

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

André Victor Sartori

**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

2015

André Victor Sartori

**DESENVOLVIMENTO, VALIDAÇÃO E APLICAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS  
PARA DETERMINAÇÃO DE MICOTOXINAS EM LEITE, FÓRMULAS INFANTIS,  
ALIMENTAÇÃO INFANTIL A BASE DE CEREAIS E AMENDOIM POR  
CROMATOGRÁFIA LÍQUIDA DE ULTRA EFICIÊNCIA ACOPLADA À  
ESPECTROMETRIA DE MASSAS SEQUENCIAL**

Tese 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 Doutor em Vigilância Sanitária

Orientador: Prof. Dr. Armi Wanderley da Nóbrega

Rio de Janeiro

2015

Catálogo na fonte  
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde  
Biblioteca

Sartori, André Victor

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 / André Victor Sartori. Rio de Janeiro: INCQS / FIOCRUZ, 2015.

176 f., il.

Tese (Doutorado em Vigilância Sanitária) – Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro, 2015.

Orientador: Armi Wanderley da Nóbrega

1. Micotoxinas. 2. Leite. 3. Fórmulas infantis. 4. Alimentos Infantis. 6. Cromatografia Líquida. I. Título

Development, validation and application of analytical methods for the determination of mycotoxins in milk, infant formulas, cereal-based infant foods and peanut by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

André Victor Sartori

**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**

Tese 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 Doutor em Vigilância Sanitária

Aprovado em: 29 / 06 / 2015

**BANCA EXAMINADORA**

---

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

---

Eloisa Dutra Caldas (Doutora)  
Universidade de Brasília

---

Maria de Lourdes Mendes de Souza (Doutora)  
Embrapa

---

Prof. Dr. Armi Wanderley da Nóbrega (Doutor) – Orientador  
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

*Dedico esse trabalho aos meus pais, André e Maria de Fátima, incansáveis incentivadores dos meus estudos, e a minha amada, Isabela, companheira nessa jornada.*

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Dr. Armi Nóbrega pela paciência e confiança depositados na execução deste trabalho;

À Maria Heloísa pelo apoio, sugestões e confiança na execução deste trabalho;

À Rosana Santos pelo apoio no trabalho e amizade demonstrada nesses anos de trabalho;

Ao Yuri Souza pela inestimável ajuda na análise das amostras;

À Juliana Mattos pelo inestimável suporte no desenvolvimento do trabalho e elaboração dos artigos;

À Eleonora pelo suporte nos textos em inglês;

À Lúcia Bastos pelo apoio e pelas oportunas sugestões;

A toda a equipe dos laboratórios de resíduos de agrotóxicos e de resíduos de micotoxinas pelo apoio na execução desse trabalho.

Ao Filipe Quirino pelo apoio na execução deste trabalho.

Ao Sérgio pelo suporte na estatística;

A todos do Departamento de Química do INCQS que de alguma maneira contribuíram na construção deste trabalho.

## RESUMO

Métodos analíticos para a 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 (CLUE-EM/EM) foram desenvolvidos e validados. Os métodos analíticos apresentaram desempenho satisfatório e sensibilidade adequada para atender as mais restritivas regulamentações para controle de micotoxinas nos alimentos estudados, contribuindo assim para o desenvolvimento da área da análise de micotoxinas. Os procedimentos de tratamento das amostras são simples e rápidos, sendo adequados à análise de rotina das micotoxinas de interesse. O método QuEChERS (*Quick Easy Cheap Effective Rugged and Safe*) foi utilizado no tratamento das amostras para determinação simultânea de aflatoxinas M1, M2, B1, B2, G1 e G2 e ocratoxina A em leite e fórmulas infantis, e para determinação das aflatoxinas M1, M2, B1, B2, G1 e G2 em amendoim. Para determinação simultânea de aflatoxinas M2, M1, G2, G1, B2, B1, desoxinivalenol, ocratoxina A, fumonisinas B2 e B1, fumonisinas B1 e B2 hidrolisadas, zearalenona e esterigmatocistina em mingaus a base de diversos cereais para alimentação infantil, os analitos foram extraídos com auxílio de mistura de solventes empregando etapas rápidas de agitação e sonificação, sem a utilização de posteriores etapas de limpeza dos extratos. Também foi desenvolvido e validado um método analítico para determinação de fumonisinas mascaradas em mingau. Os métodos analíticos validados foram aplicados na investigação dos níveis de contaminação por micotoxinas em amostras de leite UHT, leite em pó, fórmulas infantis, amendoim e em cereais para alimentação infantil (mingau). A aflatoxina M1 foi encontrada com grande incidência ( $\geq 69\%$ ) nas amostras de leite analisadas e pela primeira vez a presença de aflatoxina M2 em leite é relatada no Brasil. Também, pela primeira vez a presença de aflatoxina M1 e M2 é relatada em amostras de amendoim no Brasil. Quanto às amostras de fórmulas infantis analisadas, a aflatoxina M1 foi encontrada com baixa incidência (14%), sendo que uma amostra foi considerada inadequada para consumo de acordo com a legislação vigente na União Européia. Desoxinivalenol, aflatoxinas B1 e G1, fumonisinas B1 e B2 e zearalenona foram encontrados em amostras de mingau. As micotoxinas encontradas nas amostras de mingau excederam o limite máximo tolerável da regulamentação Brasileira em pelo menos uma amostra analisada, exceto a aflatoxina G1. Em algumas amostras de mingau a base de milho foi encontrada contaminação simultânea por diferentes classes de micotoxinas em níveis de

concentração que excedem a legislação vigente no Brasil demonstrando a importância do método multianalítico desenvolvido. A maioria das amostras de mingau a base de milho analisadas (52%) apresentaram níveis de contaminação de fumonisinas inadequados ao consumo de acordo com a legislação vigente no Brasil. Pelos resultados obtidos foi verificado que as fumonisinas mascaradas contribuem significativamente para a contaminação total de fumonisinas nas amostras analisadas. Os resultados encontrados neste estudo podem subsidiar as autoridades de saúde pública no estabelecimento de regulamentações para controle de micotoxinas em alimentos.

**Palavras-chave:** micotoxinas. CLUE-EM/EM. Leite. Fórmulas infantis. Amendoim. Mingau.



## ABSTRACT

Analytical methods for the determination of mycotoxins in milk, infant formula, cereal-based food for infant consumption and peanuts by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UHPLC-MS/MS) were investigated. The validated analytical methods showed satisfactory performance and adequate sensitivity to meet restrictive regulations for mycotoxins in foods, thus contributing to the development of mycotoxins analytical area. The sample treatment explored was found to be simple and fast and suitable for routine analysis of the target mycotoxins. The QuEChERS method (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe) was used as the extraction procedure for the simultaneous determination of aflatoxin M1, M2, B1, B2, G1 and G2 and ochratoxin A in milk and infant formulas and for the determination of aflatoxins M1, M2, B1, B2, G1 and G2 in peanuts. For the simultaneous determination of aflatoxins M2, M1, G2, G1, B2, B1, deoxynivalenol, ochratoxin A, fumonisins B1 and B2, fumonisins B1 and B2 hydrolyzed, zearalenone and sterigmatocystin in cereal-based food for infant consumption, the analytes were extracted with a mixture of solvents employing rapid stirring and sonification steps without the use of further clean-up steps. Analytical methods for determination of hidden fumonisins in cereal-based porridge for infant consumption also were validated. After validation the analytical methods were used to investigate the mycotoxin contamination of UHT and powdered milk, infant formulas, peanuts and cereal-based porridge for infant consumption. An elevated incidence of aflatoxin M1 in milk was observed ( $\geq 69\%$ ). For the first time the presence of aflatoxin M2 in milk and of aflatoxin M1 and M2 in peanut samples was reported in Brazil. Aflatoxin M1 was found with low incidence (14%) in infant formulas. However, the concentration of aflatoxin M1 in one of the analyzed infant formulas exceeded the limit presently allowed in European Union. Deoxynivalenol, aflatoxins B1 and G1, fumonisins B1 and B2 and zearalenone were found in the porridge samples. In some of the analyzed samples the Brazilian regulation for mycotoxins in porridge was exceeded. The majority of the corn-based porridge analyzed samples (52%) showed fumonisins contamination levels unsuitable for consumption according the current Brazilian legislation. It was also found that the hidden fumonisins significantly contribute to the total fumonisin contamination of the corn based samples. The results of this study may subsidize public health authorities in setting regulations for the control of mycotoxins in foods.

**Key-words:** mycotoxins. UHPLC-MS/MS. Milk. Infant formulas. Peanut. Porridge.

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Limites máximos tolerados para as micotoxinas em fórmulas infantis e/ou alimentos processados destinados a alimentação infantil ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ). .....	32
--	----

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Fórmulas estruturais das principais aflatoxinas.....	21
Figura 2: Fórmula estrutural da ocratoxina A.....	23
Figura 3: Fórmula estrutural do desoxinivalenol.....	24
Figura 4: Fórmula estrutural da zearalenona.....	25
Figura 5: Fórmulas estruturais das fumonisinas.....	27

## 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
DON	Desoxinivalenol
FB1	Fumonisina B1
FB2	Fumonisina B2
HFB1	Fumonisina B1 hidrolisada
HFB2	Fumonisina B2 hidrolisada
IARC	International Agency for Reseach on Cancer
LD	Limite de detecção
LMT	Limite máximo tolerado
LQ	Limite de quantificação
OTA	Ocratoxina A
QuEChERS	Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe
STG	Esterigmatocistina
UE	União Européia
UHT	Ultra high temperature
ZEA	Zearalenona
EFS	Extração em Fase Sólida
ELLP	Extração Líquido-Líquido Pressurizada
ELL	Extração Líquido-Líquido

APCI	Atmospheric Pressure Chemical Ionization
ESI	Electrospray Ionization
ArEM	Espectrometria de massas de alta resolução
CCD	Cromatografia em camada delgada
CG-EM	Cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas
CG-DIC	Cromatografia a gás com detecção por ionização em chama
CG-DCE	Cromatografia a gás com detecção por captura de elétrons
HPLC-F	Cromatografia líquida de alta eficiência com detector de fluorescência

## SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS .....	vi
RESUMO .....	vii
ABSTRACT .....	ix
LISTA DE TABELAS .....	x
LISTA DE ILUSTRAÇÕES .....	xi
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS .....	xii
SUMÁRIO .....	xiv
1 INTRODUÇÃO GERAL .....	17
2 ASPECTOS RELEVANTES .....	20
2.1 MICOTOXINAS .....	20
2.1.1 Aflatoxinas .....	20
2.1.2 Ocratoxina A .....	22
2.1.3 Desoxinivalenol .....	24
2.1.4 Zearalenona .....	25
2.1.5 Fumonisinias .....	26
2.1.6 Micotoxinas <i>mascaradas</i> .....	28
2.2 REGULAMENTAÇÃO PARA MICOTOXINAS EM ALIMENTOS .....	29
2.3 OCORRÊNCIA DE MICOTOXINAS EM ALGUNS ALIMENTOS .....	33
2.3.1 Leite .....	33
2.3.2 Fórmulas infantis .....	36
2.3.3 Alimentação infantil a base de cereais .....	38
2.4 TÉCNICAS ANALÍTICAS UTILIZADAS NA DETERMINAÇÃO DE MICOTOXINAS EM LEITE E ALIMENTAÇÃO INFANTIL .....	45
2.5 MÉTODOS DE TRATAMENTO DE AMOSTRAS UTILIZADOS NA DETERMINAÇÃO DE MICOTOXINAS EM LEITE E ALIMENTAÇÃO INFANTIL .....	47
3 OBJETIVOS .....	51
3.1 OBJETIVO GERAL .....	51
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	51
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	52
4.1 MANUSCRITO 1: 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 .....	53
4.2 MANUSCRITO 2: Determination of aflatoxins M1, M2, B1, B2, G1 and G2 in peanut by modified QuEChERS method and ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry .....	74

4.3 MANUSCRITO 3: Survey of aflatoxins M1, M2, B1, B2, G1, G2 and ochratoxin A in infant formulas from Rio de Janeiro, Brazil, using a modified QuEChERS method and ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry .....	90
4.4 MANUSCRITO 4: Determinação de micotoxinas em mingau a base de cereais para consumo infantil por cromatografia líquida de ultra-eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial .....	106
4.5 MANUSCRITO 5: Determination of free and hidden fumonisins in porridge corn-based for infant consumption by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry....	131
5 CONCLUSÕES GERAIS .....	144
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	147
APÊNDICE A - Resultado das amostras de leite em pó integral contaminadas com aflatoxina M1 e/ou aflatoxina M2 (Manuscrito 1).....	168
APÊNDICE B - Resultado das amostras de leite UHT integral contaminadas com aflatoxina M1 e/ou aflatoxina M2 (Manuscrito 1).....	170
APÊNDICE C - Resultado das amostras de fórmulas infantis contaminadas com a aflatoxina M1 (Manuscrito 3). .....	171
APÊNDICE D - Resultados encontrados para as fumonisinas B1 e B2 livres nas amostras de mingau a base de milho analisadas (Manuscrito 5).....	172
APÊNDICE E - Resultados encontrados para as fumonisinas B1 e B2 totais nas amostras de mingau a base de milho analisadas (FB1+FB2, calculada através das fumonisinas hidrolisadas após hidrólise das amostras) (Manuscrito 5). .....	173
APÊNDICE F - Resultados para as fumonisinas B1 e B2 mascaradas encontradas nas amostras de mingau a base de milho (Manuscrito 5). .....	174
APÊNDICE G - Resultados encontrados para as micotoxinas nas amostras de mingau analisadas (Manuscrito 4). .....	175

# 1 INTRODUÇÃO GERAL

Micotoxinas são substâncias tóxicas naturalmente produzidas como metabólitos secundários de diversos fungos filamentosos. Diversos gêneros de fungos são capazes de produzir micotoxinas. Os fungos toxigênicos são onipresentes na natureza; ocorrem regularmente em alimentos em todo o mundo devido à infestação de produtos agrícolas, ocasionando perdas econômicas na agricultura e problemas para a saúde pública (CHU, 1991, MURPHY et al., 2006).

A contaminação de alimentos por micotoxinas ocorre principalmente por condições inadequadas no cultivo, transporte, processamento e armazenamento de alimentos, os quais possibilitam o crescimento de fungos produtores de micotoxinas. A distribuição da contaminação é influenciada por fatores geográficos e climáticos, atingindo diversos tipos de alimentos em todo o mundo. Dentre os alimentos com maior ocorrência, destacam-se o milho, trigo, arroz, amendoim, café, frutas frescas e secas, farinha de mandioca, vinho, cerveja, condimentos, leite e seus derivados (MAGAN, OLSEN, 2004).

A exposição às micotoxinas pela dieta está relacionada a diversas patologias. A severidade dos efeitos à saúde depende, dentre outros fatores, da toxicidade da micotoxina, da extensão da exposição e dos efeitos sinérgicos entre diferentes substâncias ou com agentes biológicos (SPEIJERS, SPEIJERS, 2004; HUSSEIN, BRASEL, 2001).

O Brasil possui condições climáticas propícias ao crescimento de diversos fungos produtores de micotoxinas. Estudos realizados no país têm confirmado que vários alimentos e rações apresentam contaminação importante por micotoxinas, sendo considerado um grave problema para o agronegócio e a saúde pública (CALDAS et al., 2002; FREIRE et al., 2007).

O aleitamento materno exclusivo nos primeiros seis meses é considerado a prática nutricional ideal para o crescimento saudável e o melhor desenvolvimento de crianças. À dieta de crianças a partir desta idade, é recomendado introduzir gradualmente alimentos complementares ao aleitamento materno (WHO, 2001;



BRASIL, 2008).

No Brasil, a prevalência exclusiva do aleitamento materno de crianças até seis meses de idade ainda é considerada baixa (41 %), sendo introduzidos como complementares na dieta outros alimentos como leites, sucos, chás, fórmulas infantis, mingaus e papas (BRASIL, 2009). Estes alimentos também têm sido utilizados na dieta de crianças como substitutos do aleitamento materno (OLIVEIRA et al., 2005; SILVA et al., 2008; CYRILLO et al., 2009; BRUNKEN et al., 2006; SALDIVA et al., 2011). Apesar da importância nutricional, o consumo desses alimentos por crianças pode representar uma importante fonte de exposição a diversos contaminantes químicos, com destaque para as micotoxinas (BAYDAR, 2007; MEUCCI et al., 2008).

Assegurar a qualidade de alimentos consumidos por crianças é uma das questões prioritárias de saúde pública já que crianças são mais suscetíveis aos efeitos tóxicos quando expostas aos contaminantes, devido principalmente, ao menor peso corporal e a baixa capacidade de detoxificação (SHERIF et al., 2009).

Assim, monitoramentos de micotoxinas têm sido realizados em diversos países, servindo como subsídio a ações de vigilância sanitária com o intuito de diminuir a exposição e, conseqüentemente, os riscos associados. No Brasil, estudos avaliando a ocorrência de micotoxinas na maioria dos alimentos consumidos por crianças são incipientes. Neste contexto, é importante que métodos analíticos adequados aos estudos de monitoramento sejam desenvolvidos e validados.

A carência de informações no Brasil relativas à contaminação de leite, cereais para alimentação infantil e fórmulas infantis por diferentes classes de micotoxinas é a principal justificativa para realização deste estudo. O desenvolvimento de métodos adequados para análise de micotoxinas e sua aplicação na avaliação dos níveis de contaminação destas substâncias nesses alimentos subsidiará ações de vigilância sanitária no intuito de diminuir a exposição a estes contaminantes.

Métodos analíticos empregados na determinação de micotoxinas em alimentos devem estar em consonância com o estado-da-arte das técnicas instrumentais disponíveis, a fim de adequá-los às exigências das análises de rotina (KOKKONEN, 2011). Grandes desafios são enfrentados, principalmente, no desenvolvimento de métodos analíticos que atendam aos restritivos limites máximos tolerados (LMT) nas

regulamentações para controle de micotoxinas em alimentos destinados ao consumo infantil.

Esse estudo teve por objetivo desenvolver métodos analíticos adequados à determinação de micotoxinas em alimentos por cromatografia líquida de ultra-eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial (CLUE-EM/EM). As metodologias analíticas estudadas contemplam todas as micotoxinas regulamentadas no Brasil para leite, fórmulas infantis e alimentação infantil a base de cereais, além de outras micotoxinas com importância toxicológica e potencial de contaminação desses alimentos. Devido à importância para a saúde pública, métodos para determinação de aflatoxinas em amendoim bem como de fumonisinas mascaradas em alimentação infantil também foram desenvolvidos.

## 2 ASPECTOS RELEVANTES

### 2.1 MICOTOXINAS

São conhecidas cerca de 400 micotoxinas, as quais são classificadas em diferentes grupos de acordo com suas características químicas. Devido à ocorrência e toxicidade, em torno de trinta micotoxinas têm sido consideradas as mais relevantes e algumas possuem seus níveis máximos regulamentados em diversos países, destacando-se as aflatoxinas B1, B2, G1, G2, M2 e M1, fumonisinas B1, B2 e B3, desoxinivalenol, zearalenona, patulina e ocratoxina A (BRASIL, 2011; FAO, 2004). A seguir, é apresentada uma breve revisão sobre a formação, ocorrência e importância toxicológica das micotoxinas de interesse do presente estudo.

#### 2.1.1 Aflatoxinas

Aflatoxinas são micotoxinas produzidas principalmente por fungos das espécies dos *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* e *Aspergillus nomius*, os quais ocorrem principalmente em regiões com temperatura e umidade relativamente elevadas. Assim, a presença de aflatoxinas tem sido relatada como sendo mais grave em áreas tropicais e subtropicais, onde as condições climáticas de temperatura e umidade relativa favorecem o crescimento desses fungos (KLICH, 2007; VARGA et al., 2011; KURTZMAN et al., 1987).

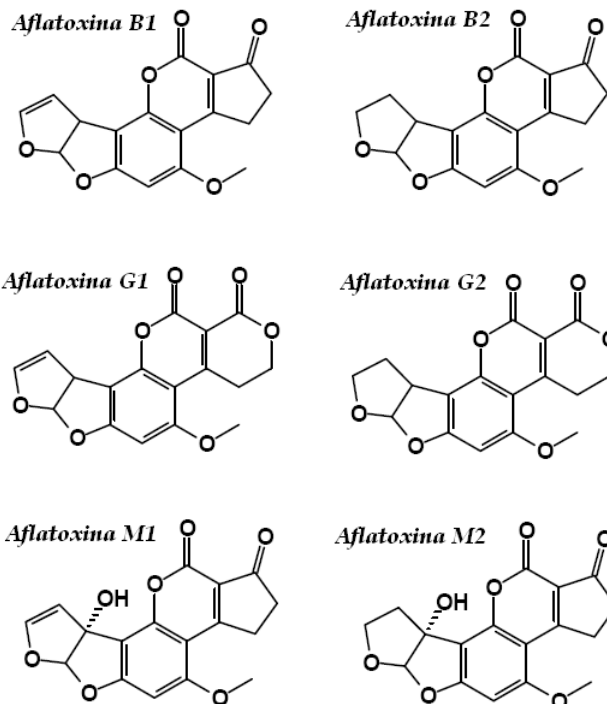
Entre as aflatoxinas identificadas até o momento, destacam-se as aflatoxinas B1, B2, G1, G2, M1 e M2 devido ao potencial tóxico e ocorrência em alimentos (FILAZI, SIRELI, 2013). As aflatoxinas M1 e M2 são os metabólitos hidroxilados das aflatoxinas B1 e B2, respectivamente, formadas no metabolismo de mamíferos expostos a essas micotoxinas na alimentação, sendo os principais metabólitos encontrados no leite. As aflatoxinas M1 e M2 também podem ser produzidas por fungos (BRÄSE et al., 2009; FILAZI, SIRELI, 2013).

As aflatoxinas B1, B2, G1 e G2 têm sido encontradas como contaminantes em

alimentos em vários países, incluindo cereais, alimentos a base de cereais e produtos derivados (MAJEED et al., 2013; WANG et al., 2013; LIU et al., 2012; LUTFULLAH, HUSSAIN, 2012; KHATOON et al., 2012; TAM et al., 2006; IQBAL et al., 2014(a,b); IBÁÑEZ-VEA et al., 2011, OK et al., 2014), cerveja (BENESOVA et al., 2012; MABLY et al., 2005), amendoim, produtos a base de amendoim (LI et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2009; IQBAL et al., 2013) frutas secas, nozes, (LUTFULLAH, HUSSAIN, 2011; LEONG et al., 2010). A contaminação de manteiga de amendoim, amendoim natural e bolo de amendoim por aflatoxinas M1 e / ou M2 também tem sido demonstrada (REN et al., 2007; HUANG et al., 2010; EZEKIEL et al., 2012). A aflatoxina M1 é a principal micotoxina encontrada em leite e seus derivados (PRANDINI et al., 2009). A aflatoxina M2 também tem sido encontrada em leite (HERZALLAH, 2009; LEE, LEE, 2014).

As aflatoxinas são as micotoxinas mais estudadas, principalmente por apresentarem maior toxicidade quando comparadas aos outros grupos de micotoxinas. A aflatoxina B1 é considerada a aflatoxina com maior potencial tóxico, seguida das aflatoxinas B2, G1 e G2. As fórmulas estruturais das aflatoxinas são apresentadas na Figura 1.

**Figura 1:** Fórmulas estruturais das principais aflatoxinas.



Efeitos agudos observados em humanos (hemorragia, lesão hepática, edema e morte) têm sido associados ao consumo de alimentos com altos níveis de contaminação por aflatoxinas (AZZIZ-BAUMGARTNER et al., 2005). Alguns estudos tem demonstrado a associação entre ocorrência de efeitos imunossupressores e a exposição por aflatoxinas em humanos (TURNER et al. 2003; JIANG et al. 2008). Evidências que algumas doenças, como o *kwashiorkor*, e o retardo no crescimento de crianças estão associadas à exposição por aflatoxinas também têm sido reportadas (HENDRICKSE, 1991; GONG et al. 2004; TURNER et al. 2007).

De acordo com a *International Agency for Reseach on Cancer (IARC)*, existe evidência suficiente de que a mistura das aflatoxinas B1, B2, G1 e G2 produzidas naturalmente seja carcinogênica para humanos – Grupo 1 (IARC, 2002). Estudos epidemiológicos têm demonstrado uma associação entre a exposição às aflatoxinas e o aumento da incidência de carcinoma hepatocelular, principalmente na presença de infecção pelo vírus da hepatite B (KUNIHOLM et al., 2008; LIU et al. 2012; WU et al., 2009). A aflatoxina B1 também foi classificada pela *IARC* como um carcinógeno para humanos – Grupo 1 (IARC, 1993). A aflatoxina M1 é classificada pela agência internacional de pesquisa em câncer como um possível carcinógeno para humanos – Grupo 2B (IARC, 1993). Esta substância também possui elevado potencial genotóxico (LAFONT et al., 1989).

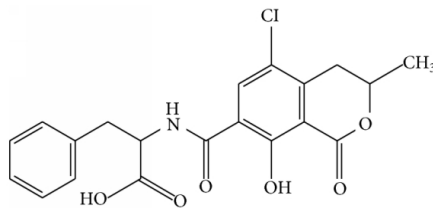
### **2.1.2 Ocratoxina A**

A ocratoxina A é a substância com maior relevância tóxica do chamado grupo das ocratoxinas, o qual também é constituído pelas ocratoxinas B, C e  $\alpha$ . As ocratoxinas, incluindo a ocratoxina A, são produzidas por várias espécies de fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*, como exemplo as espécies *A. ochraceus*, *A. melleus*, *A. auricomus*, *A. ostianus*, *A. petrakii*, *A. sclerotiorum*, and *A. sulfureus*, *A. alliaceus* e *albertensis*, *A. niger*, *A. carbonariu*, *A. glaucus* e *Penicillium verrucosum* (BAYMAN et al., 2002).

A Ocratoxina A tem sido encontrada com ampla distribuição geográfica como contaminante em um grande número de alimentos, incluindo vários cereais, como

milho, trigo, alimentos a base de cereais (MUSCARELLA et al., 2004; MAKUN et al., 2013; NGUYEN, RYU, 2014; OK et al., 2014), café (CORONEL et al., 2011; VANESA, ANA, 2013), vinho, cerveja (SOTO et al., 2014; ZHONG et al., 2014; TERRA et al., 2013), suco de uva (ROSA et al., 2004; NG et al., 2004), nozes, amendoim, pistache (TOFFA et al., 2013; DEABES, EL-HABIB, 2011; CORONEL et al., 2012), frutas secas (ZINEDINE et al., 2007a; BIRCAN et al., 2009). A ocratoxina A também tem sido encontrada em carnes, como carne de porco e de aves, transferida pelo consumo de rações contaminadas (JORGENSEN, 1998). A fórmula estrutural da ocratoxina A é apresentada na Figura 2.

**Figura 2:** Fórmula estrutural da ocratoxina A.



Quando ingerida na dieta uma parte da ocratoxina A é transformada em metabólitos menos tóxicos. No entanto, a ocratoxina A na forma inalterada é muito persistente em seres humanos devido à eliminação toxicocinética desfavorável, sendo considerada a principal razão para ser encontrada com alta ocorrência em diversos fluídos biológicos (PETZINGER, ZIEGLER, 2000).

Esta micotoxina está possivelmente associada com uma doença degenerativa dos rins de humanos, chamada de nefropatia endêmica dos Balcãs (KUMAR et al., 2007; PFOHL-LESZKOWICZ, 2002).

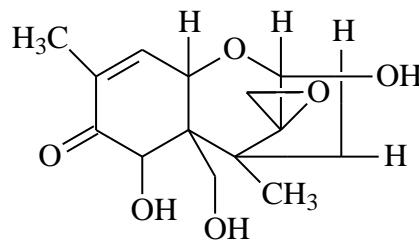
A ocratoxina A tem sido descrita como teratogênica, genotóxica, imunotóxica e carcinogênica em estudos realizados em animais (PFOHL-LESZKOWICZ, MANDERVILLE, 2007), tendo sido classificada pela IARC como um possível carcinógeno para humanos – Grupo 2B (IARC, 1993); um elevado potencial neurotóxico em experimentos realizados em animais foi constatado (SAVA et al., 2006). A ocratoxina A também pode estar relacionada a uma ação tóxica indireta, já que estudos experimentais têm demonstrado que a ocratoxina A pode estar envolvida em processos que prejudicam a excreção de outros xenobióticos (SAUVANT et al., 1998).

### 2.1.3 Desoxinivalenol

O desoxinivalenol, também conhecido como vomitoxina, tem sido considerado a principal micotoxina do grupo dos tricotecenos. Essas micotoxinas são produzidas por algumas espécies de fungos do gênero *Fusarium*, principalmente *F. graminearum* e *F. culmorum* (SOBROVA et al., 2010).

Com ampla abrangência geográfica, tem sido encontrado em vários países em diversos cereais, como trigo (STANKOVIC et al., 2012; JI et al., 2014; CENDOYA et al., 2014), arroz (OK et al., 2014), milho (KHATOON et al., 2012), aveia (CAMPBELL et al., 2000) e cevada (BOLECHOVA et al., 2015). O desoxinivalenol é relativamente estável durante o armazenamento, bem como à maioria dos procedimentos de processamento de alimentos, como moagem, cozimento e fermentação. Portanto, os produtos a base de cereais também representam uma importante fonte de exposição a essa micotoxina (SETYABUDI et al., 2012; OK et al., 2009; CASTILLO et al., 2008). A fórmula estrutural do desoxinivalenol é apresentada na Figura 3.

**Figura 3:** Fórmula estrutural do desoxinivalenol.



O desoxinivalenol afeta a saúde humana causando náuseas, vômitos, diarreia, dor abdominal, dor de cabeça, tontura e febre. Essa substância está relacionada a prejuízos na agropecuária, já que o consumo de ração contaminada por essa substância pode provocar diversos efeitos, como diminuição do consumo, vômito, perda de peso e diarreia em animais (ERKEKOGLU et al., 2008; SOBROVA et al., 2010).

Ainda há evidências inadequadas da carcinogenicidade dessa substância realizada através de experimentos animais. Por outro lado, ainda não foram realizados estudos epidemiológicos demonstrando a toxicidade dessa substância em humanos. Assim, o desoxinivalenol é classificado pela IARC no Grupo 3, ou seja, essa substância não pode ser classificada quanto a sua carcinogenicidade em seres humanos (IARC,

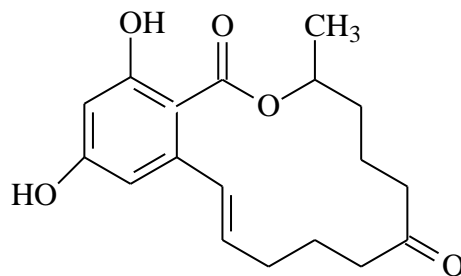
1993).

### 2.1.4 Zearalenona

A zearalenona é uma micotoxina produzida por espécies de fungos do gênero *Fusarium*, incluindo *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. cerealis*, *F. equiseti*, *F. crookwellense* e *F. semitectum*, os quais podem ser encontrados como contaminantes em vários cereais (ZINEDINE et al., 2007b).

Tem sido encontrada em vários países com grande ocorrência em diversos cereais, como trigo (STANKOVIC et al., 2012; JI et al., 2014), arroz (OK et al., 2014) e milho (BANKOLE et al., 2010), representando uma importante fonte de exposição a micotoxinas devido ao grande consumo desses alimentos. A zearalenona é relativamente estável quando alimentos contaminados por essa micotoxina são submetidos a diversos tipos de processamento, como moagem, fermentação e altas temperaturas. Assim, também tem sido encontrada em diversos alimentos processados a base de cereais (LOVELACE, NYATHI, 1977; SCOTT, 1996; RYU et al., 1999; IQBAL et al., 2014a,b). A fórmula estrutural da zearalenona é apresentada na Figura 4.

