias tóxicas produzidas como metabólitos secundários de diversos fungos filamentosos ocorrendo em diferentes regiões do mundo e representam um risco potencial para a saúde do homem e dos animais quando presentes nos alimentos e nas rações animais (PERAICA, 1999).

Os efeitos tóxicos causados por micotoxinas em seres humanos e animais incluem efeitos nefrotóxicos, neurotóxicos, carcinogênicos, imunossupressores e estrogênicos graves. Os compostos menos críticos e a ingestão crônica de pequenas quantidades de micotoxinas podem reduzir o apetite e ganho de peso em animais e causar diarreia em seres humanos (HUSSEIN, 2001).

A Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC) publicou em 1993 uma monografia na qual as micotoxinas consideradas de maior risco à saúde humana e animal foram: aflatoxinas, ocratoxina A, zearalenona, desoxinivalenol e fumonisinas (IARC, 1993).

A produção de micotoxinas depende do crescimento fúngico, portanto pode ocorrer em qualquer época do crescimento, colheita, transporte ou estocagem do alimento dependendo de fatores ambientais como temperatura e umidade (IAMANAKA et al., 2010).

A ocorrência de micotoxinas em produtos agrícolas é uma preocupação importante para a saúde dos animais e dos seres humanos (RAZZAZI-FAZELI, 1999). Além de afetar a saúde pública causa implicações econômicas que repercutem na produção agropecuária, na disponibilidade de alimentos e no comércio internacional dos produtos (FERNÁNDEZ-TREVEJO, 2008).

A contaminação de alimentos por micotoxinas tem sido relatada mundialmente e estima-se que cerca de 25 % de todos os produtos agrícolas, estejam contaminados por estas substâncias (BENETT & KLICH, 2003, MAZIERO & BERSOT, 2010).

O trigo é um produto agrícola que junto com seus subprodutos representam uma importante fonte de alimento que podem ser afetados por fungos toxigênicos capazes de produzir micotoxinas (CREPPY, 2002).

Em 2015 o Brasil produziu de 5 a 6 milhões de toneladas de trigo (IBGE, 2015) e o consumo interno foi de aproximadamente 11 milhões de toneladas (EMBRAPA, 2014). O trigo é a matéria prima para a fabricação de muitos produtos consumidos diariamente pela população (ALMEIDA et al., 2016).

O biscoito *cracker* é um produto industrializado possuindo em sua formulação 90 % de trigo (SCUDAMORE, 2009). A pesquisa da contaminação por micotoxinas nesse produto é importante já que é consumido em grande escala pela população e por grupos de diferentes faixas etárias. (SOUZA et al., 2015).

O Brasil é o segundo produtor mundial de biscoito, em 2013 produziu mais de um milhão de toneladas do produto. O consumo *per capita* desse produto no Brasil no ano de 2015 foi de 8,47 kg sendo o biscoito tipo *crackers* responsável por 21,4 % desse consumo. Em 2014, foram comercializadas 354 mil toneladas de biscoito *cracker* e água e sal, o segundo tipo de biscoito mais comercializado no Brasil (ABIMAPI, 2015).

Diversos estudos no Brasil demonstraram a presença de micotoxinas em trigo e seus subprodutos e desoxinivalenol foi a micotoxina mais encontrada. (FURLONG, 1995, OLIVEIRA, 2002, BARAJ & FURLONG, 2003 LAMARDO, 2006, CALORI-DOMINGUES, 2007). Zearalenona pode ocorrer simultaneamente com desoxinivalenol, uma vez que é produzida pela mesma espécie de *Fusarium* (CODEX ALIMENTARIUS, 2007).

Ainda são poucos os estudos realizados sobre a presença de micotoxinas em produtos à base de trigo para consumo direto. A legislação brasileira já contempla muitos desses produtos para consumo direto visando controlar a qualidade em relação a contaminação por micotoxinas e consequentemente assegurar a saúde da população (BRASIL, 2011).

Para garantir que a legislação seja respeitada é fundamental a aplicação de métodos analíticos confiáveis como os que empregam a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial, capazes de identificar e quantificar diversas micotoxinas em uma mesma análise e com pouco tratamento da amostra (CHIARADIA, 2008).

A validação de metodologias analíticas que possibilitam a análise de produtos à base de trigo é essencial para assegurar a confiabilidade do método e consequentemente gerar dados confiáveis sobre a qualidade dessa matéria prima que está presente diariamente na mesa do consumidor.

Com poucos estudos sobre a presença de micotoxinas em produtos à base de trigo, principalmente no Brasil, monitoramentos são importantes para obter mais dados sobre a contaminação de micotoxinas em alimentos para que ações de vigilância sanitária sejam realizadas e assim minimizar a exposição da população a esse contaminante.

Esse estudo tem como objetivo validar um método analítico por cromatografia líquida de ultra-eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial (CLUE-EM/EM) para avaliar a presença de micotoxinas em biscoito do tipo “crackers” e “água e sal” além de determinar a presença de micotoxinas nesses produtos e assim gerar dados que possam servir de subsídios para ações de vigilância sanitária.

1.1 MICOTOXINAS

1.1.1 Desoxinivalenol

Os tricotecenos são considerados um importante grupo de micotoxinas produzidos por vários fungos do gênero *Fusarium*, especialmente *F. graminearum* sendo encontrados como contaminantes em trigo, centeio, cevada, milho e outros cereais e ocorrem predominantemente em climas mais quentes (PERAICA et al., 1999).

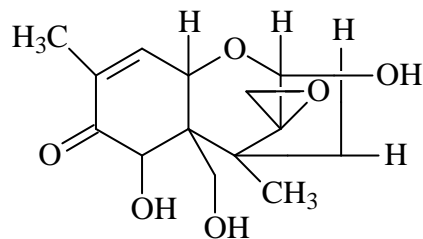
Desoxinivalenol (DON), também conhecido como vomitoxina, tem sido considerado uma das principais micotoxinas do grupo dos tricotecenos, estando relacionada a diversos efeitos tóxicos em humanos e em animais, além de extensivas perdas econômicas (FREIRE et al., 2007).

Os sintomas observados incluem náuseas, vômitos, diarreia, dor abdominal, dor de cabeça e tontura. Intoxicações humanas associadas com o consumo de grãos contaminados por tricotecenos (trigo, cevada, milho) foram relatados na Coreia, Japão, Índia, Colômbia, China e África do Sul. Dados epidemiológicos disponíveis apontam contaminação por DON em produtos de grãos como potencial causador da intoxicação aguda humana. Além disso, há um potencial efeito crônico sobre o crescimento, a função imune e a reprodução com base em resultados de estudos em animais (PERAICA et al., 1999, CODEX ALIMENTARIUS, 2007; SOBROVA et al., 2010). A Figura 1 apresenta a estrutura química de DON.

A ocorrência de DON em cereais tem sido reportada em diversos países. Trigo, cevada e milho juntos respondem por dois terços da produção mundial de cereais e são as culturas mais suscetíveis à contaminação por essa micotoxina (CODEX ALIMENTARIUS, 2007).

De acordo com IARC, DON é classificado como Grupo 3, ou seja, não classificado quanto a carcinogenicidade em humanos (IARC, 1993). O *Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives* (JECFA) definiu uma dose máxima provisória de ingestão diária tolerável de DON de $1 \mu\text{g kg}^{-1}$ por peso corpóreo (JECFA, 2001).

Figura 1 – Estrutura química de desoxinivalenol



DON é solúvel em água, muito estável durante o armazenamento e moagem, relativamente estável ao calor, à maioria dos procedimentos de processamento e de cozimento, e não é completamente destruído pela fermentação (CODEX ALIMENTARIUS, 2007).

1.1.2 Aflatoxinas

As aflatoxinas são metabólitos secundários altamente tóxicos que podem ser produzidas por três espécies de fungo do gênero *Aspergillus* sp: *A. flavus*, *A. parasiticus* e *A. nomius*, que causam contaminação em alimentos (CROWELL et al., 1981).

São conhecidos atualmente 18 compostos similares designados como aflatoxina, porém os principais tipos de interesse são: aflatoxina B1 (AFB1), aflatoxinas B2 (AFB2), aflatoxinas G1 (AFG1) e aflatoxina G2 (AFG2). Destas, as

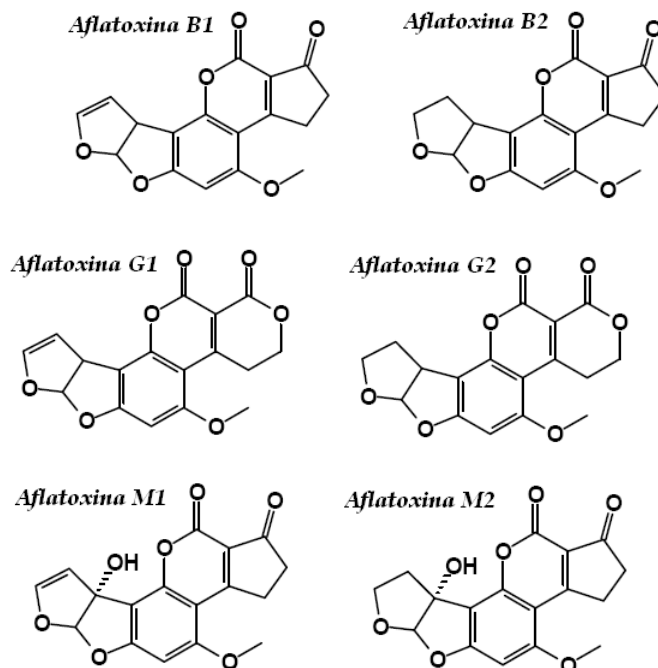
que apresentam maior toxicidade são a AFB1 e a AFG1 (OLIVEIRA et al., 2006). A estrutura química das aflatoxinas está representada na Figura 2.

A aflatoxina B1 é a mais tóxica das aflatoxinas seguida das aflatoxinas G1, B2 e G2, causando uma variedade de efeitos adversos e, em alguns casos podem ser letais, em diferentes espécies animais e humanos. Foi considerada pela IARC (1993) como pertencente ao grupo 1, composto carcinógeno para humanos (IAMANAKA *et al.*, 2007; IARC, 1993).

As aflatoxina M1 e M2 (AFM1 e AFM2) são metabólitos hidroxilados das aflatoxinas B1 e B2 e podem estar presentes no leite e produtos derivados obtidos de animais que ingeriram ração contaminada com estas aflatoxinas (CREPPY, 2002).

Os principais produtos alimentícios susceptíveis ao desenvolvimento desse fungo incluem amendoim, milho, trigo, arroz, castanha do Pará, nozes, avelã, castanha de caju, amêndoas, frutas secas, temperos, semente de algodão, mandioca, óleos vegetais, cacau, entre outros que, normalmente, são utilizados na composição de alimentos e rações (CALDAS, 2002; ARAUJO, 2006).

Figura 2 – Estrutura química das aflatoxinas.



As aflatoxinas estão associadas à toxicidade e carcinogenicidade em humanos e animais. A intoxicação aguda pode causar a morte enquanto a intoxicação crônica pode levar à alterações patológicas mais prolongadas como câncer e imunossupressão. O órgão mais afetado é o fígado e o dano hepático já foi relatado em roedores, aves domésticas e macacos. Na Índia um surto em 1974 levou à morte de 100 pessoas que consumiram milho altamente contaminado por aflatoxinas e a aflatoxina B1 foi detectada no fígado das vítimas (MURRAY, 2006).

1.1.3 Ocratoxina A

A ocratoxina A (OTA) pertence ao grupo de metabólitos secundários produzidos por fungos toxigênicos do gênero *Aspergillus* e *Penicillium* que contaminam diversos alimentos (MOSS, 1996; LARSEN et al, 2001).

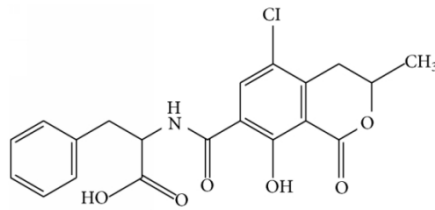
A OTA destaca-se pela alta toxicidade e pela ocorrência natural em produtos vegetais, causando intoxicações clínicas e subclínicas em animais e humanos (MOSS; 1996; FINK- GREMMELS, 2001). A estrutura química de OTA está representada na Figura 3.

Essa micotoxina vem merecendo atenção e destaque no cenário mundial devido a sua alta toxicidade e ocorrência e tem sido encontrada em diversos alimentos e bebidas diariamente consumidas pela população e ainda pode ser uma barreira na comercialização de produtos entre os países (DUARTE, 2010).

Em 1993 a *International Agency of Research on Cancer* (IARC) lançou um documento que classificou a Ocratoxina A como “provável carcinógeno para humanos” - Grupo 2B (IARC, 1993).

OTA também tem uma característica importante que é a resistência ao tratamento térmico, é fotossensível, porém o efeito da luz sobre as toxinas aderidas aos cereais tem pouca importância. Essas características indicam que a remoção das ocratoxinas de alimentos e bebidas pode ser muito difícil, sendo assim a prevenção é a melhor forma de proteção para evitar a formação da toxina (KRUGER, 2006).

Figura 3 – Estrutura química da ocratoxina A.

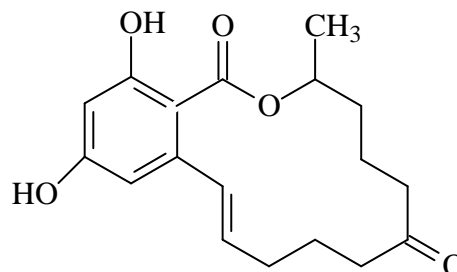


1.1.4 Zearalenona

Zearalenona (ZEA) é um metabólito secundário produzido principalmente por fungos do gênero *Fusarium*, incluindo *Fusarium graminearum*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium equisetii* e *Fusarium crookwellense*. Estas espécies fúngicas são amplamente encontradas como contaminantes em alimentos em diversos países (HAGLER, et al., 2001).

Essa micotoxinas está relacionada com intoxicações agudas e crônicas, problemas reprodutivos e no desenvolvimento, possui ação genotóxica, hepatotóxica e imunotóxica (ZINEDINE et al., 2007). Possui características estrogênicas e causa hiperestrogenismo em suínos femininos e incidentes nas mudanças da puberdade em crianças (KUIPER-GOODMAN et al., 1987). A Figura 4 apresenta a estrutura química de ZEA.

Figura 4 – Estrutura química da zearalenona.



O consumo de alimentos contaminados por ZEA pode causar hiperestrogenismo nas espécies domésticas, levando à diminuição da produção de

leite, repetição de cio, diminuição da taxa de concepção e até mesmo abortamento. (WEAVER et al., 1986; WHITLOW & HAGLER JUNIOR, 1999).

Zearalenona pode contaminar diversos alimentos principalmente os cereais. Estudos já demonstraram presença de ZEA em trigo (STANKOVIC, 2012), arroz (LEE, 1991; CHUN, 2014) e milho (VISCANTI, 1998).

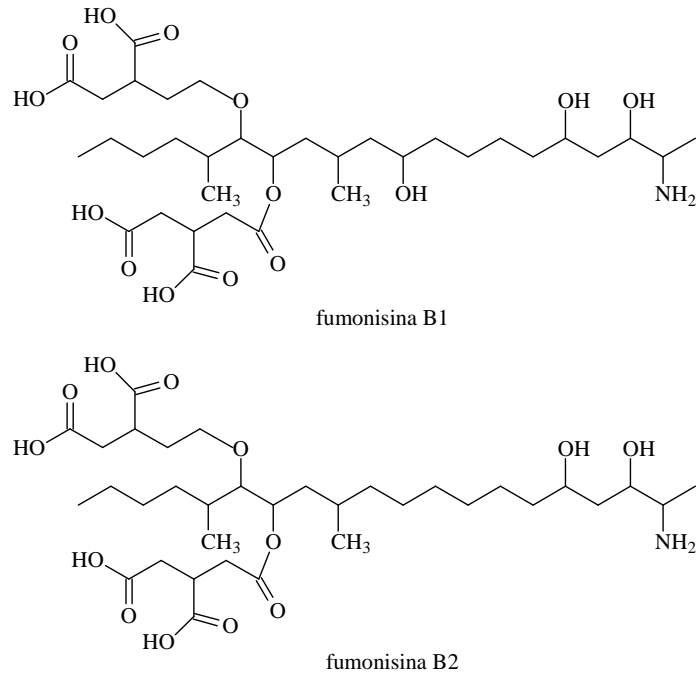
As evidências quanto à carcinogenicidade da zearalenona em animais experimentais são limitadas e a ausência de estudos em humanos levou à classificação de ZEA no Grupo 3, ou seja, não pode ser classificada quanto a sua carcinogenicidade em humanos (IARC. 1993).

1.1.5 Fumonisinias

Pelo menos 15 diferentes fumonisinias já foram relatadas, sendo agrupadas em quatro categorias principais (A, B, C e P). A fumonisina mais importante é a fumonisina B1 (FB1), porém pode estar presente junto com outras micotoxinas, principalmente fumonisina B2 (FB2) em menor quantidade (DUTTON, 1996; WHO, 2000).

Esse grupo de micotoxinas podem causar várias doenças em animais, como leucoencefalomalacia em cavalos (KELLERMAN et al., 1990, ROSS et al., 1990), edema de pulmão e hidrotórax em suínos (HARRISON et al. 1990, COLVIN & HARRISON, 1992), hemorragia cerebral em coelhos (BUCCI et al., 1996) e câncer hepático em ratos (GELDERBLOM et al., 1991). Elas também foram suspeitas de causar câncer esofágico em humanos em regiões como África do Sul, China, Nordeste da Itália e Estados Unidos onde os produtos à base de milho fazem parte da dieta (SYDENHAM et al. 1991; RHEEDER et al., 1992, CHU & LI 1994, DOKO & VISCANTI 1994). A estrutura química das fumonisinias está descrita na Figura 5.

Figura 5 – Estrutura química das fumonisinas.



As fumonisinas podem ser encontradas contaminando diversos cereais cultivados em regiões tropicais e subtropicais como trigo (STANKOVIC et al., 2012; CENDOYA et al., 2014), milho e produtos à base de milho (SOARES, 2000, MANJULA et al., 2009).

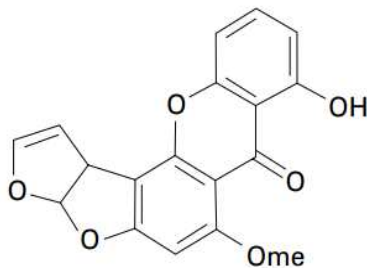
Em relação à carcinogenicidade, a fumonisina B1 foi classificada pela IARC como um possível carcinógeno para humanos, incluindo-a no Grupo 2B (IARC, 2002).

1.1.6 Esterigmatocistina

A esterigmatocistina (ESTG) apresenta estrutura semelhante à das aflatoxinas. É considerada hepatotóxica e cancerígena, podendo ser produzida por diferentes espécies de *Aspergillus* (PURCHASE & VAN DER WATT, 1970; COLE & COX, 1981). Entretanto, *Aspergillus versicolor* é, reconhecidamente, a espécie mais importante como produtora dessa micotoxina.

Apresenta toxicidade oral aguda baixa, em virtude de sua insolubilidade em água e nos sucos gástricos. Por essa razão, é provável que surtos atribuídos a essa substância sejam improváveis, tanto em humanos quanto em animais. Sua toxicidade como cancerígeno de fígado é de apenas 1/150 da aflatoxina B1, não obstante seja, ainda assim, mais potente que muitas outras substâncias cancerígenas. Por essa razão, a esterigmatocistina é aceita como um potencial indutor de câncer de fígado em humanos (TERAO, 1983). A Figura 6 apresenta a estrutura química da esterigmatocistina.

Figura 6 – Estrutura química da esterigmatocistina.



1.2 OCORRÊNCIA DE MICOTOXINAS EM TRIGO E PRODUTOS À BASE DE TRIGO

1.2.1 Ocorrência mundial de micotoxinas

Em diferentes países foram realizados estudos sobre a presença de micotoxinas em trigo e seus produtos.

Bauer e colaboradores analisaram na Alemanha 24 amostras de trigo e encontraram ZEA em 22 amostras com a concentração encontrada variando de 11 a 860 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (BAUER, 2002).

Em estudo realizado na Dinamarca por Rasmussen e colaboradores DON foi detectado em 82 % das amostras de farinha de trigo com concentração variando de 20 a 527 $\mu\text{g kg}^{-1}$. ZEA foi detectada em 33 % das amostras de farinha de trigo analisadas e a concentração encontrada foi próxima ao limite de detecção do método, 1 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (RASMUSSEN et al., 2003).

Biselli & Hummert analisaram na Alemanha 103 amostras de farinha de trigo e 88 amostras de pães e pastéis. DON esteve presente em ambos produtos. A concentração encontrada foi de 230 a 2270 e 110 a 2350 $\mu\text{g kg}^{-1}$, respectivamente (BISELLI & HUMMERT, 2005).

Schollenberger e colaboradores analisaram também na Alemanha 101 amostras de pães por espectrometria de massas. DON esteve presente em 92 % das amostras analisadas e a média da concentração das amostras foi de 134 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (SCHOLLENBERGER et al, 2005).

Pussemier e colaboradores analisaram na Bélgica amostras de trigo e de farinha de trigo e encontrou OTA em 40 % das amostras de trigo e 97 % das amostras de farinha de trigo com as concentrações variando de 0,037 a 1,0 e 0,064 a 2,1 $\mu\text{g kg}^{-1}$, respectivamente. Para DON os níveis encontrados foram de 10 a 503 $\mu\text{g kg}^{-1}$ em trigo em grão e 153 a 661 $\mu\text{g kg}^{-1}$ em farinha de trigo. ZEA esteve presente em 6 % das amostras de trigo em grão com concentração variando de 0,75 a 4 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (PUSSEMIER et al., 2006).

Berthiller e colaboradores analisaram 23 amostras de trigo na Áustria e DON foi encontrado em todas as amostras com concentração entre 42 e 4130 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (BERTHILLER, 2009).

Estudo realizado na Alemanha, Gottschalk e colaboradores detectaram a presença de DON em 100 % das amostras analisadas incluindo grão, farelo, flocos e farinha de trigo. Os níveis de concentração encontrados variaram de 57 a 1163 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (GOTTSCHALK et al., 2009).

Azouri e colaboradores analisaram 65 amostras de trigo do Líbano e encontraram DON em todas as amostras com concentração acima de 1250 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (AZOURI et al., 2010).

No Japão foram analisadas 196 amostras de biscoito e 98 % estavam contaminadas por DON em concentrações que variaram de 0,9 a 791 $\mu\text{g kg}^{-1}$. ZEA foi encontrada em apenas 4 amostras com a concentração variando de 4,2 a 4,4 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (TANAKA et al., 2010).

Em estudo realizado no México DON e ZEA foram encontrados em amostras de trigo. DON foi encontrado em 68 % das amostras sendo que em 56 % os níveis de contaminação estavam acima de 750 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e ZEA foi encontrado em 45 % das amostras com 43 % excedendo o valor de 75 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (GONZÁLEZ-OSNAYA & FARRÉS, 2011).

Em estudo realizado na Espanha foram analisadas 67 amostras de trigo. DON esteve presente em 28 amostras com concentração variando do LD a 6178 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e ZEA esteve presente em 10 amostras com concentração de LD a 25 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (SANCHIS et al., 2013).

Em estudo realizado na Índia 100 % das amostras de trigo estavam contaminadas por DON com a concentração variando de 410 a 4300 $\mu\text{g kg}^{-1}$ sendo que 90 % dessas amostras estavam com contaminação acima de 3100 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (MIRSHA, 2013).

A Tabela 1 apresenta os estudos realizados em diferentes países sobre a presença de micotoxinas em trigo e produtos à base de trigo.

Tabela 1 – Estudos de diversos países sobre a contaminação de trigo e produtos à base de trigo por micotoxinas

Referência	Ano	Local	Matriz	Micotoxina	Concentração $\mu\text{g kg}^{-1}$
Bauer	2002	Alemanha	Trigo	ZEA	11 – 860
Rasmussen	2003	Dinamarca	Farinha de trigo	DON ZEA	20 – 527 1
Biselli & Hummert	2005	Alemanha	Farinha de trigo Pães e pastéis	DON	230 – 2270 110 – 2350
Schollenberger		Alemanha	Pães	DON	15 – 690
Pussemier	2006	Bélgica	Trigo Farinha de trigo	OTA DON ZEA	0,037 – 2,1 10 – 661 0,75 – 4
Berthiler	2009	Áustria	Trigo	DON	42 – 4130
Gottstchle	2009	Alemanha	grãos, flocos e farinha de trigo	DON	57 – 1163
Azouri	2010	Líbano	Trigo	DON	>1250
Tanaka	2010	Japão	Biscoito	DON ZEA	0,9 – 702 4,2 - 4,4
Gonzales-Osnaya	2011	México	Trigo	DON ZEA	>750 > 75
Mishra	2013	Índia	Trigo	DON	410 – 4300

1.2.2 Ocorrência de micotoxinas no Brasil

No Brasil também foram realizados estudos sobre a presença de micotoxinas em trigo e produtos à base de trigo.

Furlong e colaboradores, em estudo realizado no Rio Grande do Sul, na região sul do Brasil, encontraram OTA em duas amostras de trigo com concentrações de 18 e 26 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (FURLONG, 1999).

No período de 1998 a 2000 foram analisadas em Belo Horizonte/MG 47 amostras de produtos de panificação, farinha e farelo de trigo onde 68 % apresentaram contaminação por DON variando de 40 a 1205 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (OLIVEIRA et al, 2000).

Em outro estudo também realizado na região sul do Brasil, 8 % das amostras de trigo analisadas estavam contaminadas por fumonisina B1 e a concentração encontrada foi de 24,35 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (MALLMAN et al., 2001).

Vinte e oito amostras de farinha de trigo e 14 amostras de trigo em grão foram adquiridos na cidade de São Paulo. DON foi detectado em 14 amostras de farinha de trigo e 5 amostras de trigo apresentando níveis que variaram de 82 a 600 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e 166 a 1500 $\mu\text{g kg}^{-1}$ respectivamente (LAMARDO et al., 2006).

No ano de 2007 foi realizado um estudo em Campinas/SP com 50 amostras de trigo demonstrando que 50 % dessas amostras estavam com contaminação por DON entre 90 e 500 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e em 4 % os níveis estavam acima de 1000 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (CALORI-DOMINGUES et al, 2007).

Em estudo realizado por Mallmann e colaboradores 48,4 % das amostras de trigo analisadas estavam contaminadas com DON e o nível máximo de contaminação encontrado foi de 8310 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e a média de contaminação dentre as amostras positivas foi de 289,5 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (MALLMAN et al., 2008).

No ano de 2011 foram analisadas em Londrina/PR 36 amostras de trigo e 72,2 % dessas amostras apresentaram contaminação por DON variando de 89 a 1592 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (SANTOS et al, 2011).

Em outro estudo realizado por Santos e colaboradores amostras de trigo foram avaliadas e 66 % das amostras estavam contaminadas por DON com a contaminação das amostras variando de 206,3 a 4732,3 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (SANTOS et al., 2013).

Souza e colaboradores analisaram 23 amostras de biscoito *cracker* coletadas no Rio Grande do Sul e 18 dessas amostras estavam contaminadas por DON em níveis de concentração entre 377 e 5295 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (SOUZA, et al., 2015).

Almeida e colaboradores analisaram amostras de farinha de trigo e biscoito coletadas na cidade de São Paulo. Das 58 amostras de farinha de trigo analisadas 53 estavam contaminadas por DON com a concentração máxima de 1310 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e a média encontrada foi de 360 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Das 36 amostras de biscoito analisadas, 35 estavam contaminadas por DON e a concentração máxima encontrada foi de 1720 $\mu\text{g kg}^{-1}$ com média de 591 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (ALMEIDA et al., 2016).

A Tabela 2 apresenta os estudos realizados no Brasil sobre a contaminação de micotoxinas em trigo e produtos à base de trigo.

Tabela 2 – Estudos nacionais sobre a contaminação de trigo e produtos à base de trigo por micotoxinas

Referência	Ano	Local	Matriz	Micotoxina	Concentração $\mu\text{g kg}^{-1}$
Furlong	1999	Rio Grande do Sul	Trigo	OTA	18 e 26
Oliveira	2000	Belo Horizonte	Produtos de panificação Farinha e farelo de trigo	DON	40 – 1205
Mallman	2001	Região Sul	Trigo	FMB1	24,35
Lamardo	2006	São Paulo	Trigo Farinha de trigo	DON	166 – 1500 82-600
Calori-Domingues	2007	São Paulo	Trigo	DON	90 – 500
Mallman	2008	Região Sul	Trigo	DON	< 8310
Santos	2011	Paraná	Trigo	DON	89 – 1592
Santos	2013	Paraná	Trigo	DON	206,3 - 4732,3
Souza	2015	Rio Grande do Sul	Biscoito Cracker	DON	377 – 5295
Almeida	2016	São Paulo	Farinha de trigo Biscoito	DON	LQ-1310 LQ-1720

Apesar da alta ocorrência e dos altos níveis de contaminação encontrados, principalmente para DON, em trigo no Brasil ainda são poucos os estudos sobre a contaminação em produtos à base de trigo.

É importante avaliar a extensão dessa contaminação para fornecer subsídios envolvidos com a produção, utilização e importação de trigo, como também a

fiscalização e pesquisa, com o objetivo de garantir ao consumidor final produtos de melhor qualidade.

1.3 REGULAMENTOS SOBRE MICOTOXINAS EM TRIGO E PRODUTOS À BASE DE TRIGO

A preocupação com os efeitos que as micotoxinas podem causar quando presente em alimentos tem levado muitos países, nas últimas décadas, a criarem regulamentos sobre a presença de micotoxinas em alimentos visando proteger a saúde humana e os interesses econômicos. A formulação desses regulamentos depende da disponibilidade de dados toxicológicos e sobre a presença de micotoxinas em produtos além dos interesses comerciais entre os países (FAO, 2004).

Até 2002 a legislação brasileira era restrita ao limite máximo tolerado (LMT) de $20 \mu\text{g kg}^{-1}$ para o somatório das aflatoxinas B1, B2, G1, G2 em milho e para amendoim e de $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$ e $5,0 \mu\text{g kg}^{-1}$ para a aflatoxina M1 em leite fluido e em pó, respectivamente (BRASIL, 2002).

A partir de 2011 a legislação brasileira sofreu um grande avanço em relação às micotoxinas e outros alimentos foram contemplados. A Anvisa, através da RDC Nº 7 de 18 de Fevereiro de 2011, estabeleceu os limites máximos para aflatoxinas (AFB1+AFB2+AFG1+AFG2 e AFM1), OTA, DON, fumonisinas, patulina e ZEA admissíveis em alimentos prontos para oferta ao consumidor e em matérias primas (BRASIL, 2011).

DON tem sido a principal micotoxinas regulamentada para trigos e seus produtos. A RDC Nº 7 fixou o LMT para DON e ZEA em trigo e seus derivados para aplicação em 2012 e redução gradativa até 2016. Os limites estabelecidos estão apresentados nas Tabelas 3 e 4.

Tabela 3 - Limites máximos tolerados para DON em trigo e seus produtos ($\mu\text{g kg}^{-1}$) no Brasil.

RDC Nº 7 de 18 de Fevereiro de 2011		
Aplicação	Alimento	DON ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
2012	Trigo integral, trigo para quibe, farinha de trigo integral, farelo de trigo, farelo de arroz, grão de cevada.	2000
2012	Farinha de trigo, massas, crackers, biscoitos de água e sal, e produtos de panificação, cereais e produtos de cereais e produtos de cereais exceto trigo e incluindo cevada malteada.	1750
2014	Trigo integral, trigo para quibe, farinha de trigo integral, farelo de trigo, farelo de arroz, grão de cevada.	1500
2014	Farinha de trigo, massas, crackers, biscoitos de água e sal, e produtos de panificação, cereais e produtos de cereais e produtos de cereais exceto trigo e incluindo cevada malteada.	1250
2016	Trigo integral, trigo para quibe, farinha de trigo integral, farelo de trigo, farelo de arroz, grão de cevada.	1000
2016	Farinha de trigo, massas, crackers, biscoitos de água e sal, e produtos de panificação, cereais e produtos de cereais e produtos de cereais exceto trigo e incluindo cevada malteada.	750

fonte: (Brasil, 2011)

Tabela 4 - Limites máximos tolerados para Zearalenona em trigo e seus produtos ($\mu\text{g kg}^{-1}$) no Brasil.