**Figura 4:** Fórmula estrutural da zearalenona.



A estrutura química da zearalenona e de seus metabólitos são similares às estruturas dos estrogênios produzidos naturalmente, e estas micotoxinas têm sido descritas como substâncias que possuem propriedades estrogênicas. Após a ingestão, a zearalenona é rapidamente absorvida pelo tecido intestinal. Os principais metabólitos biologicamente ativos,  $\alpha$ - e  $\beta$ -zearalenol, são formados através do metabolismo hepático (DIEKMAN, GREEN, 1992).

A exposição à zearalenona pela dieta tem sido relacionada principalmente a



desordens hormonais em animais e humanos (BENNETT, KLICH, 2003; ZINEDINE et al., 2007b); também tem sido demonstrada ação imunotóxica (HUEZA et al., 2014), hepatotóxica e genotóxica em animais (ZINEDINE et al., 2007b).

Há evidências limitadas da carcinogenicidade dessa substância em experimentos animais e ausência de estudos epidemiológicos demonstrando a toxicidade dessa substância em humanos. Assim, a zearalenona tem sido classificada pela IARC no Grupo 3, ou seja, essa substância não pode ser classificada quanto a sua carcinogenicidade em seres humanos (IARC, 1993).

Apesar de a zearalenona ser encontrada como contaminante em diversos estudos realizados no Brasil (VARGAS et al., 2001; QUEIROZ et al., 2012; ALMEIDA et al., 2012), nenhum estudo foi encontrado avaliando a contaminação de cereais para alimentação infantil para zearalenona no país.

### **2.1.5 Fumonisinias**

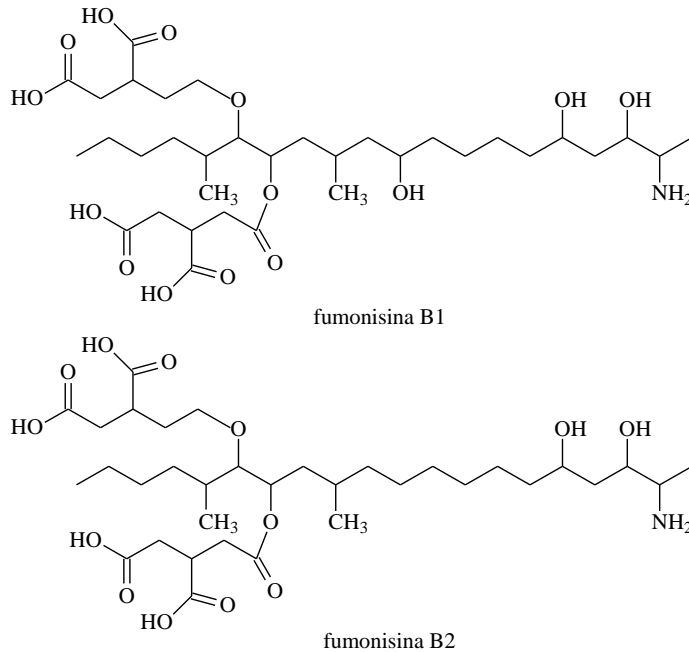
As fumonisinias são micotoxinas produzidas por algumas espécies de fungos do gênero *Fusarium*, produzidas principalmente por *F. verticillioides* e *F. proliferatum* (CREPPY, 2002).

Dentre os análogos do grupo das fumonisinias caracterizados até o momento, as fumonisinias B1, B2 e B3 são as formas presentes em quantidades mais significativas como contaminantes naturais em alimentos e com maior relevância devido ao potencial tóxico (RHEEDER et al., 2002).

Maior ocorrência e altos níveis de contaminação por fumonisinias têm sido encontrados em cereais cultivados em regiões tropicais e subtropicais. O milho é considerado o alimento com maior risco de contaminação por fumonisinias (GONG et al., 2009; GARRIDO et al., 2012). No entanto, estas micotoxinas tem sido encontradas em diversos outros alimentos, como em trigo (STANKOVIC et al., 2012; CENDOYA et al., 2014) e frutas secas (GULER, HEPERKAN, 2009). Não são completamente eliminadas nos processamentos utilizados nos alimentos, sendo, portanto, encontrados em diversos produtos, como em produtos a base de milho (TSENG et al., 1997; KIM et al., 2002; VELLUTI et al., 2001; LINO et al., 2007), em cerveja (HLYWKA, BULLERMAN, 1999), em vinho (MOGENSEN et al., 2010; LOGRIECO et al., 2010),

bem como cereais matinais e alimentos infantis a base de cereais (MAHNINE et al., 2012). As fórmulas estruturais das fumonisinas B1 e B2 são apresentadas na Figura 5.

**Figura 5:** Fórmulas estruturais das fumonisinas.



As fumonisinas foram isoladas e caracterizadas pela primeira vez em 1988 na África do Sul, em uma pesquisa que buscava determinar o agente causal de uma síndrome responsável por um tipo de necrose de células do cérebro de equinos bem como a ocorrência de câncer de esôfago em humanos (GELDERBLOM et al., 1988; MARASAS, 2001). Diversos estudos demonstraram a possível correlação entre o consumo de alimentos contaminados por fumonisinas e a necrose de células do cérebro de equinos e edema pulmonar em suínos (HARRISON et al., 1990; ROSS et al., 1990).

Devido ao alto nível de contaminação geralmente encontrado nos alimentos, principalmente em milho, a exposição às fumonisinas tem sido associada a diversos efeitos tóxicos (MISSMER et al., 2006). Estudos epidemiológicos tem demonstrado a possível correlação entre a ocorrência de câncer esofágico e o consumo de milho com altos níveis de contaminação de fumonisinas (LINO et al., 2004). Quanto aos estudos de carcinogenicidade, a *IARC* classificou a fumonisina B1 como um possível carcinógeno para humanos, incluindo-a no Grupo 2B (*IARC*, 2002).

### **2.1.6 Micotoxinas *mascaradas***

Nos últimos anos as autoridades de saúde têm demonstrado grande preocupação em relação a contaminação de alimentos pelas chamadas micotoxinas mascaradas (FAO, 2011). As micotoxinas mascaradas foram descobertas em meados dos anos 1980, a partir de observações clínicas em animais afetados por micotoxicoses, embora consumissem alimentos com baixos níveis de contaminação por micotoxinas. A toxicidade inesperada foi atribuída à presença de formas conjugadas de micotoxinas, possivelmente geradas pelo metabolismo de plantas ou fungos, que não teriam sido detectadas pelos métodos analíticos então utilizados. Estes conjugados podem ser hidrolisados no trato digestivo dos animais originando seu precursor tóxico ou podem exercer efeitos tóxicos comparáveis às micotoxinas livres (GAREIS et al., 1990).

A formação de metabólitos de micotoxinas produzidas por fungos, plantas e processamento de alimentos é conhecida há muitos anos. As micotoxinas são metabolizadas pelas plantas como mecanismo de detoxificação, assim como ocorre para diversos outros contaminantes (SANDERMANN, 2004).

Vários trabalhos têm demonstrado que o processamento térmico de produtos a base de milho pode ser um importante mecanismo de formação de conjugados das fumonisinas. Além dos conjugados, acredita-se que as fumonisinas podem ser ligadas a macromoléculas por ligações covalentes ou de interações não covalentes como complexação induzidas pela energia térmica utilizada durante o processamento dos alimentos, como na produção de flocos de milho (GALAVERNA et al., 2009; SHIER et al., 1997; HOWARD et al., 1998; POLING et al., 2002).

O milho é um dos principais cereais cultivados no Brasil, estando presente em proporção significativa na dieta da população pelo seu consumo direto ou de produtos processados, como fubá, farinha de milho, bolos, pães, biscoitos e mingaus. Grande ocorrência de fumonisinas em milho e produtos à base de milho tem sido verificada no Brasil (CALDAS, SILVA, 2007; WESTHUIZEN et al., 2003). No entanto, a contaminação pode estar sendo subestimada, já que estas micotoxinas também podem estar presentes em concentrações significativas sob a forma de fumonisinas mascaradas. Recentemente, em estudo realizado por Oliveira et al. (2015), as fumonisinas

mascaradas foram encontradas em quantidades significativas em amostras de milho não processado no Brasil.

Neste contexto, torna-se importante que métodos analíticos adequados sejam desenvolvidos e aplicados para avaliar a contaminação de fumonisinas livres e fumonisinas mascaradas em alimentação infantil a base de milho consumida no Brasil.

## **2.2 REGULAMENTAÇÃO PARA MICOTOXINAS EM ALIMENTOS**

Regulamentações para controle de micotoxinas em alimentos em diferentes países têm sido estabelecidas desde o início da década de 1970, onde alguns poucos países regulamentaram o controle das aflatoxinas em alimentos. Devido aos problemas econômicos e ao impacto à saúde, o número de países que possuem regulamentação para controle de micotoxinas em alimentos tem aumentado significativamente nos últimos anos. Atualmente, mais de 100 países possuem legislação para micotoxinas em alimentos. Ainda, novas classes de micotoxinas e alimentos têm sido incluídos às regulamentações (FAO, 1997; FAO, 2004; EGMOND et al., 2007; ERKEKOGLU et al., 2008).

Vários fatores são considerados no estabelecimento dos LMT para micotoxinas em alimentos, sendo os principais a disponibilidade de dados toxicológicos e de ocorrência das micotoxinas em vários alimentos. Estes dados são utilizados como base para realização dos estudos de avaliação de risco, os quais são imprescindíveis no estabelecimento dos limites máximos permitidos. A disponibilidade de métodos analíticos de rotina adequados ao controle das micotoxinas em níveis de contaminação estabelecidos também deve ser avaliado. Além disso, fatores socioeconômicos também são considerados no estabelecimento dos LMT atendendo aos interesses comerciais e a adequada disponibilidade de alimentos para a população (MAGAN, OLSEN, 2004; FAO, 2011).

A Resolução 34/76, de 19 de janeiro de 1977, publicada pela Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos (CNNPA), do Ministério da Saúde, foi a primeira regulamentação para controle de micotoxinas em alimentos no Brasil, estabelecendo o LMT de 30 µg/kg para o somatório das aflatoxinas B1 e G1 em alimentos para o consumo humano (BRASIL, 1977).

Publicada pelo Ministério da Agricultura, através da Secretaria de Fiscalização Agropecuária, a Portaria nº 7, de 9 de novembro de 1988 foi a primeira regulamentação para o controle dos níveis de contaminação das matérias primas empregadas na alimentação animal, estabelecendo o LMT de 50 µg/kg para o somatório das aflatoxinas nestes alimentos (BRASIL, 1988).

Posteriormente, o Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária, publicou a Portaria nº 183 de 21 de março de 1996, para controle de micotoxinas em alimentos destinados ao consumo humano adotando os limites estabelecidos no regulamento técnico do Mercado Comum do Cone Sul (Mercosul), sob a forma da Resolução nº 56/94, de 12 de janeiro de 1995, de 20 µg/kg para o somatório das aflatoxinas B1, B2, G1, G2 em amendoim e milho, de 0,5 µg/L para aflatoxina M1 em leite fluído e de 5 µg/kg para aflatoxina M1 em leite em pó (MERCOSUL, 1995; BRASIL, 1996).

Em 15 de outubro de 2002, o Ministério da Saúde, através da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, publicou a Resolução RDC nº 274, internalizando a Resolução GMC nº 25/02 do Mercosul e adotando assim os limites de 20 µg/kg para o somatório das aflatoxinas B1, B2, G1, G2 em amendoim e milho, e de 0,5 µg/L e 5,0 µg/kg para a aflatoxina M1 em leite fluído e em pó, respectivamente. Com a publicação desta Resolução, foi revogada a Resolução nº 34/76 (BRASIL, 2002; MERCOSUL, 2002).

Recentemente, o Ministério da Saúde, através da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), publicou a Resolução RDC nº 07, de 18 de fevereiro de 2011 (BRASIL, 2011), representando um grande avanço em relação ao número de micotoxinas e de alimentos contemplados. Esta Resolução, vigente no Brasil, possui alguns prazos para adequação que foram prorrogados através da Resolução RDC nº 59, de 26 de dezembro de 2013.

Na regulamentação vigente foram incluídos pela primeira vez limites para o controle de micotoxinas em alimentos próprios para a alimentação infantil (lactentes e crianças de primeira infância), como os alimentos a base de cereais para alimentação infantil e as fórmulas infantis. De acordo com a Resolução RDC nº 222, de 5 de agosto de 2002, alimento à base de cereais para lactentes e crianças de primeira infância refere-se a *“qualquer alimento à base de cereais próprio para a alimentação de*

*lactentes após os seis meses de idade e de crianças de primeira infância...”; fórmula infantil para lactente “é o produto em forma líquida ou em pó, destinado à alimentação de lactentes, até o sexto mês, sob prescrição, em substituição total ou parcial do leite materno ou humano...” e fórmula infantil de seguimento para lactentes “é o produto em forma líquida ou em pó utilizado, quando indicado, como substituto do leite materno ou humano a partir do sexto mês” (BRASIL, 2002). Os limites permitidos para a aflatoxina M1 em leite na regulamentação atual são os mesmos da RDC 274/2002, com uma modificação na unidade ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) utilizada para o limite adotado para leite fluído.*

Há grande disparidade entre as legislações internacionais para os limites máximos de aflatoxina M1 em leite, afetando principalmente a relação comercial entre diferentes países. Na União Européia (UE) um limite de  $0,05 \mu\text{g}/\text{kg}$  tem sido estabelecido para leite fluído e leite em pó reconstituído, sendo dez vezes menor que o limite vigente no Brasil (CE, 2006).

A aflatoxina M1 tem sido a principal micotoxina regulamentada em fórmulas infantis no mundo, incluindo a UE que estabelece um limite de  $0,025 \mu\text{g}/\text{kg}$  para a aflatoxina M1 em fórmulas infantis, considerando o produto reconstituído (pronto para o consumo). Na legislação vigente no Brasil, apenas o somatório das aflatoxinas B1, B2, G1 e G2 foi regulamentado em fórmulas infantis, sendo o LMT de  $1 \mu\text{g}/\text{kg}$ , não incluindo portanto limites para o controle da aflatoxina M1 nesses alimentos.

Diversos países possuem legislações específicas para micotoxinas em alimentos destinados a alimentação infantil. Há grande disparidade entre as micotoxinas contempladas bem como entre os limites máximos aceitos. As principais micotoxinas contempladas por alguns países, incluindo o Brasil e a UE, são apresentadas na Tabela 1.

**Tabela 1:** Limites máximos tolerados para as micotoxinas em fórmulas infantis e/ou alimentos processados destinados a alimentação infantil ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ).

<b>Micotoxinas</b>	<b>DON</b>	<b>AFM1<sup>4</sup></b>	<b>AFB1</b>	<b>(AFB1+AFB2+ AFG1+AFG2)</b>	<b>FB1+FB2</b>	<b>OTA</b>	<b>ZEA</b>
UE <sup>1</sup>	200	0,025	0,1	-	200	0,5	20
Brasil <sup>2</sup>	200	-	-	1	200	2	20
Turquia <sup>3</sup>	-	0,05	1	2	-	-	-
Áustria <sup>3</sup>	-	0,01	-	-	-	-	-
Canadá <sup>3</sup>	600	-	-	-	-	-	-
R. Tcheca <sup>3</sup>	-	0,05	0,5	1 a 2	-	1	-
Alemanha <sup>3</sup>	-	0,01	-	0,05	-	-	-
Iran <sup>3</sup>	-	0,02	0,5 a 1	-	-	1	-
Itália <sup>3</sup>	-	0,01	-	-	-	0,5	20
Honduras <sup>3</sup>	-	0,02	-	0,01	-	-	-
Marrocos <sup>3</sup>	-	0,03	-	-	-	-	-
Kuwait <sup>3</sup>	-	-	-	0,05	-	-	-
Suíça <sup>3</sup>	-	0,02	-	0,01	-	0,5	-
Ucrânia <sup>3</sup>	200	0,5	1	-	-	-	40

Fontes: <sup>1</sup>CE, 2006; <sup>2</sup>ANVISA, 2011; <sup>3</sup>FAO, 2004. <sup>4</sup>limie máximo tolerável em fórmulas infantis considerando o alimento pronto para consumo, à exceção da Ucrânia. DON: desoxinivalenol; AFM1: aflatoxina M1; AFG2: aflatoxina G2; AFG1: aflatoxina G1; AFB2: aflatoxina B2; AFB1: aflatoxina B1; FB1: fumonisina B1; FB2: fumonisina B2; OTA: ocratoxina A; ZEA: zearalenona.

## 2.3 OCORRÊNCIA DE MICOTOXINAS EM ALGUNS ALIMENTOS

### 2.3.1 Leite

O leite e seus derivados são alimentos com elevado consumo em diversos países do mundo, principalmente por crianças, podendo representar uma fonte importante de exposição às micotoxinas. A contaminação do leite por micotoxinas ocorre principalmente pelo consumo de ração contaminada por micotoxinas (FINK-GREMMELS, 2008; PERAICA et al., 1999).

A aflatoxina M1 tem sido a micotoxina mais encontrada em leite em todo o mundo, tendo seus níveis de contaminação regulamentados em diversos países. Além da alta ocorrência, alguns estudos têm relatado níveis de contaminação acima dos LMT pelas regulamentações para aflatoxina M1 em leite, demonstrando alto risco de exposição de adultos e, principalmente, de crianças a este contaminante (PRANDINI et al., 2009; GONÇALEZ et al., 2005; KOS et al., 2014).

Em estudo realizado na Coréia do Sul, a aflatoxina M1 foi encontrada em 76% das amostras de leite pasteurizado e em 75% das amostras de leite em pó, sendo que em 37% das amostras analisadas o LMT adotado na UE para aflatoxina M1 foi excedido (KIM et al., 2000).

No Irã, diversos estudos têm sido realizados demonstrando alta ocorrência e níveis de concentração de aflatoxina M1 nas amostras de leite analisadas. Rezaei et al. (2014) avaliaram a contaminação de amostras de leite da província de Qom, e a aflatoxina M1 foi encontrada em todas as amostras analisadas (100%) em níveis de contaminação acima do adotado na UE. Nematí et al. (2010) investigou a presença de aflatoxina M1 em 90 amostras de leite do comércio da cidade de Ardabil, e todas as amostras analisadas (100%) apresentaram contaminação por aflatoxina M1, sendo que em 30 (33%) das amostras analisadas excederam o LMT na UE. Em estudos similares realizados em diferentes regiões do Irã, a contaminação por aflatoxina M1 excedeu o LMT adotado na UE em 62% e 78% das amostras analisadas respectivamente reportados por Ghazani (2009) e Oveisi et al. (2007).

Na Turquia, Tekinsen & Eken (2008) investigaram a contaminação por aflatoxina



M1 em 100 amostras de leite tratado com alta temperatura (*ultra high temperature*, UHT) e leite cru. A aflatoxina M1 foi encontrada em 67 (67%) das amostras analisadas em níveis de concentração entre 0,01 e 0,63 µg/kg, sendo que 31% das amostras analisadas excederam o LMT vigente na UE. Em outro estudo realizado na Turquia, a aflatoxina M1 foi encontrada em 53 (30,1%) das 176 amostras analisadas em níveis de concentração entre 0,025 e 1,0 µg/kg, sendo que 30 (17%) das amostras analisadas excederam o LMT da UE (GOLGE, 2014).

Na avaliação da contaminação de 21 amostras de leite em pó produzidos na Argentina, a aflatoxina M1 foi encontrada em todas as amostras analisadas, em níveis de concentração entre 0,1 e 0,92 µg/kg, com concentração média de 0,41 µg/kg (LONDOÑO et al., 2013).

Em estudo realizado com 40 amostras de leite pasteurizado e UHT comercializadas em Portugal, a aflatoxina M1 foi encontrada em 11 (27,5%) das amostras analisadas, com concentração média de 0,023 µg/L. O LMT adotado na UE foi excedido em 2 (5%) das amostras analisadas (DUARTE et al., 2013).

Kos et al. (2014) avaliou a ocorrência de aflatoxina M1 em 150 amostras de diferentes tipos de leite provenientes da Sérvia. A aflatoxina M1 foi encontrada em 98,7% das amostras analisadas em níveis de concentração entre 0,01 e 1,2 µg/kg. Em 129 (86,0%) das amostras analisadas os níveis de concentração encontrados excederam o LMT estabelecido na UE.

Na Croácia, Bilandzic et al. (2014) investigaram a contaminação de aflatoxina M1 em 4422 amostras de leite UHT e cru. A aflatoxina M1 foi encontrada em níveis de concentração de 0,003 a 1,1 µg/L para leite cru e de 0,004 a 0,183 µg/L para leite UHT, sendo que, respectivamente, 27,8% e 9,6% das amostras analisadas excederam o LMT da UE.

Apesar da inexistência de legislação específica, outras micotoxinas também têm sido encontradas em leite, como a aflatoxina M2 (LEE, LEE, 2014; CHEN et al., 2012), as aflatoxinas B1 e/ou B2 (CHEN et al., 2012; ZHANG et al., 2013), as fumonisinas (MARAGOS et al., 1994; GAZZOTTI et al., 2009) e a ocratoxina A (PATTONO et al., 2011; CHEN et al., 2012).

No Brasil, a aflatoxina M1 tem sido encontrada com alta ocorrência em leite

fluido. No entanto, relativamente poucos estudos foram reportados avaliando a contaminação de leite em pó.

A contaminação por aflatoxina M1 foi investigada em 300 amostras de leite em pó integral provenientes de escolas e creches do município de São Paulo, SP e 33 (11%) das amostras analisadas estavam contaminadas em níveis de 0,10 a 1 µg/L, com concentração média de 0,27 µg/L (OLIVEIRA et al., 1997).

Prado et al. (1999) analisaram 61 amostras de diferentes tipos de leite, incluindo leite em pó, provenientes de Belo Horizonte, MG e verificaram a presença de aflatoxina M1 em 50 (82%) das amostras analisadas, em níveis de concentração entre 0,006 e 0,077 µg/L. Todas as amostras analisadas foram consideradas adequadas ao consumo de acordo com a legislação vigente no Brasil.

Em estudo realizado por Pereira et al. (2005) na região de Lavras, MG a aflatoxina M1 foi encontrada em 19 (52,8%) das 36 amostras de leite cru e em 13 (38,2%) das 34 amostras de leite pasteurizado analisadas, em níveis de concentração abaixo do LMT no Brasil.

Gonçalez et al. (2005) analisaram 43 amostras de leite adquiridas no comércio de 27 municípios do Estado de São Paulo e a aflatoxina M1 foi detectada em 17 (39,5%) das amostras analisadas, sendo que 11 (25,6%) das amostras analisadas apresentaram concentrações acima do LMT de acordo com a legislação brasileira.

Rosmaninho et al. (2006) investigaram a presença de aflatoxina M1 em 40 amostras de leite pasteurizados dos tipos A, B, C e UHT, disponíveis no comércio do município de São Paulo, SP. Em 23 (57,5%) das amostras analisadas a aflatoxina M1 foi encontrada, em níveis de concentração entre 0,01 e 0,12 µg/L.

Oliveira et al. (2006) investigaram a presença de aflatoxina M1 em 48 amostras de leite pasteurizado e UHT provenientes do comércio do município de São Paulo, SP e 37 (77,1%) das amostras analisadas apresentaram contaminação em níveis de concentração entre 0,011 e 0,251 µg/L de leite. Os níveis encontrados não excederam o LMT vigente no Brasil (BRASIL, 2002). No entanto, em 43,2% das amostras contaminadas os níveis de contaminação foram acima do LMT adotado na UE.

Em estudo realizado com amostras de leite UHT, cru e pasteurizado provenientes das cidades de São Paulo e Marília, SP, 107 amostras foram investigadas quanto à

presença de aflatoxina M1. A aflatoxina M1 foi detectada em 79 (73,8%) das amostras analisadas, em níveis de concentração entre 0,02 e 0,26  $\mu\text{g/L}$ , portanto, em níveis de concentração abaixo do LMT adotado no Brasil; em 7 (6,5%) das amostras os níveis de concentração excederam o LMT estabelecido na UE (SHUNDO, SABINO, 2006).

A presença de aflatoxina M1 foi investigada em 125 amostras de leite em pó, leite pasteurizado e leite UHT da cidade de São Paulo. A aflatoxina M1 foi encontrada em 119 (95,2%) das amostras analisadas, em níveis de concentração entre 0,01 e 0,2  $\mu\text{g/kg}$  e concentração média de 0,031  $\mu\text{g/kg}$ ; na determinação das concentrações das amostras de leite em pó foi considerado o produto reconstituído pronto para o consumo (SHUNDO et al., 2009).

Na avaliação da contaminação de 9 amostras de leite em pó produzido no Brasil, a aflatoxina M1 foi encontrada em todas as amostras (100%), em níveis de concentração entre 0,03 e 0,81  $\mu\text{g/kg}$ , com concentração média de 0,35  $\mu\text{g/kg}$  (LONDOÑO et al., 2013).

Em estudo realizado com 40 amostras de leite de diferentes tipos provenientes da região sudeste do Brasil, a aflatoxina M1 foi encontrada em 21 (52,5%) das amostras analisadas, sendo que todas as amostras apresentaram contaminação acima do LMT no Brasil (SCAGLIONI et al., 2014).

A presença de aflatoxina B1 (SCAGLIONI et al., 2014) e a ausência de aflatoxina M2 (GARRIDO et al., 2003; IHA et al., 2007) em leite no Brasil também foram relatadas anteriormente. No entanto, estudos investigando a presença de ocratoxina A em leite no Brasil não foram encontrados na literatura, exceto para leite humano (NAVAS et al., 2005; ANDRADE et al., 2013; IHA et al., 2014).

### **2.3.2 Fórmulas infantis**

A aflatoxina M1 e a ocratoxina A também têm sido as principais micotoxinas encontradas como contaminantes em fórmulas infantis, principalmente à base de leite. A aflatoxina B1 também têm sido encontrada nesses alimentos.

Em estudo realizado com 26 amostras de fórmulas infantis provenientes do comércio da cidade de Seul, Coréia, a aflatoxina M1 foi encontrada em 18 (69%) das amostras analisadas, em faixa de concentração de 0,032 a 0,132  $\mu\text{g/kg}$ . A concentração

média encontrada foi de 0,062 µg/kg (KIM et al., 2000).

Oveisi et al. (2007) analisou 120 amostras de fórmulas infantis provenientes do Irã e a aflatoxina M1 foi encontrada em 116 (96,6%) das amostras analisadas em níveis de concentração entre 0,001 e 0,014 µg/kg, com concentração média de 0,0073 µg/kg.

Em estudo realizado em Ankara, Turquia, 29 amostras de fórmulas infantis a base de leite e 9 amostras de fórmulas infantis a base de leite com cereais foram analisadas quanto à presença das aflatoxinas B1 e M1 e ocratoxina A. Quanto às amostras de fórmulas infantis a base de leite, as micotoxinas pesquisadas foram, respectivamente, detectadas em 27 (93%), 13 (45%) e 7 (24%) das amostras analisadas, em concentrações médias de 0,73, 0,06 e 0,50 µg/kg. Em relação as amostras de fórmulas infantis a base de leite com cereais, as micotoxinas foram encontradas em 6 (67%), 4 (44%) e 4 (44%) das amostras analisadas, em concentrações médias de 1,93, 0,18 e 2,38 µg/kg, respectivamente (BAYDAR et al., 2007).

A contaminação pelas aflatoxinas M1 e B1 e pela ocratoxina A foi investigada em 7 amostras de fórmulas infantis adquiridas no comércio da cidade de Lisboa, Portugal. Alta incidência foi verificada para a aflatoxina M1 (85,7%) e ocratoxina A (42,9%) nas amostras analisadas, com níveis de concentração entre 0,005 e 0,041 µg/kg e entre 0,011 e 0,136 µg/kg, respectivamente. A aflatoxina B1 foi detectada em uma (14,3%) das amostras (0,003 µg/kg) (ALVITO et al., 2010).

Em estudo realizado com 185 amostras de fórmulas infantis produzidas na Itália, a presença de aflatoxina M1 e ocratoxina A foi investigada e estas micotoxinas foram detectadas em duas (1,1%) e 133 (72%) das amostras analisadas, respectivamente. A ocratoxina A foi encontrada na faixa de concentração de 0,035 a 0,689 µg/kg (MEUCCI et al., 2010).

A incidência de aflatoxina M1 foi investigada 69 amostras de fórmulas infantis comercializadas na Espanha. Em 26 (37,7%) das amostras analisadas a aflatoxina M1 foi encontrada em concentrações entre 0,0006 e 0,0116 µg/kg, com concentração média de 0,0031 µg/kg (GÓMEZ-ARRANZ, NAVARRO-BLASCO, 2010).

Zhang et al. (2013) investigou a presença de micotoxinas, incluindo as aflatoxinas M1, B1, B2, G1 e G2 e ocratoxina A, em 18 amostras de fórmulas infantis e a aflatoxina M1 foi detectada em 3 (16,7%) das amostras analisadas.

Um nível de contaminação de 0,33 µg/kg foi encontrado para a aflatoxina M1 em uma amostra de fórmula infantil produzida e comercializada na Argentina (LONDOÑO et al., 2013).

No Brasil, apenas um estudo com limitado número de amostras (n= 7), provenientes de Ribeirão Preto, SP, foi encontrado na literatura avaliando a contaminação de fórmulas infantis por aflatoxina M1 (IHA et al., 2013). No referido estudo, a aflatoxina M1 não foi encontrada nas amostras analisadas.

### **2.3.3 Alimentação infantil a base de cereais**

A presença de micotoxinas em alimentos destinados à alimentação infantil, principalmente em alimentos a base de cereais, tem sido relatada em vários estudos realizados em diferentes países. As aflatoxinas, fumonisinas, ocratoxina A, desoxinivalenol e zearalenona têm sido encontradas com maior ocorrência nesses alimentos, demonstrando a estabilidade destas micotoxinas aos diversos processamentos utilizados na produção destes alimentos.

A contaminação por micotoxinas foi demonstrada em estudo realizado no Canadá com 363 amostras de alimentos infantis a base de cereais, incluindo alimentação infantil a base de aveia, cevada, soja, arroz e mistura de cereais (LOMBAERT et al., 2003). As micotoxinas desoxinivalenol, zearalenona, fumonisinas e ocratoxina A foram encontradas, respectivamente, em 63%, 33%, 30%, 26% das amostras analisadas.

A presença de ocratoxina A foi pesquisada em 20 amostras de alimentos infantis a base de cereais na Espanha e em 14 (70%) das amostras analisadas a micotoxina pesquisada foi encontrada com concentração média de 0,187 µg/kg; em duas amostras de alimentos infantis a base de multi-cereais os níveis de concentração encontrados (0,706 e 0,740 µg/kg) foram maiores que o LMT na UE (0,5 µg/kg) (ARAGUÁS et al., 2005).

Em outro estudo realizado no Canadá, 177 amostras de alimentação infantil a base de cereais foram analisadas quanto à contaminação por aflatoxinas. As aflatoxinas B1 e B2 foram encontradas em níveis de concentração entre 0,002 e 0,966 µg/kg e de 0,002 a 0,108 µg/kg, respectivamente; a aflatoxina B1 foi detectada em 50% das

amostras analisadas, sendo que em 1% das amostras analisadas, o LMT na UE foi excedido (TAM et al., 2006).

Em estudo realizado em Ankara, Turquia, 25 amostras de alimentos infantis a base de cereais foram analisados quanto à presença das aflatoxinas B1 e M1 e ocratoxina A. As micotoxinas pesquisadas foram encontradas, respectivamente, em 22 (88%), 6 (24%) e 14 (56%) das amostras analisadas e com concentrações médias de 0,80, 0,06 e 1,82 µg/kg (BAYDAR et al., 2007).