RDC Nº 7 de 18 de Fevereiro de 2011		
Aplicação	Alimento	ZEA ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
2012	Trigo integral, farinha de trigo integral, farelo de trigo	400
2012	Farinha de trigo, massas, crackers e produtos de panificação, cereais e produtos de cereais exceto trigo e incluindo cevada malteada	200
2016	Trigo integral, farinha de trigo integral, farelo de trigo	200
2016	Farinha de trigo, massas, crackers e produtos de panificação, cereais e produtos de cereais exceto trigo e incluindo cevada malteada	100

fonte: (Brasil, 2011)

De acordo com essa legislação esses valores aplicados em 2012 seriam reduzidos até 2016, porém a RDC 59 de 26 de dezembro de 2013 prorrogou o prazo para redução para 1 de janeiro de 2017. No dia 8 de fevereiro de 2017 foi publicada a RDC 138 que revogou a RDC 59 e fixou novos limites para DON e ZEA em biscoito cracker e água e sal Assim o limite máximo tolerável para biscoito *cracker* e biscoito água e sal em vigor é de $1000 \mu\text{g kg}^{-1}$ para DON e $100 \mu\text{g kg}^{-1}$ para ZEA (BRASIL, 2013).

A Comunidade Europeia também possui LMT para trigo e produtos à base de trigo, porém mais rigorosos que o Brasil. Para biscoito o limite máximo permitido para DON é de $500 \mu\text{g kg}^{-1}$ e para zearalenona é de $50 \mu\text{g kg}^{-1}$ (CE, 2006). Os LMT estabelecidos pela Comunidade Europeia estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5 - Limites máximos de DON e ZEA tolerados pela Comunidade Europeia em trigo e seus produtos ($\mu\text{g kg}^{-1}$).

LMT Comunidade Europeia (2006)		
Alimentos	Micotoxinas ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	
	DON	ZEA
Trigo não processado (exceto o trigo duro)	1250	100
Trigo destinado ao consumo humano direto, farinha de trigo, farelo como produto final comercializado para consumo humano direto	750	75
Pão, pastelaria, biscoitos, cereais e cereais matinais	500	50

fonte: (CE, 2006)

1.4 MÉTODOS ANALÍTICOS PARA DETERMINAÇÃO DE MICOTOXINAS EM TRIGO E SEUS PRODUTOS

Para garantir o cumprimento da legislação em vigor, é necessário dispor de métodos de análise de micotoxinas confiáveis e exatos, que permitam uma identificação e confirmação inequívocas e também uma quantificação precisa já que os níveis de concentração encontrados podem ser muito baixos (FRENICH, 2009).

Os métodos mais usados para determinação de micotoxinas em trigo e seus produtos incluem Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), Cromatografia à gás com detecção por captura de elétrons (CG-DCE), Espectrometria de massas (EM) e ELISA (AZOURI, 2010).

Nos últimos anos técnicas de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial (CLAE-EM/EM) e a de cromatografia líquida de ultra eficiência acopladas à espectrometria de massas sequencial (CLUE-EM/EM) vêm sendo utilizadas em diferentes matrizes (BERTHILLER, 2005, CAVALIERI, et al., 2005, LATTANZIO et al., 2007, SPANJER et al., 2008).

O uso de técnicas como CLAE-EM/EM e CLUE-EM/EM permite a análise de multi-micotoxinas e necessita de pouco tratamento das amostras permitindo análises rápidas com sensibilidade adequada às regulamentações mais restritivas (FRENICH, 2009).

1.5 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

Para assegurar a qualidade dos resultados analíticos de um método de análise é necessário demonstrar a confiabilidade através do estudo de validação do mesmo sendo necessária a verificação de alguns parâmetros como, por exemplo, a seletividade, a linearidade, a exatidão e precisão, os limites de detecção e de quantificação do método analítico.

1.5.1 Seletividade

A matriz da amostra pode conter componentes que podem eluir no mesmo tempo de retenção do analito de interesse. A seletividade garante que o pico de resposta seja exclusivamente do composto de interesse (SHABIR, 2003, INMETRO, 2011).

Se a seletividade não for assegurada, a linearidade, a exatidão e a precisão estarão seriamente comprometidas (RIBANI, 2004).

1.5.2 Efeito Matriz

Efeito matriz é o efeito causado sobre um método analítico por todos os outros componentes da matriz que não sejam o analito de interesse que podem aumentar ou suprimir o sinal podendo afetar a reprodutibilidade e a exatidão dos resultados. (BERTHILHER, 2005). Para compensar o efeito matriz podem ser realizados alguns procedimentos como, por exemplo, curva de calibração em matriz (DIEZ, 2016).

1.5.3 Linearidade

Linearidade é a capacidade do método de produzir resultados diretamente proporcionais à concentração da substância de interesse, dentro de uma determinada faixa de aplicação (RIBANI, 2004).

Para indicar se a reta pode ou não ser adequada 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 de 0,99 Este parâmetro permite obter uma estimativa da qualidade da curva obtida, pois quanto mais próximo de 1,0, menor a dispersão do conjunto de pontos experimentais e menor a incerteza dos coeficientes de regressão estimados (INMETRO, 2011, RIBANI et al., 2004).

1.5.4 Exatidão e Precisão

A exatidão indica o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados em um determinado ensaio e um valor de referência aceito como verdadeiro. Precisão representa a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões sob condições definidas (INMETRO, 2011).

A repetibilidade representa a concordância entre os resultados de medições sucessivas de um mesmo método, efetuadas sob as mesmas condições de medição, chamadas condições de repetibilidade: mesmo procedimento; mesmo analista; mesmo instrumento usado sob as mesmas condições; mesmo local; repetições em um curto intervalo de tempo (RIBANI, 2004).

Precisão intermediária indica o efeito das variações dentro do laboratório devido a eventos como diferentes dias ou diferentes analistas ou diferentes equipamentos ou uma combinação destes fatores (RIBANI, 2004).

1.5.5 Limite de Detecção e Limite de Quantificação

O limite de detecção (LD) representa a menor concentração da substância em exame que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, utilizando um determinado procedimento experimental. O limite de quantificação (LQ) representa a menor concentração da substância em exame que pode ser medida, utilizando um determinado procedimento experimental (RIBANI, 2004, INMETRO, 2011).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Validar um método analítico para determinação de micotoxinas em biscoito *crackers* e água e sal.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Selecionar amostras de biscoito *cracker* e água e sal a serem estudadas
- Validar um método por Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas sequencial (CLUE-EM/EM) para detectar e quantificar as micotoxinas.
- Analisar as amostras de biscoito *crackers* e água e sal pela metodologia validada;
- Avaliar os resultados analíticos considerando o consumo de biscoito e o nível de concentração encontrado nas amostras.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 PADRÕES ANALÍTICOS

Os padrões analíticos utilizados nesse estudo foram obtidos como sais sólidos ou em solução. Padrões sólidos das aflatoxinas B1, B2, G1, G2, M1, M2, ocratoxina A e esterigmatocistina foram obtidos da *Sigma-Aldrich* (St. Louis, MO, USA).

3.1.1 Solução estoque

Soluções estoque de OTA ($40 \mu\text{g mL}^{-1}$) foram preparadas em solução empregando uma mistura de tolueno-ácido acético como solvente (99:1, v/v). Soluções estoque de EST ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$) e de cada aflatoxina ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$) foram preparadas em acetonitrila. As concentrações de todas as soluções estoque preparadas a partir dos padrões sólidos foram checadas por espectrofotometria UV (Horwitz, Latimer, 2005). Soluções estoque das fumonisinas B1 e B2 ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$) em acetonitrila/água 1:1 (v/v) foram obtidas da Fluka/Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Soluções estoque de DON ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$) em acetonitrila foram obtidas da Fluka/Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Solução estoque de ZEA em acetonitrila ($100,7 \mu\text{g mL}^{-1}$) foi obtida da Biopure (Tulln, Austria). Todas as soluções estoque foram armazenadas a -18°C ($\pm 2^\circ\text{C}$).

3.1.2 Solução Intermediária

As soluções intermediárias foram preparadas a partir de diluições da solução estoque e usadas para o preparo das curvas de calibração em solvente, em matriz e em matriz diluída.

3.2 REAGENTES E SOLVENTES

Para o preparo das amostras e das curvas de calibração foram usados os seguintes reagentes: Acetonitrila e metanol (HPLC-grade) da marca J T Baker

(Phillipsburg, NJ, USA), Hexano (> 96%) obtido da Merck (Darmstadt, Germany), Água ultra-pura que foi obtida através de sistema Milli-Q Gradient (Millipore, Bedford, MA, USA).

Para a fase móvel do CLUE foram usados os seguintes reagentes: Formiato de amônio (> 99 %) e ácido fórmico (para espectrometria de massas) foram obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

3.3 EQUIPAMENTOS

Para realização do estudo foram utilizados equipamentos como: balança analítica (SARTORIUS LP620P), blender (WARRING), vortex (IKA Work), centrífuga com refrigeração (HITACHI, CF 7D2), bomba de vácuo (MILLIPORE), ultrassom (BRANSON, 2510), fluxo de nitrogênio (Turbo-Vac LV) e UPLC-MS/MS.

3.4 INSTRUMENTAL (CLUE-EM/EM)

A cromatografia foi realizada utilizando um cromatógrafo (Waters ACQUITY UPLC™) equipado com uma coluna cromatográfica BEH C18 (100 mm x 2.1 mm i.d., 1.7 µm) mantida à temperatura de 35 ° C. O fluxo da fase móvel foi mantido constante em 0,3 mL/min.

Devido à presença de efeito memória (*carryover*) para as fumonisinas dois métodos de análise foram utilizados (SARTORI, 2015). Para determinação das fumonisinas, fumonisinas hidrolisadas e esterigmatocistina, solução 0,3 % de ácido fórmico foi utilizada como fase móvel aquosa. O gradiente de eluição foi iniciado com 60 % (v/v) de metanol, seguindo-se um aumento para 80 % (v/v) em 3 min e mantendo em 80 % por 1 min. O sistema foi então reequilibrado por 2 min com 60 % de metanol. O volume de injeção foi de 5 µL. Para determinação das aflatoxinas M2, M1, B2, B1, G2 e G1, desoxinivalenol e zearalenona, solução 5 mM de formiato de amônio foi usada como fase móvel aquosa. O gradiente de eluição iniciou com 10 % de metanol, foi aumentado para 100 % em 4 min e foi mantido em 100 % por 1,5 min. O sistema foi então reequilibrado por 2 min com 10 % de metanol. O volume de injeção foi de 5 µL.

A detecção foi realizada empregando-se um espectrômetro de massas sequencial do tipo quadrupolo (Waters, Quattro Premier™ XE) equipado com uma

fonte de ionização por *electrospray* (ESI) operado em modos de ionização positivo e negativo. Nitrogênio foi usado como gás do cone e gás de desolvatação em um fluxo de 50 L/h e 750 L/h, respectivamente. Argônio foi usado como gás de colisão em uma pressão de 4×10^{-3} mbar. As duas transições dos íons selecionadas e as condições de aquisição para as micotoxinas são apresentadas nas Tabelas 6 e 7.

Tabela 6 - Condições operacionais do espectrômetro de massas usadas na avaliação de diversas micotoxinas (Fumonisina B1 hidrolisada, Fumonisina B1, Fumonisina B2 hidrolisada, Fumonisina B2, Esterigmatocistina).

Micotoxinas	t_R (min) ^a	Transição de quantificação Q (m/z)	Transição de qualificação q (m/z)	Q/q ^b	Energia de colisão (eV) ^c	Voltagem do cone (V)	Dwell time (s)
Fumonisina B1 hidrolisada	1,60 (1)	406,3>388,3	406,3>370,3	1,2 (±0,2)	20 / 20	30	0,05
Fumonisina B1	1,75 (1)	722,2>334,3	722,2>352,3	1,2 (±0,2)	40 / 40	50	0,05
Fumonisina B2 hidrolisada	2,47 (2)	390,3>372,3	390,3>354,3	1,3 (±0,3)	20 / 20	30	0,02
Fumonisina B2	2,72 (2)	706,2>336,3	706,2>318,3	2,0 (±0,4)	35 / 35	50	0,02
Esterigmatocistina	3,00 (3)	325,2>281,2	325,2>310,2	1,1 (±0,2)	35 / 25	45	0,02

Legenda: ESI operado em modo positivo para todas as substâncias;

Interchannel delay e *interscan delay* foram ambos 0,005 s;

^aJanelas de aquisição demonstradas entre parênteses;

^bIntensidades relativas para as transições dos íons (Q/q) e o máximo de tolerância aceitável para confirmação demonstrado entre parênteses;

^cValores estão demonstrados na ordem: transição de quantificação / transição de qualificação.

Tabela 7 - Condições do espectrômetro de massas selecionadas para análise de Desoxinivalenol, Aflatoxina M2, Aflatoxina M1 Aflatoxina G2, Aflatoxina G1, Aflatoxina B2, Ocratoxina A, Zearalenona.

Micotoxinas	t_R (min) ^a	Transição de quantificação Q (m/z)	Transição de qualificação q (m/z)	Q/q ^b	Energia de colisão (eV) ^c	Voltagem do cone (V)	Dwell time (s)
Desoxinivalenol	2,15 (1)	297,1>249,1	297,1>231,1	2,2 ($\pm 0,6$)	25 / 25	25	0,15
Aflatoxina M2	2,91 (2)	331,3>273,3	331,3>285,2	1,9 ($\pm 0,4$)	25 / 25	45	0,15
Aflatoxina M1	3,05 (3)	329,2>273,2	329,2>259,2	2,1 ($\pm 0,5$)	25 / 25	50	0,015
Aflatoxina G2	3,04 (3)	331,3>245,3	331,3>285,3	1,5 ($\pm 0,3$)	30 / 30	40	0,015
Aflatoxina G1	3,16 (3)	329,2>243,2	329,2>283,2	1,5 ($\pm 0,3$)	25 / 25	45	0,015
Aflatoxina B2	3,28 (3)	315,2>287,0	315,2>259,2	1,0 ($\pm 0,2$)	25 / 30	50	0,015
Aflatoxina B1	3,38 (3)	313,0>269,2	313,0>285,2	1,8 ($\pm 0,4$)	35 / 25	40	0,015
Ocratoxina A	3,75 (4)	404,2>239,2	404,2>358,2	1,6 ($\pm 0,3$)	25 / 15	25	0,15
Zearalenona	4,23 (5)	316,9>174,8	316,9>130,8	1,3 ($\pm 0,3$)	25 / 30	50	0,15

Legenda: ESI operado em modo positivo para todas as substâncias, exceto para a zearalenona;

Interchannel delay e *interscan delay* foram ambos 0,005 s;

^aJanelas de aquisição demonstradas entre parênteses;

^bIntensidades relativas para as transições dos íons (Q/q) e o máximo de tolerância aceitável para confirmação demonstrado entre parênteses;

^cValores estão demonstrados na ordem: transição de quantificação / transição de qualificação.

3.5 AMOSTRAS

As amostras foram adquiridas no mercado da região metropolitana do Rio de Janeiro, RJ, entre os anos de 2015 e 2016. Foram coletadas no total sessenta (n= 60) amostras de biscoito sendo 30 de biscoito *cracker* e 30 de biscoito água e sal. Esses produtos possuem a mesma formulação variando apenas na quantidade de gordura em que o biscoito *cracker* é mais gorduroso.