Outro estudo realizado com 27 amostras de alimentação infantil à base de milho adquiridas no comércio da cidade de Valência, Espanha foi conduzido para investigar a contaminação por fumonisinas. As fumonisinas foram encontradas em apenas uma (3,7%) das amostras analisadas, em níveis de concentração de 15,9, 9,2 e 5,8 µg/kg para as fumonisinas B1, B2 e B3, respectivamente (D'ARCO et al., 2008).

Gottschalk et al. (2009) analisou 13 amostras de alimentação infantil a base de aveia e 5 amostras de alimentação infantil a base de trigo provenientes da região da Bavária, Alemanha e o desoxinivalenol foi encontrado em 54% e 100% das amostras analisadas, respectivamente.

A presença de ocratoxina A foi investigada em 24 amostras de alimentos infantis a base de cereais provenientes do comércio de Adana, Turquia; 4 (17%) das amostras analisadas estavam contaminadas com a micotoxina pesquisada na faixa de concentração de 0,12 a 0,37 ng/mL (KABAK, 2009).

Em estudo realizado com 44 amostras de alimentos infantis a base de cereais da Itália, o desoxinivalenol e a zearalenona foram encontrados respectivamente em 16 (36%) e uma (2%) das amostras analisadas (ROMAGNOLI et al., 2010).

A contaminação pelas aflatoxinas M1 e B1 e pela ocratoxina A foi investigada em 20 amostras de alimentos infantis a base de cereais adquiridas no comércio da cidade de Lisboa, Portugal. As micotoxinas investigadas foram encontradas, respectivamente, em 4 (20%), 5 (25%) e 13 (65%) das amostras analisadas. Os níveis de concentração encontrados foram de 0,008 a 0,023 µg/kg para a aflatoxina M1, de 0,002 a 0,009 µg/kg para a aflatoxina B1 e de 0,01 a 0,212 µg/kg para a ocratoxina A (ALVITO et al., 2010).

Em estudo realizado com 34 amostras de alimentação infantil a base de cereais provenientes do mercado da República Tcheca, a zearalenona foi encontrada em 14%

das amostras analisadas com concentração média de 40 µg/kg; o desoxinivalenol foi encontrado em 14,7% das amostras analisadas em concentração de 19 a 134 µg/kg; a ocratoxina A foi encontrada em uma (2,9%) das amostras analisadas (0,43 µg/kg) (KOSTELANSKÁ et al., 2010).

Beltran et al. (2011) detectou a presença de ocratoxina A em duas amostras de alimentos infantis a base de cereais provenientes do comércio de Castellon, Espanha em níveis de contaminação de 0,05 µg/kg.

A contaminação por desoxinivalenol em 30 amostras de alimentos infantis a base de cereais provenientes da Espanha foi investigada por Cano-Sancho et al. (2011) e esta micotoxina foi encontrada em 12 (40%) das amostras analisadas, com concentração máxima de 286 µg/kg e concentração média de 131 µg/kg.

Ozden et al. (2012) investigou a presença de ocratoxina A em 21 amostras de alimentos infantis a base de cereais adquiridos no comércio de Istanbul, Turquia; a ocratoxina A foi encontrada em 4 (19,0%) das amostras analisadas na faixa de concentração de 0,08 a 0,2 µg/kg e concentração média de 0,14 µg/kg.

Mahnine et al. (2012) analisou 20 amostras de alimentos infantis a base de cereais provenientes do Marrocos quanto a contaminação por fumonisinas e estas foram encontradas em duas (10%) das amostras analisadas em relativamente baixos níveis de contaminação; uma das amostras (produto à base de arroz) estava contaminada com 2 e 1,2 µg/kg das fumonisinas B1 e B2, respectivamente; a outra amostra (produto a base de trigo) estava contaminada somente com a fumonisina B2 em nível de contaminação de 2,3 µg/kg. No entanto, não foram analisadas amostras de alimentação infantil a base de milho, reconhecidamente o principal cereal com risco de contaminação por fumonisinas.

Rubert et al. (2012b) analisou 35 amostras de alimentação infantil, incluindo alimentação infantil a base de cereais, provenientes da cidade de Valência, Espanha. O desoxinivalenol foi encontrado em 9 amostras analisadas, em níveis de concentração de 70 a 210 µg/kg; ocratoxina A e zearalenona foram encontradas em duas amostras, com níveis de concentração de 0,35 e 0,5 µg/kg e de 10 e 15 µg/kg, respectivamente; a fumonisina B1 foi encontrada em 3 amostras, com faixa de concentração de 75 a 100 µg/kg; a fumonisina B2 e a aflatoxina G2 foram encontradas em uma amostra, com

níveis de concentração de 75 a 1,2 µg/kg, respectivamente; aflatoxina M1 foi detectada em uma amostra; esterigmatocistina foi encontrada em duas amostras (10 e 50 µg/kg), demonstrando que essa micotoxina também pode ser encontrada em alimentação infantil a base de cereais.

Um total de 17 amostras de alimentação infantil a base de cereais adquiridas no comércio da cidade de Washington, DC foram analisadas quanto à presença de micotoxinas. O desoxinivalenol foi encontrado em 4 (23,5%) das amostras analisadas, em concentrações de 46 a 877 µg/kg. A aflatoxina B1, ocratoxina A e zearalenona também foram detectadas nessas amostras (ZHANG et al., 2014).

Em estudo realizado por Juan et al. (2014), entre outros alimentos, 25 amostras de alimentos infantis a base de cereais provenientes da região de Campania, Itália foram analisadas para investigar a contaminação por 23 micotoxinas. Entre outras micotoxinas, o desoxinivalenol foi encontrado em 19 (76,0%) das amostras analisadas, com concentração média de 102,6 µg/kg; em duas amostras os níveis de concentração encontrados foram acima do LMT na UE (200 µg/kg). A ocratoxina A foi encontrada em 60% das amostras analisadas em níveis de concentração de 0,05 a 0,12 µg/kg.

No Brasil, estudos têm reportado a ocorrência de micotoxinas em vários cereais, incluindo os principais tipos de cereais utilizados no preparo de produtos destinados a alimentação infantil.

Em estudo realizado com 83 amostras de milho coletadas no Estado de Minas Gerais, 15 amostras apresentaram contaminação por aflatoxinas (SABINO et al., 1986).

Estudo realizado com 328 amostras de milho provenientes de diferentes estados do Brasil, a zearalenona foi encontrada em 4,5% das amostras em concentração entre 653 e 9830 µg/kg (SABINO et al., 1989).

Em estudo realizado com 36 amostras de milho provenientes do Rio Grande do Sul, as aflatoxinas foram encontradas em 30,5% das amostras analisadas em níveis de concentração entre 10 e 906 µg/kg (HENNIGEN, DICK, 1995).

Em estudo realizado com 48 amostras de milho dos Estados do Paraná, Mato Grosso do Sul e de Goiás, as fumonisinas B1 e B2 foram detectadas em 97,4% e 94,8% das amostras analisadas, respectivamente (HIROOKA et al., 1996).

Em estudo realizado por Prado et al. (1997) com 115 amostras de milho, o



desoxinivalenol foi detectado em 7 (6,1%) das amostras analisadas em níveis de concentração entre 102 e 542 µg/kg.

Estudo realizado com cereais comercializados nas cidades de Pelotas e Rio Grande, RS a ocratoxina A foi encontrada em duas (4,3%) amostras de arroz (48 e 19 µg/kg) e em duas (2,5%) amostras de trigo (18 e 26 µg/kg). A zearalenona foi encontrada em uma (2,6%) das amostras de milho (163 µg/kg) e em duas (2,5%) das amostras de farinha de trigo (105 e 97 µg/kg). Somente uma amostra analisada (aveia em flocos) estava contaminada com zearalenona em concentração acima do LQ (8,5 µg/kg), dentre as 34 amostras de produtos de cereais analisadas (FURLONG et al., 1999).

Em estudo realizado com 150 amostras de milho recém-colhido proveniente de diferentes regiões do Estado do Paraná, a fumonisina B1 foi encontrada em 100% das amostras (média de 2390 µg/kg) e fumonisina B2 em 97,7% das amostras (média de 1090 µg/kg) (ONO et al., 1999).

Em estudo realizado com 214 amostras de milho adquiridas no comércio de diferentes regiões brasileiras, 88 (38,3%) das amostras analisadas apresentaram contaminação por aflatoxinas; níveis médios de 9,4 µg/kg e faixa de concentração entre 0,4 a 139 µg/kg foram encontradas para o somatório das aflatoxinas. A zearalenona foi encontrada em 30,4% das amostras analisadas; com uma faixa de concentração entre 36,8 e 719 µg/kg (VARGAS et al., 2001).

Estudo realizado com 110 amostras de milho recém-colhido provenientes de diferentes regiões do Estado de São Paulo, as aflatoxinas foram encontradas em 60 (54,5%) das amostras analisadas e a zearalenona em uma (0,9%) das amostras analisadas (4640 µg/kg) (MACHINSKI et al., 2001).

A incidência de desoxinivalenol foi avaliada em 90 amostras de milho e 5 amostras estavam contaminadas com esta micotoxina em níveis de contaminação entre 30 e 770 µg/kg (OLIVEIRA et al., 2001).

Em estudo realizado com 315 amostras de diferentes cereais provenientes da região sul do Brasil, a fumonisina B1 foi encontrada em 103 amostras (32,7%). Considerando cada cereal analisado, a fumonisina B1 foi encontrada em 35%, 80%, 8%, 25% e 14% das amostras de milho, arroz, trigo, aveia e cevada, respectivamente

(MALLMANN et al., 2001).

As aflatoxinas foram encontradas em amostras de milho em grão e milho pipoca provenientes do comércio do Distrito Federal, correspondendo a 60% e 13,6% das amostras analisadas, respectivamente (CALDAS et al., 2002).

O desoxinivalenol foi encontrado em 32 (68%) das amostras de trigo (farinha e farelo) e produtos de panificação analisadas provenientes de Belo Horizonte, em níveis de contaminação entre 40 e 1205 µg/Kg. A zearalenona também foi detectada em baixos níveis de concentração em amostras de flocos de cereais, fubá, farinha de aveia e farinha láctea (OLIVEIRA et al., 2002).

Westhuizen et al. (2003) analisaram 76 amostras de milho destinadas ao consumo humano provenientes de diferentes regiões do Estado de Santa Catarina quanto à contaminação pelas fumonisinas B1, B2 e B3. As fumonisinas B1 e B2 foram detectadas em todas as amostras analisadas (100%); a concentração média encontrada para o somatório das fumonisinas (B1+B2+B3) foi de 2870 µg/kg.

Estudo realizado com 56 amostras de arroz também comercializado nas cidades de Pelotas e Rio Grande, RS duas amostras apresentaram contaminação por ocratoxina A (104 e 128 µg/kg). Apenas uma (1,8%) das amostras analisadas estava contaminada com desoxinivalenol, sendo encontrado um nível de concentração de 300 µg/kg (NUNES et al., 2003).

Para alimentos à base de milho (121 amostras) coletadas no comércio da cidade de Maringá, PR, três amostras (2,5%) apresentaram contaminação por aflatoxina B1, com nível de concentração entre 8 e 59 µg/kg; aflatoxina B2 foi encontrada em duas amostras (1,7%) em uma concentração de 2,4 µg/kg; ocratoxina A foi encontrada em uma amostra analisada (0,8%) com um nível de concentração de 64 µg/kg; zearalenona foi encontrada em uma amostra analisada (0,8%) com um nível de concentração de 448 µg/kg (SEKIYAMA et al., 2005).

Em um estudo realizado com 74 amostras de produtos a base de milho adquiridas no comércio da cidade de Recife, PE, a aflatoxina B1 foi encontrada em 5 amostras e o nível máximo de concentração encontrado foi 20 µg/kg. Duas amostras excederam o LMT de 20 µg/kg para o somatório das aflatoxinas B1, B2, G1 e G2 (farinha de milho pré-cozida com 21,5 µg/kg e quirera com 23,3 µg/kg). A fumonisina B1

foi encontrada em 94,6% das amostras em concentrações variando de 20 a 8600 µg/kg (KAWASHIMA, SOARES, 2006).

Calori-Domingues et al. (2007) realizaram um estudo da contaminação de desoxinivalenol em 50 amostras de trigo provenientes dos Estados de São Paulo, Paraná e Rio Grande do Sul e 50 amostras de trigo importado da Argentina e Paraguai. A micotoxina pesquisada foi detectada em 94% e 88% das amostras analisadas, com níveis médios de contaminação de 332 e 90 µg/kg, respectivamente, considerando as amostras nacionais e importadas. O maior nível de contaminação encontrado no estudo foi de 4573 µg/kg.

Em estudo realizado por Mallmann et al. (2008), 48,4% das amostras de trigo e farelo de trigo analisadas estavam contaminadas com desoxinivalenol; o nível máximo de contaminação encontrado foi de 8310 µg/kg em trigo e 3129 µg/kg em farelo de trigo; a média de contaminação dentre as amostras positivas foi de 289,5 µg/kg para trigo e 424 µg/kg para farelo de trigo. Das amostras de milho, cevada e malte analisadas, 48,4%, 28,8%, 74,4% e 45,9%, respectivamente, estavam contaminadas com desoxinivalenol; os níveis máximos de concentração encontrados foram de 620, 23740 e 4587,0 µg/kg para as amostras de milho, cevada e malte analisadas, respectivamente; a média de contaminação entre as amostras positivas foi de 170 µg/kg para milho, 930 µg/kg para cevada e 172 µg/kg para malte.

Estudo realizado com 40 amostras de milho provenientes de produtores do Estado de Minas Gerais, a zearalenona foi detectada em 38 amostras (95,0%) com níveis de concentração entre 1,8 e 99 µg/kg. As fumonisinas foram detectadas em todas as amostras analisadas (100%) com níveis de concentração entre 230 e 6450 µg/kg (QUEIROZ et al., 2012).

Em estudo realizado com amostras de arroz provenientes de diversas regiões do país, 30% das amostras analisadas apresentaram contaminação por zearalenona em uma faixa de concentração entre 3,6 e 4872 µg/kg. O desoxinivalenol foi detectado em 9% das amostras de arroz analisadas, com um nível máximo de concentração de 244 µg/kg. A ocratoxina A foi encontrada em 28% das amostras de arroz analisadas em níveis de concentração entre 0,20 e 0,24 µg/kg. As aflatoxinas foram encontradas em 58,7% das amostras analisadas de arroz, incluindo amostras de sub-produtos e

derivados, em níveis de concentração entre 0,11 e 207,0 µg/kg (ALMEIDA et al., 2012).

Em estudo realizado com 113 amostras de trigo do Estado do Paraná, o desoxinivalenol foi encontrado em 66,4% das amostras em níveis de contaminação entre 206,3 e 4732,3 µg/kg, com concentração média de 1894,9 µg/kg (SANTOS et al., 2013).

Sabendo-se que várias micotoxinas presentes nesses cereais são estáveis nos processamentos utilizados no preparo de produtos para alimentação infantil, a contaminação desses alimentos por micotoxinas deve ser avaliada (BULLERMAN, BIANCHINI, 2007).

No entanto, poucos estudos foram encontrados na literatura avaliando a qualidade da alimentação infantil a base de cereais quanto à contaminação por micotoxinas no Brasil (MACHINSKI, SOARES, 2000; CASTRO et al., 2004; CALDAS, SILVA, 2007)

## **2.4 TÉCNICAS ANALÍTICAS UTILIZADAS NA DETERMINAÇÃO DE MICOTOXINAS EM LEITE E ALIMENTAÇÃO INFANTIL**

O cumprimento das legislações vigentes para controle de micotoxinas requer a utilização de métodos analíticos confiáveis. Vários caminhos analíticos têm sido desenvolvidos para determinação de micotoxinas em alimentos (KRSKA et al., 2008; CIGIĆ, PROSEN, 2009; KÖPPEN et al., 2010; SAEGER, 2011; TURNER et al, 2009). Devido aos baixos níveis de concentração encontrados para a maioria das micotoxinas, principalmente em alimentação infantil, e a complexidade das matrizes analisadas o desenvolvimento de métodos analíticos para determinação de micotoxinas em alimentos tem sido considerado uma atividade desafiadora (KOKKONEN, 2011).

A maioria dos métodos analíticos reportados aplica-se a determinação de uma substância ou um grupo de substâncias quimicamente relacionadas utilizando principalmente as técnicas de cromatografia em camada delgada (CCD), a eletroforese capilar, a cromatografia líquida de alta eficiência com detector de fluorescência (CLAE-F), a cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas

(CLAE-EM), a cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas (CG-EM), ao detector por captura de elétrons (CG-DCE) ou ao detector por ionização em chama (CG-DIC) e técnicas imunoenzimáticas.

Na última década, as 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) têm sido amplamente utilizadas na determinação de micotoxinas em diferentes matrizes. Cabe ressaltar a crescente aplicabilidade de alguns detectores de espectrometria de massas de alta resolução (ArEM) associados à cromatografia líquida de alta ou ultra eficiência (ex.: *Time of flight-TOF* e *Orbitrap*) na determinação de micotoxinas em alimentos (KRSKA et al., 2008; FANG et al., 2013; JIA et al., 2014; ZACHARIASOVA et al., 2010; RUBERT et al., 2012a).

As técnicas de cromatografia líquida acopladas à espectrometria de massas sequencial apresentam ampla faixa linear e sensibilidade adequadas à determinação de micotoxinas em alimentos, inclusive de leite e alimentação infantil, os quais são alimentos com os menores limites máximos tolerados quanto a contaminação por micotoxinas. Além disso, estas técnicas são consideradas poderosas ferramentas qualitativas, sendo utilizadas simultaneamente na confirmação inequívoca de substâncias. A alta seletividade desses detectores possibilita a redução ou eliminação de etapas de limpeza das amostras após extração o que oferece a possibilidade de análise simultânea de diferentes classes de micotoxinas, com menor tempo de análise e custo reduzido (SORENSEN, ELBAEK, 2005; SULYOK et al., 2007; MOL et al., 2008; SOUZA, 2009; FRENICH et al., 2009; LACINA et al., 2012).

Diversas fontes de ionização à pressão atmosférica têm sido desenvolvidas para acoplamento da cromatografia líquida com a espectrometria de massas, sendo as fontes de ionização química (APCI, *Atmospheric Pressure Chemical Ionization*) e de ionização por *eletrospray* (ESI, *Electrospray Ionization*) as mais utilizadas. A ESI tem sido a técnica de escolha para análise de micotoxinas já que possibilita a ionização da maioria das micotoxinas conhecidas. No entanto, esta técnica pode apresentar pronunciado efeito matriz (aumento ou diminuição do sinal analítico) afetando a exatidão de diversos métodos analíticos tradicionalmente utilizados na quantificação de

micotoxinas em alimentos.

Diversos estudos têm demonstrado a aplicabilidade das técnicas de CLAE-EM/EM e CLUE-EM/EM na análise de micotoxinas em alimentos. Os primeiros estudos reportados utilizando estas técnicas baseiam-se na adaptação de métodos de tratamento de amostra exaustivos comumente utilizados para as técnicas analíticas menos seletivas, como a CLAE/F. No entanto, a alta seletividade dos detectores de EM/EM e ArEM e a facilidade de limpeza das interfaces, tem incentivado o desenvolvimento de métodos rápidos de tratamento de amostras, diminuindo ou eliminando etapas de limpeza dos extratos.

A técnicas de CLAE-EM/EM e CLUE-EM/EM também têm sido utilizadas para a determinação de fumonisinas mascaradas em alimentos. Como descrito anteriormente, as fumonisinas podem estar ligadas a macromoléculas ou conjugadas a outras substâncias. Quando tratadas com bases fortes (hidrólise alcalina) as fumonisinas livres, bem como as formas conjugadas, podem sofrer hidrólise obtendo como produtos as formas hidrolisadas. Assim, a quantificação das fumonisinas mascaradas tem sido realizada indiretamente pela quantificação das formas hidrolisadas, obtidas da hidrólise alcalina das fumonisinas mascaradas. Além disso, os padrões analíticos das fumonisinas hidrolisadas podem ser obtidos facilmente a partir das fumonisinas adquiridas comercialmente, possibilitando a calibração e consequente quantificação das formas hidrolisadas (DALL'ASTA et al., 2008).

## **2.5 MÉTODOS DE TRATAMENTO DE AMOSTRAS UTILIZADOS NA DETERMINAÇÃO DE MICOTOXINAS EM LEITE E ALIMENTAÇÃO INFANTIL**

Os métodos utilizados no tratamento das amostras de leite, fórmulas infantis e alimentos infantis a base de cereais para determinação de micotoxinas geralmente requerem etapas de extração e de limpeza dos extratos devido à complexidade dessas matrizes, as quais possuem elevados teores de proteína e de gordura. Vários métodos de tratamento de amostra têm sido reportados para determinação de micotoxinas nessas matrizes utilizando as técnicas de CLAE-EM/EM ou CLUE-EM/EM, como

descrito a seguir.

A maioria dos métodos desenvolvidos utilizam diferentes proporções de acetonitrila / água. A adição de ácido ao solvente de extração tem sido utilizada para privilegiar a extração de micotoxinas com características ácidas, como exemplo as fumonisinas. Os métodos desenvolvidos procurando uma condição ideal de extração de todas as micotoxinas de interesse possuem como objetivo a maior proporção de solvente orgânico em relação à água, diminuindo assim a extração de componentes polares presentes na matriz.

Chen et al. (2005) relataram um método para determinação de aflatoxina M1 em leite usando extração em fase sólida (EFS) com cartucho de C18 e limpeza dos extratos utilizando colunas de imunoafinidade ou colunas multifuncionais (Mycosep).

Sorensen & Albaek (2005) relataram um método para determinação de 18 micotoxinas em leite, incluindo aflatoxina M1 e ocratoxina A. Neste método, as micotoxinas foram extraídas usando extração líquido-líquido e os extratos purificados com cartuchos de EFS (OASIS HLB). Este caminho também foi usado por Huang et al. (2014) para determinação simultânea da aflatoxina M1, ocratoxina A, zearalenona and  $\alpha$ -zearalenol

Um método para a determinação simultânea de seis micotoxinas (toxina T-2, aflatoxinas M1, B1, B2, G1 e G2) e agrotóxicos em leite por EFS utilizando cartucho de C18 (AGUILERA-LUIZ et al., 2011). Este método também foi aplicado na análise de fórmulas infantis a base de leite.

A técnica de EFS com colunas de imunoafinidade também têm sido utilizada para o enriquecimento e limpeza na determinação de aflatoxina M1 em leite (CHEN et al., 2011) e na determinação simultânea de aflatoxinas M1, B1, B2, G1, G2, e ocratoxina A em leite e fórmulas infantis (BELTRAN et al., 2011).

Campone et al. (2013) desenvolveram um método através da aplicação sequencial das técnicas de extração líquido-líquido (ELL) e de microextração líquido-líquido dispersiva para determinação de aflatoxina M1 em leite e fórmulas infantis.

Mol et al. (2008) desenvolveram um método de extração genérico para a extração simultânea de vários compostos em matrizes alimentares e alimentos para animais, incluindo 20 micotoxinas em leite. Esse método mostrou recuperação

satisfatória para a ocratoxina A e para as aflatoxinas B1, B2, G1 e G2, além de outras micotoxinas. No entanto, a aflatoxina M1 não foi incluída neste estudo.

Wang et al. (2010) e Biancardi et al. (2013) relataram métodos simples para determinação de aflatoxina M1 em leite por métodos de ELL utilizando respectivamente acetonitrila e acetato de etila como solventes de extração.

Zhang et al. (2013) desenvolveram um método para a determinação das aflatoxinas M1, B1, B2, G1 e G2, desoxinivalenol, fumonisinas B1 e B2, ocratoxina A, toxina T-2 e zearalenona em vários alimentos, incluindo leite e fórmulas infantis, utilizando um filtro de centrífuga (exclusão por peso molecular) para a purificação dos extratos. Método similar de tratamento de amostra foi utilizado por Zhang et al. (2014) para determinação das aflatoxinas B1, B2, G1 e G2, desoxinivalenol, fumonisinas B1, B2 e B3, ocratoxina A, toxina T-2 e zearalenona em alimentação infantil a base de cereais.

Nos últimos anos, o método conhecido como *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe* (QuEChERS) de tratamento de amostras, desenvolvido para análise de agrotóxicos em frutas e legumes (ANASTASSIADES et al., 2003), também tem sido amplamente utilizado para outras aplicações, incluindo análise de micotoxinas em vários alimentos (DESMARCHELIER et al., 2010; VACLAVIK et al., 2010; ROMERO-GONZALEZ et al., 2011; TAMURA et al., 2011; DESMARCHELIER et al., 2014). Apesar das vantagens da utilização deste método, poucos estudos têm relatado a aplicação de QuEChERS para a determinação de micotoxinas em leite.

Em estudo relatado por AGUILERA-LUÍZ et al. (2011), a primeira etapa de dois métodos QuEChERS (citrato e acetato), foram avaliados pela primeira vez para a determinação simultânea de micotoxinas (aflatoxinas M1, G2, G1, B2 e B1, ocratoxina A e toxinas T-2 e HT-2) e pesticidas em leite; uma etapa de limpeza adicional com EFS (Oasis HLB e C18) foi utilizada. Os autores relataram que a aflatoxina M1 não foi devidamente extraída e concluíram que as metodologias QuEChERS avaliadas não foram satisfatórias para análise de micotoxinas em leite.

Jia et al. (2014) otimizaram um método QuEChERS para análise simultânea de 58 micotoxinas em produtos lácteos, incluindo leite; foi utilizada a etapa de EFS dispersiva (EFSd) para limpeza dos extratos. Cabe ressaltar que neste estudo a técnica



de CLUE-ArEM foi utilizada e que, devido à presença de efeito matriz, apenas uma avaliação semi-quantitativa das micotoxinas de interesse foi realizada.

Chen et al. (2012) desenvolveram um método para determinação simultânea das aflatoxinas M1, M2, B1, B2, G1 e G2 e ocratoxina A em produtos de origem animal, incluindo leite. As amostras foram extraídas empregando extração líquido-líquido pressurizada (ELLP) e a limpeza dos extratos foi realizada utilizando EFS com cartuchos HLB.

A técnica de dispersão da matriz em fase sólida (C18) foi aplicada por Rubert et al. (2012b) na determinação de 21 micotoxinas em alimentação infantil, incluindo cereais para alimentação infantil.

Kostelanská et al. (2010) relataram um método para determinação de 45 micotoxinas em alimentação infantil, incluindo cereais para alimentação infantil, através da extração dos analitos com a utilização de solventes orgânicos sob agitação, seguido da concentração dos extratos; não foram utilizados procedimentos para limpeza dos extratos.

Como descrito anteriormente vários procedimentos para tratamento de amostras têm sido empregados para determinar micotoxinas em leite, fórmulas infantis e alimentação infantil a base de cereais. No entanto, nenhum método rápido e simples, utilizando a técnica de CLUE-EM/EM ou CLAE-EM/EM, foi reportado para determinação simultânea das micotoxinas de interesse em leite, fórmulas infantis e alimentação infantil a base de cereais. Neste contexto, torna-se necessário o desenvolvimento de métodos analíticos adequados à análise de rotina de micotoxinas nesses alimentos.

## **3 OBJETIVOS**

### **3.1 OBJETIVO GERAL**

Desenvolver, validar e aplicar métodos analíticos para determinação de micotoxinas em leite, fórmulas infantis, alimentação infantil a base de cereais e amendoim por CLUE-EM/EM.

### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- a) Desenvolver e validar método analítico utilizando a técnica de CLUE-EM/EM para determinação das seguintes micotoxinas em leite: aflatoxinas B1, B2, G1, G2, M1, M2 e ocratoxina A;
- b) Desenvolver e validar método analítico utilizando a técnica de CLUE-EM/EM para determinação das seguintes micotoxinas em fórmulas infantis: aflatoxinas B1, B2, G1, G2, M1, M2 e ocratoxina A;
- c) Desenvolver e validar método analítico utilizando a técnica de CLUE-EM/EM para determinação das seguintes micotoxinas em alimentação infantil a base de cereais: desoxinivalenol, aflatoxinas B1, B2, G1, G2, M1, M2, ocratoxina A, fumonisinas B1 e B2, fumonisinas B1 e B2 hidrolisadas, zearalenona e esterigmatocistina;
- d) Desenvolver e validar método analítico para determinação de fumonisinas e fumonisinas mascaradas em alimentação infantil a base de milho por técnica de CLUE-EM/EM;
- e) Desenvolver e validar método analítico utilizando a técnica de CLUE-EM/EM para determinação das aflatoxinas B1, B2, G1, G2, M1, M2 em amendoim e derivados;
- f) Investigar a incidência das micotoxinas de interesse em leite, fórmulas infantis, alimentação infantil à base de cereais e amendoim.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos nesta tese de doutorado estão estruturados sob a forma compacta, com a apresentação de cinco manuscritos descritos a seguir. Resultados suplementares referentes aos manuscritos estão apresentados como apêndices.

- a) Manuscrito 1: 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 (artigo publicado: Sartori et al. Food Analytical Methods, Vol. 8, 9, 2321-2330, 2015, DOI 10.1007/s12161-015-0128-4).
- b) Manuscrito 2: Determination of aflatoxins M1, M2, B1, B2, G1 and G2 in peanut by modified QuEChERS method and ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (artigo publicado: Sartori et al. Revista Visa em Debate, Vol. 3, 3, 115-121, 2015, Doi: 10.3395/2317-269x.00406).
- c) Manuscrito 3: Survey of aflatoxins M1, M2, B1, B2, G1, G2 and ochratoxin A in infant formulas from Rio de Janeiro, Brazil, using a modified QuEChERS method and ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (artigo em elaboração a ser submetido para publicação em revista científica da área).
- d) Manuscrito 4: Determinação de micotoxinas em mingau a base de cereais para consumo infantil por cromatografia líquida de ultra-eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial (artigo em elaboração a ser submetido para publicação em revista científica da área).
- e) Manuscrito 5: Determination of free and hidden fumonisins in porridge corn-based for infant consumption by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (artigo em elaboração a ser submetido para publicação em revista científica da área).

## **4.1 MANUSCRITO 1: 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**

André Victor Sartori, Juliana Swensson de Mattos, Maria Heloísa Paulino de Moraes, Armi Wanderley da Nóbrega

### **ABSTRACT**

A suitable method for routine analysis of aflatoxins M1, M2, B1, B2, G1 and G2 and ochratoxin A in milk by modified Quick Easy Cheap Effective Rugged and Safe (QuEChERS) sample treatment method and ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UHPLC-MS/MS) was developed and validated. Satisfactory recoveries ranged from 72 to 121%, with relative standard deviation lower than 17% were obtained for the target compounds. The limits of quantification for aflatoxin M1 were 0.017 and 0.25  $\mu\text{g kg}^{-1}$  for UHT milk and powdered milk, respectively. The validated method was successfully applied to the determination of mycotoxins in milk samples from local supermarkets in Rio de Janeiro, Brazil. Ochratoxin A and aflatoxins B1, B2, G1 and G2 were not detected in the analyzed samples. Aflatoxin M1 was found in 53 (74%) of the powdered milk samples analyzed at concentration levels ranging from 0.08 to 1.19  $\mu\text{g kg}^{-1}$ . In UHT milk, aflatoxin M1 was found in 11 (69%) of the analyzed samples at concentration levels ranging from 0.005 to 0.042  $\mu\text{g kg}^{-1}$ . The concentrations found for aflatoxin M1 in milk samples was lower than the maximum permitted level according to Brazilian regulation. Aflatoxin M2 was detected in 17 (24%) of the powdered milk samples ( $>0.08 \mu\text{g kg}^{-1}$ ) and in 3 (18%) of the UHT milk samples ( $>0.009 \mu\text{g kg}^{-1}$ ). The present study is the first report shown the incidence of aflatoxin M2 in milk in Brazil.

Keywords: aflatoxins; ochratoxin A; UHT milk; powdered milk; UHPLC-MS/MS

## Introduction

Mycotoxins are a diverse group of toxic compounds produced as secondary metabolites of certain fungus and they are found as contaminants in foods and feeds worldwide. Several of these compounds are classified by the International Agency for Research in Cancer as human carcinogens, e.g. aflatoxins B1, B2, G1 and G2, and as potential human carcinogens, e.g. aflatoxin M1 and ochratoxin A (IARC 1993).

Lactating animals that consume aflatoxins B1 and B2 contaminated feed, eliminate hydroxylated metabolites into milk respectively known as aflatoxins M1 and AFM2 (Peraica et al. 1999). Aflatoxin M1 is the mycotoxin most frequently found in milk around the world (Prandini et al. 2009). The occurrence of ochratoxin A (Pattono et al., 2011) and aflatoxin M2 (Lee and Lee 2014) has also been reported in milk. In Brazil, previous studies indicated the high occurrence of aflatoxin M1 (Shundo et al. 2009) presence of aflatoxin B1 (Scaglioni et al. 2014) and absence of aflatoxin M2 in milk (Garrido et al. 2003; Iha et al. 2007). Moreover, studies of ochratoxin A in milk, except for breast milk (Navas et al. 2005; Andrade et al. 2013; Iha et al. 2014) have not so far been reported in the country.

The occurrence of mycotoxins in milk and dairy products and the high consumption of these products, especially by infants, represent a worldwide concern. In order to protect public health, regulations to control aflatoxin M1 contamination level have been established in several countries. In Brazil, the RDC n<sup>o</sup> 7/2011 set the maximum limits of 0.5  $\mu\text{g kg}^{-1}$  and 5  $\mu\text{g kg}^{-1}$  for aflatoxin M1 in UHT milk and powdered milk, respectively (Brasil 2011). However, maximum limits have been set by many other countries in quite lower levels, e.g the value set by the European Commission is ten times lower, compared to Brazilian regulation (EC 2006).

Several analytical approaches have been used to determine mycotoxins in food matrices (Köppen et al. 2010). For the determination of aflatoxin M1 in milk high-performance liquid chromatography (HPLC) with fluorescence detection (HPLC/F) (Herzallah 2009; Alvito et al. 2010) and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) have been widely used (Pei et al. 2009).

More recently, high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS), ultra-high performance liquid chromatography tandem

mass spectrometry (UHPLC-MS/MS) and UHPLC high-resolution mass spectrometry (UHPLC-HRMS) have been used for mycotoxin determination in different matrices (Krska et al. 2008; Fang et al. 2013; Jia et al. 2014). Due to the high selectivity and sensitivity of these techniques, simultaneous analysis of different classes of mycotoxins can be achieved in several matrices with minimal sample treatment. Nevertheless, due to the high protein and fat content of the matrix, the analysis of mycotoxins in milk using the aforementioned techniques usually requires extraction and clean-up steps (Sorensen and Albaek 2005; Aguilera-Luiz et al. 2011; Beltran et al. 2011; Chen et al. 2012; Zhang et al. 2013; Huang et al. 2014; Jia et al. 2014). However, simple and fast methods for the simultaneous determination of the aflatoxins M1, M2, B1, B2, G1 and G2 and ochratoxin A in milk so far has not been reported.

The aim of this study was to develop and validate a method for routine analysis of aflatoxins M1, M2, B1, B2, G1, G2 and Ochratoxin A in milk by UHPLC-MS/MS. The method involves a simultaneous sample extraction and clean-up (defatting) procedure, based on a modified *Quick Easy Cheap Effective Rugged and Safe* (QuEChERS) method, without further clean-up step. Results of the analysis of eighty-eight commercial milk samples purchased in local supermarkets in Rio de Janeiro, Brazil using the validated method are presented.

## **Materials and Methods**

### **Reagents and chemicals**

Acetonitrile, methanol (HPLC-grade) and sodium chloride (purity > 99%) were purchased from J T Baker (Phillipsburg, NJ, USA). Acetic acid (purity > 99%) was supplied by Tedia (Fairfield, Ohio, USA). Anhydrous magnesium sulfate (purity > 95%) was supplied by Caledon Laboratory (Georgetown, Ont., Canada). Hexane (purity > 96%) was obtained from Merck (Darmstadt, Germany). Ultrapure water was obtained from Milli-Q Gradient water system (Millipore, Bedford, MA, USA). The standards (aflatoxins B1, B2, G1, G2, M1, M2 and ochratoxin A) and ammonium formate (purity > 99%) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

A 40  $\mu\text{g mL}^{-1}$  stock solution of ochratoxin in a mixture of toluene-acetic acid (99:1 v/v) was prepared; individual aflatoxins stock solutions (10  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) were prepared in

acetonitrile. The concentrations of the stock solutions were determined by UV spectrophotometry (AOAC 2005). Dilutions of the aflatoxins stock solutions were performed with acetonitrile to obtain solutions of aflatoxins in smaller concentrations (200 ng mL<sup>-1</sup>). An aliquot of ochratoxin A stock solution was evaporated and an appropriated volume of acetonitrile was used to obtain a stock solution of 200 ng mL<sup>-1</sup>. All stock solutions were stored at -20 °C. Aliquots of aflatoxins and ochratoxin A stock solutions (200 ng mL<sup>-1</sup>) were combined and the volume adjusted with acetonitrile to obtain an intermediate multimycotoxin solution at a concentration of 20 ng mL<sup>-1</sup>. These solutions were prepared weekly and stored at -18 °C.

### **Sample preparation**

For powdered milk, 1.5 g of sample was weighed into a 50 mL centrifuge tube, 15 mL of deionized water was added and the tube was shaken for 30 seconds. For UHT milk, 15 g of the sample was used in the treatment. Following, 10 mL of hexane and 15 mL of acetonitrile (1% acetic acid, v/v) were added and the tube was shaken for 30 s. Then, a mixture of 6 g of magnesium sulphate and 1.5 g of sodium chloride was added, the tube was immediately shaken vigorously using a vortex (IKA Works) for 1 min and centrifuged in HIMAC CF 7D2 (Hitachi) at 3000 rpm for 7 min. The upper layer of hexane phase was removed. Finally, an aliquot of 5 mL of acetonitrile phase was concentrated to dryness with an evaporator Turbo-Vac LV at 50 °C under a gentle flow of nitrogen. The residue was dissolved with 1 mL of methanol/water (1:1, v/v), then the solution was filtered through a 0.22 µm polyethylene filter.

### **Milk Samples**

A total of eighty-eight commercial milk samples were purchased in local supermarkets in Rio de Janeiro, Brazil corresponding to sixteen samples of whole UHT milk (from May to October 2014) and seventy-two samples of whole powdered milk (November 2009 to May 2012). UHT milk samples were stored in original packaging at room temperature and analyzed within the shelf life of the products. Powdered milk samples were stored in original packing at -20 °C until analysis.

## UHPLC-MS/MS analysis

Liquid chromatography was performed using an ACQUITY UPLC™ system (Waters). A BEH C18 column (100 mm x 2.1 mm i.d., 1.7 µm particle size) was used as the stationary phase. The column temperature was maintained at 35 °C. Methanol (Phase B) and aqueous solution of ammonium formate 5 mM/ acetic acid 1 % (Phase A) were used as mobile phases. The elution gradient started with 25 % of mobile phase B, increased to 100% in 4 min and held in 100% for 1.5 min. The system was then re-equilibrated for 2 min in 25% of mobile phase B. The flow rate was set at 0.3 mL min<sup>-1</sup>. The injection volume was 10 µL using full loop mode.

The detection was performed using a tandem quadrupole mass spectrometer (Waters, Quattro Premier™ XE) equipped with an electrospray ionization (ESI) source operated in positive mode. The source parameters were capillary voltage 3.5 kV, extractor voltage 3 V, rf lens 0.1 V, multiplier 750 V, desolvation temperature of 350 °C, source temperature of 120 °C. Nitrogen was used as cone and desolvation gas at a flow of 50 L h<sup>-1</sup> and 650 L h<sup>-1</sup>, respectively. Argon was used as collision gas at a pressure of 4 x 10<sup>-3</sup> mbar. The two ion transitions selected for each mycotoxin and acquisition conditions performed are shown in Table 1. The analytes were allocated in three acquisition time windows as follows: aflatoxin M2 (1); other aflatoxins assessment (2) and ochratoxin A (3). For ochratoxin A and aflatoxin M2 the dwell time was 200 ms and for all other aflatoxins was 30 ms. Interchannel delay and interscan delay were both 5 ms.

**Table 1:** The selected ion transitions and acquisition MS/MS parameters.

Mycotoxins	Retention time (min)	Quantifier transition ion ( <i>m/z</i> )	Qualifier transition ion ( <i>m/z</i> )	Q/q <sup>a</sup>	Collision energy (eV) <sup>b</sup>	Cone voltage(V)
Aflatoxin M2	2.31	331.3 > 273.3	331.3 > 285.2	1.97 (± 0.39)	25 / 20	45
Aflatoxin M1	2.48	329.2 > 273.2	329.2 > 259.2	2.20 (± 0.55)	20 / 25	50
Aflatoxin G2	2.46	331.3 > 313.3	331.3 > 245.3	1.76 (± 0.35)	25 / 30	40
Aflatoxin G1	2.62	329.2 > 243.2	329.2 > 311.2	1.61 (± 0.32)	25 / 20	45
Aflatoxin B2	2.76	315.2 > 287.0	315.2 > 259.2	1.17 (± 0.23)	25 / 30	50
Aflatoxin B1	2.89	313.0 > 285.2	313.0 > 269.2	1.90 (± 0.38)	25 / 35	40
Ochratoxin A	3.82	404.2 > 239.2	404.2 > 358.2	1.78 (± 0.36)	25 / 15	25

<sup>a</sup> Relative ion transitions intensities (Q/q) and maximum permitted tolerances (given in bracket).

<sup>b</sup> Values are given in the order quantifier transition ion / qualifier transition ion.



## Results and discussion

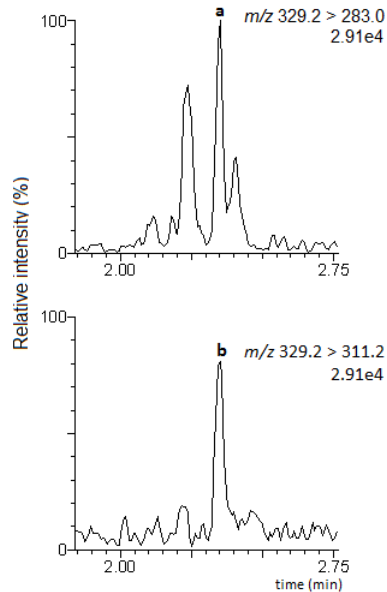
### Optimization of the analytical method

The MS/MS conditions were optimized by continuous infusion of individual working standard solutions ( $1000 \text{ ng mL}^{-1}$ ) in ESI positive mode. The cone voltage were optimized and the protonated molecule  $[M+H]^+$  were selected for all compounds. Collision energies were applied to obtain the fragment ions. Then, the collision energies were optimized for each transition and the two more intense product ions were selected in the MS acquisition method (quantification and confirmation transitions ions). However, the transitions initially selected for aflatoxin G1 ( $329 > 283$ ) and aflatoxin G2 ( $331 > 285$ ) showed interfering peaks when the sample preparation method was applied to whole powdered milk sample in the selectivity studies step. Thus, these transitions were replaced avoiding further clean up steps and providing satisfactory method sensitivity and greater selectivity. The Figure 1 demonstrates the improvement obtained for the selectivity of aflatoxin G1.

The capillary voltage was optimized by injection of the compounds. The capillary voltage selected was 3.5 kV, which provides greater sensitivity for aflatoxin M1 and satisfactory sensitivity for the other compounds. Dwell times were optimized in order to obtain satisfactory reproducibility and sensitivity for all compounds.

The sensitivity was evaluated using acetonitrile and methanol as the organic mobile phase. Methanol was selected because better results for all compounds, mainly for aflatoxins, was achieved using this solvent. The addition of ammonium formate (5 mM) and ammonium acetate (5 mM) in the mobile phases was evaluated and better sensitivity was obtained for all target compounds using ammonium formate. In order to obtain a better peak shape for ochratoxin A, acetic acid (1%) was also added in aqueous mobile phase.

**Figure 1:** Chromatograms of a whole powdered milk blank extract fortified with the aflatoxin G1 ( $0.5 \text{ ng mL}^{-1}$ ) showing: a) presence of matrix interferents ( $m/z \text{ 329.2} > 283.0$ ); b) absence of matrix interferents ( $m/z \text{ 329.2} > 311.2$ ).



The sample preparation method used in this study is based on a procedure suggested by Przybylski and Segard (2009) on analyzing pesticides in meat based baby-food. The mentioned authors described a modification of the QuEChERS method in which it was introduced a triple water, acetonitrile and hexane partitioning extraction step, to reduce co-extraction of lipophilic components of the samples.

The extraction efficiency of the modified QuEChERS method adopted was evaluated using 1.5 g of whole powdered milk samples fortified with all target mycotoxins ( $1.5 \mu\text{g kg}^{-1}$ ). The samples were reconstituted with 15 mL of water to increase the moisture content and 10 mL hexane was added. Initially, the salting out partitioning step was performed using anhydrous magnesium sulfate (6 g) and sodium acetate (1.5 g). However, whereas satisfactory recoveries (70 to 100%) for the aflatoxins was observed, an inadequate recovery for ochratoxin A (<60%) was found. To improve recovery, sodium chloride (1.5 g) was then used instead of sodium acetate; satisfactory recoveries (70 to 120%) were then observed for all target compounds. Once the salting out partitioning step was optimized, the samples were extracted with 15 mL of acetonitrile containing 1% acetic acid.

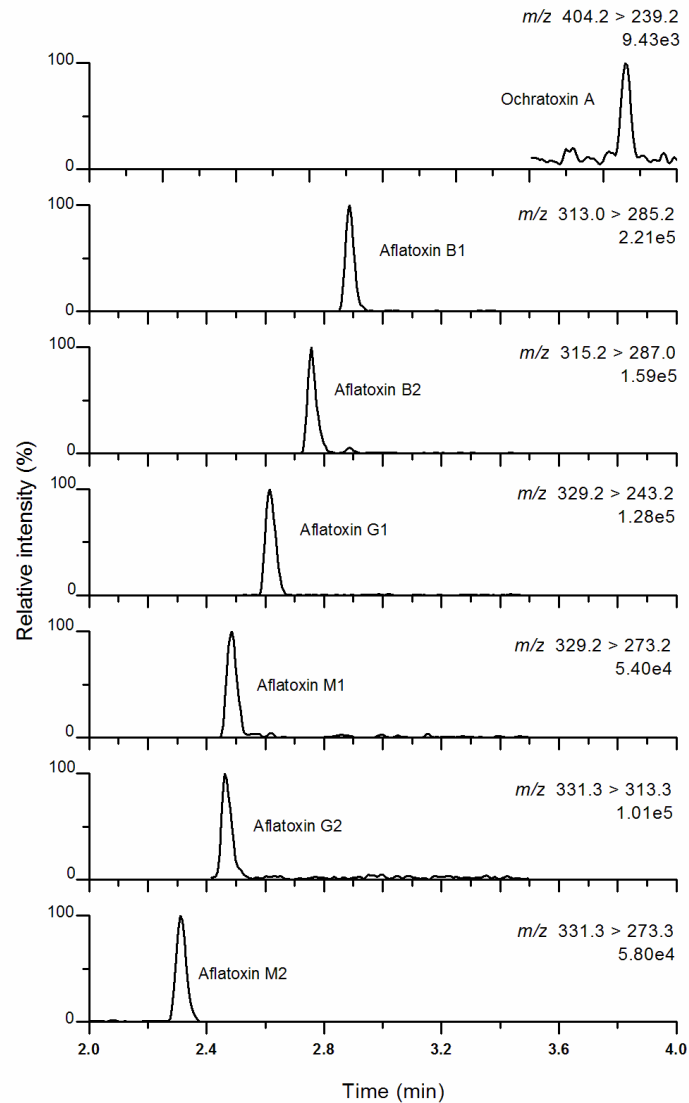
The effects of the composition of the solvent used to reconstitute the residue obtained after evaporating the acetonitrile extract on peak shapes and the loss of the target compounds associated with the matrix precipitation and filtration steps was studied. Different ratios of methanol/water (75:25, 50:50 and 25:75 v/v) and two filter types (Nylon 0.2 m or Polyethylene 0.2 m) were tested. The solvent methanol/water 50:50 (v/v) was selected to provide satisfactory peak shape for all target analytes, mainly for aflatoxin M<sub>2</sub>, injecting a volume of 10 µL. The polyethylene filter were chosen because avoid loss of the analytes in the filtration step. It is noteworthy that the extract concentration stage can be done with several samples at the same time, without impairing the application of the method in routine analysis.

### **Validation of the analytical method**

The method was validated for UHT milk and powdered milk. Single laboratory validation was performed by evaluating the following analytical performance parameters: selectivity, matrix effect, linearity, trueness, precision, limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ).

The selectivity of the method was evaluated by analyzing matrix blank samples (skim, semi-skimmed and whole milk). For all matrices, the absence of interference signals eluting at the same retention time of the selected mycotoxins was verified. Figure 2 shows a chromatogram of a whole powdered milk blank extract fortified with target mycotoxins.

**Figure 2:** Chromatograms of a whole powdered milk blank extract fortified with target mycotoxins (1.5 ng mL<sup>-1</sup>).



The identification of the mycotoxins was performed by comparing observed retention times for analytes in the samples with those obtained using standard solution. Confirmations were performed by comparing the signal intensity ratios of the two ion transitions for each analyte in the sample with those obtained using standard solution.

Liquid chromatography with tandem mass spectrometry detection is a powerful analytical technique for detection and quantification of analytes in complex matrices. However, it is known that using this technique the analyte signals are highly susceptible

to matrix effect (signal suppression or enhancement) in the presence of co-eluting matrix components. To investigate of matrix effect in our study, UHT milk and powdered milk (skim, semi-skimmed, whole milk), were selected. A calibration curve for each compound in each matrix extract (matrix-matched calibration) and in the methanol/water (1:1 v/v) was prepared at five concentration levels, ranging from 0.1 to 1.5 ng mL<sup>-1</sup>; each solution was then analyzed in triplicate.

The calibration curve slopes were compared by analysis of covariance (ANCOVA), considering a significance level of 5% (García-Campaña et al. 1997). The results obtained are shown in Table 2. As assumption for comparison of calibration curves by ANCOVA, it is necessary to check if the residual variances of the calibration curves are homogeneous. The residual variances were checked by modified Levene test (Brown and Forsythe 1974). The homogeneity of all the calibration curves was confirmed ( $p$ -values > 0.05). The slopes of the three calibration curves of each matrix studied were compared with the slope of the calibration curve in solvent. There were significant differences between the slopes of the calibration curves prepared in solvent and matrices for target aflatoxins ( $p$ -values < 0.05), showing that the matrix effect is significant for these compounds. The slopes of all the calibration curves prepared in matrices were compared in order to find out a representative matrix-matched calibration (powdered or UHT milk). There were significant differences between the calibration curves for aflatoxins M2, M1 and G2 ( $p$ -values < 0.05), shown that a representative matrix cannot be used for these compounds. The influence of the sample fat content on matrix effect was also investigated. There were no significant differences between the slopes of the three matrix-matched calibrations ( $p$ -values > 0.05), demonstrating that the matrix effect for target compounds is not dependent to the fat content in the samples. Therefore, two representative calibration curves were selected for routine analysis, one for UHT milk and another for powdered milk since the difference of matrix effect was verified only for the type of matrix (powdered or UHT milk) and not for the fat content.

Table 2 shows the values of matrix effects for evaluated compounds in the matrices. The numerical values were calculated by Equation 1, where  $\text{slope}_{\text{solvent}}$  is the slope of the calibration curve in solvent and  $\text{slope}_{\text{matrix}}$  is the slope of the matrix-matched calibration (positive values indicate signal enhancement and negative values indicate

signal suppression).

$$\text{Matrix Effect (\%)} = (\text{slope}_{\text{solvent}} - \text{slope}_{\text{matrix}} / \text{slope}_{\text{solvent}}) \times 100 \quad (\text{Equation 1})$$

Due to the presence of significant matrix effects for some mycotoxins, the linearity of the calibration curves used in routine analysis was evaluated using matrix-matched calibration curves (whole UHT milk and whole powdered milk) in five concentration levels between 0.1 and 1.5 ng mL<sup>-1</sup> and then the solutions were analysed in triplicate. Ordinary least squares method was applied for the elaboration of the calibration curves. The resulting correlation coefficients were always greater than 0.99.

**Table 2: Matrix effects evaluation for UHT milk and powdered milk.**

Mycotoxin	Powdered Milk (skim, semi-skimmed and whole)				UHT Milk (skim, semi-skimmed and whole)				Solvent	
	Regression equations	<sup>a</sup> ANCOVA (p-value)	<sup>b</sup> ANCOVA (p-value)	Matrix effect (%)	Regression equations	<sup>a</sup> ANCOVA (p-value)	<sup>b</sup> ANCOVA (p-value)	Matrix effect (%)	Regression equation	<sup>c</sup> ANCOVA (p-value)
Aflatoxin M2	y=2084x-29, y=2004x-15, y=2116x-54	0.132	0.00	52	y=1761x+37, y=1822x-6, y=1865x-32	0.15	0.00	34	y=1359x-19	0.00
Aflatoxin M1	y=1587+22, y=1628x-48, y=1579x-41	0.65	0.00	16	y=1839x+32, y=2046x-17, y=1930x+91	0.052	0.00	41	y=1375x-5	0.00
Aflatoxin G2	y=3112x-105, y=2956x-30, y=2847x+12	0.13	0.00	-20	y=2779x-115, y=2579x-30, y=2666x-28	0.22	0.00	-28	y=3702x+58	0.00
Aflatoxin G1	y=5022x-53, y=4941x+58, y=4912x-65	0.77	0.00	-24	y=4771x-94, y=4700x-93, y=4640x+56	0.68	0.00	-27	y=6485x-44	0.20
Aflatoxin B2	y=3789x+0, y=3684x-15, y=3486x-41	0.12	0.00	-39	y=3843x-143, y=3768x+21, y=3613x+64	0.28	0.00	-37	y=5977x+13	0.37
Aflatoxin B1	y=6567x+27, y=6793x+39, y=6173x-42	0.07	0.00	-32	y=6449x-64, y=6390x+54, y=6470x+11	0.07	0.00	-33	y=9546x-170	0.61
Ochratoxin A	y=2468x+30, y=2346x+88, y=2448x-31	0.07	0.07	2	y=2297x-45, y=2323x-15, y=2438x-10	0.06	0.09	-1,0	y=2375x-11	0.06

<sup>a</sup>Obtained by analysis of covariance comparing the three slopes of the calibration curves prepared for each matrix (different fat content); <sup>b</sup>obtained by analysis of covariance comparing the slopes of the three matched calibration matrix with the slopes of the calibration curve in solvent; <sup>c</sup> obtained by analysis of covariance comparing the six slopes of the calibration curves prepared in matrix. *p*-Value > 0.05, there is no significant difference between the slopes of the calibration curves evaluated with a level of confidence of 95%.

The linearity was assessed according to the procedure described by Souza and Junqueira (2005). As assumptions for regression analysis, the homocedasticity, the independency and the normality of the regression residuals were checked. Initially, the outliers were successively investigated by Jackknife standardised residuals test (Belsley et al. 1980). The homocedasticity of residuals, checked by modified Levene test (Brown and Forsythe 1974), for all the calibration curves was confirmed ( $p$ -values  $> 0.05$ ). The independency of residuals, checked by Durbin-Watson statistic (Durbin and Watson 1951), for all calibration curves was confirmed ( $p$ -values  $> 0.05$ ). The normality of residuals, checked by Ryan-Joiner test (Ryan and Joiner 1976), for all the calibration curves was confirmed ( $p$ -values  $> 0.05$ ). The regression significance and the lack-of-fit were performed by analysis of variance (ANOVA) (Draper and Smith 1998). A high regression significance ( $p$ -values  $< 0.001$ ) and the lack-of-fit not significant ( $p$ -values  $> 0.05$ ) were observed, attesting the linearity of the calibration curves studied.

The trueness and precision were evaluated by recovery studies using blank matrices of whole UHT milk (15 g) and whole powdered milk (1.5 g) spiked with the mycotoxins at three concentration levels (0.05, 0.1 and 0.2  $\mu\text{g kg}^{-1}$  for UHT milk; 0.5, 1 and 2  $\mu\text{g kg}^{-1}$  for powdered milk) with three replicates for each level. The quantities of samples were selected in order to obtain adequate sensitivity to meet the most restrictive regulations for aflatoxin M1.

The result values are shown in Table 3 and Table 4, where the precision is expressed by the relative standard deviation (RSD) and trueness by the recovery values. The results were evaluated according to the European Commission Decision 2002/657/EC (EC 2002). The recovery values ranged from 72 to 121 %, with RSD lower than 17% for all mycotoxins. The developed method showed good trueness and precision in the concentration levels evaluated.

Whole UHT milk and whole powdered milk samples respectively spiked with all the target mycotoxins at concentrations of 0.05 and 0.5  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , were used to calculate the limits of detection (LOD) and limits of quantification (LOQ), considering signal-to-noise ratios of 3 and 10, respectively. The summary results are shown in Tables 3 and 4.



**Table 3:** Parameters of validation of the method for powdered milk.

Mycotoxins	LOD	LOQ	0.5 $\mu\text{g kg}^{-1}$		1 $\mu\text{g kg}^{-1}$		2 $\mu\text{g kg}^{-1}$	
			Rec	RSD	Rec	RSD	Rec	RSD
Aflatoxin M2	0.08	0.26	91.0	12.6	87.6	2.2	117.2	3.5
Aflatoxin M1	0.08	0.25	84.2	6.4	88.9	11.4	91.9	6.3
Aflatoxin G2	0.14	0.48	88.7	5.0	83.9	4.9	113.0	8.7
Aflatoxin G1	0.06	0.20	83.8	8.3	85.3	11.2	72.8	5.6
Aflatoxin B2	0.11	0.36	88.9	9.5	84.4	5.6	97.9	6.5
Aflatoxin B1	0.07	0.23	88.7	12.2	92.2	4.7	84.1	5.8
Ochratoxin A	0.44	1.45	81.8	16.7	90.7	3.3	121.0	3.5

LOD, Limit of detection ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ); LOQ, Limit of Quantification ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ );  
Rec(%), recovery; RSD (%) relative standard deviation; number of replicates: 3

**Table 4:** Parameters of validation of the method for UHT milk.

Mycotoxins	LOD	LOQ	0.05 $\mu\text{g kg}^{-1}$		0.1 $\mu\text{g kg}^{-1}$		0.2 $\mu\text{g kg}^{-1}$	
			Rec	RSD	Rec	RSD	Rec	RSD
Aflatoxin M2	0.009	0.029	95.3	9.8	100.1	1.3	94.0	1.3
Aflatoxin M1	0.005	0.017	110.8	7.3	99.5	6.0	90.3	0.7
Aflatoxin G2	0.013	0.044	84.4	3.7	99.7	4.2	97.3	3.2
Aflatoxin G1	0.006	0.019	91.9	3.9	96.0	4.0	93.2	2.6
Aflatoxin B2	0.014	0.048	108.4	2.6	99.8	2.8	99.1	3.2
Aflatoxin B1	0.010	0.033	85.2	7.3	96.8	9.8	86.1	6.1
Ochratoxin A	0.039	0.129	87.9	13.5	85.3	9.1	88.3	5.6

LOD, Limit of detection ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ); LOQ, Limit of Quantification ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ );  
Rec(%), recovery; RSD (%) relative standard deviation; number of replicates: 3

The sensitivity of the proposed method was considered adequate for routine analysis. The LOQ of the method for aflatoxin M1 was at least twelve times lower than the Brazilian limit and two times lower than more restrictive EU regulation limit. The sensitivity of the proposed method was also compared to those of other liquid chromatography MS/MS methods published in the literature. For aflatoxin M1, it was comparable to those of the methods using cleanup by Oasis HLB SPE cartridges (Sorensen and Albaek 2005), SPE (C18 sorbent) with cleanup by Mycosep multifunctional columns (Chen et al. 2005)

and by SPE (C18 sorbent) for enrichment and clean-up (Aguilera-Luiz et al. 2011) and extraction with acetonitrile without further clean-up stage (Wang et al. 2011). For the aflatoxins B1, B2, G1 e G2, sensitivities were also comparable to those obtained by the method which uses only extraction by SPE (C18). For ochratoxin A, the sensitivity was lower than that obtained when Oasis HLB SPE cartridges method was used.

### **Sample analysis**

The validated method was applied to the determination of mycotoxins in seventy-two whole powdered milk and sixteen whole UHT milk samples. Ochratoxin A and aflatoxins B1, B2, G1 and G2 were not detected in the analyzed samples. Aflatoxin M1 was found in 53 (74%) of the powdered milk samples analyzed at concentration levels ranging from 0.08 to 1.19  $\mu\text{g kg}^{-1}$ . In UHT milk, aflatoxin M1 was found in 11 (69%) of the analyzed samples at concentration levels ranging from 0.005 to 0.042  $\mu\text{g kg}^{-1}$ . The concentration levels found for aflatoxin M1 were lower than maximum permitted level according to Brazilian legislation for powdered milk (5  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) and UHT milk (0.5  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ). However, 11 (15 %) of the powdered milk samples would not be accepted according to EC Regulation.

The high incidence of aflatoxin M1 in milk found in this study is in according to those 66.7%, 96.0%, 100% respectively reported by Scaglioni et al. (2014), Shundo et al. (2009) and Londoño et al. (2013) in Brazil and the 62.3%, 91.5%, 73.2% and 62.5% respectively reported by Fallah (2010), Rahimi et al. (2011), Kocasari (2014) and Elmali et al. (2008) in other countries.

The maximum concentration level of aflatoxin M1 found in powdered milk samples in this study (1.19  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) was higher than the 0.38, 0.76, 0.81  $\mu\text{g kg}^{-1}$  reported respectively by Prado et al. (1999), Iha et al. (2013) and Londoño et al. (2013) in Brazil. The average concentration of aflatoxin M1 in powdered milk found in this study (0.47  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) was lower than the 0.61  $\mu\text{g kg}^{-1}$  reported by Shundo et al. (2009) and similar to 0.44  $\mu\text{g kg}^{-1}$  reported by Londoño et al. (2013) in the country.

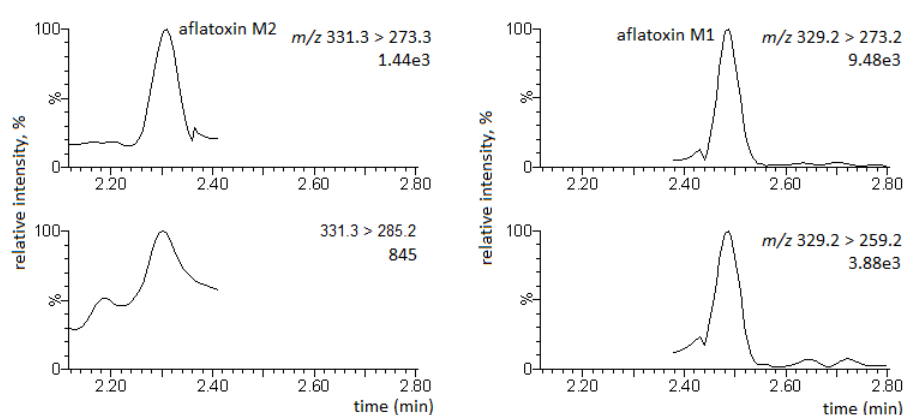
Concerning UHT milk samples, the maximum concentration found of aflatoxin M1 (0.042  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , or 0.042  $\mu\text{g L}^{-1}$  considering the milk density equal to one) was about one hundred fold lower than the 4.1  $\mu\text{g L}^{-1}$  reported by Oliveira

et al. (2013) in Brazil; lower than the 0.52, 0.54, 0.259  $\mu\text{g L}^{-1}$  reported in other countries respectively by Fallah (2010), Unusan (2006) and Movassagh (2011). The average concentration of aflatoxin M1 in UHT milk found in this study (0.032  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , or 0.032  $\mu\text{g L}^{-1}$  considering the milk density equal to one) was lower than the 0.075 and 1.2  $\mu\text{g L}^{-1}$  respectively reported by Oliveira et al. (2006) and Scaglioni et al. (2014) in Brazil; lower than the 0.046 and 0.11  $\mu\text{g L}^{-1}$  respectively reported by Rahimi et al. (2011) and Unusan (2006) and higher than the 0.018  $\mu\text{g L}^{-1}$  (Londoño et al. 2013) in other countries.