As amostras coletadas são de 13 produtores diferentes representados por 16 diferentes marcas. As amostras foram armazenadas a -18°C ($\pm 2^{\circ} \text{C}$) até a realização das análises.

3.6 TRATAMENTO DAS AMOSTRAS

As amostras de biscoito foram trituradas em blender por um minuto, peneiradas em peneira com diâmetro máximo de 1 mm e homogeneizadas antes de serem processadas. O método de tratamento das amostras foi baseado em estudo publicado anteriormente (SARTORI, 2015). Cada amostra (3 g) foi pesada em tubo de centrifuga com 50 mL de capacidade. Em seguida, adicionou-se 5 mL de hexano, 5 mL de solução de ácido fórmico 3 % e 10 mL de acetonitrila. O tubo foi então agitado vigorosamente por 2 min utilizando-se um vortex (IKA Work) e em seguida foi sonificado por 10 min. Então, o tubo foi transferido para uma centrifuga (Hitach-HIMAC CF 7D2) e submetido a centrifugação a 3000 rpm por 7 min. Uma alíquota de 5 mL do extrato (acetonitrila/água) foi concentrada à secura a 50 °C sob fluxo de nitrogênio (Turbo-Vac LV). Os resíduos foram então ressuspensos com 1 mL de metanol/água (1:1, v/v) e as soluções filtradas utilizando filtros de polietileno (0,22 µm) antes das análises.

3.7 VALIDAÇÃO

O método analítico foi avaliado para determinação de aflatoxinas M2, M1, G2, G1, B2, B1, desoxinivalenol, ocratoxina A, fumonisinas B1 e B2 e fumonisinas B1 e B2 hidrolisadas, zearalenona e esterigmatocistina em biscoito *cracker* e água e sal. Os parâmetros foram avaliados seguindo o Protocolo de Validação de Métodos de Análise para Micotoxinas em Alimentos - POP 65.3120.145 do Laboratório de Análise de Resíduos de Micotoxinas do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS, 2009) e os critérios de legislações vigentes. Foram avaliados os seguintes parâmetros: seletividade, efeito matriz, linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção e limite de quantificação.

3.7.1 Seletividade

Para avaliar a seletividade o tempo de retenção de amostras de biscoito *crackers* e água e sal foram comparadas com o tempo de retenção de soluções padrões dos analitos em estudo.

Para confirmação foram comparadas as razões da intensidade dos sinais das transições dos íons de cada analito.

3.7.2 Efeito Matriz

Para avaliar a presença de efeito matriz foram preparadas três curvas de calibração para cada substância de interesse: curva em solvente metanol/água (1:1, v/v), curva em matriz (1 g mL⁻¹) e curva em matriz diluída (0,1 g mL⁻¹). As curvas em solvente e em matriz foram preparadas em seis níveis de concentração, nas faixas de concentração de 0,5 a 25 ng mL⁻¹ (aflatoxinas, M1, G1, B2, B1, ocratoxina A e esterigmatocistina), 1 a 100,0 ng mL⁻¹ (zearalenona), 1,5 a 75 ng mL⁻¹ (fumonisina B1 e B2), 2,5 a 125,0 ng mL⁻¹ (fumonisinas hidrolisadas B1 e B2) e 5 a 250 ng mL⁻¹ (desoxinivalenol). As curvas foram injetadas em triplicata.

Para avaliar a presença de efeito matriz os coeficientes angulares e lineares das curvas de calibração foram comparados pelo teste t, considerando um nível de significância de 5% (SOUZA, 2007). A extensão do efeito matriz foi avaliada comparando os coeficientes angulares das curvas de calibração preparadas em solvente com os coeficientes angulares das curvas preparadas em matriz e o cálculo foi realizado a partir da Equação 1 (SARTORI et al., 2015):

$$\text{Efeito Matriz} = (\text{coeficiente angular}_{\text{matriz}} / \text{coeficiente angular}_{\text{solvente}}) \times 100$$

(Equação 1)

3.7.3 Linearidade e faixa de trabalho

A linearidade foi avaliada a partir das mesmas curvas de calibração em matriz (*cracker* e água e sal) utilizadas para avaliar o efeito matriz com os mesmos níveis de concentração já que foi observado um efeito matriz significativo para as micotoxinas estudadas (SOUZA & JUNQUEIRA, 2005).

Como premissas para a análise de regressão foram verificadas a homocedasticidade, a independência e a normalidade dos resíduos da regressão.

Inicialmente, os valores aberrantes foram investigados sucessivamente pelo teste de resíduos padronizados de Jackknife (BELSLEY et al., 1980). A significância da regressão e a falta de ajuste foram verificadas pela análise de variância (ANOVA) (DRAPER & SMITH, 1998).

3.7.4 Exatidão e Precisão

Para avaliar a exatidão e a precisão do método foram realizados estudos de recuperação utilizando amostras branco de biscoito fortificadas com as micotoxinas de interesse em três níveis de concentração, com quatro replicatas para cada nível. A precisão intermediária foi avaliada através da análise de amostras fortificadas com a mesma concentração utilizada no primeiro nível de concentração. As amostras foram analisadas por quatro analistas diferentes em quatro dias diferentes. Na Tabela 8 consta os níveis de fortificação para cada micotoxina.

Tabela 8 – Níveis de concentrações das fortificações utilizadas nos estudos de recuperação do método ($\mu\text{g kg}^{-1}$).

Micotoxinas	Nível 1 ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Nível 2 ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Nível 3 ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
Desoxinivalenol	100	500	1500
Aflatoxina M2	1	5	15
Aflatoxina M1	1	5	15
Aflatoxina G2	1	5	15
Aflatoxina G1	1	5	15
Aflatoxina B2	1	5	15
Aflatoxina B1	1	5	15
Ocratoxina A	1	5	15
Esterigmatocistina	1	5	15
Zearalenona	10	50	150
Fumonisina B1	10	50	150
Fumonisina B2	10	50	150
Fumonisina B1 (hidrolisada)	10	50	150
Fumonisina B2 (hidrolisada)	10	50	150

As fórmulas utilizadas para calcular a recuperação e a exatidão do método estão representadas nas Equações 2 e 3.

$$\% \text{ Rec} = \frac{C_{\text{medida}}}{C_{\text{fortificada}}} \times 100$$

(Equação 2)

Sendo:

Rec = Recuperação;

C = concentração

$$\text{CV} = \frac{\text{DP}}{\text{CMD}} \times 100$$

(Equação 3)

Sendo:

CV = Coeficiente de variação

DP = desvio-padrão;

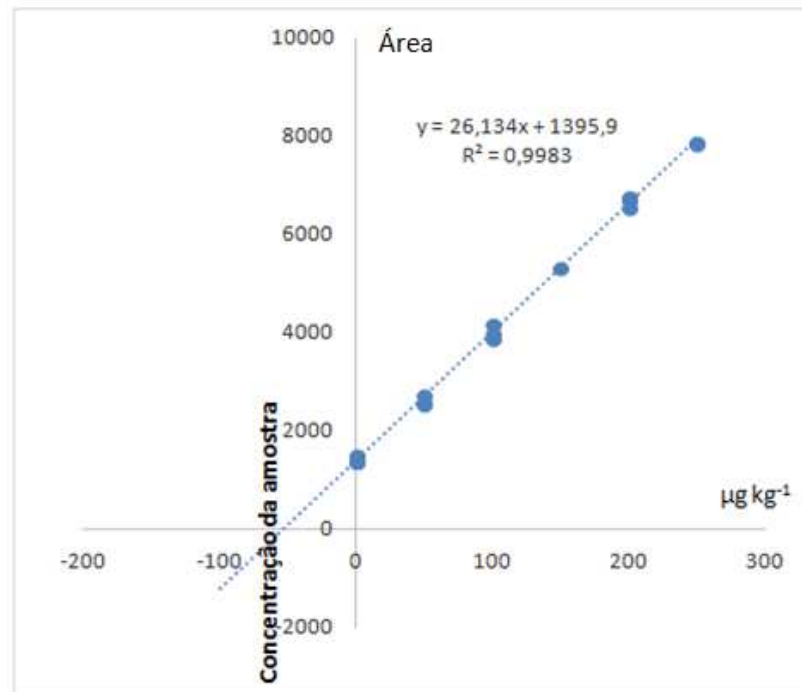
CMD = concentração média determinada

3.7.5 Limite de Detecção e Limite de Quantificação

O LD e o LQ das amostras de biscoito crackers foram determinados através da relação sinal/ruído de 3 e 10, respectivamente (SAEGER, 2011), utilizando o menor nível de concentração utilizado no estudo de recuperação descrito anteriormente. Não foi encontrada nenhuma amostra de biscoito *crackers* ou água e sal livre de contaminação por DON. Para solucionar esse problema foi utilizado o método de adição padrão para determinar a concentração de DON na amostra com

o menor nível de contaminação de DON encontrada (SANTE, 2016). Foram adicionadas quantidades conhecidas de padrão de DON no extrato final para obter concentrações que correspondem na amostra às seguintes concentrações: 50, 100, 150, 200 e 250 $\mu\text{g kg}^{-1}$. A concentração encontrada na amostra, corrigida pela recuperação do método, foi de 68,5 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e o sinal/ruído para determinação do limite de detecção e quantificação foi determinado a partir dessa amostra. O gráfico 1 apresenta o método de adição padrão.

Gráfico 1: Determinação da concentração de DON da amostra de biscoito por adição padrão.



3.8 ANÁLISE DAS AMOSTRAS

As amostras foram injetadas em duplicata e os resultados foram apresentados pela média das injeções. As amostras foram quantificadas a partir das curvas de calibração em matriz cracker e matriz água e sal. As amostras que apresentaram altas concentrações de micotoxinas e portanto se encontram fora da faixa linear da curva de calibração em matriz foram diluídas e quantificadas nas

curvas de calibração em matriz diluída. Os resultados encontrados foram avaliados de acordo com a RDC Nº 7/2011 (BRASIL, 2011).

3.9 ESTIMATIVA DA EXPOSIÇÃO A DON EM BISCOITOS CRACKER E ÁGUA E SAL

A estimativa da ingestão máxima tolerável representa a exposição humana permitida como resultado da ocorrência natural da substância nos alimentos, sem prejuízo para a saúde do indivíduo. Para isso, os níveis estabelecidos pelas agências governamentais devem ser considerados.

A Associação Brasileira das Indústrias de Biscoitos (ABIMAPI, 2015) estimou que o consumo brasileiro *per capita* de biscoito foi de 8,47 kg em 2015. Considerando que 21 % desse consumo são através do consumo de biscoito *cracker* e água e sal, foi estimado um consumo de 4,8 g *per capita* por dia de biscoitos *cracker* e água. Utilizando essas informações sobre o consumo foi possível estimar os níveis de micotoxinas ingeridos diariamente nesses produtos através da equação 4.

$$\text{Ingestão Diária de DON} = \text{consumo (kg)} \times \text{concentração média encontrada } (\mu\text{g kg}^{-1}) / 60 \text{ Kg (peso padrão)}$$

(Equação 4)

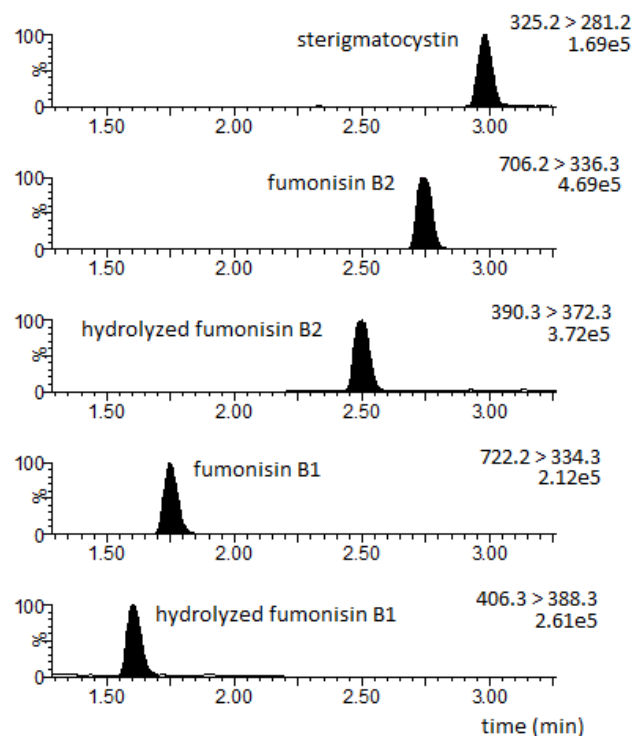
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 VALIDAÇÃO DO MÉTODO

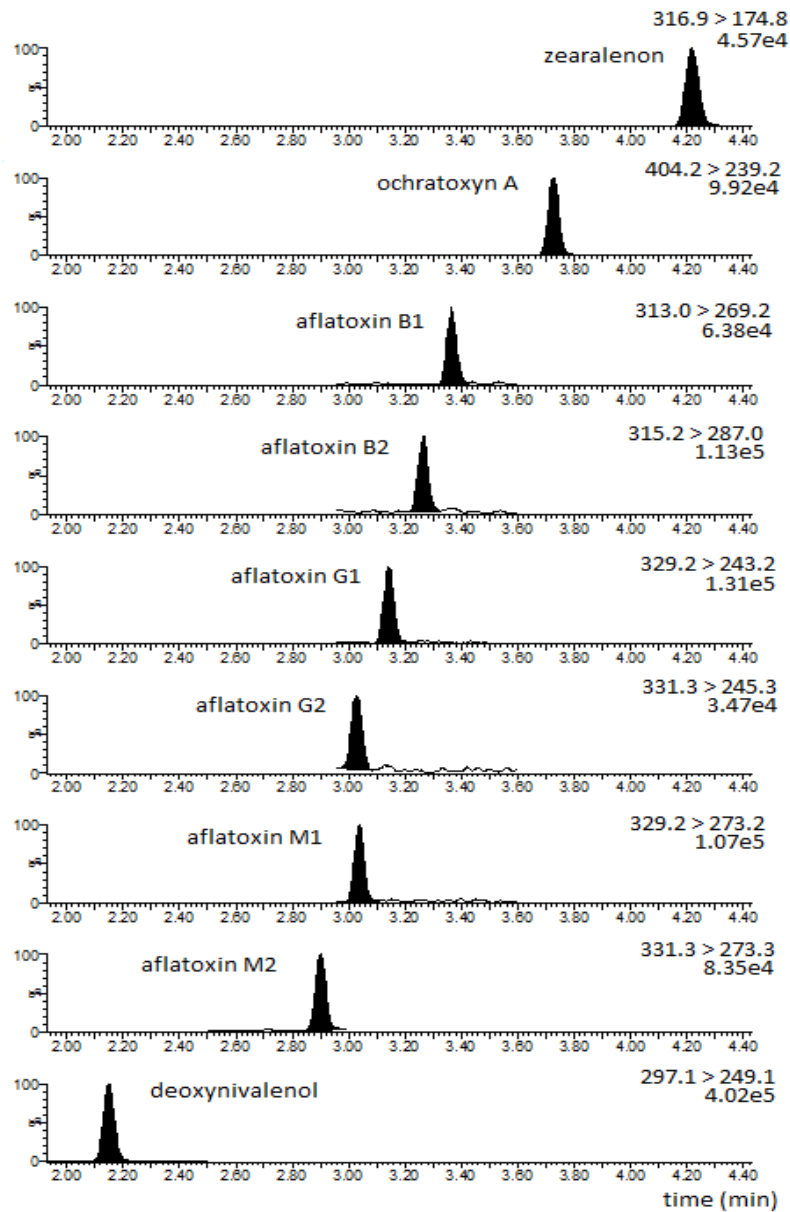
4.1.1 Seletividade

O método avaliado demonstrou ser seletivo para a matriz estudada já que não foram observados interferentes eluindo no mesmo tempo de retenção dos analitos de interesse. A Figura 7 apresenta cromatogramas de uma amostra de cracker fortificada com as micotoxinas alvo mostrando a ausência de interferentes.

Figura 7: Cromatogramas obtidos de uma amostra de *cracker* fortificada com as micotoxinas alvo (nível intermediário de concentração) utilizados na validação do método.



Continuação da Figura 7: Cromatogramas obtidos de uma amostra de *cracker* fortificada com as micotoxinas alvo (nível intermediário de concentração) utilizados na validação do método.



Legenda: Níveis de concentração em ordem crescente: aflatoxinas M2, M1, G2, G1, B2 e B1, ochratoxina A e esterigmatocistina: $5 \mu\text{g kg}^{-1}$; desoxinivalenol: $500 \mu\text{g kg}^{-1}$; Fumonisinias (B1 e B2) e Fumonisinias hidrolisadas (B1 e B2) e zearalenona: $50 \mu\text{g kg}^{-1}$.

4.1.2 Efeito matriz

Através do teste t foram verificadas diferenças significativas ($p < 0,01$) entre os coeficientes angulares e/ou lineares das curvas de calibração preparadas. Nas curvas de calibração em solvente e em matriz em biscoito *cracker* foi observada

diferença entre os coeficientes para todas as micotoxinas alvo, exceto ESTG; em relação à curva em matriz em biscoito água e sal foi verificada diferenças significativas para todas as micotoxinas estudadas, com exceção de AFM1, AFM2 e HFB1. Assim, foi demonstrado que o efeito da matriz é significativo para maioria das substâncias estudadas.

A extensão do efeito matriz está demonstrada na Tabela 9. As curvas em matriz diluída (0,1 g mL⁻¹) obtiveram efeito matriz menos significativo para as micotoxinas estudadas.

Tabela 9 – Extensão do efeito da matriz sobre as micotoxinas nas matrizes estudadas.

Micotoxinas	Efeito Matriz (%) ^a			
	Crackers	Crackers (diluída)	Água e Sal	Água e Sal (diluída)
DON	-29,0	-0,4	-42,3	4,8
AFM1	8,1	-5,3	-2,4	3,3
AFM2	4,9	0,4	-4,5	3,4
AFG2	-52	-14	-61,3	-9,3
AFG1	-57,0	-12,0	-66,6	-15,2
AFB2	-58,2	-19,2	-68,8	-21,7
AFB1	-57,1	-18,6	-66,3	-21,2
OTA	-24,0	-1,5	-43,0	-0,1
ST	-4,2	-4,1	-7,1	9,3
ZEA	-42,6	-9,2	-58,6	-7,3
FUMB1	-27,4	-5,7	-19,8	2,0
FUMB2	-19,72	-0,95	-16,1	4,2
HFB1	-26,38	-5,48	-13,9	6,6
HFB2	-16,36	9,45	-0,2	23,9

a (+) aprimoramento do sinal; (-) supressão do sinal

matriz diluída: 0,1 g de matriz por 1 mL de extrato final;

As micotoxinas que apresentaram maior efeito da matriz foram as aflatoxinas B e G em que ocorreu uma supressão de sinal tanto na matriz *crackers* quanto na matriz água e sal. As micotoxinas que apresentaram menor efeito matriz foram as aflatoxinas M1 e M2 e esterigmatocistina.

Para eliminar o efeito matriz as amostras analisadas foram quantificadas nas curvas em matriz.

4.1.3 Linearidade

As curvas de calibração em matriz *cracker* e matriz água e sal foram avaliadas e assim as faixas de trabalho para cada micotoxina foram determinadas.

A homocedasticidade dos resíduos, verificada pelo teste de Levene modificado (BROWN & FORSYTHE, 1974), foi confirmada para todas as curvas avaliadas (p -valores $> 0,05$). A independência dos resíduos, avaliada pela estatística de Durbin-Watson (DURBIN & WATSON, 1951), foi confirmada para todas as curvas de calibração avaliadas (p -valores $> 0,05$). A normalidade dos resíduos, verificada pelo teste de Ryan-Joiner (RYAN & JOINER, 1976), também foi confirmada (p -valores $> 0,05$). Foi verificada alta significância da regressão (p -valores $< 0,001$) e falta de ajuste não significativa (p -valores $> 0,05$), atestando a linearidade das curvas de calibração avaliadas. As Tabelas 10 e 11 apresentam os resultados da avaliação da linearidade em matriz *crackers* e matriz água e sal.

Tabela 10 – Avaliação da linearidade da curva em matriz *cracker*.

Curva em Matriz <i>Cracker</i>					
Micotoxinas	Faixa de trabalho (ng mL ⁻¹)	Equação da reta	R ²	R	Homocedasticidade
Desoxinivalenol	5 - 250	y= 32,5x + 59,9	0,993	0,996	p > 0,05
Aflatoxina M2	0,5 - 20	y= 946,6x + 307,2	0,998	0,999	p > 0,05
Aflatoxina M1	0,5 - 25	y= 999,8x + -19,2	0,992	0,996	p > 0,05
Aflatoxina G2	0,5 - 25	y= 391,3x + 79,8	0,998	0,994	p > 0,05
Aflatoxina G1	0,5 - 25	y= 1219,3x + 416,9	0,996	0,998	p > 0,05
Aflatoxina B2	0,5 - 25	y= 1061,1x + 71,3	0,998	0,999	p > 0,05
Aflatoxina B1	0,5 - 15	y= 1448,3x + 745,0	0,997	0,998	p > 0,05
Fumonisina B1	1,5 - 45	y= 438,5x + 1214,2	0,991	0,996	p > 0,05
HFB1	2,5 - 125	y= 548,0x + 631,1	0,993	0,997	p > 0,05
HFB2	2,5 - 75,0	y= 750,2x + 1867,3	0,991	0,995	p > 0,05
Ocratoxina A	0,5 - 25	y= 598,0x + 189,8	0,999	0,999	p > 0,05
Zearalenona	1,0 - 50	y= 1009,1x + 961,6	0,996	0,998	p > 0,05
Fumonisina B2	1,5 - 45	y= 1084,5x + 2414,6	0,99	0,992	p > 0,05
Esterigmatocistina	0,5 - 25	y= 1995,1x + -282,3	0,997	0,998	p > 0,05

Tabela 11 – Avaliação da linearidade da curva em matriz água e sal.

Curva em Matriz Água e Sal					
Micotoxinas	Faixa de trabalho (ng mL ⁻¹)	Equação da reta	R ²	r	Homocedasticidade
Desoxinivalenol	5 - 250	y= 26,5x + 116,6	0,99	0,992	p > 0,05
Aflatoxina M2	0,5 - 25	y= 861,2x + -59,0	0,991	0,994	p > 0,05
Aflatoxina M1	0,5 - 25	y= 902,6x + -219,0	0,98	0,991	p > 0,05
Aflatoxina G2	0,5 - 25	y= 316,9x + 4,6	0,981	0,99	p > 0,05
Aflatoxina G1	0,5 - 25	y= 946,3x + 64,6	0,998	0,999	p > 0,05
Aflatoxina B2	0,5 - 25	y= 791,3x + 125,5	0,997	0,998	p > 0,05
Aflatoxina B1	0,5 - 25	y= 1136,9x + 88,9	0,99	0,995	p > 0,05
Fumonisina B1	1,5 - 45	y= 484,4x + 532,9	0,996	0,998	p > 0,05
HFB1	2,5 - 125	y= 640,8x + -1403,3	0,994	0,997	p > 0,05
HFB2	2,5 - 125	y= 895,5x + -1536,6	0,998	0,999	p > 0,05
Ocratoxina A	0,5 - 25	y= 449,1x + 120,8	0,99	0,995	p > 0,05
Zearalenona	1,0 - 50	y= 726,9x + 385,9	0,998	0,999	p > 0,05
Fumonisina B2	1,5 - 45	y= 1133,6x + 1081,0	0,996	0,998	p > 0,05
Esterigmatocistina	0,5 - 25	y= 1933,2x + -174,0	0,996	0,998	p > 0,05

4.1.4 Exatidão e Precisão

Os resultados obtidos estão demonstrados na Tabela 12 onde a precisão é expressa pelo desvio padrão relativo (CV %) e a exatidão por valores de recuperação. Os valores de recuperação encontrados entre 70 a 110 % atenderam aos critérios de aceitação da Comunidade Europeia (CE, 2002, CE, 2006) bem como o desvio padrão relativo abaixo de 14 % para a maioria das micotoxinas em condições de repetibilidade (mesmo analista e mesmo dia). No Gráfico 2 e 3 constam as recuperações e os coeficientes de variação obtidos para cada nível estudado.

Na avaliação da precisão intermediária o DPR encontrado para as micotoxinas de interesse foi inferior a 17 %.

Tabela 12 – Resultados da validação: exatidão, precisão e precisão intermediária.

Micotoxinas	Nível 1			Nível 2		Nível 3	
	Rec	DPR ^a	DPR ^b	Rec	DPR	Rec	DPR
Desoxinivalenol	77,9	6,2	5,0	91,2	8,3	82,2	1,5
Aflatoxina M2	76,2	3,0	7,4	109,6	9,9	84,7	4,3
Aflatoxina M1	85,3	12,2	13,3	107,6	9,0	79,0	10,2
Aflatoxina G2	104,4	7,2	16,7	109,8	5,9	86,5	4,8
Aflatoxina G1	70,0	3,3	3,8	91,2	8,5	78,6	2,4
Aflatoxina B2	70,3	12,3	4,0	106,7	9,1	86,3	1,8
Aflatoxina B1	72,3	13,4	5,4	91,4	8,1	75,9	2,1
Fumonisina B1	83,6	8,0	4,0	96,2	3,9	85,0	3,6
Fumonisina B2	80,2	10,1	6,4	93,8	2,9	87,0	5,3
Fumonisina B1 (hidrolizada)	71,5	11,0	8,8	91,6	2,7	77,9	5,7
Fumonisina B2 (hidrolizada)	70,5	9,9	6,6	89,4	0,9	73,0	3,4
Ocratoxina A	88,0	7,6	5,1	99,5	7,3	79,3	7,9
Zearalenona	75,6	1,9	4,6	101,0	6,2	88,7	1,3
Esterigmatocistina	70,9	4,9	6,3	87,0	4,1	73,9	5,5

Legenda: Rec (%), Recuperação; ^aDPR (%), Desvio padrão relativo (*intra-day*, n=4); ^bDPR (%) Desvio padrão relativo (*inter-day*, n=4). Níveis de concentração em ordem crescente: aflatoxinas M2, M1, G2, G1, B2 e B1, ocratoxina A e esterigmatocistina: 1, 5, 15 $\mu\text{g kg}^{-1}$; desoxinivalenol: 100, 500, 1500 $\mu\text{g kg}^{-1}$; Fumonisinas (B1 e B2) e Fumonisinas hidrolizadas (B1 e B2) e zearalenona: 10, 50, 150 $\mu\text{g kg}^{-1}$.

Gráfico 2: Resultados das recuperações obtidas para cada nível estudado para as micotoxinas de interesse.

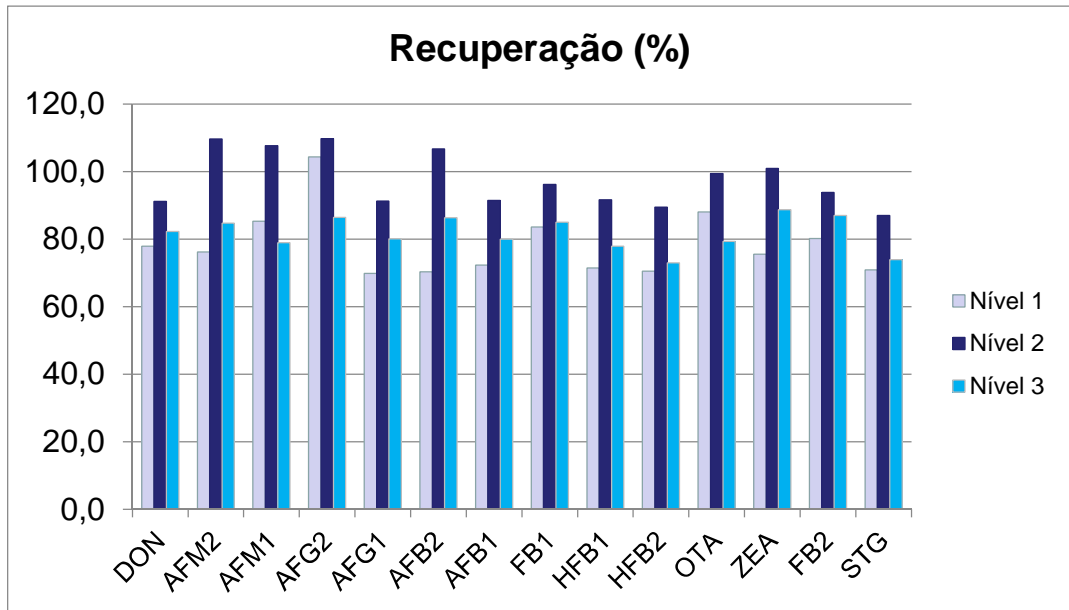
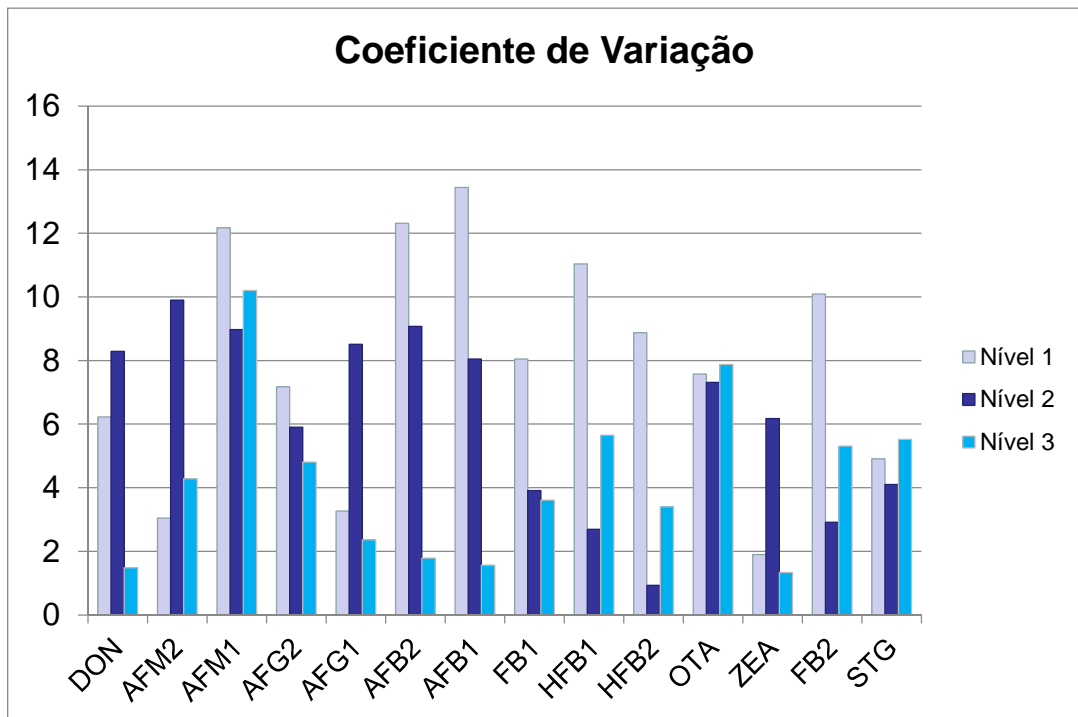


Gráfico 3: Resultados dos coeficientes de variação obtidos para cada nível estudado para as micotoxinas de interesse.



A recuperação e o DPR encontrados para desoxinivalenol, zearalenona, aflatoxina M1, G2, B2, G1, B2, ocratoxina e fumonisinas B1 e B2 atenderam aos

critérios estabelecidos pela Comunidade Europeia que contempla valores específicos de recuperação e precisão para essas micotoxina (CE, 2006). Para as outras micotoxinas que não possuem valores específicos de recuperação e precisão (aflatoxinas M2, esterigmatocistina e as fumonisinas B1 e B2 hidrolisadas) foi utilizado para avaliação os critérios estabelecidos pelo documento da Comunidade Europeia de 2002 (CE, 2002).