Aflatoxin M2 was detected in 17 (24%) of the powdered milk samples ( $>0.08 \mu\text{g kg}^{-1}$ ) and in 3 (18%) of the UHT milk samples ( $>0.009 \mu\text{g kg}^{-1}$ ). Aflatoxin M2 has been found in milk in other countries (Herzallah 2009; Lee and Lee 2014). In Brazil, absence of aflatoxin M2 in milk has been reported (Garrido et al. 2003; Iha et al. 2007). Therefore, the present study is the first report shown the occurrence of aflatoxin M2 in milk in Brazil.

All samples that were positive for aflatoxin M2 were also positive for aflatoxin M1 highlighting the importance of the multiresidue method here presented. Figure 3 shows the chromatograms for one of the samples (powdered milk) naturally contaminated with aflatoxins M1 and M2.

**Figure 3** Chromatogram of a whole powdered milk sample naturally contaminated by aflatoxin M1 ( $0.65 \mu\text{g kg}^{-1}$ ) and aflatoxin M2 (detected).



## Conclusions

A modified QuEChERS method very useful for routine analysis of the aflatoxins M1, M2, B1, B2, G1 and G2 and ochratoxin A in UHT milk and powdered milk by UHPLC-MS/MS was developed and validated. The method is

sensitive and fast, involving a simple simultaneous extraction and clean-up followed by concentration of extract. The validated method was successfully applied to the determination of mycotoxins in commercial whole powdered milk. The milk samples analyzed in this study can be considered safe for consumption in relation to contamination of aflatoxin M1 based on Brazilian legislation. However, found concentration levels can make it difficult the export of milk to countries with more restrictive legislation for this contaminant, as an example to the EU countries. In addition to aflatoxin M1, the results suggest that milk should be monitored for the aflatoxin M2 contamination providing occurrence data for performing risk assessment studies. Because of its simplicity, if used extensively, the analytical method here described may contribute to harmonize legislation referring to mycotoxins levels in milk in different countries, particularly in which it concerns to aflatoxin M2, where there is an obvious gap of information related to its effect on public health.

**Compliance with Ethics Requirements:** André Victor Sartori declares that he has no conflict of interest. Juliana Swensson de Mattos declares that she has no conflict of interest. Maria Heloísa Paulino de Moraes declares that she has no conflict of interest. Armi Wanderley da Nóbrega declares that he has no conflict of interest. This article does not contain any studies with human or animal subjects.

## References

Aguilera-Luiz MM, Plaza-Bolanos P, Romero-Gonzalez R, Vidal JLM, Frenich AG (2011) Comparison of the efficiency of different extraction methods for the simultaneous determination of mycotoxins and pesticides in milk samples by ultra high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 399: 2863-75.

Alvito PC, Sizoo EA, Almeida CMM, van Egmond HP (2010) Occurrence of aflatoxins and ochratoxin A in baby foods in Portugal. *Food Analytical Methods* 3: 22–30.

Andrade PD, Silva JLG, Caldas ED (2013) Simultaneous analysis of aflatoxins B1, B2, G1, G2, M1 and ochratoxin A in breast milk by high-performance liquid chromatography/fluorescence after liquid–liquid extraction with low temperature purification (LLE–LTP). *Journal of Chromatography A* 1304: 61-68.

AOAC official methods of analysis (2005) (18th ed.) Gaithersburg, MD: AOAC International.

Belsley DA, Kuh E, Welsch RE (1980) Regression diagnostics: identifying influential data and sources of collinearity. New York: Wiley, 292 p.

Beltran E, Ibanez M, Sancho JV, Cortes MA, Yusa V, Hernandez F (2011) UHPLC–MS/MS highly sensitive determination of aflatoxins, the aflatoxin metabolite M1 and ochratoxin A in baby food and milk. *Food Chemistry* 126: 737.

Brasil (2011) Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 7, de 18 do fevereiro de 2011. Dispõe sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 2011, 46: 66-67.*

Brown BM, Forsythe AB (1974) Robust tests for the equality of variances. *Journal of the American Statistical Association* 69: 364-367.

Chen CY, Li WJ, Peng KY (2005) Determination of aflatoxin M1 in milk and milk powder using high-flow solid-phase extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53: 8474-8480.

Chen D, Cao X, Tao Y, Wu Q, Pan Y, Huang L, Wang X, Wang Y, Peng D, Liu Z, Yuan Z (2012) Development of a sensitive and robust liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry and a pressurized liquid extraction for the determination of aflatoxins and ochratoxin A in animal derived foods. *Journal of Chromatography A* 1253: 110-119.

Draper N, Smith H (1998) Applied regression analysis. New York: Wiley, 706 p.

Durbin J, Watson GS (1951) Testing for serial correlation in least squares regression ii. *Biometrika*, 38, 1-2, 159-178.

EC European Commission (2002) Commission decision 2002/657/EC of 12 August 2002 - Implementing Council Directive 96/23/EC concerning performance of analytical methods and the interpretation of result. *Official Journal of the European Communities, L 221/8, Brussels, 2002.*

EC European Commission (2006) No 1881/2006 of 19 December 2006, as amended, on Setting Maximum Levels for Certain Contaminants in Foodstuffs. *Offic. J. Eur. Union*. 2006, 364: 5-24.

Elmali M, Yapar K, Kart A, Yaman H (2008) Aflatoxin M1 levels in milk powder consumed in Turkey. *Journal of Animal and Veterinary Advances* 7: 643- 645.

Fallah AA (2010) Assessment of aflatoxin M1 contamination in pasteurized and UHT milk marketed in central part of Iran. *Food and Chemical Toxicology* 48: 988–991.

Fang LX, Xiong AZ, Wang R, Ji S, Yang L, Wang ZT (2013) A strategy for screening and identifying mycotoxins in herbal medicine using ultra-performance liquid chromatography with tandem quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Separation Science* 36: 3115-22.

García-Campaña A, Cuadros-Rodríguez L, Aybar-Muñoz J, Alés-Barrero F (1997) Chemometric protocol to validate an analytical method in the presence of corrigible constant and proportional systematic errors. *Journal of AOAC International* 80: 657-664.

Garrido NS, Iha MH, Ortolani MRS, Fávoro RMD (2003) Occurrence of aflatoxins M1 and M2 in milk commercialized in Ribeirão Preto-SP, Brazil. *Food Additives and Contaminants* 20: 70-73.

Herzallah SM (2009) Determination of aflatoxins in eggs, milk, meat and meat products using HPLC fluorescent and UV detectors. *Food Chemistry* 114: 1141.

Huang LC, Zheng N, Zheng BQ, Wen F, Cheng JB, Han RW, Xu XM, Li SL, Wang JQ (2014) Simultaneous determination of aflatoxin M1, ochratoxin A, zearalenone and  $\alpha$ -zearalenol in milk by UHPLC-MS/MS. *Food Chemistry* 1(146): 242-249.

IARC International Agency for Research on Cancer (1993) World Health Organization (WHO). IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to human, Lyon, France, 56, 245.

Iha MH, Abe LT, Okada MM, Favaro RMD (2007) Occurrence of aflatoxins M1 and M2 in goat milk marketed commercialized in the region of Ribeirão Preto-SP, Brazil. *Revista do Instituto Adolfo Lutz* 66(1): 57-62.

Iha MH, Barbosa CB, Heck AR, Trucksess MW (2014) Aflatoxin M1 and ochratoxin A in human milk in Ribeirão Preto-SP, Brazil. *Food Control* 40: 310-313.

Iha MH, Barbosa CB, Okada IA, Trucksess MW (2013) Aflatoxin M1 in milk and distribution and stability of aflatoxin M1 during production and storage of yoghurt and cheese. *Food Control* 29: 1-6.

Jia W, Chu X, Ling Y, Huang J, Chang J (2014) Multi-mycotoxin analysis in dairy products by liquid chromatography coupled to quadrupole orbitrap mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1345: 107–114.

Kocasari SF (2014) Occurrence of aflatoxin M1 in UHT milk and infant formula samples consumed in Burdur, Turkey. *Environmental monitoring and assessment* 186(10), 6363-8.

Köppen R, Koch M, Siegel D, Merkel S, Maul R, Nehls I (2010) Determination of mycotoxins in foods: current state of analytical methods and limitations. *Applied Microbiology and Biotechnology* 86(6): 1595-1612.

Krska R, Schubert-Ullrich P, Molinelli A, Sulyok M, Macdonald S, Crews C (2008) Mycotoxin analysis: An update. *Food Additives and Contaminants* 25: 152.

Lee D, Lee KG (2014) Analysis of aflatoxin M1 and M2 in commercial dairy products using high-performance liquid chromatography with a fluorescence detector. *Food Control* (2014) doi: 10.1016/j.foodcont.2014.09.020.

Londoño VAG, Boasso AC, de Paula MCZ, Garcia LP, Scussel VM, Resnik S, Pacín A (2013) Aflatoxin M1 survey on randomly collected milk powder commercialized in Argentina and Brazil. *Food Control* 34(2): 752–755.

Movassagh MH (2011) Presence of aflatoxin M1 in UHT milk in Tabriz (Northwest of Iran). *Journal of Food Safety* 31(2): 238-241.

Navas SA, Sabino M, Rodriguez-Amaya DB (2005) Aflatoxin M1 and ochratoxin A in a human milk bank in the city of São Paulo, Brazil. *Food Additives & Contaminants* 22 (5): 457-462.

Oliveira CA, Rosmaninho J, Rosim R (2006) Aflatoxin M1 and cyclopiazonic acid in fluid milk traded in Sao Paulo, Brazil. *Food Additives and Contaminants* 23: 196.

Oliveira CP, Soares NFF, Oliveira TV, Júnior JCB, Silva WA (2013) Aflatoxin M1 occurrence in ultra high temperature (UHT) treated fluid milk from Minas Gerais/Brazil. *Food Control* 30: 90-92.

Pattono D, Gallo PF, Civera T (2011) Detection and quantification of Ochratoxin A in milk produced in organic farms. *Food Chemistry* 127(1): 374-377.

Pei SC, Zhang YY, Eremin SA, Lee WJ (2009) Detection of aflatoxin M1 in milk products from China by ELISA using monoclonal antibodies. *Food Control* 20 (12): 1080–1085.

Peraica M, Radic B, Lucic A, Pavlovic M (1999) Toxic effects of mycotoxins in humans. *Bulletin of the World Health Organization* 77(9): 754-766.

Prado G, Oliveira MS, Abrantes FM, Santos LG, Soraes CR, Veloso T (1999) Ocorrência de aflatoxina M1 em leite consumido na cidade de Belo Horizonte -

Minas Gerais/Brasil - agosto/98 à abril/99. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* 19: 3.

Prandini A, Tansini G, Sigolo S, Filippi L, Laporta M, Piva G (2009) On the occurrence of aflatoxin M1 in milk and dairy products. *Food and Chemical Toxicology* 47: 984.

Przybylski C, Segard C (2009) Method for routine screening of pesticides and metabolites in meat based baby-food using extraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Separation Science* 32: 1858-1867.

Rahimi E, Nilchian Z, Behzadnia A (2011) Presence of Aflatoxin M1 in Pasteurized and UHT Milk Commercialized in Shiraz, Khuzestan and Yazd, Iran. *Journal of Chemical Health Risks* 1(1): 07-10.

Ryan TA, Joiner BL (1976) Normal probability plots and tests for normality. The State College: Pennsylvania State University.

Scaglioni PT, Becker-Algeri T, Drunkler D, Badiale-Furlong E (2014) Aflatoxin B1 and M1 in milk. *Analytica Chimica Acta* 829: 68–74.

Shundo L, Navas SA, Lamardo LCA, Ruvieri V, Sabino M (2009) Estimate of aflatoxin M1 exposure in milk and occurrence in Brazil. *Food Control* 20(7): 655-657.

Sorensen LK, Elbaek TH (2005) Determination of mycotoxins in bovine milk by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 820: 183.

Souza SVC, Junqueira RG (2005) A procedure to assess linearity by ordinary least squares method. *Analytica Chimica Acta* 552(1-2): 25-35.

Unusan N (2006) Occurrence of aflatoxin M1 in UHT milk in Turkey. *Food and Chemical Toxicology* 44: 1897–1900.

Wang H, Zhou XJ, Liu YQ, Yang HM, Guo QL (2011) Simultaneous determination of chloramphenicol and aflatoxin M1 residues in milk by triple quadrupole liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59: 3532.

Zhang K, Wong JW, Hayward DG, Vaclavikova M, Liao CD, Trucksess MW (2013) Determination of mycotoxins in milk-based products and infant formula using stable isotope dilution assay and liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 61(26): 6265–6273.



## **4.2 MANUSCRITO 2: DETERMINATION OF AFLATOXINS M1, M2, B1, B2, G1 AND G2 IN PEANUT BY MODIFIED QUECHERS METHOD AND ULTRA-HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY-TANDEM MASS SPECTROMETRY**

André Victor Sartori, Juliana Swensson de Mattos, Yuri Pereira Souza, Rosana Pereira dos Santos, Maria Heloisa Paulino de Moraes, Armi Wanderley da Nobrega

### **ABSTRACT**

A suitable method for routine analysis of aflatoxins M1, M2, B1, B2, G1, G2 in peanut by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry was developed and validated. The sample preparation was performed using a triple partitioning (water / acetonitrile / hexane) modified Quick Easy Cheap Effective Rugged and Safe (QuEChERS) method. For the first time, this method is reportedly used for aflatoxins analyses in peanut. Satisfactory recoveries ranged from 71 to 101%, with relative standard deviation lower than 15% were obtained for the target aflatoxins. The determination coefficients were  $\geq 0.99$  showing good linearity. The LOD and LOQ varied from 0.03 to 0.26 ng g<sup>-1</sup> and 0.1 to 0.88 ng g<sup>-1</sup>, respectively. The validated method was successfully applied to the determination of aflatoxins in ten peanut samples. Total aflatoxin concentration exceeded the maximum permitted level according to Brazilian regulation in one sample of roasted peanut, while aflatoxins M1 and M2 were detected respectively in three and in one of the samples. The results strongly suggest that peanuts as well as peanut products should be continuously monitored for the aflatoxins investigated in this work.

**KEYWORDS:** Aflatoxins, Peanut, QuEChERS, UHPLC-MS/MS

## **Determinação de aflatoxinas M1, M2, B1, B2, G1 e G2 em amendoim utilizando um método QuEChERS modificado e cromatografia líquida de ultra eficiência com detecção por espectrometria de massas sequencial**

### **Análises de aflatoxinas em amendoim pelo método QuEChERS**

#### **RESUMO**

Um método adequado para a análise de rotina de aflatoxinas M1, M2, B1, B2, G1, G2 em amendoim por cromatografia líquida de ultra eficiência com espectrometria de massas foi desenvolvido e validado. A preparação da amostra foi realizada utilizando um método QuEChERS (Quick Easy Cheap Effective Rugged and Safe) modificado empregando partição tripla (água / acetonitrila / hexano) Pela primeira vez, este método foi utilizado para análise de aflatoxinas em amendoim. Recuperações satisfatórias, entre 71 e 101%, com coeficientes de variação inferiores a 15% foram obtidos para as aflatoxinas estudadas. Os coeficientes de determinação foram  $\geq 0,99$ , demonstrando boa linearidade. Os limites de detecção e de quantificação variaram de 0,03 a 0,26  $\text{ng g}^{-1}$  e 0,1 a 0,88  $\text{ng g}^{-1}$ , respectivamente. O método validado foi aplicado com sucesso na determinação de aflatoxinas em dez amostras de amendoim. Para uma amostra de amendoim torrado foi encontrado valor de concentração de aflatoxinas totais acima do LMT pela regulamentação brasileira. As aflatoxinas M1 e M2 foram detectadas, respectivamente, em três e em uma das amostras das analisadas. Os resultados obtidos sugerem fortemente um contínuo monitoramento da contaminação do amendoim e seus produtos pelas aflatoxinas investigadas nesse estudo.

**PALAVRAS-CHAVE:** Aflatoxinas, Amendoim, QuEChERS, CLUE-EM/EM

## Introduction

Mycotoxins are secondary metabolites produced by filamentous fungi and they are classified into several groups<sup>1</sup>. Among the mycotoxins, the aflatoxins group has been considered of special concern to food safety in many countries due to the high occurrence of these compounds as food contaminants and to their toxic effects on human health<sup>2,3,4</sup>. The aflatoxins are classified as being carcinogenic to humans by International Agency for Research on Cancer<sup>5</sup>.

The aflatoxins B1, B2, G1, G2 are the major aflatoxins found as contaminants in peanuts and peanut products. Maximum limits have been set by international authorities for the aflatoxins B1 and/or the sum of the aflatoxins B1, B2, G1, G2 (total aflatoxins) in peanut and several other foods<sup>6,7,8</sup>. The Brazilian regulation sets only the maximum limit (20 ng g<sup>-1</sup>) for total aflatoxins<sup>9</sup>.

The aflatoxins M1 and M2 are the major metabolites of aflatoxin B1 and B2, respectively, produced in the metabolism of mammals. Several studies have, thus, been conducted to demonstrate the contamination of milk and dairy products by these compounds<sup>10,11</sup>. The aflatoxins M1 and M2 may also be produced by fungi cultures in minor amounts<sup>12,13</sup>.

The contamination of natural peanut, peanut butter and other peanut products with aflatoxins M1 and/or M2 was demonstrated recently<sup>14,15,16</sup>. The presence of aflatoxin M1 has also been observed in corn<sup>17,18</sup> and in traditional Chinese medicines<sup>19</sup>.

Although they have a less toxic potential, the contamination of peanut and their derivative products with aflatoxins M1 and M2 should be monitored. Thus, reliable analytical methods are required.

Several analytical techniques and sample treatment methods have been used to determine mycotoxins in food matrices<sup>20,21,22,23</sup>. In the last decade, high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS) and ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (UHPLC-MS/MS) have been widely used for the determination of mycotoxins in food<sup>20</sup>, including peanut and their derivative products<sup>24,15,25,26</sup>. Regarding the methods used for sample treatment, the QuEChERS method (quick, easy, cheap, effective, rugged and safe), developed for analysis of pesticides in fruits and vegetables<sup>27</sup>, has been widely used for the determination of mycotoxins in

food<sup>28,29,30</sup>.

For the simultaneous determination of the six aflatoxins in peanut and their derivative products only one method, utilizing clean-up with a home-made mixed cartridge and analysis by UHPLC-MS/MS, was published<sup>14</sup>.

The aim of this study was, thus, to develop and validate a method to be used in routine analysis of aflatoxins M1, M2, B1, B2, G1, G2 in peanuts and peanuts products. The analytical procedure investigated involved a simultaneous extraction of the aflatoxins and a clean-up step, using a modified QuEChERS procedure. UHPLC-MS/MS was used for the determination of the target compounds. As far as we know, this is the first report describing the use of a triple partitioning modified QuEChERS method for aflatoxins analysis in peanut.

## **Materials and methods**

### **Reagents and chemicals**

Acetonitrile, methanol (HPLC grade) and sodium chloride (>99%) were purchased from J T Baker (Phillipsburg, NJ, USA). Acetic acid (HPLC grade) was supplied by Tedia (Fairfield, Ohio, USA). Anhydrous magnesium sulfate (>95%) was supplied by Caledon Laboratory (Georgetown, Ont., Canada). Hexane (>96%) was obtained from Merck (Darmstadt, Germany). Ultrapure water was obtained from Milli-Q Gradient water system (Millipore, Bedford, MA, USA). The standards (aflatoxins B1, B2, G1, G2, M1 and M2) and ammonium formate (>99%) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

### **Standard solutions preparation**

Individual stock solutions of the aflatoxins were prepared in acetonitrile. The concentrations of the prepared stock solutions ( $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) were checked by UV spectrophotometry. Aliquots of the stock solutions were combined to obtain an intermediate solution in acetonitrile ( $100 \text{ ng mL}^{-1}$ ) for all target aflatoxins. The working solutions were also prepared in acetonitrile by serial dilutions of the intermediate solution. The solutions were stored at  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  until used. To prepare the matrix-matched calibration curves, working solution aliquots were evaporated to dryness and then resuspended with the same volume of uncontaminated sample extracts (blank matrices).

### Sample treatment

To 5 g of the sample, weighed in a 50 mL centrifuge tube, were added 10 mL of ultrapure water, 10 mL of hexane and 15 mL of acetonitrile; the tube was then shaken for 30 s; a mixture of 4 g of magnesium sulphate and 1.5 g of sodium chloride was added, the tube was immediately shaken vigorously using a vortex for 1 min and then centrifuged at 3000 rpm for 7 min. An aliquot of 5 mL of the acetonitrile phase was evaporated to dryness under a gentle flow of nitrogen at 45 °C and then the residue was dissolved with 2 mL of methanol/water (1:1, v/v). The solution thus obtained was filtered through a 0.22 µm polyethylene filter before injection.

### UPLC-MS/MS analysis

Liquid chromatography was performed using an ACQUITY UPLC™ system (Waters). A BEH C18 column (100 mm x 2.1 mm i.d., 1.7 µm particle size; Waters, Milford, MA, USA) was used as the stationary phase. The column temperature was maintained at 35 °C. Methanol (Phase B) and aqueous solution of ammonium formate (5 mM) (Phase A) were used as mobile phases. Mobile phase B increased linearly from 10% to 100% in 4 min and then was held constant for 1.5 min. The system was then re-equilibrated for 2 min at the initial mobile phase composition. The flow rate was set at 0.3 mL min<sup>-1</sup>. The injection volume was 5 µL.

The detection was performed in positive mode using a tandem mass spectrometer (Waters, Quattro Premier XE) with electrospray ionization interface. The source parameters were capillary voltage 3.5 kV, extractor voltage 3 V, rf lens 0.1 V, multiplier 750 V, desolvation temperature 350 °C, source temperature 120 °C. Nitrogen was used as cone and desolvation gas at a flow of 50 L h<sup>-1</sup> and 750 L h<sup>-1</sup>, respectively. Argon was used as collision gas at a pressure of 4 x 10<sup>-3</sup> mbar. The two ion transitions selected for each aflatoxin and acquisition conditions performed are show in Table 1. For all aflatoxins the dwell time was 200 ms. The interchannel delay and interscan delay were both 5 ms.

Table 1: The selected ion transitions and acquisition MS/MS parameters.

	Quantification transitions	Confirmation transitions	Collision energy* (eV)	Cone voltage (V)
Aflatoxin M2	331.3 > 273.3	331.3 > 285.2	25 / 20	45
Aflatoxin M1	329.2 > 259.2	329.2 > 273.2	25 / 20	50
Aflatoxin G2	331.3 > 313.3	331.3 > 245.3	25 / 30	40
Aflatoxin G1	329.2 > 243.2	329.2 > 311.2	25 / 20	45
Aflatoxin B2	315.2 > 259.0	315.2 > 287.0	30 / 25	50
Aflatoxin B1	313.0 > 269.2	313.0 > 285.2	35 / 25	40

\*Values are given in the order: quantification transition ion / confirmation transition ion.

## Peanut Samples

Eight samples of peanut roasted and two samples of raw peanuts samples were purchased from local supermarkets in Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

## Results and discussion

### UPLC-MS/MS optimization

The MS/MS conditions were optimized by continuous infusion of individual working standard solutions (1000 ng mL<sup>-1</sup>) in ESI positive mode. The cone voltage was optimized and the protonated precursor ion [M+H]<sup>+</sup> were selected for all compounds. Collision energies were applied to obtain the fragment ions. Then, the collision energies were optimized for each transition and the two more intense product ions were selected in the MS acquisition method (quantification and confirmation transitions ions). The capillary voltage was optimized by injection of the compounds in the chromatographic system. The capillary voltage selected was 3.5 kV, which provided satisfactory sensibility for all compounds. Dwell times were optimized in order to obtain satisfactory reproducibility and sensibility.

The sensibility and peak separation of the mycotoxins were evaluated using acetonitrile and methanol as the mobile phases. Greater sensibility and good peak shape for target compounds were achieved using methanol as mobile phase. Aflatoxins M1 and G2 peaks could not be separated in the optimized chromatographic conditions. However, these substances could be detected due to the high selectivity of mass spectrometry.

The effect on the sensitivity of substances due to addition of ammonium

formate and ammonium acetate in the mobile phase, which avoid stable adducts formation, was also evaluated. In all cases the sensitivity was higher using ammonium formate in the mobile phase.

### **Optimization of the sample preparation procedure**

The sample preparation method used in this study was based on a procedure reported by Przybylski et al. (2009)<sup>31</sup>. The mentioned authors introduced a water, acetonitrile and hexane partitioning extraction in QuEChERS method to reduce the extraction of lipophilic components of the samples.

The optimization of the method was performed using peanut samples (5 g) fortified with target aflatoxins in the intermediate concentration level used in the validation step (5 ng g<sup>-1</sup>). The efficiency of extraction for two solvents (15 mL of acetonitrile and 1% of acetic acid in acetonitrile) was evaluated. Acetonitrile was selected as the extraction solvent because no co-elution of matrix-interfering compounds were observed and the recoveries were considered satisfactory for all analytes studied (70 to 120%). The co-elution of matrix-interfering compounds, mainly for aflatoxin M<sub>2</sub>, and unsatisfactory recoveries (<70% for aflatoxins B<sub>1</sub> and G<sub>1</sub>; >120% for aflatoxins M<sub>1</sub> and G<sub>2</sub>) were observed using 1% acetic acid in acetonitrile. To remove lipid globules observed in the acetonitrile extracting phase, the effects of the addition of different volumes of hexane (5 and 10 mL) were evaluated. The addition of 10 mL of hexane was finally chosen because it was found to remove the lipid globules without losing the analytes. Attempting to decrease the LOD of the method, an aliquot of 5 mL of acetonitrile extract was concentrated to dryness and the residue thus obtained dissolved by using a 50/50 (v/v) methanol/water mixture. This mixture of solvents was found to affect favorably the shape of the peaks and to avoid loss of the target compounds associated with matrix precipitation and filtration.

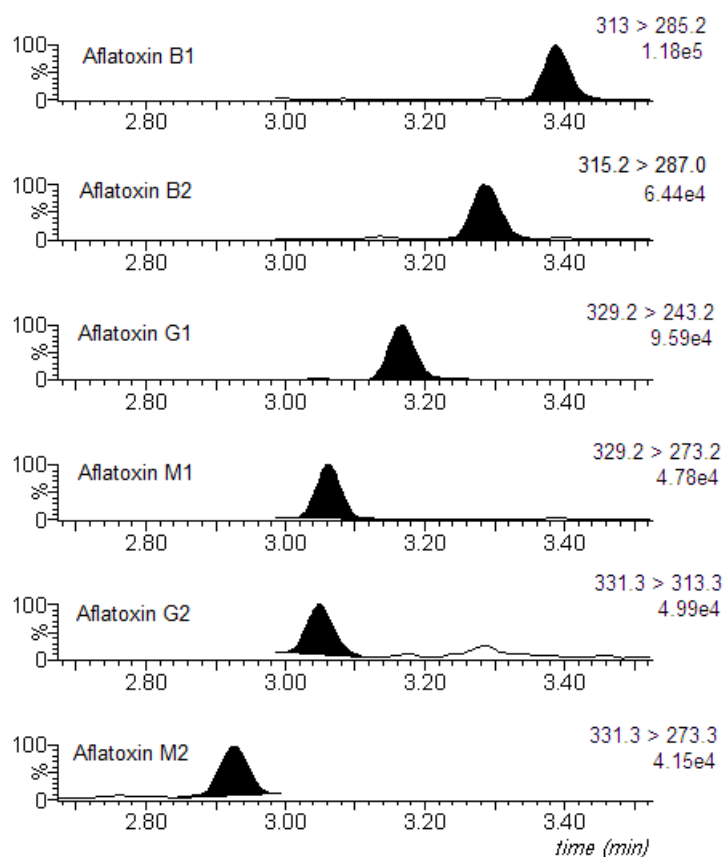
### **Validation of the analytical method**

Single laboratory validation was performed by evaluating of the following analytical performance parameters: selectivity, linearity, trueness (recovery),

precision (repeatability and intermediate precision), limit of detection (LOD), and limit of quantification (LOQ).

The selectivity of the method was evaluated analyzing blank matrices (raw peanuts, skinless peanuts and roasted peanuts). The absence of interference signals eluting at the same analytes retention time was verified in all matrices. The identification of the aflatoxins was performed by comparison of retention time and signal intensity ratios of the two ion transitions monitored. The Figure 1 shows the chromatograms of the studied aflatoxins in roasted peanut.

**Figure 1:** Chromatogram (quantification transitions) of the aflatoxins in the fortified roasted peanut ( $2.5 \text{ ng g}^{-1}$ ).



Liquid chromatography with tandem mass spectrometry detection is a powerful analytical technique for detection and quantification of analytes in complex matrices. However, it is known that using this technique the analyte signals are highly susceptible to matrix effect (signal suppression or enhancement) in the presence of co-eluting matrix components. To investigate



the matrix effect, the matrices peanut, peanut skinless and peanut roasted were selected. The calibration curves of each matrix selected and calibration curve in solvent (methanol/water (1:1 v/v)) were prepared in duplicate at concentration ranges from 0.15 to 15 ng mL<sup>-1</sup>. The solutions were analysed in triplicate and ordinary least squares regression was applied for the elaboration of the calibration curve.

The calibration curve slopes were compared by analysis of covariance (ANCOVA), considering a significance level of 5%<sup>32,33,34</sup>. As premise for comparison of calibration curves by ANCOVA, it is necessary to check if the residual variances of the calibration curves are homogeneous. The residual variances were checked by Levene`s test, considering a significant level of 5%. The homogeneity of all the calibration curves was confirmed ( $p$ -values>0.05)<sup>35</sup>. Then, the slopes of the calibration curves of each matrix studied were compared with the slopes of the calibration curves in solvent. There were significant differences between the slopes of the calibration curves prepared in solvent and matrices for the majority of the target compounds, except for the aflatoxins M1 and M2 in peanut and peanut roasted ( $p$ -value > 0.05). The slopes of the calibration curves prepared in matrices were also compared in order to find out a possible representative matrix-matched calibration. There were significant differences between the calibration curves for the target aflatoxins ( $p$ -value < 0.05). Therefore, matrix-matched calibration was used for quantification of the aflatoxins in routine analyses.