Essas micotoxinas atenderam aos critérios estabelecidos para a recuperação e DPR, exceto HFB1, HFB2 e ESTG não atenderam aos critérios de recuperação para o nível 3, porém os valores encontrados foram muito próximos do valor recomendado (77,9, 73,0 e 73,9 %, respectivamente). As Tabelas 13 e 14 apresentam os critérios de recuperação estabelecidos pela Comunidade Europeia.

Tabela 13: Critérios de recuperação estabelecidos pela Comunidade Europeia específico para cada micotoxina (CE, 2006).

Micotoxinas	Concentração $\mu\text{g kg}^{-1}$	Recuperação (%)
AFM1	0,01 - 0,05	60 - 120
	>0,05	70 - 110
AFB1, AFB2, AFG1 e AFG2	<1,0	50 - 120
	1 -10	70 - 110
	>10	80 - 110
OTA	<1,0	50 - 120
	1 - 10	70 - 110
DON	>100 - \leq 500	60 - 110
	>500	70 - 120
ZEA	\leq 50	60 - 120
	>50	70 - 120
FB1 e FB2	\leq 500	60 - 120
	>500	70 - 110

fonte: (CE, 2006)

Tabela 14: Critérios de recuperação estabelecidos pela Comunidade Europeia específico para micotoxinas (CE, 2002).

	Concentração ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Recuperação (%)
Micotoxinas	≤ 1	50 – 120
	$>1 - 10$	70 – 110
	≥ 10	80 - 110

fonte: (CE, 2002).

Com os resultados apresentados o método desenvolvido apresentou boa exatidão e precisão para a maioria dos níveis de concentração avaliados

4.1.5 Limite de Detecção e Limite de Quantificação

Os resultados do limite de detecção e quantificação estão representados na Tabela 15 para todas as micotoxinas estudadas.

Tabela 15 - Limite de Detecção e de Quantificação ($\mu\text{g kg}^{-1}$).

Micotoxinas	LD ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	LQ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
Desoxinivalenol	3,68	12,27
Aflatoxina M2	0,23	0,78
Aflatoxina M1	0,40	1,33
Aflatoxina G2	0,88	2,93
Aflatoxina G1	0,43	1,44
Aflatoxina B2	0,41	1,38
Aflatoxina B1	0,33	1,11
Fumonisina B1	0,51	1,71
Fumonisina B2	0,44	1,47
Fumonisina B1 (hidrolizada)	2,22	7,41
Fumonisina B2 (hidrolizada)	1,26	4,20
Ocratoxina A	0,09	0,31
Zearalenona	0,68	2,25
Esterigmatocistina	0,06	0,20

Com os resultados obtidos observa-se que a sensibilidade do método estudado está adequada para a análise de rotina atendendo as legislações mais exigentes para as micotoxinas regulamentadas nesses produtos.

4.2 ANÁLISE DAS AMOSTRAS

O método validado foi aplicado para determinar a presença de micotoxinas (aflatoxinas M2, M1, G2, G1, B2, B1, desoxinivalenol, ocratoxina A, fumonisinas B2 e B1, fumonisinas B2 e B1 hidrolisadas, zearalenona e esterigmatocistina) em amostras de biscoito *crackers* e biscoito água e sal. Os resultados foram avaliados de acordo com a RDC nº 7 de 2011, atual legislação brasileira para controle de micotoxinas em alimentos e comparados com estudos presentes na literatura.

DON foi encontrado nas 60 (100 %) amostras de biscoitos analisados. Em amostras de *crackers* foram encontradas concentrações de 66,4 a 1507,4 $\mu\text{g kg}^{-1}$, com uma média de 437,4 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Em amostras de biscoito água e sal foram encontradas concentrações que variaram de 73,4 a 1444,8 $\mu\text{g kg}^{-1}$, com uma média de 524,9 $\mu\text{g kg}^{-1}$.

ZEA foi detectada em 30 (50 %) das 60 amostras analisadas em concentrações entre LD e 14,83 $\mu\text{g kg}^{-1}$ sendo 13 amostras de *cracker* (LD a 13,58 $\mu\text{g kg}^{-1}$) e 17 de água e sal (LD a 14,83).

FB1 foi detectada em 17 (28 %) amostras sendo 8 amostras de biscoito *cracker* e 9 amostra de biscoito água e sal em concentrações abaixo do limite de quantificação.

Na Tabela 16 constam os resultados encontrados nas análises das amostras de biscoito *cracker* e água e sal.

Tabela 16 - Contaminação por Desoxinivalenol, Zearalenona e Fuminisina B1 em amostras de biscoito ($\mu\text{g kg}^{-1}$).

Micotoxina	Amostras positivas	Crackers			Água e Sal		
		mínimo	máximo	Média	Mínimo	Máximo	Média
DON	60	66,4	1507,4	437,4	73,4	1444,8	524,9
ZEA	30	LD (0,68)	13,58	6,64	LD (0,68)	14,83	6,38
FB1	17	LD (0,51)	< LQ (1,71)	-	LD (0,51)	<LQ (1,71)	-

Nos Gráficos 4 e 5 constam os resultados encontrados sobre a contaminação po Desoxinivalenol nas amostras de biscoito analisadas.

Gráfico 4 - Contaminação por Desoxinivalenol em amostras de biscoito *cracker* ($\mu\text{g kg}^{-1}$).

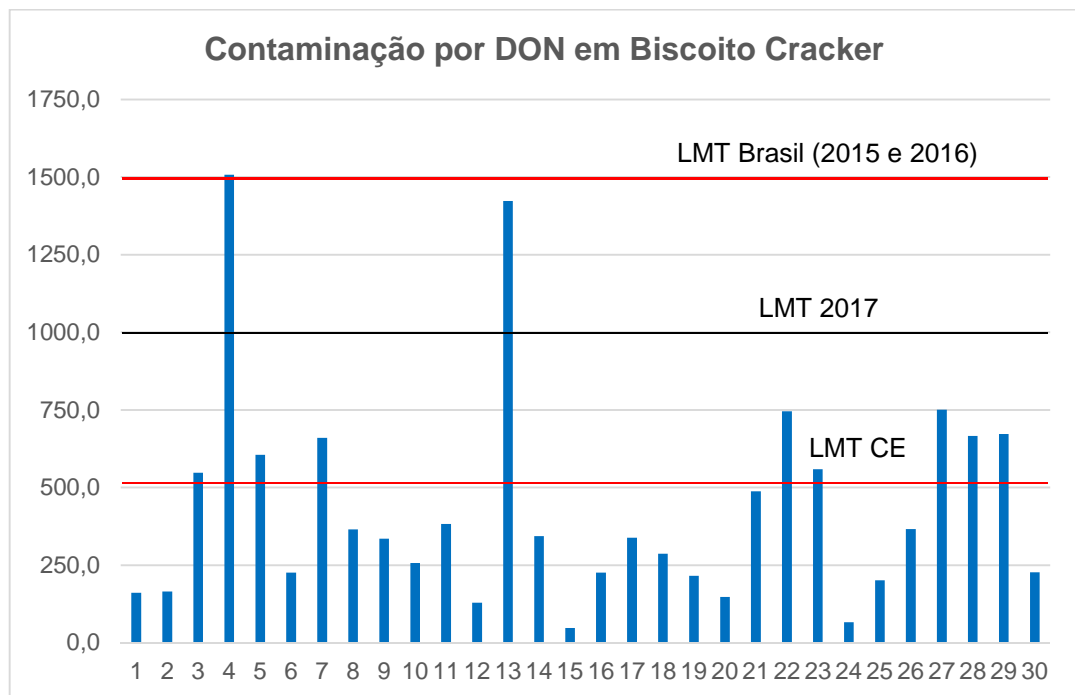
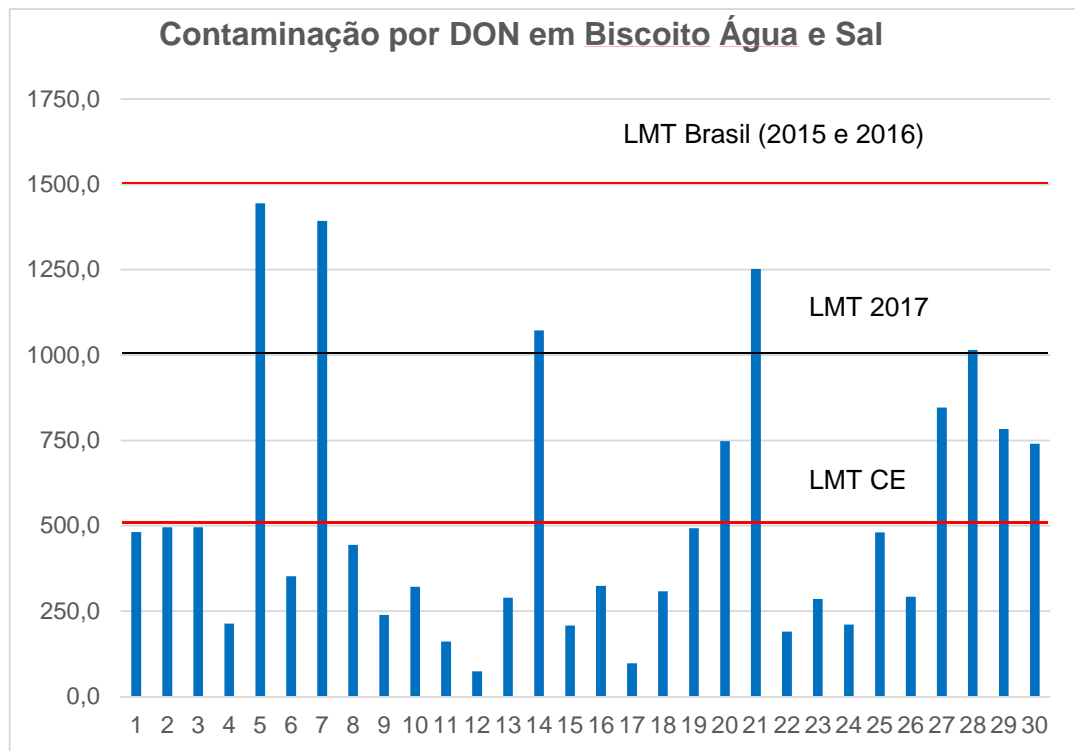


Gráfico 5- Contaminação por Desoxinivalenol em amostras de biscoito água e sal ($\mu\text{g kg}^{-1}$).

A concentração de desoxinivalenol encontrada neste estudo foi inferior a encontrada por Souza (2015) e Almeida (2016) e superior a concentração encontrada por Tanaka (2010) e Savi (2016). Souza (2015) analisou 23 amostras de biscoito cracker e 18 amostras estavam contaminadas por DON. A variação da concentração encontrada foi maior do que a encontrada nesse estudo, variando de 377 a 5295 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Já Almeida e colaboradores (2016) avaliaram 36 amostras de biscoito e a concentração máxima encontrada foi de 1720 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Tanaka (2010) avaliou 196 amostras de biscoito e encontrou DON em 98 % das amostras com a concentração variando de 0,9 a 791 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Savi e colaboradores (2016) analisaram 10 amostras de biscoito *cracker* e encontraram DON em 3 amostras com a concentração variando de 434 a 1159 $\mu\text{g kg}^{-1}$, contaminação muito próxima a encontrada nesse estudo. Na Tabela 17 constam os resultados encontrados na literatura sobre a presença de DON em biscoito.

Tabela 17 – Comparação sobre a presença de DON em amostras de biscoitos em estudos realizados no Brasil e no mundo.

Referência	Local	N° amostras	Amostras positivas	Concentração ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
Presente estudo	Brasil	60	60	66,4 – 1507,4
Souza (2015)	Brasil	23	18	377 - 5295
Almeida (2016)	Brasil	36	35	200 - 1720
Savi (2016)	Brasil	10	3	434 - 1159
Tanaka (2010)	Japão	196	192	0,9 - 791

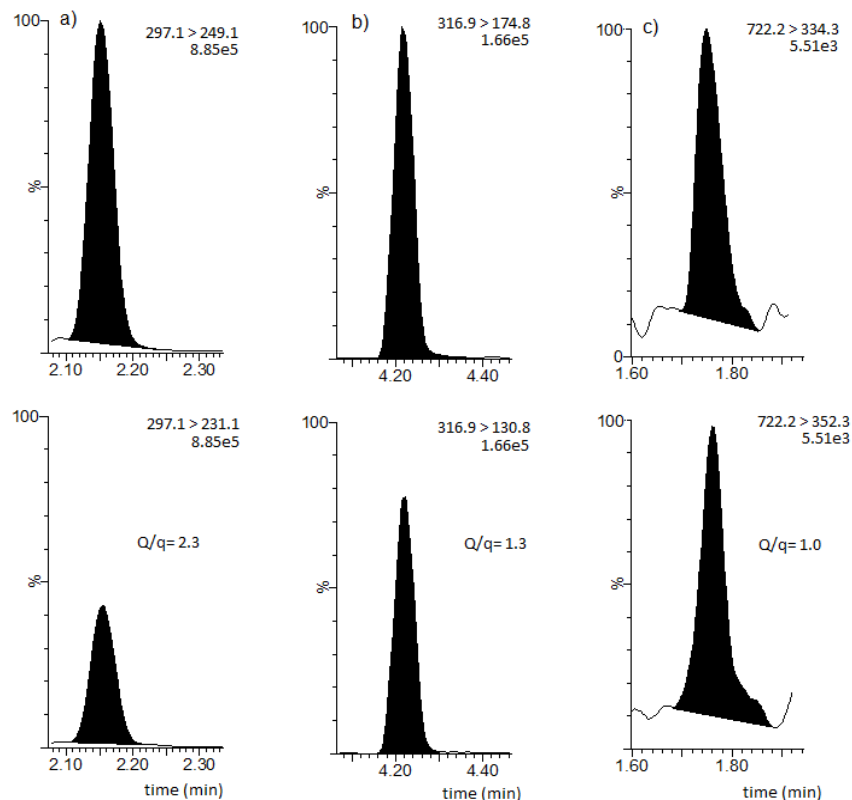
A porcentagem de amostras de biscoito contaminadas por zearalenona foi maior do que encontrada por Tanaka e colaboradores (2010), porém as médias de concentração encontradas foram bem próximas.

Não foram encontrados trabalhos sobre a presença de fumonisinas em biscoito *crackers*, porém a presença de fumonisinas tem sido demonstrada em trigo. No sul do Brasil, Mallman e colaboradores (2001) encontraram fumonisina B1 em uma amostra de trigo. Stankovic e colaboradores (2012) analisaram na Servia amostras de trigo e encontraram fumonisina B1 em 92 das 103 amostras analisadas em concentrações que variaram de 750 a 5400 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Li e colaboradores (2015) encontraram fumonisina B1 em amostras de farinha de trigo na China com a concentração variando de 0,3 a 34,6 $\mu\text{g kg}^{-1}$.

De acordo com a RDC nº 7º (2011) o limite máximo permitido para DON em biscoito *cracker* e biscoito água e sal era de 1750 $\mu\text{g kg}^{-1}$ até dezembro de 2015 e a partir de janeiro de 2016 esse limite passaria a ser de 750 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Porém com a RDC 59 de 2013 o prazo foi prorrogado para 1 de janeiro de 2017 mantendo o limite de 1750 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Assim, nenhuma das amostras analisadas em 2015 e 2016 excedeu o limite máximo estabelecido pela legislação brasileira. Porém se levarmos em consideração o limite estabelecido para DON pela comunidade europeia para produtos à base de trigo que é de 500 $\mu\text{g kg}^{-1}$ 30 amostras estariam acima do valor permitido por essa legislação.

Nesse estudo quatro amostras apresentaram contaminação por DON, ZEA e FUB1 mostrando uma possível contaminação simultânea entre essas micotoxinas. Stankovic e colaboradores (2012) analisaram 103 amostras de trigo e 47,8 % das amostras de trigo continham DON, ZEA e FUB1 indicando também essa possível contaminação simultânea. A Figura 8 apresenta uma das amostras analisadas que apresentaram contaminação simultânea de DON, ZEA e FUB1.

Figura 8: Cromatograma de uma amostra naturalmente contaminada por a) desoxinivalenol ($1252,2 \mu\text{g kg}^{-1}$), b) zearalenona ($14,83 \mu\text{g kg}^{-1}$) e c) fumonisina B1 ($>LD$).



Foram analisadas amostras de 16 marcas diferentes e os resultados estão apresentados na Tabela 18. Todas as marcas apresentaram contaminação por DON, apenas duas marcas não estavam contaminadas por ZEA e 9 amostras apresentaram contaminação por FB1. As marcas D, F, J, K e P apresentaram maior contaminação por DON e ZEA sugerindo uma possível contaminação simultânea entre essas micotoxinas.

Tabela 18: Resultado das amostras de biscoito analisadas quanto a presença de DON, ZEA e FB1 por marca.

Marcas	DON			ZEA		FB1	
	Amostras Positivas / Amostras analisadas	Média da concentração	Faixa	Amostras Positivas / Amostras analisadas	Faixa	Amostras Positivas / Amostras analisadas	Faixa
A	10/10	210,62	48,26 - 383,05	1/10	ND - <LQ	7/10	ND - <LQ
B	9/9	239,43	161,27 - 343,64	1/9	ND - <LQ	3/9	ND - <LQ
C	5/5	351,92	226,13 - 547,59	2/5	ND - 3,43	2/5	ND - <LQ
D	10/10	865,91	227,70 - 1507,37	9/10	ND - 14,53	0/10	ND
E	3/3	321,51	147,88 - 605,93	1/3	ND - 4,00	1/3	ND - <LQ
F	4/4	886,65	660,54 - 1392,48	4/4	>LD - 10,68	0/4	ND
G	3/3	355,33	213,08 - 487,80	2/3	ND - 3,82	1/3	ND - <LQ
H	1/1	335,60	335,60	1/1	3,82	0/1	ND
I	3/3	217,80	129,59 - 285,80	1/3	ND - <LQ	0/3	ND
J	1/1	1423,40	1423,40	1/1	11,99	1/1	<LQ
K	2/2	905,48	558,80 - 1252,16	2/2	>LD - 14,83	0/2	ND
L	1/1	66,45	66,45	0/1	ND	0/1	ND
M	2/2	414,50	336,40 - 492,57	0/2	ND	2/2	ND - <LQ
N	2/2	463,03	444,23 - 481,83	2/2	4,61 - 5,06	1/2	ND - <LQ
O	1/1	495,47	495,47	1/1	4,24	0/1	ND
P	3/3	682,52	480,15 - 1071,85	2/3	ND - 6,83	1/3	ND - <LQ

4.3 ESTIMATIVA DA EXPOSIÇÃO A DON EM BISCOITOS CRACKER E ÁGUA E SAL

A exposição ao DON através do consumo de biscoitos crackers e água e sal foi estimada considerando que esta foi a micotoxina presente em todas as amostras analisadas neste estudo. A quantidade média de DON encontrada em biscoito, 481 $\mu\text{g kg}^{-1}$, resultaria numa ingestão diária de 0,04 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de peso corporal por dia e se for considerado um adulto de 60 Kg este valor não ultrapassaria o limite proposto pelas autoridades de segurança do JECFA (2001), que é 1,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de peso corporal por dia. Se considerarmos a maior concentração encontrada que é de 1507,4 $\mu\text{g kg}^{-1}$ o nível de 0,12 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de peso corporal de DON poderia ser ingerido por dia.

Assim, o biscoito *cracker* e água e sal podem contribuir com 3,8 % do consumo total de DON preconizado pelo JECFA.

Souza e colaboradores (2015) e Savi colaboradores (2016) também estimaram a ingestão de DON em biscoito e o valor encontrado também não ultrapassou o limite preconizado pelo JECFA. No estudo realizado por Savi e colaboradores o biscoito *cracker* contribuiu com 3 % do consumo de DON, valor muito próximo encontrado nesse estudo.

A concentração de DON presente nas amostras de biscoito desse estudo não ultrapassou o valor aceitável definido pelo JECFA, mas vale ressaltar que o biscoito *cracker* e água e sal não são a única fonte de DON na dieta já que o trigo está presente em muitos outros produtos consumidos diariamente. Além disso, os dados estimados de consumo não consideraram uma ingestão diária maior ou a ingestão por diferentes faixas etária.

5 CONCLUSÃO

Nesse estudo um método para determinação de aflatoxinas M2, M1, G2, G1, B2, B1, desoxinivalenol, ocratoxina A, fumonisinas B2 e B1, fumonisinas B2 e B1 hidrolisadas, zearalenona e esterigmatocistina em biscoito *cracker* e água e sal foi validado. O método apresentou sensibilidade satisfatória podendo ser usado em análises de monitoramento. Foi observado efeito matriz significativo para a maioria das micotoxinas que foi corrigido utilizando curvas de calibração em matriz para quantificar as amostras. O método de adição padrão para determinar o limite de detecção e de quantificação para DON foi empregado com sucesso propondo o uso desse método na ausência de amostra branco.

O método validado foi aplicado para analisar amostras de biscoito *cracker* e água e sal. Desoxinivalenol, Zearalenona e Fumonisinas B1 foram detectadas nas amostras. A presença de DON em todas as amostras pode ser considerada um problema de saúde pública, pois muitas amostras apresentaram concentrações muito próximas ao limite máximo permitido pela legislação brasileira. A presença simultânea de desoxinivalenol, zearalenona e fumonisina B1 nas amostras confirma a importância da utilização de métodos que avaliam várias micotoxinas numa mesma análise e assim detectar um maior número desses contaminantes que podem estar presentes nos alimentos.

A estimativa do consumo de DON através do biscoito *cracker* e água e sal, não ultrapassou o limite determinado pelo *JECFA*, porém o resultado encontrado poderá servir de subsídio para que órgãos da saúde pública aumentem o controle sobre esse produto, além de alertar e prevenir pessoas que se expõem diariamente a este contaminante através do consumo de alimentos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIMAPI. Associação Brasileira das Indústrias de Biscoitos, Massas Alimentícias e Pães & Bolos Industrializados. 2015. Dados Estatísticos. [cited 2015 Jul 31]. Available from: http://abima.com.br/cloud/ABIMAPI_ANUARIO_2015.pdf

ALMMEIDA, A. P.; LAMARDO, L. C. A.; SHUNDO, L.; SILVA, S. A.; NAVAS, S. A.; ALABURDA, J.; RUVIERI, V.; SABINO, M. Occurrence of deoxynivalenol in wheat flour, instant noodle and biscuits commercialised in Brazil. **Food Additives & Contaminants**: part b, 2016.

ARAUJO, J.M.A. Aflatoxinas. In: _____. **Química de alimentos**. 3.ed Viçosa: UFV, (cap.VII), 2006.

AZOURI, H., ANTONIOS, D., GUITTON, V., DARROZES, S., PALLARDY, M. Monitoring the levels of deoxynivalenol (DON) in cereals in Lebanon and validation of an HPLC/UV detection for the determination of DON in crushed wheat (bulgur). **Food Additives and Contaminants**, vol. 3, no. 1, 2010.

BARAJ, E. & FURLONG, EB. Procedimento para determinação simultânea dos tricotecenos desoxinivalenol e toxina T-2. **Revista Instituto Adolfo Lutz**. v. 62, p. 95–104, 2003.

BAUER, J., ENGELHARDT, G., MEYER, K., SCHNEWEIS, I. Occurrence of Zearalenone-4- β -D-glucopyranoside in Wheat. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 1736-1738, 2002.

BENNET, J. W. & KLICH, M. Mycotoxins. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, DC, v.16, n. 3, p. 497-516, 2003.

BELSLEY, D.A.; KUH, E.; WELSCH, R.E. Regression diagnostics: identifying influential data and sources of collinearity. **New York: Wiley**, 292 p., 1980.

BERTHILLER, F., DALL'ASTA, C., CORRADINI, R., MARCHELLI, R., SULYOK, M., KRŠKA, R., ADAM, G., SCHUHMACHER, R. Occurrence of deoxynivalenol and its 3- β -D-glucoside in Wheat and maize. **Food Additives & Contaminants: Part A: Chemistry, Analysis, Control, Exposure & Risk Assessment**, v. 26, p. 4, 2009.

BERTHILLER, F.; SCHUMACHER, R.; BUTTINGE, G.; KRŠKA, R. Rapid simultaneous determination of major type A and B-trichothecenes as well as zearalenone in maize by high performance liquid chromatograph tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography**, v. 1062, p. 209-216, 2005.

BISELLI, S. & HUMMERT, C. Development of a multicomponent method for *Fusarium* toxins using LCMS/MS and its application during a survey for the content of T-2 toxin and deoxynivalenol in various feed and food samples. **Food Additives and Contaminants**, v. 22, p. 752-760, 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RDC nº 7, de 18 de fevereiro de 2011. Dispõe sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos. **Diário Oficial [da] União**, Brasília, 22 de fev. 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC n. 274 de 15 de outubro de 2002. **Diário Oficial [da] União**, Brasília, 16 out. 2002.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC No. 59 de 26 de dezembro de 2013. Dispõe sobre a prorrogação dos prazos estabelecidos nos artigos 11 e 12 e respectivos anexos III e IV da Resolução da Diretoria Colegiada RDC No. 7, de 18 de fevereiro de 2011 que dispõe limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos. **Diário Oficial [da] União**, Brasília, DF, Sec I, 30 de dezembro de 2013.

BROWN, B.M. & FORSYTHE, A.B. Robust tests for the equality of variances. **Journal of the American Statistical Association**, v. 69, p. 364-367, 1974.

BUCCI, T. J., HANSEN, D. K., LABORDE, J. B. Leukoencephalomalacia and Hemorrhage in the Brain of Rabbits Gavigated With Mycotoxin Fumonisin B. **Natural Toxins**, v. 4, p. 51-52, 1996.

CALDAS, E.D.; SILVA, S.C.; OLIVEIRA, J.N. Aflatoxinas e ocratoxina A em alimentos e riscos para a saúde humana. **Saúde Pública**, São Paulo, v. 36, n.3, p.319-323, junho, 2002.

CALORI-DOMINGUES, M. A.; ALMEIDA R. R.; TOMIWAKA, M. M.; GALLO, C. R.; GLORIA, E. M.; DIAS, C. T. S. Ocorrência de desoxinivalenol em trigo nacional e importado utilizado no Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27(1), p.181-185, 2007.

CAVALIERI, C., FOGLIA, P., PASTORINI, E., SAMPERI, R., & LAGANÀ, A. Development of a multiresidue method for analysis of major Fusarium mycotoxins in corn meal using liquid chromatography/tandem mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, 19, 2085–2093, 2005.

CENDOYA, E; MONGE, M P; PALACIOS, S A ; CHIACCHIERA, S M; TORRES, A M; FARNOCHI, M C; RAMIREZ, M L. Fumonisin occurrence in naturally contaminated wheat grain harvested in Argentina. **Food Control**, 37, p.56(6), 2014.

CHIARADIA, M. C., COLLINS, C. H. AND ISABEL, C. S. F. Jardim Universidade O estado da arte da cromatografia associada à espectrometria de massas acoplada à espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos em alimentos **Quimica Nova**, Vol. 31, No. 3, p. 623-636, Campinas, 2008.

CHU, F.S & LI, G.Y. Simultaneous occurrence of fumonisin B1 and other mycotoxins in moldy corn collected from the People's Republic of China in regions with high incidences of esophageal cancer. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, p. 847-852, 1994.

CHUN, H. S.; OK, H. E.; KIM, D. M.; KIM, D.; CHUNG, S. H.; CHUNG, M. S.; PARK, K. H. Mycobiota and natural occurrence of aflatoxin, deoxynivalenol, nivalenol and zearalenone in rice freshly harvested in South Korea. **Food Control**, v. 37, p. 284 e 291, 2014.

CODEX ALIMENTARIUS. JOINT FAO/WHO FOOD STANDARDS PROGRAMME. CODEX COMMITTEE ON CONTAMINANTS IN FOODS. First Session Beijing, China, 16-20, Abril, 2007.

COLE, R. J. & COX, R. H. Handbook of toxic fungal metabolites. **New York: Academic Press**, P. 987, 1981.

COLVIN, B. M. & HARRISON, L. R. Fumonisin-induced pulmonary edema and hydrothorax in swine. **Mycopathologia**, v. 117, p. 79-82, 1992.

COMUNIDADE EUROPEIA (CE). Setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. Commission Regulation (EC) No 1881/2006. Official Journal of the European Union, L 364/5, 20.12.2006.

COMUNIDADE EUROPEIA (CE). Implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results. Official Journal of the European Communities, 2002.

COMUNIDADE EUROPEIA (CE). Commission Regulation (EC) N° 401/2006 - laying down the methods of sampling and analysis for the official control of the levels of mycotoxins in foodstuffs. Official Journal of the European Union, 2006

CREPPY EE. Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe. **Toxicology Letters**, v., 127, p. 19–28, 2002.

CROWELL, W.A, MILLER, D.M., STUART, B.P. Experimental aflatoxicosis in swine: morphological and clinical pathological results. **Canadian Journal of Comparative Medicine**, Ontario, v.43, p. 343-351, Oct, 1981.

DOKO, M. B. & VISCONTI, A. Occurrence of fumonisins B1 and B2 in corn and corn-based human foodstuffs in Italy. **Food Additives and Contaminants**, v. 11, p. 433–439, 1994.

DÍEZ, C., FEINBERG, M., STAUB SPÖRRI, A., COGNARD, E., ORTELLI, D., EDDER, P., RUDZ, S. Evaluation of Quantification Methods to Compensate for Matrix Effects in the Analysis of Benzalkonium Chloride and Didecyldimethylammonium Chloride in Fruits and Vegetables by LC-ESI-MS/MS. **Food Analytical Methods**, v. 9, p. 485-499, 2016.

DRAPER N. & SMITH, H. Applied regression analysis. **New York: Wiley**, 706 p., 1998.

DUARTE, T. L. **Ocratoxina A em alimentos e bebidas: uma revisão bibliográfica**. 2010. Tese (Graduação em Engenharia de Alimentos – Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul, 2010.

DURBIN J. & WATSON, G.S. Testing for serial correlation in least squares regression ii. **Biometrika**, v. 38, 1-2, p. 159-178, 1951.

DUTTON, MF. Fumonisins, mycotoxins of increasing importance: their nature and their effects. **Pharmacol Ther**; v.70, p. 137–161, 1996.

EMBRAPA. 2014. EMBRAPA/Estatística. Trigo em números. [cited 2015 Jul 31]. Available from:

http://www.cnpt.embrapa.br/pesquisa/economia/2014_01_TRIGO%20em%20numeros.pdf

FAO. Worldwide regulations for mycotoxins in food and feed in 2003. Food and Agriculture Organization of the United Nations. FAO Food and Nutrition Paper 81. Rome, Italy, 2004.

FEIRE, F. C. O., et al. Micotoxinas: Importância na alimentação e saúde humana e animal. **EMBRAPA**, p. 24-25, 2007.

FERNÁNDEZ-TREVEJO, A., OTERO, E. & TORRES, C.. Temas de higiene e dos alimentos, La Habana, 2008.

FINK-GREMMELS, J.; JAHN, A.; BLOM, M. J. Toxicity and Metabolism of Ochratoxin A. **Natural Toxins**. New York, n.23, p.32-37, 2001.

FRENICH, A. G.; VIDAL, J. L. M.; GONZÁLEZ, R. R.; LUIZ, M. M. A. Simple and high-throughput method for the multimycotoxin analysis in cereals and related foods by ultra-high performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. **Food chemistry**, 117(4), 2009.

FURLONG, B. E et al. Mycotoxins and fungi in wheat harvested during 1990 in test plots in the state of São Paulo Brasil, **Mycopathologia**, Den Haag, v. 131, n. 3, p. 185-190, 1995a. 13.

_____. Mycotoxins and fungi in wheat stored in elevators in the state of Rio Grande do Sul, Brasil. **Food Additive and Contaminants**, London, v. 12, n. 5, p. 683-688, 1995b.