Table 2 shows the values of matrix effects for aflatoxins in the three matrices studies. The numerical values were calculated by Equation 1, where Slope<sub>solvent</sub> is the slope of the calibration curve in solvent and Slope<sub>matrix</sub> is the slope of the matrix-matched calibration (positive values indicate signal enhancement and negative values indicate signal suppression).

$$\text{Matrix Effect (\%)} = (\text{Slope}_{\text{solvent}} - \text{Slope}_{\text{matrix}} / \text{Slope}_{\text{solvent}}) \times 100 \quad \text{Equation 1}$$

Table 2. Matrix effects (%) for aflatoxins in evaluated matrices

Aflatoxins	Matrix effects (%) <sup>a</sup>		
	Peanut	Peanut (skinless)	Peanut (roasted)
M2	-7	16	-6
M1	2	15	6
G2	-26	-29	-42
G1	-39	-34	-33
B2	-36	-24	-42
B1	-23	-14	-26

<sup>a</sup>Signal enhancement (+); Signal suppression (-)

Due to the presence of significant matrix effects for some mycotoxins, linearity was evaluated using matrix-matched calibration curves with three triplicates of six calibration levels between 0.15 and 15 ng mL<sup>-1</sup>. Ordinary least squares regression was applied for the elaboration of the calibration curve. The resulting linear coefficients were always greater than 0.99. The recovery and precision (repeatability) were evaluated using peanut (blank matrix) spiked with the aflatoxins at 3 levels (ng g<sup>-1</sup>) with four replicates for each level. The results are reported in Table 2, in which the precision is expressed by the relative standard deviation (RSD) and trueness by the recovery values. The recovery values ranged from 71 to 101%, with RSD lower than 13% for all mycotoxins and in the concentration levels evaluated, showed good trueness and precision of the developed method (European Commission Decision 2002/657/EC (EC, 2002)<sup>36</sup>. The intermediary precision (evaluated in three different days) was evaluated using the intermediate concentration level (5 ng g<sup>-1</sup>) and satisfactory results were obtained for all target analytes with RSD in the range of 4.8 and 15.1 %.

Samples spiked with all the target aflatoxins in lower concentration level were used to calculate the limits of detection (LOD) and limits of quantification (LOQ), considering signal-to-noise ratios of 3 and 10, respectively. The summary results are shown in Table 3.

Table 3: Limits of detection, limits of quantification, recovery and precision values obtained in the validation.

Afl.	LOD	LOQ	<sup>a</sup> RSD	1 ng g <sup>-1</sup> (n= 4)		5 ng g <sup>-1</sup> (n= 4)		10 ng g <sup>-1</sup> (n= 4)	
				Rec	<sup>b</sup> RSD	Rec	<sup>b</sup> RSD	Rec	<sup>b</sup> RSD
M2	0,06	0,19	5,4	100.3	12.4	91.3	6.9	82.6	10.7
M1	0,14	0,48	11,9	87.2	9.9	76.4	4.8	74.9	4.1
G2	0,26	0,88	6,0	98.9	10.7	93.8	3.9	85.6	4.5
G1	0,03	0,10	15,1	98.5	1.6	83.1	2.7	79.3	3.8
B2	0,21	0,69	7,3	86.8	8.0	77.7	5.2	71.3	2.1
B1	0,13	0,43	4,8	89.8	4.9	84.9	1.5	83.5	2.0

0.5, 2.5 and 5 ng g<sup>-1</sup> for the aflatoxins M1 and M2; Afl.: aflatoxins; Rec: recovery; <sup>a</sup>RSD: relative standard deviation (intermediate precision); <sup>b</sup>RSD: relative standard deviation (repeatability); LOD: limit of detection (ng g<sup>-1</sup>); LOQ: limit of quantitation (ng g<sup>-1</sup>)

### Sample analyses

The validated method was applied to the determination of aflatoxins in commercial peanut samples. The results are shown in Table 4. Total aflatoxins concentration value was found to exceed the Brazilian maximum permitted level (20 ng g<sup>-1</sup>) in one sample of roasted peanuts.

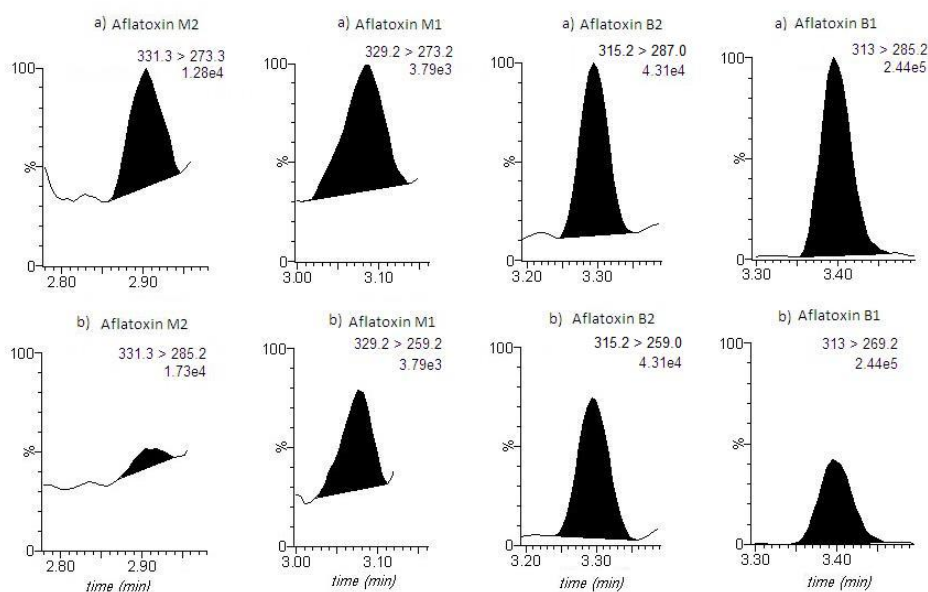
Table 4: Aflatoxin concentration in peanut samples.

Analyzed samples	Aflatoxins (ng g <sup>-1</sup> )					
	M <sub>2</sub>	M <sub>1</sub>	G <sub>2</sub>	G <sub>1</sub>	B <sub>2</sub>	B <sub>1</sub>
Peanut (roasted)#1	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Peanut (roasted)#2	nd	nd	nd	1.03	>LOD	2.34
Peanut (roasted)#3	0.98	0.53	nd	nd	2.78	10.20
Peanut (roasted)#4	nd	0.55	nd	nd	4.08	23.59
Peanut (roasted)#5	nd	nd	nd	nd	nd	0.44
Peanut (roasted)#6	nd	>LOD	nd	>LOD	0.70	2.82
Peanut (roasted)#7	nd	nd	nd	nd	>LOD	1.54
Peanut (roasted)#8	nd	nd	nd	nd	nd	>LOD
Peanut (raw)#1	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Peanut (raw)#2	nd	nd	nd	nd	nd	nd

nd: not detected; LOD: limit of detection

The aflatoxins M1 and M2 were detected respectively in three and one of the samples, highlighting the importance of the multiresidue method developed. A chromatogram for a sample naturally contaminated with aflatoxins M2, M1, B2 and B1 is shown in Figure 2.

**Figure 2:** Chromatogram of a roasted peanut sample naturally contaminated by aflatoxins M2 ( $0.98 \text{ ng g}^{-1}$ ), M1 ( $0.53 \text{ ng g}^{-1}$ ), B2 ( $2.78 \text{ ng g}^{-1}$ ) and B1 ( $10.20 \text{ ng g}^{-1}$ ) corresponding to: a) quantification transitions, b) confirmation transitions.



## Conclusions

A suitable modified QuEChERS method for analysis of aflatoxins M1, M2, B1, B2, G1, G2 in peanut by UPLC-MS/MS was developed and validated. The method may be very useful for the quality control of peanut and peanut products in which it concerns aflatoxins as it involves a very simple simultaneous extraction / clean-up step followed by concentration of the extract. The validated method was successfully applied to the determination of aflatoxins in ten peanut samples. The results strongly suggest that peanuts as well as peanut products should be continuously monitored for the aflatoxins investigated in this work. The sample treatment method here proposed might be a powerful approach for the determination of aflatoxins in other food matrices.

## References

1. Bennett JW, Klich M. Mycotoxins. *Clin. Microbiol. Rev.* 2003, 16(3):497-516.
2. Williams JH, Phillips TD, Jolly PE, Stiles JK, Jolly CM, Aggarwal D. Human aflatoxicosis in developing countries: a review of toxicology, exposure, potential health consequences, and interventions. *Am. J. Clin. Nutr.* 2004, 80:1106–22.
3. Fung F, Clark RF. Health effects of mycotoxins: a toxicological overview. *J. Toxicol. Clin. Toxicol.* 2004, 42 (2): 217–234.
4. Shephard GS. Impact of mycotoxins on human health in developing countries *Food Addit. Contam.* 2008, 25 (2): 146–151.
5. International Agency for Research on Cancer (IARC). *Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*, IARC, Lyon, 2002, 81:171 - 300.
6. European Commission (EC) No 1881/2006 of 19 December 2006, as amended, on Setting Maximum Levels for Certain Contaminants in Foodstuffs. *Offic. J. Eur. Union.* 2006, 364: 5-24.
7. Van Egmond HP, Schothorst RC, Jonker MA. Regulations relating to mycotoxins in food: perspectives in a global and European context. *Anal. Bioanal. Chem.* 2007, 389: 147-157.
8. Food and Agriculture Organization of the United States (FAO). Worldwide regulations for mycotoxins in food and feed in 2003. *FAO Food and Nutrition Paper 81*. Rome, Italy, 2004.
9. 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 República Federativa do Brasil*, Brasília, 2011, 46: 66-67.
10. Peraica M, Radic B, Lucic A, Pavlovic M. Toxic effects of mycotoxins in humans. *Bulletin of the World Health Organization*, 1999, 77 (9): 754-766.
11. Dors GC, Caldas SS, Feddern V, Bemvenuti RH, Hackbart HCS, Souza MM, et al. (2011). Aflatoxins: Contamination, Analysis and Control. In: Guevara-González RG. (Ed), *Aflatoxins- Biochemistry and Molecular Biology*, InTech, 415-438, Available from, [http://cdn.intechopen.com/pdfs/20401/InTech-Aflatoxins\\_contamination\\_analy-sis\\_and\\_control.pdf](http://cdn.intechopen.com/pdfs/20401/InTech-Aflatoxins_contamination_analy-sis_and_control.pdf), (accessed 28 August 2014).
12. Bräse S, Encinas A, Keck J, Nising CF. Chemistry and Biology of Mycotoxins and Related Fungal Metabolites. *Chem. Rev.* 2009, 109: 3903-3990.

13. Filazi A, Sireli UT. Occurrence of Aflatoxins in Food, Aflatoxins - Recent Advances and Future Prospects, Prof. Razzaghi-Abyaneh M. (Ed.), ISBN: 978-953-51-0904-4, *InTech*, 2013. Available from: <http://www.intechopen.com/books/aflatoxins-recent-advances-and-future-prospects/occurrence-of-aflatoxins-in-food>.
14. Ren Y, Zhang Y, Shao S, Cai Z, Feng L, Pan H, Wang Z. Simultaneous determination of multi-component mycotoxin contaminants in foods and feeds by ultra-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J.chromatogr. A*. 2007, 1143:1-2: 48-64.
15. Huang B, Han Z, Cai Z, Wu Y, Ren Y. Simultaneous determination of aflatoxins B1, B2, G1, G2, M1 and M2 in peanuts and their derivative products by ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta*. 2010, 662: 62-68.
16. Ezekiel CN, Sulyok M, Warth B, Odebode AC, Krska R. Natural occurrence of mycotoxins in peanut cake from Nigeria. *Food Control*. 2012, 27 (2): 338–342.
17. Vesonder R, Haliburton J, Stubblefield R, Gilmore W, Peterson S. *Aspergillus flavus* and aflatoxins B1, B2, and M1 in corn associated with equine death. *Arch Environ. Contam. Toxicol*. 1991, 20(1):151-3.
18. Shotwell OL, Goulden ML, Hesseltine CW. Aflatoxin M1. Occurrence in stored and freshly harvested corn. *J. Agric.Food Chem*. 1976, 24(3): 683-684.
19. Han Z, Zheng Y, Luan L, Cai Z, Ren Y, Wu Y. An ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for simultaneous determination of aflatoxins B1, B2, G1, G2, M1 and M2 in traditional Chinese medicines. *Anal. Chim. Acta*. 2010, 664 (2): 165-171.
20. Krska R, Schubert-Ullrich P, Molinelli A, Sulyok M, MacDonald S, Crews C. Mycotoxin analysis: An update. *Food Addit. Contam. Part A*. 2008, 25(2): 152-163.
21. Cigić IK, Prosen H. An Overview of Conventional and Emerging Analytical Methods for the Determination of Mycotoxins. *Int. J. Mol. Sci*. 2009, 10: 62-115.
22. Köppen R, Koch M, Siegel D, Merkel S, Maul R, Nehls I. Determination of mycotoxins in foods: current state of analytical methods and limitations. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. 2010, 86(6):1595-612.
23. Saeger, S. Determining Mycotoxins and Mycotoxigenic Fungi in Food and Feed. Woodhead Publishing Series in Food Science, *Technology and Nutrition*: Number 203. Published by Woodhead Publishing Limited, Cambridge, UK, 2011.

24. Spanjer MC, Rensen PM, Scholten JM. LC-MS/MS multi-method for mycotoxins after single extraction, with validation data for peanut, pistachio, wheat, maize, cornflakes, raisins and figs. *Food Addit. Contam. Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess.* 2008, 25(4):472-89.
25. Ediage EN, Mavungu JDD, Monbaliu S, Peteghem CV, Saeger SD. A Validated Multianalyte LC–MS/MS Method for Quantification of 25 Mycotoxins in Cassava Flour, Peanut Cake and Maize Samples *J. Agric. Food Chem.* 2011, 59(10): 5173–5180.
26. Škrbić B, Živančev J, Godula M. Multimycotoxin analysis of crude extracts of nuts with ultra-high performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *J. Food Comp. Anal.* 2014, 34(2): 171–177.
27. Anastassiades M, Lehotay SJ, Stajnbaher D, Scheck FJ. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and "dispersive solid-phase extraction" for the determination of pesticide residues in produce. *J. AOAC Int.* 2003, 86: 412.
28. Desmarchelier A, Oberson JM, Tella P, Gremaud E, Seefelder W, Mottier P. Development and Comparison of Two Multiresidue Methods for the Analysis of 17 Mycotoxins in Cereals by Liquid Chromatography Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry.; *J. Agric. Food Chem.* 2010, 58: 7510–7519.
29. Vaclavik L, Zachariasova M, Hrbek V, Hajslova J. Analysis of multiple mycotoxins in cereals under ambient conditions using direct analysis in real time (DART) ionization coupled to high resolution mass spectrometry. *Talanta* 82 (2010) 1950-1957.
30. R. Romero-González, A. Garrido Frenich, J.L. Martínez Vidal, O.D. Prestes, S.L. Grió.; Simultaneous determination of pesticides, biopesticides and mycotoxins in organic products applying a quick, easy, cheap, effective, rugged and safe extraction procedure and ultra-high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 1218 (2011) 1477–1485.
31. C. Przybylski, C. Segard. Method for routine screening of pesticides and metabolites in meat based baby-food using extraction and gas chromatography-mass spectrometry *J. Sep. Sci.* 2009, 32: 1858-1867.
32. Campana AMG, Rodriguez LC, Luis, Juan, AM. Chemometric protocol to validate an analytical method in the presence of corrigible constant and proportional systematic errors. *J.AOAC Int.* 1997, 80: 7-64.
33. Rodriguez LC, Campana AMG, Eva LA, Francisco JEG, Lourdes CCM, Antonia GF, Luis MVJ. Correction function on biased results due to matrix effects Application to the routine analysis of pesticide residues. *Anal. Chim. Acta.* 2003, 478(2): 281-301.

34. Frenich AG, Vidal JLM, González RR, Luiz MMA. Simple and high-throughput method for the multimycotoxin analysis in cereals and related foods by ultra-high performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Food Chem.* 2009, 117 (4): 705-712.

35. Brown BM, Forsythe AB. Robust tests for the equality of variances. *Journal of the American Statistical Association.* 1974, 69(346): 364-367.

36. European Commission (EC); Commission decision 2002/657/EC of 12 August 2002 - Implementing Council Directive 96/23/EC concerning performance of analytical methods and the interpretation of result. *Official Journal of the European Communities*, L 221/8, Brussels, 2002.



### **4.3 MANUSCRITO 3: SURVEY OF AFLATOXINS M1, M2, B1, B2, G1, G2 AND OCHRATOXIN A IN INFANT FORMULAS FROM RIO DE JANEIRO, BRAZIL, USING A MODIFIED QUECHERS METHOD AND ULTRA-HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY-TANDEM MASS SPECTROMETRY**

André Victor Sartori, Maria Heloísa Paulino de Moraes, Rosana Pereira dos Santos, Yuri Pereira de Souza, Armi Wanderley da Nóbrega

#### **ABSTRACT**

The aim of this study was to determine the contamination levels of aflatoxins M1, M2, G1, G2, B1 and B2 and Ochratoxin A in 92 commercial infant formulas powders samples available in the Rio de Janeiro market, Brazil using a sensitive modified *Quick Easy Cheap Effective Rugged and Safe* (QuEChERS) method and ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UHPLC-MS/MS) for sample analysis. Ochratoxin A and aflatoxins B1, B2, G1 and G2 were not detected in the analyzed samples. Aflatoxin M1 was detected ( $\geq$  limit of detection, LOD) in 13 analyzed samples (14.1%) and quantified ( $\geq$  limit of quantification, LOQ) in 5 analyzed samples (5.4%) at concentration levels ranging from 0.021 to 0.044  $\mu\text{g kg}^{-1}$  and average concentration of 0.026  $\mu\text{g kg}^{-1}$ . The concentration of aflatoxin M1 found in one analyzed sample (0.044  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) exceeds the limit allowed by European Union regulation (0.025  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ). The results of this study may subsidize public health authorities in setting regulations for the control of aflatoxin M1 in infant formulas.

Keywords: aflatoxin, ochratoxin A, infant formula, UHPLC-MS/MS

#### **PRACTICAL APPLICATIONS**

This study reports the results of the first survey on the contamination of aflatoxins M1, M2, B1, B2, G1, G2 and Ochratoxin A in commercial infant formulas in Brazil. A suitable method for routine analysis of target compounds by modified QuEChERS method and UHPLC-MS/MS was validated. The results here reported suggests that the contamination of infant formulas with aflatoxin M1 is an important issue and should be regulated by public health authorities.

## Introduction

Mycotoxins are a diverse group of toxic compounds produced as secondary metabolites of certain fungus and they are found as contaminants in foods and feeds worldwide. Aflatoxins B1, B2, G1 and G2 are classified by the International Agency for Research in Cancer as human carcinogens; aflatoxin M1 and ochratoxin A are classified as possible human carcinogens (IARC, 1993). The aflatoxins M1 and M2 are hydroxylated metabolites eliminated into milk of lactating animals that consume aflatoxins B1 and B2 contaminated feed (Peraica et al., 1999).

Exclusive breast-feeding is considered to be the ideal nutritional practice for infants up to six months old. It is recommended to introduce gradually complementary foods to the diet of the infants (WHO, 2001, Brasil, 2008). Despite of the unquestionable nutritional benefits of this practice, complementary foods, including infant formulas, may expose infants to chemical contaminants such as mycotoxins. Since infants are considered to be more susceptible than adults to chemical contaminants, the safety of foods consumed by infants is a priority public health issue (Sherif et al., 2009).

Aflatoxin M1 is the mycotoxin most surveyed in milk and infant formulas worldwide. High occurrence for aflatoxin M1 have been found in infant formulas (Kanungo, Bhand, 2014; Zhang et al., 2013; Londoño et al., 2013; El-Tras et al., 2011; Beltran et al., 2011; Gomez-Arranz, Navarro-Blasco, 2010; Oveisi et al 2007; Rastogi et al., 2004; Kim et al., 2000). In addition to aflatoxin M1, ochratoxin A (Meucci et al., 2010; Alvito et al., 2010; Baydar et al., 2007) and aflatoxins B1, B1, B2, G1 and G2 (Alvito et al., 2010; Baydar et al., 2007; Mushtaq et al., 2012) have been also found in infant formulas.

In Brazil, many studies indicated the high occurrence of aflatoxin M1 in milk (Shundo et al., 2009; Oliveira et al., 2006); the presence of aflatoxin B1 in milk also has been shown (Scaglioni et al., 2014). However, few studies have investigated the presence of mycotoxins in infant formulas in Brazil. Iha et al. (2013) investigated aflatoxin M1 in seven samples of infant formulas in Brazil; the authors did not find the aflatoxin M1 in the analyzed samples.

High-performance liquid chromatography (HPLC), with detection by fluorescence (HPLC/F), as well as enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), were used by several authors to determine micotoxins in infant

formulas (Alvito et al., 2010; Meucci et al., 2010; Kim et al., 2000; Gómez-Arranz, Navarro-Blasco, 2010; Baydar et al., 2007; Kim et al., 2000; Oveisi et al., 2007; Rastogi et al., 2004; El-Tras et al., 2011). Most recently, HPLC tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS) has been used frequently for the same purpose (Zhang et al., 2013).

The so called QuEChERS method, originally used on analyzing for pesticides in fruits and vegetables (Anastassiades et al., 2003), has been extended more recently used to the determination of mycotoxins in food (Desmarchelier et al., 2010; Romero-Gonzalez et al., 2011; Tamura et al., 2011; Desmarchelier et al., 2014). To the best of our knowledge, the QuEChERS extraction method so far was not used in the determination of mycotoxins in infant formula.

The aim of this study was thus to investigate the presence of aflatoxins M2, M1, G2, G1, B2, and B1 and ochratoxin A in several brands of infant formulas sold in the market of Rio de Janeiro, Brazil. The samples were analyzed using a modified *Quick Easy Cheap Effective Rugged and Safe* (QuEChERS) method and ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (UHPLC-MS/MS).

## **Materials and methods**

### **Reagents and chemicals**

The mycotoxin standards (aflatoxins B1, B2, G1, G2, M1, M2 and ochratoxin A) and ammonium formate (purity > 99%) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Acetonitrile, methanol (HPLC-grade) and sodium chloride (purity > 99%) were purchased from J T Baker (Phillipsburg, NJ, USA). Acetic acid (purity > 99%) was supplied by Tedia (Fairfield, Ohio, USA). Anhydrous magnesium sulfate (for analysis) was supplied by Merck (Darmstadt, Germany). Hexane (purity > 96%) was obtained from Merck (Darmstadt, Germany). Ultrapure water was obtained from Milli-Q Gradient water system (Millipore, Bedford, MA, USA).

### **Standard solutions preparation**

An ochratoxin A stock solution ( $40 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) was prepared in a toluene-acetic acid (99:1 v/v) mixture; stock solutions of each aflatoxin ( $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ )

were prepared in acetonitrile. The concentrations of the stock solutions were determined by UV spectrophotometry (Horwitz, Latimer, 2005). More diluted individual solutions ( $200 \text{ ng mL}^{-1}$ ) of micotoxins other than ochratoxin A were prepared by dilution of the  $10 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$  stock solutions with acetonitrile. On preparing a  $200 \text{ ng mL}^{-1}$  solution of ochratoxin A, an aliquot of a  $40 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$  ochratoxin A stock solution was evaporated and an appropriated volume of acetonitrile added to obtain a  $200 \text{ ng mL}^{-1}$  stock solution. All stock solutions were stored at  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ . Aliquots of aflatoxins and ochratoxin A solutions ( $200 \text{ ng mL}^{-1}$ ) were combined and the volume adjusted with acetonitrile to obtain an intermediate multimycotoxin solution at a concentration of  $20 \text{ ng mL}^{-1}$ . These solutions were prepared weekly and stored at  $-18 \text{ }^\circ\text{C}$ .

### **Sample preparation**

For sample preparation, the method reported by Sartori et al., 2015 with some modifications was used. To 1.5 g of the sample, weighed in a 50 mL centrifuge tube, 15 mL of ultrapure water was added and the tube vigorously shaken until complete dissolution of the sample. Hexane (10 mL) and 15 mL of 1% acetic acid in acetonitrile were added, and the contents of the tube shaken for 30 s; magnesium sulphate (6 g) and sodium chloride (1.5 g) were added, the tube immediately shaken using a vortex (IKA Works) for 1 min and then centrifuged (HIMAC CF 7D2, Hitachi) at 3000 rpm for 7 min. An aliquot of 10 mL of the acetonitrile phase was evaporated to dryness under a gentle flow of nitrogen at  $45 \text{ }^\circ\text{C}$  (Turbo-Vac LV) and then the residue was dissolved with 1 mL of methanol/water (1:1, v/v). The solution thus obtained was filtered through a  $0.22 \text{ } \mu\text{m}$  polyethylene filter before injection.

### **Infant formula samples**

A total of ninety-two (92) samples of infant formula powders from five different producers, representing thirty-one different brands, were purchased randomly in local supermarkets and drug stores in Niterói and Rio de Janeiro, RJ, Brazil from May 2011 to August of 2013. The samples were classified according the information in the labels supplied by the producers as starter infant formulas ( $n=45$ , intended for infants aged up to 6 months) and follow-on infant formula ( $n=47$ , intended for infants older than 6 months). Aliquots (50 g)

of commercial samples were transferred to plastic containers and stored at -20 °C until analysis.

### **UHPLC-MS/MS analysis**

Liquid chromatography was performed using an ACQUITY UPLC™ system (Waters). A BEH C18 column (100 mm x 2.1 mm i.d., 1.7 µm particle size) was used as the stationary phase. The column temperature was maintained at 35 °C. Methanol (Phase B) and aqueous solution of ammonium formate 5 mM/acetic acid 1 % (Phase A) were used as mobile phases. Mobile phase B increased from 10 % to 100% in 4 min and then held constant for 1.5 min. The system was then re-equilibrated for 2 min in initial mobile phase composition. The flow rate was set at 0.3 mL min<sup>-1</sup>. The injection volume was 10 µL using full loop mode.

The detection was performed using a tandem quadrupole mass spectrometer (Waters, Quattro Premier™ XE) equipped with an electrospray ionization (ESI) source operated in positive mode. The source parameters were capillary voltage 3.5 kV, extractor voltage 3 V, rf lens 0.1 V, multiplier 750 V, desolvation temperature of 350 °C, source temperature of 120 °C. Nitrogen was used as cone and desolvation gas at a flow of 50 L h<sup>-1</sup> and 750 L h<sup>-1</sup>, respectively. Argon was used as collision gas at a pressure of 4 x 10<sup>-3</sup> mbar. The two ion transitions selected for each mycotoxin and acquisition conditions performed are shown in Table 1. The analytes were allocated in three acquisition time windows as follows: aflatoxin M2 (1); other aflatoxins assessment (2) and ochratoxin A (3). For ochratoxin A and aflatoxin M2 the dwell time was 200 ms and for all other aflatoxins was 30 ms. Interchannel delay and interscan delay were both 5 ms.

**Table 1:** The selected ion transitions and acquisition MS/MS parameters.

Mycotoxins	Retention time (min)	Quantifier transition ion (Q) (m/z)	Qualifier transition ion (q) (m/z)	Q/q <sup>a</sup>	Collision energy (eV) <sup>b</sup>	Cone voltage (V)
Aflatoxin M2	2.85	331.3 > 273.3	331.3 > 285.2	1.97 (± 0.39)	25 / 20	45
Aflatoxin M1	2.99	329.2 > 273.2	329.2 > 259.2	2.20 (± 0.55)	20 / 25	50
Aflatoxin G2	3.00	331.3 > 313.3	331.3 > 245.3	1.76 (± 0.35)	25 / 30	40
Aflatoxin G1	3.11	329.2 > 243.2	329.2 > 311.2	1.61 (± 0.32)	25 / 20	45
Aflatoxin B2	3.23	315.2 > 287.0	315.2 > 259.2	1.17 (± 0.23)	25 / 30	50
Aflatoxin B1	3.35	313.0 > 285.2	313.0 > 269.2	1.90 (± 0.38)	25 / 35	40
Ochratoxin A	4.16	404.2 > 239.2	404.2 > 358.2	1.78 (± 0.36)	25 / 15	25

<sup>a</sup> Relative ion transitions intensities (Q/q) and maximum permitted tolerances (given in bracket).

<sup>b</sup> Values are given in the order quantifier transition ion / qualifier transition ion.

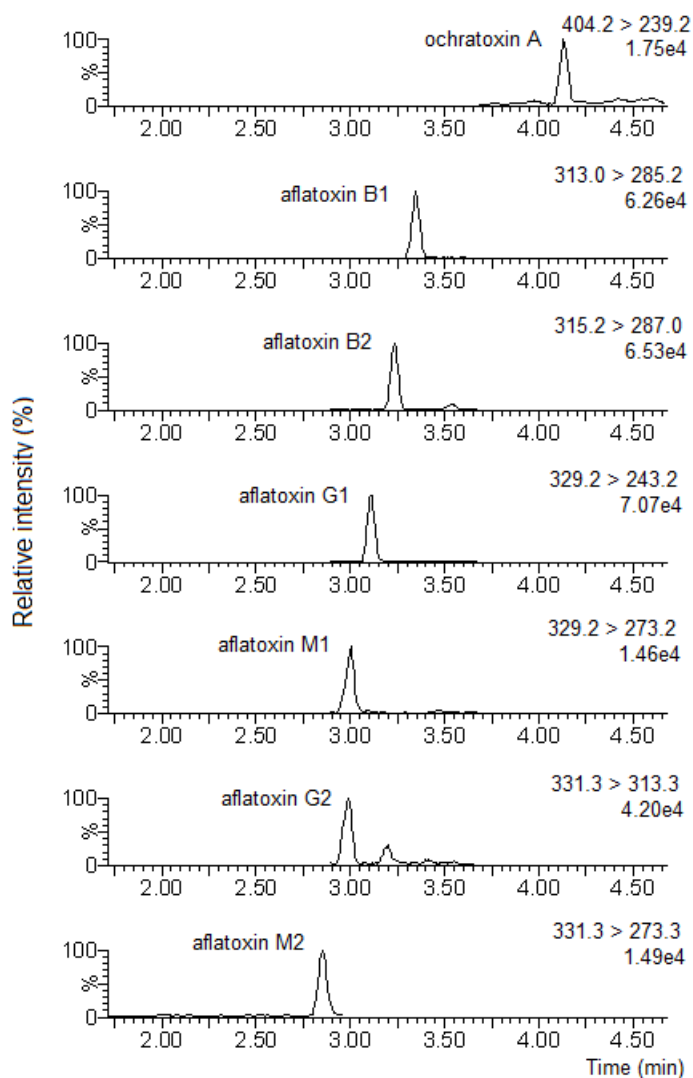
## Results and discussion

### Validation of the analytical method

Method validation was performed by evaluating of the following analytical performance parameters: selectivity, matrix-effect, linearity, trueness (recovery), precision (intra-day and inter-day repeatability), limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ).

The selectivity of the method was evaluated by analyzing matrix blank samples of whole powdered milk and different infant formulas types. For all matrices evaluated, the absence of interference signals eluting at the same retention time of the selected mycotoxins was verified. Figure 1 shows a chromatogram of a follow-on formula spiked with the target compounds in 0.15  $\mu\text{g kg}^{-1}$  (concentration of infant formulas reconstituted with water). The identification of the mycotoxins was performed by comparing the analyte retention time in samples with those obtained using standard solution. The confirmation was performed by comparing the signal intensity ratios of the two ion transitions of each analyte in the sample with those obtained using standard solution (Table 1).

**Figure 1:** Chromatogram of a follow-on formula spiked with the target compounds in  $0.15 \mu\text{g kg}^{-1}$  (concentration of infant formulas reconstituted with water).



To investigate matrix effects, whole powdered milk and infant formulas of different producers available on the local market (started milk based infant formula,  $n=3$ ; milk based follow on infant formula,  $n=3$ ; lactose free infant formula,  $n=2$ ) were selected. Calibration curves for the target compounds in matrix extracts (matrix-matched calibration) and in methanol/water (1:1 v/v) were prepared at four concentration levels, ranging from 0.1 to  $1.5 \text{ ng mL}^{-1}$ ; each solution was then analyzed in triplicate. The calibration curve slopes were compared by analysis of covariance (ANCOVA), considering a significance level of 5% (García-Campaña et al., 1997). Prior to performing the analysis by ANCOVA, the homogeneity of the residual variances of all the calibration curves

was confirmed ( $p$ -values  $> 0.05$ ) using a modified Levene test (Brown and Forsythe, 1974). A strong suppression of the analytical signal was observed for the target mycotoxins in soy based infant formula matrix. Therefore, the analytical method was considered inadequate to be used in the determination of target mycotoxins in soy based infant formula samples.

It can be seen that for ochratoxin A and aflatoxin M1, there were no significant differences between the slopes of the calibration curves for all evaluated matrices and the slope of the calibration curve in solvent ( $p$ -values  $> 0.05$ ). An absence of matrix effects for those compounds in all studied matrices was thus observed. However, there were significant differences between the slopes of the calibration curves prepared in solvent and matrices for at least two of the target aflatoxins in each studied matrix ( $p$ -values  $< 0.05$ ).

Matrix effects for the target compounds in different matrices are shown in Table 2 where positive values indicate signal enhancement and negative values indicate signal suppression.



**Table 2:** Matrix effects evaluation for infant formula and powdered milk.

Mycotoxins	Milk-based infant formulas (started) n= 4			Milk-based infant formulas (follow-on) n= 3			Milk-based infant formulas (lactose free) n=2			Powdered Milk (whole) n=1		<sup>c</sup> (p-value)
	<sup>a</sup> (p-value)	<sup>b</sup> (p-value)	Matrix Effect (%)	<sup>a</sup> (p-value)	<sup>b</sup> (p-value)	Matrix Effect (%)	<sup>a</sup> (p-value)	<sup>b</sup> (p-value)	Matrix effect (%)	<sup>b</sup> (p-value)	Matrix effect (%)	
Aflatoxin M2	0.07	0.00	39	0.09	0.00	75	3.03	0.00	29	0.00	74	0.00
Aflatoxin M1	0.72	0.07	8	0.84	0.29	11	2.03	0.26	6	0.22	4	0.89
Aflatoxin G2	0.32	0.12	-6	0.73	0.08	9	3.85	0.98	0	0.01	-12	0.00
Aflatoxin G1	0.07	0.00	-17	0.18	0.07	-5	0.19	0.02	-8	0.00	-29	0.00
Aflatoxin B2	0.10	0.00	-15	0.79	0.38	-5	0.25	0.00	-11	0.00	-24	0.00
Aflatoxin B1	0.16	0.00	-11	0.06	0.00	-10	0.13	0.01	-6	0.00	-19	0.00
Ochratoxin A	0.18	0.20	6	0.33	0.51	-2	1.34	0.25	3	0.71	5	0.72

<sup>a</sup> Obtained by analysis of covariance comparing the slopes of the calibration curves prepared for each matrix (different producers); <sup>b</sup> obtained by analysis of covariance comparing the slopes of the matched calibration matrix with the slopes of the calibration curve in solvent; <sup>c</sup> obtained by analysis of covariance comparing all the slopes of the calibration curves prepared in matrix. *p*-Value > 0.05, there is no significant difference between the slopes of the calibration curves evaluated with a level of confidence of 95%.

The linearity of the calibration curves used in routine analysis was evaluated using matrix-matched calibration curves in four concentration levels between 0.1 and 1.5 ng mL<sup>-1</sup> and then the solutions were analysed in triplicate. Ordinary least squares method was applied for the elaboration of the calibration curves. The resulting correlation coefficients were always greater than 0.99. The linearity was assessed according to the procedure described by Souza & Junqueira (2005). As assumptions for regression analysis, the homocedasticity, the independency and the normality of the regression residuals were checked. Initially, the outliers were successively investigated by Jackknife standardised residuals test (Belsley et al., 1980) until outliers were not detected or a maximum exclusion of 22.2% in the number of original results (Horwitz, 1995). The homocedasticity of residuals, checked by modified Levene test (Brown, Forsythe, 1974), was confirmed ( $p$ -values > 0.05). The independency of residuals, checked by Durbin-Watson statistic (Durbin, J. & Watson, 1951), was confirmed ( $p$ -values > 0.05). The normality of residuals, checked by Ryan-Joiner test (Ryan, Joiner, 1976), was confirmed ( $p$ -values > 0.05). The regression significance and the lack-of-fit were performed by analysis of variance (ANOVA) (Draper, Smith, 1998). A high regression significance ( $p$ -values < 0.001) and the lack-of-fit not significant ( $p$ -values > 0.05) were observed, attesting the linearity of the calibration curves studied.

The trueness and intra-day precision were evaluated by recovery studies using follow on infant formula spiked with the mycotoxins at three concentration levels (0.05, 0.1 and 0.15 µg kg<sup>-1</sup>, with four replicates for each level. The result values are shown in Table 3, where the precision is expressed by the relative standard deviation (RSD) and trueness by the recovery values. The results were evaluated according to the European Commission Decision 2002/657/EC (EC, 2002). The recovery values ranged from 75 to 111 %, with RSD lower than 12% for all mycotoxins studied. The RSD for intermediate precision (inter day) was also lower than 12%. Hence, the method showed good trueness and precision for the concentration levels evaluated.

Infant formulas spiked with all the target mycotoxins at concentrations of 0.05 µg kg<sup>-1</sup>, were used to calculate the limits of detection (LOD) and limits of quantification (LOQ), considering signal-to-noise ratios of 3 and 10, respectively. The summary results are shown in Tables 3. The sensitivity of the validated method was considered adequate for routine analysis. The LOQ of the method for the aflatoxins B1, B2, G1 and G2 were much lower than Brazilian maximum limit (1 µg kg<sup>-1</sup>) for total aflatoxins (sum of the aflatoxins B1, B2, G1 and

G2) in infant formulas. The LOQ obtained for aflatoxin M1 ( $0.016 \mu\text{g kg}^{-1}$ ) was lower than the limit of restriction set by the EU regulation ( $0.025 \mu\text{g kg}^{-1}$ ) for infant formulas (EC, 2006) and comparable with the  $0.01 \mu\text{g kg}^{-1}$  reported by Zhang et al. (2013) which uses centrifugal filter molecular weight cutoff in the sample treatment step and HPLC-MS/MS.

**Table 3:** Parameters of validation of the method for infant formulas.

Mycotoxins	LOD	LOQ	$0.05 \mu\text{g kg}^{-1}$			$0.1 \mu\text{g kg}^{-1}$		$0.15 \mu\text{g kg}^{-1}$	
			Rec	<sup>a</sup> RSD	<sup>b</sup> RSD	Rec	<sup>a</sup> RSD	Rec	<sup>a</sup> RSD
Aflatoxin M2	0.003	0.011	89.0	3.1	4.6	87.3	2.0	95.4	7.4
Aflatoxin M1	0.005	0.016	88.5	8.2	7.9	110.6	3.9	99.1	10.1
Aflatoxin G2	0.008	0.028	103.1	5.0	13.5	85.3	7.3	88.0	6.9
Aflatoxin G1	0.002	0.008	83.5	7.4	10.8	79.6	2.5	79.8	7.5
Aflatoxin B2	0.004	0.012	92.1	5.9	4.88	87.6	4.9	91.4	4.9
Aflatoxin B1	0.004	0.013	104.0	6.2	12.1	93.5	2.9	98.3	2.3
Ochratoxin A	0.018	0.059	75.0	12.2	10.3	107.5	4.3	97.3	11.7

LOD, Limit of detection ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ); LOQ, Limit of Quantification ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ); Concentration of infant formulas reconstituted with water; Rec(%), recovery; <sup>a</sup>RSD (%) relative standard deviation (intra-day, n=4); <sup>b</sup>RSD (%) relative standard deviation (inter-day, n=4 days).

### Sample analysis

The validated method was applied to the determination of aflatoxins M1, M2, G1, G2, B1, B2 and ochratoxin A in 92 infant formulas samples.

In order to protect public health, regulations to control aflatoxin M1 contamination level in milk and infant formula have been established in several countries (EC, 2006; FAO, 2004). The current regulation in Brazil, RDC n<sup>o</sup> 7/2011, set the maximum limit of  $1 \mu\text{g kg}^{-1}$  for total aflatoxins (sum of G2, G1, B1 and B2) in started infant formula and follow-on formula. The limit allowed for aflatoxin M1 in infant formula and follow on formula has not been established in Brazil (Brasil, 2011). For evaluation of contamination of the samples it was considered the reconstitution stated on the formula containers and the limits according to EU regulation.

Aflatoxin M1 was found in 13 (14.1%) of the analyzed samples. Incidences of aflatoxin M1 in infant formulas ranging from 1% to 86% have been reported previously (Meucci et al., 2010; Beltran et al., 2011; Alvito et al., 2010; Baydar et al., 2007; Gómez-Arranz, Navarro-Blasco, 2010; Kim et al. 2000 and Zhang et al., 2013). In five (5.4%) of the analyzed samples,

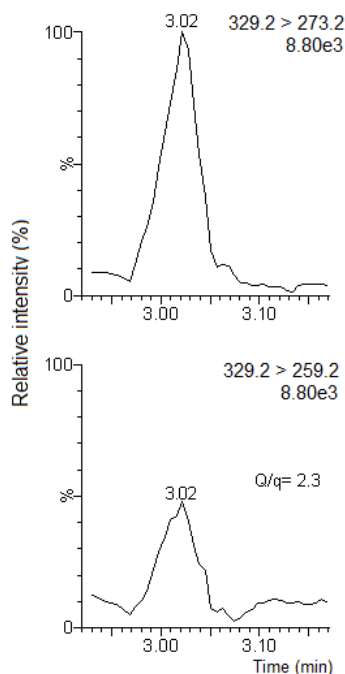
aflatoxin M1 was found at concentration levels ranging from 0.021 to 0.044  $\mu\text{g kg}^{-1}$ . The concentration level found for one sample of follow-on formula (0.044  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) exceeded the maximum level permitted set by EU regulation (0.025  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ).

The maximum aflatoxin M1 concentration found in samples was similar to the 0.041  $\mu\text{g kg}^{-1}$  reported by Alvito et al. (2010) and greater than the 0.012 and 0.006  $\mu\text{g kg}^{-1}$  reported respectively by Gómez-Arranz and Navarro-Blasco (2010) and Beltran et al. (2011).

The average aflatoxin M1 concentration found in this study (0.026  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ), whereas in calculating the values of the samples with concentrations  $\geq$  LOQ, was lower than the 0.06  $\mu\text{g kg}^{-1}$  reported by Kim et al. (2000) and Baydar et al. (2007) and higher than the 0.0031  $\mu\text{g kg}^{-1}$  reported by Gómez-Arranz and Navarro-Blasco (2010).

The Figure 2 shows the chromatograms for one of the samples naturally contaminated by aflatoxins M1 (0.044  $\mu\text{g/kg}$ ). The other mycotoxins investigated were not detected in the analyzed samples.

**Figure 2:** Chromatograms of a sample of follow on infant formula naturally contaminated by aflatoxin M1 (0.044  $\mu\text{g/kg}$ ).



## Conclusions

A suitable modified QuEChERS method for analysis of aflatoxins M1, M2, B1, B2, G1,

G2 and ochratoxin A in infant formulas was validated. The method is sensitive and fast, involving a simple simultaneous extraction and clean-up followed by concentration of extract and analysis by UHPLC-MS/MS. The validated method was applied to the determination of mycotoxins in infant formulas from metropolitan region of Rio de Janeiro, RJ.

The present study is the first report of the contamination of infant formulas by aflatoxin M1 in Brazil. The samples analyzed in this study can be considered according to the EU regulation, the exception of one sample of infant follow-on formula.

Contamination results found in this study demonstrate the importance of conducting monitoring studies to support the discussion about the possible regulation of aflatoxin M1 in infant formulas in Brazil.

## References

Alvito, P.C.; Sizoo, E.A.; Almeida, C.M.M.; van Egmond, H.P. Occurrence of aflatoxins and ochratoxin A in baby foods in Portugal. *Food Analytical Methods*, 3: 22–30, 2010.

Anastassiades, M.; Lehotay, S.J.; Stajnbaher, D.; Scheck, F.J. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and "dispersive solid-phase extraction" for the determination of pesticide residues in produce. *J. AOAC Int.* 86: 412, 2003.

Baydar, T.; Erkekoglu, P.; Sipahi, H.; Sahin, G. Aflatoxin B1, M1 and Ochratoxin A Levels in Infant Formulae and Baby Foods Marketed in Ankara, Turkey. *Journal of Food and Drug Analysis*, Vol. 15, No. 1, Pages 89-92, 2007.

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

Beltran, E.; Ibanez, M.; Sancho, J.V.; Cortes, M.A.; Yusa, V.; Hernandez, F. UHPLC–MS/MS highly sensitive determination of aflatoxins, the aflatoxin metabolite M1 and ochratoxin A in baby food and milk. *Food Chemistry*, 126 (2), 737-744, 2011.

Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 7, de 18 do fevereiro de 2011. Dispõe sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília, 2011, 46: 66-67.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. *Protocolos do Sistema de Vigilância Alimentar e Nutricional – SISVAN na assistência à saúde / Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica.* – Brasília : Ministério da Saúde, 2008.

Brown, B.M., Forsythe, A.B. Robust tests for the equality of variances. *Journal of the American Statistical Association* 69: 364-367, 1974.

Desmarchelier, A.; Tessiot, S.; Bessaire, T.; Racault, L.; Fiorese, E.; Urbani, A.; Chan, W.C.; Cheng, P.; Mottier, P. Combining the quick, easy, cheap, effective, rugged and safe approach and clean-up by immunoaffinity column for the analysis of 15 mycotoxins by isotope dilution liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A*. 1337:75-84, 2014.

Desmarchelier, A.; Oberson, J.M.; Tella, P.; Gremaud, E.; Seefelder, W.; Mottier, P. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 7510, 2010.

Draper, N.; Smith, H. *Applied regression analysis*. New York: Wiley, 706 p., 1998.

Durbin, J.; Watson, G.S. Testing for serial correlation in least squares regression ii. *Biometrika*, 38, 1-2, 159-178, 1951.

EC (European Commission). Commission decision 2002/657/EC of 12 August 2002 - Implementing Council Directive 96/23/EC concerning performance of analytical methods and the interpretation of result. *Official Journal of the European Communities*, L 221/8, Brussels, 2002.

EC (European Commission). No 1881/2006 of 19 December 2006, as amended, on Setting Maximum Levels for Certain Contaminants in Foodstuffs. *Offic. J. Eur. Union*. 2006, 364: 5-24.

El-Tras, W.F.; El-Kady, N.N.; Tayel, A.A. Infants exposure to aflatoxin M1 as a novel foodborne zoonosis. *Food and Chemical Toxicology*, 49, 2816-2819, 2011.

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

García-Campaña, A.; Cuadros-Rodríguez, L.; Aybar-Muñoz, J.; Alés-Barrero, F. Chemometric protocol to validate an analytical method in the presence of corrigible constant and proportional systematic errors. *Journal of AOAC International* 80: 657-664, 1997.

Gómez-Arranz, E.; Navarro-Blasco, I. Aflatoxin M1 in Spanish infant formulae: occurrence and dietary intake regarding type, protein-base and physical state. *Food additives & contaminants. Part B, Surveillance*, Vol.3(3), pp.193-9, 2010.

Horwitz, W.; Latimer, G.W. *Official methods of analysis of AOAC International*, AOAC International, Gaithersburg, Md., 2005.

Horwitz, W. Protocol for the design, conduct and interpretation of method-performance studies. *Pure Appl. Chem.*, v. 67, n. 2, p. 331343, 1995

IARC (International Agency for Research on Cancer). World Health Organization (WHO). IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to human, Lyon, France, 56, 245, 1993.

Iha, M.H., Barbosa, C.B.; Okada, I.A.; Trucksess, M.W. Aflatoxin M1 in milk and distribution and stability of aflatoxin M1 during production and storage of yoghurt and cheese. *Food Control*, 29, 1-6, 2013.

Kanungo, L.; Bhand, S. A survey of Aflatoxin M1 in some commercial milk samples and infant formula milk samples in Goa, India. *Food and Agricultural Immunology*. Volume 25, Issue 4, 2014.

Kim, E.K.; Shon, D.H.; Ryu, D.; Park, J.W.; Hwang, H.J.; Kim, Y.B. Occurrence of aflatoxin M1 in Korean dairy products determined by ELISA and HPLC. *Food Additives and Contaminants*, Vol.17 (1), pp.59-64, 2000.

Londoño, V.A.G; Boasso, A.C.; de Paula, M.C.Z.; Garcia, L.P.; Scussel, V.M.; Resnik, S; Pacín, A. Aflatoxin M1 survey on randomly collected milk powder commercialized in Argentina and Brazil. *Food Control*, Volume 34, Issue 2, 752–755, 2013.

Meucci, V.; Razzuoli, E.; Soldani, G.; Massart, F. Mycotoxin detection in infant formula milks in Italy. *Food Additives and Contaminants*, Vol. 27, No. 1, 64–71, 2010.

Mushtaq, M.; Sultana, B.; Anwar, F.; Khan, M.Z.; Ashrafuzzaman, M. Occurrence of Aflatoxins in selected processed foods from Pakistan. *Int. J. Mol. Sci.* 13, 8324-8337, 2012.

Oliveira, C.A.; Rosmaninho, J.; Rosim, R. Aflatoxin M1 and cyclopiazonic acid in fluid milk traded in Sao Paulo, Brazil. *Food Additives and Contaminants*, 23, 196, 2006.

Oveisi, M.R.; Jannat, B.; Sadeghi, N.; Hajimahmoodi, M.; Nikzad, A. Presence of aflatoxin M1 in milk and infant milk products in Tehran, Iran. *Food Control*, 18(10), 1216-1218, 2007.

Peraica, M.; Radic, B.; Lucic, A.; Pavlovic, M. Toxic effects of mycotoxins in humans. *Bulletin of the World Health Organization*, 77 (9): 754-766, 1999.

Rastogi, S.; Dwivedi, P. D.; Khanna, S. K.; Das, M. Detection of Aflatoxin M1 contamination in milk and infant milk products from Indian markets by ELISA. *Food Control*, 15, 287-290, 2004.

Romero-Gonzalez, R.; Frenich, A.G.; Vidal, J.L.M.; Prestes, O.D.; Grió, S.L. Simultaneous determination of pesticides, biopesticides and mycotoxins in organic products applying a quick, easy, cheap, effective, rugged and safe extraction procedure and ultra-high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1218, 1477-1485, 2011.

Ryan, T.A.; Joiner, B.L. Normal probability plots and tests for normality. The State College: Pennsylvania State University, 1976.

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*, Published on line: 19 February 2015 (DOI 10.1007/s12161-015-0128-4).

Scaglioni, P.T; Becker-Algeri, T.; Drunkler, D.; Badiale-Furlong, E. Aflatoxin B1 and M1 in milk. *Analytica Chimica Acta*, 829, 68–74, 2014.

Sherif, O.S.; Salama, E.E.; Abdel-Wahhab. Mycotoxins and child health: the need for health risk assessment. *Int. Journal of Hygiene and Environmental Health*, 212 (4), 347-368, 2009.

Shundo, L.; Navas, S.A.; Lamardo, L.C.A; Ruvieri, V.; Sabino, M. Estimate of aflatoxin M1 exposure in milk and occurrence in Brazil. *Food Control*, Volume 20, Issue 7, Pages 655–657, 2009.

Souza, S.V.C; Junqueira, R.G. A procedure to assess linearity by ordinary least squares method. *Analytica Chimica Acta*, 552(1-2): 25-35, 2005.

Tamura, M.; Uyama, A.; Mochizuki, N. Development of a multi-mycotoxin analysis in beer-based drinks by a modified QuEChERS method and ultra-high-performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *Anal Sci.*, 27(6):629-35, 2011.

WHO. World Health Organization. Infant and Young Child Nutrition. Fity-Fourth World Health Assembly, WHA54.2. Geneva: World Health Organization; 2001.

Zhang, K.; Wong, J. W.; Hayward, D. G.; Vaclavikova, M.; Liao, C-D.; Trucksess, M. W. Determination of mycotoxins in milk-based products and infant formula using stable isotope dilution assay and liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.*, 2013, 61 (26), pp 6265–6273.



#### **4.4 MANUSCRITO 4: DETERMINAÇÃO DE MICOTOXINAS EM MINGAU A BASE DE CEREAIS PARA CONSUMO INFANTIL POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ULTRA-EFICIÊNCIA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS SEQUENCIAL**

André Victor Sartori, Maria Heloísa Paulino de Moraes, Rosana Pereira dos Santos, Yuri Pereira de Souza, Armi Wanderley da Nóbrega

##### **RESUMO**

Foi desenvolvido e validado um método analítico para determinação de aflatoxinas M2, M1, G2, G1, B2, B1, desoxinivalenol, ocratoxina A, fumonisinas B1 e B2, fumonisinas hidrolisadas B1 e B2, zearalenona e esterigmatocistina em mingau à base de cereais para consumo infantil por cromatografia líquida de ultra-eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial. No tratamento das amostras foi utilizado um procedimento relativamente simples onde se utilizou extração com mistura de solventes e etapas rápidas de agitação e sonificação, sem a utilização de etapas posteriores de limpeza dos extratos. Recuperações consideradas satisfatórias (63,5 a 113,2%) e desvios padrão relativos inferiores a 20% foram obtidos para todas as substâncias. Limites de quantificação para as micotoxinas alvo entre 0,14 µg/kg (esterigmatocistina) e 6,73 µg/kg (desoxinivalenol) foram observados. O método validado foi aplicado na determinação das micotoxinas em amostras de mingau à base de cereais para consumo infantil adquiridas na região metropolitana do Rio de Janeiro, RJ. Em 21 (25,0%) das amostras analisadas o nível de contaminação encontrado excedeu o limite máximo permitido pela legislação vigente no Brasil para pelo menos uma das micotoxinas investigadas.

## Introdução

As micotoxinas são substâncias tóxicas produzidas naturalmente como metabólitos secundários por diversos fungos filamentosos. Encontradas como contaminantes de alimentos em todo o mundo, as micotoxinas têm causado perdas econômicas significativas para a agricultura e problemas para a saúde pública (Chu, 1991, Murphy et al., 2006). A *International Agency for Research on Cancer (IARC)* classificou as aflatoxinas como carcinógenos para humanos e a ocratoxina A e a fumonisina B1 como possíveis carcinógenos para humanos (Peraica et al., 1999; IARC, 1993; IARC, 2002).

A verificação do atendimento das normas oficiais estabelecidas para o controle de micotoxinas em alimentos requer o uso de métodos analíticos confiáveis. Vários caminhos analíticos têm sido empregados para a determinação de micotoxinas em alimentos (Krska et al., 2008; Cigić, Prosen, 2009; Köppen et al., 2010; Saeger, 2011; Turner et al, 2009). Nos últimos anos, a cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial (CLAE-EM/EM) e, mais recentemente, a cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial (CLUE-EM/EM), incluindo a espectrometria de massas de alta resolução, têm sido amplamente utilizadas para a determinação de micotoxinas em diferentes alimentos (Krska et al., 2008; Fang et al., 2013; Jia et al., 2014; Zachariasova et al., 2010; Rubert et al., 2012a).

A seletividade das técnicas mencionadas anteriormente tem permitido a análise simultânea de diferentes classes de micotoxinas em diversos tipos de alimentos empregando procedimentos relativamente simples no preparo das amostras (Sulyok et al., 2007; Mol et al., 2008; Frenich et al., 2009; Lacina et al., 2012). Em contraste, os métodos relatados para determinação de micotoxinas em alimentos para consumo infantil têm utilizado etapas de limpeza dos extratos e/ou procedimentos de tratamento das amostras sofisticados (Zhang et al., 2014; Rubert et al., 2012b), com poucas exceções (Kostelanská et al., 2010).

A contaminação de alimentos a base de cereais para consumo infantil por micotoxinas tem sido reportada em vários estudos (Lombaert et al., 2003; Tam et al., 2006; Gottschalk et al., 2009; Beltran et al., 2011; Kostelanská et al., 2010; Rubert et al., 2012(b); D'Arco et al., 2008; Mahnine et al., 2012; Zhang et al., 2014; Juan et al., 2014; Kabak, 2009; Baydar et al., 2007; Ozden et al., 2012; Araguás et al., 2005; Alvito et al., 2010; Romagnoli et al., 2010; Cano-Sancho et al., 2011).

No Brasil, foi constatada elevada ocorrência de micotoxinas em vários cereais,

inclusive naqueles utilizados como base na produção de alimentos destinados ao consumo infantil (Maziero, Bersot, 2010). No entanto, poucos estudos destinados à determinação de micotoxinas em alimentos à base de cereais para consumo infantil têm sido reportados no Brasil (Castro et al., 2004; Caldas, Silva, 2007).

O objetivo deste estudo foi desenvolver e validar um método analítico adequado para a determinação de micotoxinas em mingau a base de cereais para consumo infantil empregando a CLUE-EM/EM. O método analítico foi aplicado na determinação de micotoxinas em 84 amostras de mingau a base de cereais para consumo infantil coletadas na região metropolitana do Rio de Janeiro, RJ.

## **Materiais e métodos**

### **Reagentes e solventes**

Acetonitrila e metanol (HPLC-grade) foram obtidos da J T Baker (Phillipsburg, NJ, USA). Formiato de amônio (>99%) e ácido fórmico (para espectrometria de massas) foram obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Hexano (> 96%) foi obtido da Merck (Darmstadt, Germany). Água ultra-pura foi obtida através de sistema Milli-Q Gradient (Millipore, Bedford, MA, USA).

### **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). Soluções estoque de ocratoxina A (40 µg/mL) foram preparadas em solução empregando uma mistura de tolueno-ácido acético como solvente (99:1, v/v). Soluções estoque de esterigmatocistina (10 µg/mL) e de cada aflatoxina (10 µg/mL) 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 µg/mL) em acetonitrila/água 1:1 (v/v) foram obtidas da Fluka/Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Soluções estoque de desoxinivalenol (100 µg/mL) em acetonitrila foram obtidas da Fluka/Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Solução estoque de zearalenona em acetonitrila (100,7 µg/mL) foi obtida da Biopure (Tulln, Austria).

As fumonisinas B1 e B2 hidrolisadas foram preparadas no laboratório através da hidrólise

das fumonisinas B1 e B2 obtidas comercialmente de acordo com o procedimento de Dall'Asta et al. (2009). Uma alíquota (5 mL) de uma solução padrão contendo as fumonisinas B1 e B2 (50 µg/mL) em acetonitrila/água 1:1 (v/v) foi evaporada a securo sob fluxo de N<sub>2</sub> a 40 °C; o resíduo foi redissolvido em 5 mL de solução 2 M de KOH e deixado reagir por 12 h à temperatura ambiente; as fumonisinas hidrolisadas foram então extraídas da solução alcalina por três vezes com 10 mL de acetato de etila; os extratos foram combinados e secos sob fluxo de N<sub>2</sub> e o resíduo redissolvido em 5 mL metanol. As concentrações das formas hidrolisadas foram calculadas considerando-se os fatores de conversão estequiométrica, obtendo-se 28,1 e 27,6 µg/mL para as concentrações de fumonisinas B1 e B2 hidrolisadas, respectivamente. Todas as soluções estoque foram armazenadas a -18 °C.

### **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. Dois gradientes de eluição utilizando diferentes composições de fase móvel foram utilizados para evitar a ocorrência de efeito memória (*carry-over*) na cromatografia e para obter sensibilidade adequada para todas as substâncias alvo.

No gradiente de eluição utilizado para determinação das fumonisinas, fumonisinas hidrolisadas e esterigmatocistina, solução 0,3% de ácido fórmico foi utilizada como fase móvel aquosa, o gradiente de eluição sendo 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.

No gradiente de eluição utilizado 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 7.5 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. Os parâmetros da fonte de ionização otimizados foram: voltagem do capilar (3.5 kV), voltagem do cone extrator

(3 V), *rf lens* (0.1 V), multiplicadora (750 V), temperatura de desolvatação (350 °C), temperatura da fonte (120 °C). 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  $4 \times 10^{-3}$  mbar. As duas transições dos íons selecionadas e as condições de aquisição para as micotoxinas são apresentadas nas Tabelas 1 e 2.

**Tabela 1:** Condições do espectrômetro de massas selecionadas (Fumonisina B1 hidrolisada, Fumonisina B1, Fumonisina B2 hidrolisada, Fumonisina B2, Esterigmatocistina).

Micotoxinas	$t_R$ (min) <sup>a</sup>	Transição de quantificação Q (m/z)	Transição de qualificação q (m/z)	Q/q <sup>b</sup>	Energia de colisão (eV) <sup>c</sup>	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

ESI operado em modo positivo para todas as substâncias; *Interchannel delay* e *interscan delay* foram ambos 0,005 s; <sup>a</sup>Janelas de aquisição demonstradas entre parênteses; <sup>b</sup>Intensidades relativas para as transições dos íons (Q/q) e o máximo de tolerância aceitável para confirmação demonstrado entre parênteses; <sup>c</sup>Valores estão demonstrados na ordem: transição de quantificação / transição de qualificação.

**Tabela 2:** Condições do espectrômetro de massas selecionadas (Desoxinivalenol, Aflatoxina M2, Aflatoxina M1, Aflatoxina G2, Aflatoxina G1, Aflatoxina B2, Ocratoxina A, Zearalenona).

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

ESI operado em modo positivo para todas as substâncias, exceto para a zearalenona; *Interchannel delay* e *interscan delay* foram ambos 0,005 s; <sup>a</sup>Janelas de aquisição demonstradas entre parênteses; <sup>b</sup>Intensidades relativas para as transições dos íons (Q/q) e o máximo de tolerância aceitável para confirmação demonstrado entre parênteses; <sup>c</sup>Valores estão demonstrados na ordem: transição de quantificação / transição de qualificação.

## **Preparo das amostras**

Cada amostra (3 g) foi pesada em tubo de centrífuga 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 centrífuga (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.

## **Coleta das amostras**

Foram adquiridas no mercado da região metropolitana do Rio de Janeiro, RJ, entre os anos de 2012 e 2014, oitenta e quatro (84) amostras de mingau a base de cereais, produzidos por treze (13) diferentes fabricantes e correspondendo a trinta e sete (37) diferentes marcas, sendo classificadas como: mingau a base de milho (n= 30); mingau a base de arroz (n= 20); mingau a base de aveia (n= 7); mingau a base de aveia e arroz (n= 10); mingau a base de trigo (n= 3); mingau a base de multi-cereais (n= 14). As amostras foram armazenadas a -18 °C até a realização das análises.

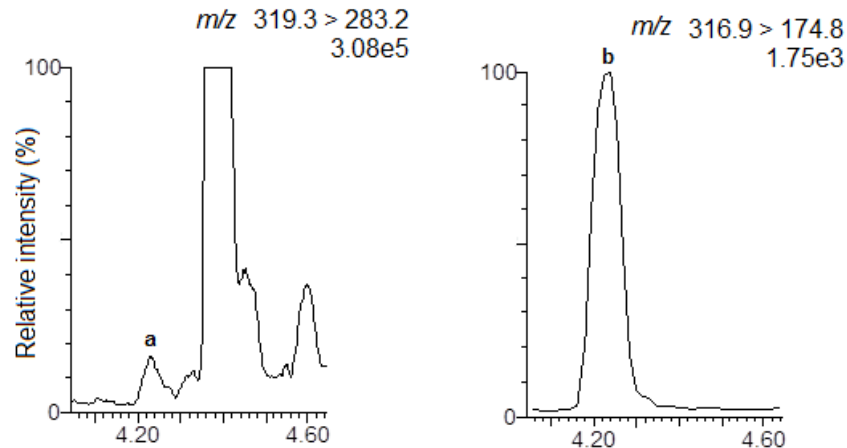
## **Resultados e discussão**

### **Otimização das condições do CLUE-EM/EM**

As condições do espectrômetro de massas foram otimizadas por infusão das soluções padrão individuais em concentrações entre 500 e 1000 ng/mL, usando uma fonte *ESI* operada em ambos os modos de ionização (positivo e negativo). A voltagem do cone foi otimizada para cada substância alvo. Energias de colisão foram otimizadas para cada transição e os dois íons produtos mais intensos foram selecionados para serem usados como as transições de quantificação e confirmação. Para todas as micotoxinas estudadas foram selecionadas transições de íons obtidos no modo positivo, exceto para zearalenona. Para essa micotoxina, as transições obtidas no modo de ionização positivo (319,3> 301,2 e 319,3> 283,2) apresentaram picos cromatográficos interferentes, quando o método de preparação da amostra foi aplicado à amostras de mingau a base de cereais. Assim, as

transições obtidas em modo negativo de ionização foram selecionados obtendo sensibilidade e seletividade satisfatórias (Figura 1).