FURLONG, E.B.; SOARES, L.A.S.; VIEIRA, A.P.; DADALT, G. Aflatoxinas, ocratoxina A e zearalenona em alimentos da região sul do Rio Grande do Sul. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 58, p. 105-111, 1999.

GELDERBLOM, W. C. A., KRIEK, N. P. J., MARASAS, W. F. O., and THIEL, P. G., Toxicity and carcinogenicity of the *Fusarium moniliforme* metabolite, fumonisin B1, in rats. **Carcinogenesis**, 12, 1247-1251, 1991.

GONZÁLEZ-OSNAYA, L. & FARRÉS, A., Deoxynivalenol and zearalenone in Fusarium-contaminated wheat in México City. **Food Additives and Contaminants: Part B**, v. 4, no 1, p. 71-78, March, 2011.

GOTTSCHALK, C.; BARTHEL, J.; ENGELHARDT, G.; BAUER, J.; MEYER, K. Simultaneous determination of type A, B and D trichothecenes and their occurrence in cereals and cereals products. **Food Additives and Contaminants**, 26(9), 1273-1289, 2009.

HAGLER, W. M., TOWERS, N. R., JR., MIROCHA, C. J., EPPLEY, R. M., & BRYDEN, W. L. Zearalenone: mycotoxin or mycoestrogen? **B. A. Summerell, J. F.** p. 321 e 331 St. Paul, 2001.

HARRISON, L.R.; COLVIN, B.M.; GREEN, J.T.; NEWMAN, L.E.; COLE, J.R. Pulmonary edema and hydrothorax in swine produced by fumonisin B1, a toxic metabolite of *Fusarium moniliforme*. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 2, p. 217–221, 1990.

HUSSEIN, H.S.; BRASEL, J.M. Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. **Toxicology**, v. 15, 167(2), p. 101-34, 2001.

IAMANAKA, B. T., OLIVEIRA, I. S., TANIWAKI, M. H. Micotoxinas em alimentos. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica**, Recife, v. 7, p. 138-161, 2010.

IARC (International Agency for Research on Cancer). Evaluation of carcinogen risks to humans. Some naturally occurring substances: foods items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. **IARC Monographs**, 56, 489 –521, 1993.

IARC (International Agency for Research on Cancer). Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene. IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. **IARC Monographs**, 82: 301-366, 2002.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/lspa_2015.pdf>. Acesso em: 3 de nov, 2016.

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde. **POP 65.3120.145**: Protocolo de Validação de Métodos de Análise para Micotoxinas em Alimentos. Rev. 03. Rio de Janeiro, 2009.

INMETRO. Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia. **Orientações sobre Validação de Métodos Analíticos**: DOQ-CGCRE-08, Rev. 04, 2011.

JECFA. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Safety evaluation of certain mycotoxins in food, Fifty sixth meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA), FAO Food and Nutrition Paper 74, WHO **Food Additives Series** 47. Vol. 2001. Geneve (Switzerland): WHO; p. 419–555, 2001.

KELLERMAN, T. S., MARASAS, W. F. O., THIEL, P. G., GELDERBLOM, W. C. A., CAWOOD, M. & COETZER, J. A. W., 1990. Leukoencephalomalacia in two horses induced by oral dosing of fumonisin B1. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, v. 57, p. 269-275, 1990.

KRUGER, C. D. **Ocratoxina A em suínos abatidos no estado do Rio de Janeiro sob inspeção sanitária**, Tese (Pós Graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal Fluminense. Niterói, Rio de Janeiro, 2006.

KUIPER-GOODMAN, T., SCOTT, P.M., WATANABE, H. Risk assessment of the mycotoxin zearalenone. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 7, p. 253–306, 1987.

LAMARDO, L. C. A., NAVAS, S. A, SABINO, M. Desoxinivalenol (DON) em trigo e farinha de trigo comercializados na cidade de São Paulo. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 65(1), p.32-35, 2006.

LARSEN, T. O.; SVENDSEN, A.; SMEDSGAARD, J. Biochemical characterization of ochratoxin A producing strains of the genus *Penicillium*. **Applied Environmental Microbiology**, Whashington, v. 67, n. 8, p. 3630-3635, 2001.

LATTANZIO, V. M. T., SOLFRIZZO, M., POWERS, S., & VISCONTI, A. Simultaneous determination of aflatoxins, ochratoxin A and Fusarium toxins in maize by liquid chromatography/tandem mass spectrometry after multitoxin immunoaffinity cleanup. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 21, p. 3253–3261, 2007.

LEE, Y. W.; KIM, J. G.; CHUNG, D. H.; ROH, P. U. AND PESTKA J. J. Natural occurrence of zearalenone in rice and soybean produced in Korea. **Mycotoxin Research**, v. 7, 1991.

LI, W.; LI, F.; JIANG, D., ZHENG, F. & CHEN, J. Fumonisin B1, B2 and B3 in corn products, wheat flour and corn oil marketed in Shandong province of China. **Food Additives & Contaminants: Part B**, vol. 8, No. 3, p. 169–174, 2015.

MALLMANN, C. A.; ALMEIDA, C. A. A.; DILKIN, P.; STURZA, D. A. F.; VASCONCELOS, T. G.; RAUBER, R. Determinação de desoxinivalenol em grãos e cereais por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por espectrometria de massa (LC/MS). **Revista Ciência da Vida**. Seropédica, RJ, EDUR, v. 28, suplemento, 2008.

MALLMANN, C.A.; SANTURIO, J.M.; ALMEIDA, C.A.A; DILKIN, P. Fumonisin B1 levels in cereals and feeds from Southern Brazil. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, 68(1), 41-45, 2001.

MANJULA, K., HELL, K., FANDOHAN, P., ABASS, A., BANDYOPADHYAY, R. Aflatoxin and fumonisin contamination of cassava products and maize grain from markets in Tanzania and republic of the Congo. **Toxin Reviews**, V. 28(2–3), p 63–69, 2009.

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

MISHRA, S., ANSARI, M. K., DWIVEDI, D. P., PANDEY, P. H., DAS, M. Occurrence of deoxynivalenol in cereals and exposure risk assessment in Indian population. **Food Control**, v. 30, p. 549-555, 2013.

MOSS, M. O. Mode of formation of ochratoxin A. **Food Additives and Contaminants**, London, v.13, p.5-9, 1996.

MURRAY, Patrick R., ROSENTHAL, Ken S.; PFALLER, Michael A. **Microbiologia Médica**. 5 ed. Rio de Janeiro: Editora Elsevier, 2006.

OLIVEIRA, Q.; SOARES, L.M.V.; SAWAZAKI, E. Levantamento da incidência de desoxinivalenol, diacetoxiscirpenol e toxina T2 em híbridos de milho pipoca plantados no Estado de São Paulo e em milho pipoca comercializado na Cidade de Campinas, SP. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 21(3), p.330, 2001.

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

OLIVEIRA, C.A.F.; SEBASTIÃO, L.S.; ROSIM, R.E.; FAGUNDES, H.; FERNANDES, A.M. Ocorrência simultânea de aflatoxina e ácido ciclopiazônico em rações para

vacas leiteiras. **Revista Analítica**, São Paulo, v.5, n.24, p.56-58, Agosto/Setembro 2006.

PERAICA, M.; RADIC, B.; LUCIC, A.; PAVLOVIC, M. Toxic effects of mycotoxins in humans. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 77 (9), p. 754-766, 1999.

PURCHASE, I. F.; VAN DER WATT, J. J. Carcinogenicity of sterigmatocystin. **Food and Cosmetics Toxicology**, v. 8, n.3, p. 289-295, 1970.

PUSSEMIER, L., PIERARD, J-Y., ANSELME, M., TANGNI, E.K., MOTTE, J.-C. AND LARONDELLE, Y. Development and application of analytical methods for the determination of mycotoxins in organic and conventional wheat. **Food Additives and Contaminants**, v. 23(11), p. 1208 -1218, 2006.

RASMUSSEN, P.H., GHORBANI, F. AND BERG, T. Deoxynivalenol and other *Fusarium* toxins in wheat and rye flours on the Danish market. **Food Additives and Contaminants**, v. 20(4), p. 396-404, 2003.

RAZZAZI-FAZELI, E. BOHM, J., LUF, W. Determination of nivalenol and doxynivalenol in wheat using liquid chromatograph-mass spectrometry with negative ion atmospheric pressure chemical ionisation. **Journal of Chromatography A**, v. 854, p. 45-55, 1999.

RHEEDER, J. P., MARASAS, W. F. O., THIEL, P. G., SYDENHAM, E. W., SHEPHARD, G. S., and VAN SCHALKWYK, D. J. *Fusarium moniliforme* and the fumonisins in corn in relation to human oesophageal cancer in Transkei. **Phytopathology**, v. 82, p. 353-357, 1992.

RIBANI, M., BOTTOLI, C. B. G., COLLINS, C. H., JARDIM, I. C. S. F., MELO, L. F. C. Validação em Métodos Cromatográficos e Eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, No. 5, p. 771-780, 2004.

ROSS, P.F.; NELSON, P.E.; RICHARD, J.L.; OSWEILER, G.D.; RICE, L.G.; PLATTNER, R.D.; WILSON, T.M. Production of fumonisins by *Fusarium moniliforme* and *usarium proliferatum* isolates associated with equine leukoencephalomalacia and a pulmonary edema syndrome in swine. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56 (10), p. 3225–3226, 1990.

RYAN, T.A. & JOINER, B.L. Normal probability plots and tests for normality. **The State College: Pennsylvania State University**, 1976.

SAEGER, S. D., PETEGHEM, C. V., MONBALIU, S., MAVUNGU, J. D., EDIAGE, E. N. A Validated Multianalyte LC-MS/MS Method for Quantification OF 25 Mycotoxins in Cassava Flour, Peanut Cake and Maize Samples. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, p. 5173-5180, 2011.

SANCHIS, V., VIDAL, A., MARÍN, S., RAMOS, J. A., CANO-SANCHO, G. Determination of aflatoxins, deoxynivalenol, ochratoxin A and zearalenone in wheat and oat based bran supplements sold in the Spanish market. **Food and Chemical Toxicology**, v. 53, p. 133–138, 2013.

SANTE, EUROPEAN COMMISSION, Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticides residues analysis in food and feed. Document No SANTE/11945/2015, 01 Jan 2016.

SANTOS et al. Monitoramento e nível de ingestão de desoxinivalenol por trigo. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 32, n.4, p.1439-1450, out./dez., 2011.

SANTOS, J.S.; SOUZA, T.M.; ONO, E.Y.S.; HASHIMOTO, E.H.; BASSOI, M.C.; MIRANDA, M.Z.D.; ITANO, E.N.; KAWAMURA, O.; HIROOKA, E.Y. Natural occurrence of deoxynivalenol in wheat from Paraná State, Brazil and estimated daily intake by wheat products. **Food Chemistry**, 138(1), 90-95, 2013.

SARTORI, A. V. **Desenvolvimento, Validação e Aplicação de métodos analíticos para determinação de micotoxinas em leite, fórmulas infantis, alimentação infantil a base de cereais e amendoim por cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial**. Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz. 177 p. (Tese, Programa de Pós Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde), 2007.

SARTORI, A.V.; MATTOS, J.S.; MORAES, M.H.P.; NÓBREGA A W. Determination of aflatoxins M1, M2, B1, B2, G1, G2 and ochratoxin A in UHT and powdered milk by modified QuEChERS method and ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Food Analytical Methods**, v. 8, p. 2321 2015.

SAVI, G. D., PIACENTINI, K. C., TIBOLA, C. S., SANTOS, MARIA, G. S., SCUSSEL, M., V. Deoxynivalenol in the wheat milling process and wheat-based products and daily intake estimates for the Southern Brazilian population. **Food Control**, v. 62, p. 231–236, 2016.

SCHOLLENBERGER, M., DROCHNER, W., RUFLE, M., SUCHY, S., TERRY-JARA H., MULLER, T. Trichothecene toxins in different groups of conventional and organic

bread of the German market. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.18 p. 69-78, 2005.

SCUDAMORE, K. A., HAZELB, C. M., PATEL, S. AND SCRIVENC, F.
Deoxynivalenol and other Fusarium mycotoxins in bread, cake, and biscuits produced from UK-grown wheat under commercial and pilot scale conditions. **Food Additives and Contaminants**. Vol. 26, No. 8, P. 1191–1198, August 2009.

SHABIR, G. A. Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization. **Journal of Chromatography**, v. 987, p. 57–66, 2003.

SOARES, L. M. V. & MACHINSKI, M. Fumonisin B1 and B2 in Brazilian corn-based food products. **Food Additives and Contaminants**, vol. 17, No. 10, p.875-879, 2000.

SOBROVA, P., ADAM, V. VASATKOVA, A BEKLOVA, M., ZEMAN, L., KIZEK, R.
Deoxynivalenol and its toxicity. **Interdisciplinary Toxicology**, v. 3(3), p.94–99, 2010.

SOUZA, S.V.C. & JUNQUEIRA, R.G. A procedure to assess linearity by ordinary least squares method. **Analytica Chimica Acta**, v. 552(1-2), p. 25-35, 2005.

SOUZA, S.V.C. **Procedimento para validação intralaboratorial de métodos de ensaio: delineamento e aplicabilidade em análises de alimentos**. Belo Horizonte: Faculdade de Farmácia da UFMG. 296 p. (Tese, Doutorado em Ciência de Alimentos), 2007.

SOUZA, T. D., CALDAS, S. S., PRIMEL, E. G., FURLONG, E. B. Exposure to deoxynivalenol, Ht-2 and T-2 toxins by consumption of wheat-based product in southern Brazil. **Food Control**, v.50, p. 789-793, 2015.

SPANJER, M. C.; RENSEN, P. M.; SCHOLTEN, J. M. LC – MS/MS multi-method for mycotoxins after single extraction, with validation data for peanut, pistachio, wheat, maize, corn-flakes, raisins and figs. **Food Additives and Contaminants**, v. 25, p. 472-489, 2008.

STANKOVIC, S.; LEVIC, J.; IVANOVIC, D.; KRNJAJA, V.; STANKOVIC, G.; TANCIC, S. Fumonisin B1 and its co-occurrence with other fusariotoxins in naturally-contaminated wheat grain. **Food Control**, V. 23(2), p. 384-388, 2012.

SYDENHAM, E. W., SHEPHARD, G. S., THIEL, P. G., MARASAS, W.F.O., and STOCKENSTRÖM, S., Fumonisin contamination of commercial corn-based human foodstuffs. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 39, p. 2014-2018, 1991.

TANAKA, H., SUGITA-KONISHI, Y., TAKINO, M., TORIBA, A. HAYAKAWA, K. A survey of the occurrence of Fusarium mycotoxins in biscuits in Japan by using LC/MS. **Journal of Health Science**, v. 56, n. 2, p. 188-194, 2010.

TERAO, K. Sterigmatocystin – a masked potent carcinogenic mycotoxin. *Journal of Toxicology*: **Toxin Reviews**, v. 2, p. 77-110, 1983.

VISCONTI, A.; PASCALE, M. Determination of zearalenone in corn by means of immunoaffinity clean-up and high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. **Journal of Chromatography A**, v. 815, p. 133-140, 1998.

WEAVER, G. A.; KURTZ, H. J.; BEHRENS, J. C.; ROBINSON, T. S.; SEGUIN, B.E.; BATES, F.Y.; MIROCHA, C.J. Effect of zearalenone on the fertility of virgins dairy heifers. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v.47, n. 6, p.1395-1397, 1986.

WHITLOW, L. W. & HAGLER JUNIOR, W. M. Mycotoxins in dairy cattle. In: MOLIN, R; VALENTINI, M. L. **Simpósio Sobre Micotoxinas em Grãos**, São Paulo: Fundação Cargil, p. 151-181. 1999.

WHO. Fumonisin B1 (Environmental health criteria 219). **International Programme on chemical safety**. Geneva: World Health Organization; 2000.

ZINEDINE, A.; SORIANO, J. M.; MOLTÓ, J. C.; MAÑES, J. Review on the toxicity, occurrence, metabolism, detoxification, regulations and intake of zearalenone: An oestrogenic mycotoxin. **Food and Chemical Toxicology**, v. 45, p. 1-18, 2007.