**Figura 1:** Cromatogramas de uma amostra de mingau a base de aveia e arroz fortificada com a zearalenona (10 µg/kg) demonstrando: a) presença de interferentes da matriz utilizando ionização em modo positivo ( $m/z$  319,3 > 283,2) e b) ausência de interferentes da matriz utilizando ionização em modo negativo ( $m/z$  316,9 > 174,8).



A composição da fase móvel foi estudada com o objetivo de obter picos cromatográficos com formato e sensibilidade adequados para todas as micotoxinas alvo. A presença de efeito memória também foi considerada na avaliação. Metanol foi selecionado para ser utilizado como solvente orgânico já que este solvente proporciona maior sensibilidade para as substâncias de interesse comparado com a acetonitrila. Diferentes proporções do solvente orgânico no gradiente inicial (10, 25, 55 e 60 %), com um gradiente linear terminando em 80 e 90 % de solvente orgânico, bem como a eficiência de diferentes aditivos utilizados em ambas as fases móvel (aquosa e orgânica) ou somente na fase aquosa (formiato de amônio 5 mM, 0,1 % ácido fórmico, 0,3% de ácido fórmico, formiato de amônio 5 mM/0,1% de ácido fórmico, formiato de amônio 5 mM/0,3% de ácido fórmico) foram estudados com o intuito de obter maior sensibilidade e formato adequado dos picos cromatográficos.

Diminuindo a proporção do solvente orgânico na fase móvel inicial foi observado aumento na sensibilidade para as micotoxinas alvo; sensibilidade adequada para as micotoxinas foi obtida utilizando 10 e 25% de fase orgânica no gradiente inicial. Efeito memória considerado insignificante (<1%) foi observado para a ocratoxina A, utilizando estes

métodos. Para o esterigmatocistina foi observado efeito memória (> 3%) utilizando estas condições. Os piores resultados de efeito memória foram observados para as fumonisinas, principalmente para a fumonissina B2, uma vez que esta substância aparece em vários ciclos de injeção após a injeção de uma solução padrão ou de uma amostra contaminada, como também foi observado em estudos reportados anteriormente (Plattner et al., 1999; Tamura et al., 2012). Ausência de efeito memória foi obtida por estas substâncias, utilizando 60% de solvente orgânico no gradiente inicial de fase móvel, solução de ácido fórmico a 0,3% como fase móvel e gradiente linear terminando em 80% de fase orgânica. Como estas condições são inadequadas à análise de todas as substâncias alvo, dois gradientes de eluição foram utilizados. Assim, foram utilizadas as condições descritas acima para determinação das fumonisinas, fumonisinas hidrolisadas e esterigmatocistina. Para a determinação de aflatoxinas M2, M1, B2, B1, G1 e G2, ocratoxina A, desoxinivalenol e zearalenona, 10% de solvente orgânico do gradiente inicial e solução de formato de amônio 5 mM como fase móvel aquosa foram usadas. Assim, foi obtido sensibilidade adequada e ausência de efeito memória significativo para todas as substâncias.

Após seleção da fase móvel, diferentes volumes de injeção (5, 7.5 and 10  $\mu$ L) foram avaliados quanto ao formato dos picos cromatográficos e da sensibilidade do método. No método para determinação de fumonisinas, fumonisinas hidrolisadas e esterigmatocistina um volume de injeção de 5  $\mu$ L foi selecionado apresentando sensibilidade adequada para todas as substâncias. Para o método utilizado na determinação das outras micotoxinas, um volume de injeção de 7.5  $\mu$ L foi o maior volume onde não foi observado presença de problemas cromatográficos, principalmente para o desoxinivalenol e, portanto, este volume foi selecionado.

### **Otimização do método de tratamento das amostras**

Inicialmente foram selecionados alguns métodos descritos na literatura para a determinação simultânea de diferentes classes de micotoxinas em alimentos, que utilizam a extração com solventes sob agitação (Sulyok et al., 2007; Mol et al., 2008; Kostelanská et al., 2010) e o método QuEChERS (Tamura et al., 2011; Lacina et al., 2012). Os procedimentos avaliados foram modificados de modo a reduzir o tempo de análise e aumentar a sensibilidade. Amostras de mingau a base de arroz e aveia fortificadas com as micotoxinas de interesse foram utilizadas na avaliação. Os procedimentos avaliados estão



descritos a seguir.

Procedimento A – QuEChERS (Tamura et al., 2011): 3 g de amostra foram pesados em tubo de centrífuga com 50 mL de capacidade, adicionando-se em seguida 10 mL de água e 10 mL de acetonitrila. Então uma mistura de sais (4 g de sulfato de magnésio, 1 g de cloreto de sódio, 0,5 g de citrato de sódio dibásico sesquihidratado e 1 g de citrato de sódio tribásico dihidratado) foi adicionada, o tubo imediatamente agitado por 1 min e em seguida centrifugado a 3000 rpm por 7 min. Uma alíquota de 3 mL do extrato (acetonitrila) foi evaporada à secura (50 °C) sob fluxo de nitrogênio e os resíduos dissolvidos em 1 mL de metanol/água (1:1, v/v). A solução foi filtrada utilizando filtro de polietileno 0,22 µm antes da injeção.

Procedimento B - QuEChERS (Lacina et al., 2012): 3 g de amostra foram pesados em tubo de centrífuga com 50 mL de capacidade e 10 mL de solução de ácido fórmico 2% e 10 mL de acetonitrila adicionados. Uma mistura de sais (4 g de sulfato de magnésio e 1 g de cloreto de sódio) foi então adicionada, o tubo imediatamente agitado por 1 min e centrifugado a 3000 rpm por 7 min. Uma alíquota de 3 mL do extrato (acetonitrila) foi evaporada à secura (50 °C) sob fluxo de nitrogênio e os resíduos dissolvidos com 1 mL de solução metanol/água (1:1, v/v). A solução foi filtrada utilizando filtro de polietileno 0,22 µm antes da injeção.

Procedimento C - extração com solventes (Sulyok et al., 2007; Kostelanská et al., 2010): 3 g de amostra foram pesados em tubo de centrífuga com 50 mL de capacidade, 5 mL de solução 5% de ácido fórmico e 20 mL de acetonitrila foram adicionados. O tubo foi agitado por 2 min, em seguida sonificado por 10 min e centrifugado a 3000 rpm por 7 min. Uma alíquota de 5 mL do extrato foi evaporada à secura (50 °C) sob fluxo de nitrogênio e os resíduos dissolvidos com 1 mL solução de metanol/água (1:1, v/v). A solução foi filtrada utilizando filtro de polietileno 0,22 µm antes da injeção. Obs: a sonificação foi usada em substituição à agitação por 60 min empregada nos métodos originais.

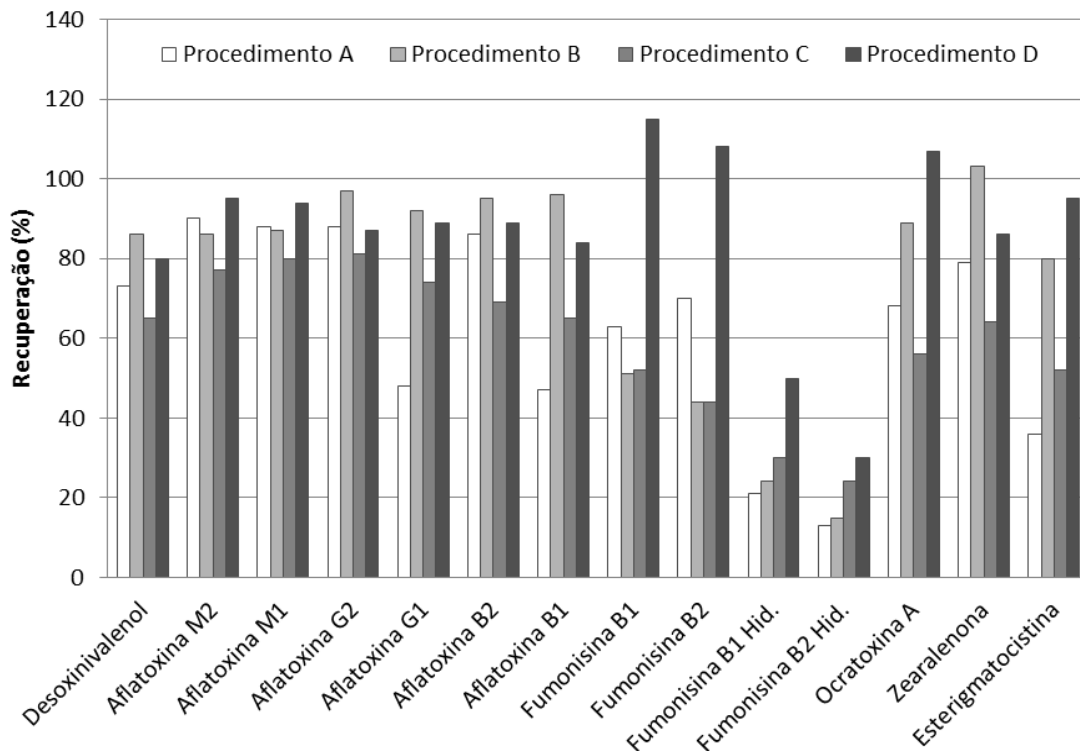
Procedimento D - extração com solventes (Mol et al., 2008): 3 g de amostra foram pesados em tubo de centrífuga com 50 mL de capacidade, 5 mL de água e 15 mL de acetonitrila (1% de ácido fórmico) foram adicionados. O tubo foi agitado por 2 min e em seguida sonificado por 10 min. O tubo foi então centrifugado a 3000 rpm por 7 min. Uma alíquota de 5 mL do extrato foi evaporada à secura (50 °C) sob fluxo de nitrogênio e então os resíduos foram dissolvidos em 1 mL de solução metanol/água (1:1, v/v). A solução foi

filtrada utilizando filtro de polietileno 0,22  $\mu\text{m}$  antes da injeção. Obs: a sonificação foi usada em substituição à agitação por 60 min empregada no método original.

Os resultados obtidos para os procedimentos avaliados são apresentados na Figura 2.

Para todos os procedimentos avaliados foi observado uma recuperação insatisfatória para pelo menos duas substâncias de interesse. Recuperações satisfatórias foram obtidas para todas as micotoxinas de interesse no Procedimento D, exceto para as fumonisinas hidrolisadas. No entanto, os resultados obtidos para os Procedimentos C e D sugerem uma melhor eficiência de extração para as fumonisinas hidrolisadas com o aumento da proporção de água no solvente de extração.

**Figura 2:** Recuperações (%) obtidas para os procedimentos avaliados.



Com base nestes resultados, vários experimentos foram conduzidos com o objetivo de obter um procedimento para a adequada extração das micotoxinas alvo. Amostras de mingau a base de aveia e arroz (3 g) fortificadas com as micotoxinas alvo foram usadas para realização dos experimentos. As recuperações foram determinados utilizando extratos das amostras branco fortificados com as micotoxinas em concentração adequada, evitando a influência do efeito de matriz nos estudos. Um total de 13 procedimentos foram realizados em duplicata, tendo como base os métodos utilizados nos procedimentos C e D, sendo que a

adição simultânea de hexano na etapa de extração também foi avaliada. As condições utilizadas em cada experimento estão apresentadas na Tabela 3.

**Tabela 3:** Condições avaliadas na otimização do método de extração.

Código do procedimento	Volume de hexano adicionado (mL)	Volume de água adicionado (mL)	Ácido Fórmico na água adicionada (%)	Volume de acetonitrila adicionado (mL)	Sonificação/agitação utilizada na extração (min)
P01	-	5	-	10	10 / 0
P02	-	5	-	15	10 / 0
P03	-	5	3	10	10 / 0
P04	-	5	3	15	10 / 0
P05	5	5	-	10	10 / 0
P06	5	5	-	15	10 / 0
P07	5	5	3	10	10 / 0
P08	5	5	3	15	10 / 0
P09	10	5	-	10	10 / 0
P10	10	5	-	15	10 / 0
P11	10	5	3	10	10 / 0
P12	10	5	3	15	10 / 0
P13	5	5	3	10	30 / 30

Os resultados obtidos estão demonstrados na Tabela 4. Para as fumonisinas, recuperações satisfatórias foram obtidas utilizando extrações com adição de ácido nos solventes de extração (experimentos P03, P04, P07, P08, P11, P12 e P13). Em relação às fumonisinas hidrolisadas, foram obtidas recuperações satisfatórias quando o hexano foi usado simultaneamente com o solvente de extração acetonitrila/água (10: 5, v/v) e ácido fórmico (procedimentos P07 e P11). Não foram observadas diferenças significativas quanto a eficiência de extração das fumonisinas hidrolisadas utilizando 5 mL (experimento P07) ou 10 mL (experimento P11) de hexano.

Nos experimentos P01 a P12 foi utilizado sonificação das amostras por 10 min. Como demonstrado nos resultados, os experimentos P07 e P11 apresentaram recuperações satisfatórias para todas as micotoxinas de interesse, no entanto, a condição experimental P07 foi selecionada já que utiliza menor quantidade de hexano. Esta condição experimental foi selecionada para investigar a possível relação do tempo de extração com a eficiência da extração das fumonisinas hidrolisadas. Assim, o tempo de sonificação foi aumentado para 30 min e uma etapa adicional de agitação de 30 min foi realizada (experimento P13). Não foi observada maior eficiência de extração aumentando o tempo de extração. Assim, o procedimento utilizado no experimento P07 foi selecionado para ser validado em nosso estudo.

**Tabela 4:** Resultados de recuperação (%) encontrados na otimização do método de extração.

<b>Código<sup>a</sup></b>	<b>DON</b>	<b>AFM2</b>	<b>AFM1</b>	<b>AFG2</b>	<b>AFG1</b>	<b>AFB2</b>	<b>AFB1</b>	<b>FB1</b>	<b>FB2</b>	<b>HFB1</b>	<b>HFB2</b>	<b>OTA</b>	<b>ZEA</b>	<b>STG</b>
<b>P01</b>	110	112	99	102	112	108	110	45 <sup>b</sup>	59	46 <sup>b</sup>	35 <sup>b</sup>	90	114	102
<b>P02</b>	90	102	82	96	101	92	90	10 <sup>b</sup>	15 <sup>b</sup>	30 <sup>b</sup>	19 <sup>b</sup>	109	92	88
<b>P03</b>	94	101	105	107	100	104	101	105	109	58 <sup>b</sup>	44 <sup>b</sup>	97	108	99
<b>P04</b>	80	95	94	87	89	89	84	115	108	50 <sup>b</sup>	30 <sup>b</sup>	107	86	95
<b>P05</b>	98	119	113	122	123	116	121	21 <sup>b</sup>	32 <sup>b</sup>	60	41 <sup>b</sup>	128	125	118
<b>P06</b>	93	115	142	118	108	110	107	5 <sup>b</sup>	9 <sup>b</sup>	47 <sup>b</sup>	34 <sup>b</sup>	110	106	99
<b>P07</b>	84	105	112	107	109	113	102	95	99	72	63	104	104	91
<b>P08</b>	87	102	98	118	106	105	95	96	106	61	46 <sup>b</sup>	107	84	82
<b>P09</b>	93	103	109	110	119	113	111	28 <sup>b</sup>	59	57	40 <sup>b</sup>	111	113	108
<b>P10</b>	95	120	125	113	114	111	110	5 <sup>b</sup>	10 <sup>b</sup>	45 <sup>b</sup>	34 <sup>b</sup>	131	105	112
<b>P11</b>	100	112	122	113	109	118	101	106	102	77	62	78	127	93
<b>P12</b>	59	78	81	80	69	71	69	71	72	43 <sup>b</sup>	37 <sup>b</sup>	115	78	88
<b>P13</b>	94	104	112	101	99	102	96	113	117	73	57	107	104	94

<sup>a</sup>As condições experimentais estão demonstradas na Tabela 3. <sup>b</sup>Resultados considerados insatisfatórios (<60%). DON: desoxinivalenol; AFM2: aflatoxina M2; AFM1: aflatoxina M1; AFG2: aflatoxina G2; AFG1: aflatoxina G1; AFB2: aflatoxina B2; AFB1: aflatoxina B1; FB1: fumonisina B1; FB2: fumonisina B2; HFB1: fumonisina B1 hidrolisada; HFB2: fumonisin B2 hidrolisada; OTA: ocratoxina A; ZEA: zearalenona; STG: esterigmatocistina.

## Validação do método analítico

O método analítico foi validado 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 mingaus a base de cereais.

Ausência de sinais interferentes que eluem no mesmo tempo dos analitos foi observado para todos os tipos de mingau estudados (milho, aveia, arroz, arroz/aveia e multicereais). As micotoxinas foram identificadas por comparação dos tempos de retenção dos analitos nas amostras com os obtidos utilizando soluções padrão. A confirmação foi feita por comparação das razões das intensidades dos sinais das transições dos íons de cada analito.

A grande variedade de marcas de mingaus disponíveis no mercado bem como a ausência de amostras não contaminadas (branco) para todas as micotoxinas alvo em todas as matrizes de interesse torna inviável a realização de um estudo de efeito matriz incluindo todas as matrizes de interesse. Assim, a extensão do efeito matriz foi estudada utilizando uma amostra branco de mingau a base de aveia e arroz.

Para investigar o efeito matriz curvas de calibração para cada substância alvo em matriz (*matrix-matched calibration*) e em solvente metanol/água (1:1, v/v) foram preparadas em oito níveis de concentração, nas faixas de concentração de 0,25 a 5 ng/mL (aflatoxinas M2, M1, G2, G1, B2, B1 e ocratoxina A), 1 a 20 ng/mL (esterigmatocistina), 5 a 100 ng/mL (fumonisinas B1 e B2 hidrolisadas, desoxinivalenol e zearalenona) e 10 a 200 ng/mL (fumonisinas B1 and B2). As curvas de calibração foram comparadas por análise de covariância (ANCOVA), considerando um nível de significância de 5% (García-Campaña et al., 1997). Como premissa para realização desta análise, a homogeneidade das variâncias dos resíduos de todas as curvas de calibração foram confirmadas ( $p$ -valores  $> 0,05$ ) usando o teste de Levene modificado (Brown, Forsythe, 1974). Através da ANCOVA foi verificada diferença significativa ( $p$ -valores  $< 0,05$ ), entre as inclinações das curvas de calibração construídas em matriz e em solvente para várias micotoxinas alvo, demonstrando que o efeito matriz observado é significativo para essas substâncias.

O fator de diluição do extrato final e o tempo do gradiente de eluição foram estudados com o objetivo de eliminar ou reduzir o efeito matriz observado. O efeito da diluição dos extratos foi estudado usando diferentes proporções de matriz no extrato final (0,1, 0,25, 0,5 e 1 g/mL), mantendo constante a concentração das micotoxinas nos extratos finais. Com o

aumento do fator de diluição dos extratos foi observado diminuição do efeito matriz para a maioria das micotoxinas. No entanto, foi observado efeito matriz significativo (>10%) para a maioria das micotoxinas em todas as diluições estudadas. A influência do aumento no tempo utilizado no gradiente de eluição (4 para 6 min) na extensão do efeito matriz foi estudado. Foi observado uma diminuição na extensão do efeito matriz em até 49% para a maioria das substâncias utilizando o maior tempo de gradiente de eluição estudado. No entanto, como o efeito matriz obtido para essa condição foi ainda significativo (>10 %) para a maioria das substâncias, não justifica um aumento no tempo de análise. Além disso, com o aumento do tempo de gradiente de eluição foi observado perda de intensidade dos sinais cromatográficos entre 20 e 65% comparado ao sinal cromatográfico obtido com o gradiente de eluição mais rápido, prejudicando assim a sensibilidade do método analítico.

Com o objetivo de eliminar o efeito matriz o método de adição padrão foi empregado para quantificação dos analitos quando os limites máximos tolerados foram excedidos bem como quando não foram disponíveis matrizes não contaminadas para preparo das curvas de calibração em matriz (Mavungu et al., 2009; EC, 2014).

A linearidade das curvas de calibração foi avaliada utilizando os mesmos níveis de concentração do estudo de efeito matriz de acordo com o procedimento descrito por 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 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). A significância da regressão e a falta de ajuste foram verificadas pela análise de variância (ANOVA) (Draper, Smith, 1998). Foi verificado 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.

A exatidão e precisão do método analítico foram avaliadas por meio de estudos de recuperação usando amostras branco (mingau a base de aveia e arroz) fortificadas com as

micotoxinas alvo em quatro níveis de concentração, com quatro replicatas para cada nível. Os resultados obtidos estão demonstrados na Tabela 5, onde a precisão é expressa pelo desvio padrão relativo (DPR %) e a exatidão pelos valores de recuperação. Os resultados foram avaliados de acordo com os critérios estabelecidos na UE (EC, 2002; EC, 2006). Os valores de recuperação foram entre 63,5 e 113,2 %, com DPR inferior a 20% para todas as micotoxinas em condições de repetibilidade (mesmo dia e mesmo analista). A precisão intermediária foi realizada através da análise de amostras fortificadas com as mesmas concentrações utilizadas no segundo nível de concentração. Estas amostras foram analisadas em três dias por três analistas diferentes. O DPR obtido para o estudo de precisão intermediária foi menor que 12% para as micotoxinas estudadas. Assim, o método desenvolvido apresentou boa exatidão e precisão nos níveis de concentração avaliados.

Amostras de mingau a base de aveia e arroz fortificadas com as substâncias alvo com os menores níveis de concentração utilizados nos estudos de recuperação descritos anteriormente foram utilizadas para determinar os LD e LQ. Os resultados obtidos estão demonstrados na Tabela 5. A sensibilidade do método proposto foi considerada adequada para análises de rotina, atendendo aos LMT para as micotoxinas regulamentadas em alimentação infantil a base de cereais.

**Tabela 5:** Resultados obtidos na validação do método analítico.

Micotoxinas	LD	LQ	Nível 1		Nível 2			Nível 3		Nível 4	
			Rec	<sup>a</sup> DPR	Rec	<sup>a</sup> DPR	<sup>b</sup> DPR	Rec	<sup>a</sup> DPR	Rec	<sup>a</sup> DPR
Desoxinivalenol	2,02	6,73	99,5	3,1	83,9	12,2	4,7	94,5	20,0	63,5	8,6
Aflatoxina M2	0,11	0,38	86,5	9,6	88,0	9,4	5,7	106,8	16,8	79,5	5,3
Aflatoxina M1	0,08	0,27	88,3	12,9	92,6	9,4	2,1	110,6	19,9	73,0	9,2
Aflatoxina G2	0,25	0,82	75,3	10,5	81,8	6,9	8,2	109,2	17,0	84,6	5,5
Aflatoxina G1	0,16	0,53	83,1	9,7	90,5	9,1	4,3	99,2	13,4	79,5	4,3
Aflatoxina B2	0,14	0,46	110,4	11,2	96,9	5,2	6,0	112,0	18,1	89,4	3,9
Aflatoxina B1	0,07	0,23	90,0	8,1	83,3	7,1	2,8	94,2	17,7	82,4	3,9
Fumonisina B1	0,54	1,81	83,8	5,9	88,4	16,8	9,6	107,5	7,5	103,0	5,3
Fumonisina B2	0,45	1,51	81,9	8,8	85,2	11,8	8,5	113,2	8,5	102,4	3,0
Fumonisina B1 (hidrolizada)	0,95	3,18	93,2	9,5	95,3	5,4	11,6	89,4	7,1	82,5	6,3
Fumonisina B2 (hidrolizada)	0,92	3,07	91,8	14,9	87,8	4,1	9,0	84,6	7,2	76,0	7,3
Ocratoxina A	0,13	0,43	92,3	8,4	99,0	11,8	5,0	106,5	10,7	103,4	5,5
Zearalenona	0,64	2,12	112,3	5,3	85,9	11,0	7,7	97,0	9,8	101,2	0,6
Esterigmatocistina	0,04	0,14	102,2	8,7	91,8	3,2	2,4	99,9	5,7	94,5	2,7

LD, Limite de detecção ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ); LQ, Limite de quantificação ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ); Rec(%), Recuperação; <sup>a</sup>DPR (%), Desvio padrão relativo (*intra-day*, n=4); <sup>b</sup>DPR (%) Desvio padrão relativo (*inter-day*, n=3). Níveis de concentração em ordem crescente em relação aos níveis de concentração, aflatoxinas G2, G1, B2 e B1 e ocratoxina A: 1, 5, 10 e 20  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ; Aflatoxinas M2 e M1: 0,5, 2,5, 5,0 e 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ; desoxinivalenol e zearalenona: 10, 50, 100 e 200  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ; Fumonisinias (B1 e B2) e Fumonisinias hidrolisadas (B1 e B2): 5, 50, 100 e 200  $\mu\text{g}/\text{kg}$ .



## **Análise das amostras**

O método analítico validado foi aplicado na determinação das micotoxinas alvo em amostras de mingau a base de cereais para consumo infantil. Os resultados foram avaliados de acordo com a RDC nº 07/2011, legislação vigente no Brasil para controle de micotoxinas em alimentos (Brasil, 2011). Em 21 (25,0%) das amostras analisadas neste estudo o nível de contaminação encontrado excedeu o limite máximo permitido para pelo menos uma das micotoxinas.

A aflatoxina B1 foi encontrada em 6 (7 %) das amostras analisadas em níveis de concentração entre 0,07 e 2,06 µg/kg. A incidência encontrada para a aflatoxina B1 neste estudo pode ser considerada baixa comparada com os valores de 88, 50 and 25% encontrados respectivamente por Baydar et al. (2007), Tam et al. (2006) e Alvito et al. (2010) em alimentação infantil a base de cereais. Em uma amostra (mingau a base milho), a concentração encontrada para a aflatoxina B1 excedeu o limite máximo permitido para o somatório das aflatoxinas (1 µg/kg) em alimentação infantil a base cereais no Brasil. A aflatoxina G1 foi detectada (>0,16 µg/kg) em duas amostras analisadas.

As fumonisinas B1 e B2 foram encontradas simultaneamente em 40 (47,6 %) das amostras analisadas. As fumonisinas (B1 + B2) foram encontradas em níveis de concentração entre 7 e 1500 µg/kg, com uma média de 283 µg/kg. Os níveis de contaminação encontrados para as fumonisinas (B1 + B2) em 15 (18 %) das amostras analisadas excedeu o limite máximo permitido (200 µg/kg) no Brasil. As fumonisinas foram encontradas em todas (100%) das amostras de mingau a base de milho analisadas. A alta incidência e os altos níveis de contaminação encontrados em nosso estudo estão de acordo com os resultados reportados previamente para alimentação infantil a base de milho no Brasil (Castro et al., 2004).

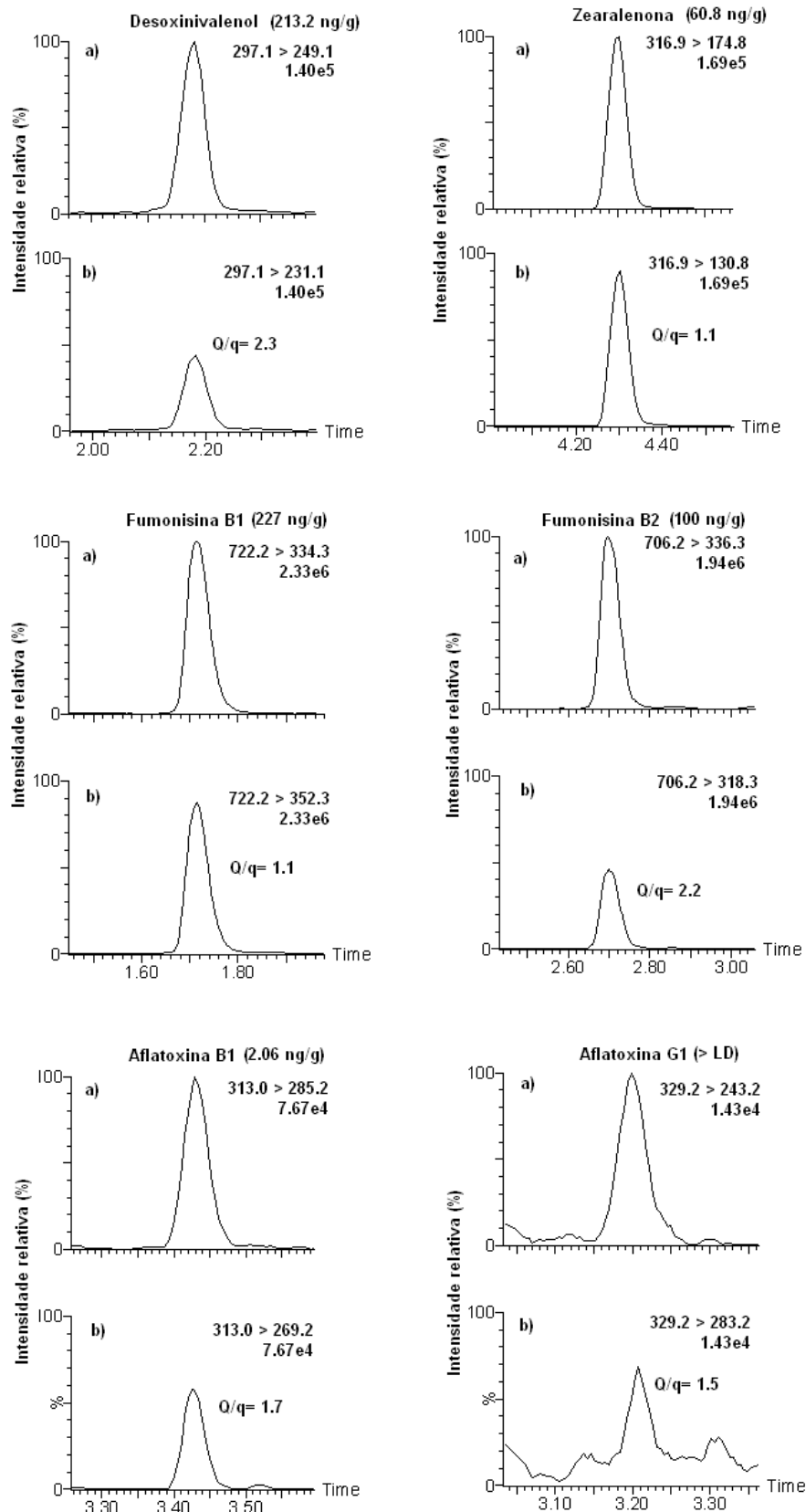
As fumonisinas B1 e B2 hidrolisadas foram encontradas em 3 (3,6 %) das amostras analisadas, demonstrando que as fumonisinas podem ser hidrolisadas durante o processamento industrial utilizado no preparo desses produtos (Dombrink-Kurtzman & Dvorak, 1999).

O desoxinivalenol foi encontrado em 55 (65,5 %) das amostras analisadas em níveis de concentração entre 2,0 e 332,5 µg/kg, com uma média de 68,1 µg/kg. Em 5 (6,0 %) das amostras analisadas os níveis de concentração excederam o limite máximo permitido (200 µg/kg) no Brasil. A incidência de desoxinivalenol encontrada nesse estudo foi menor que o

valor de 76% reportado por Juan et al. (2014) e maior que os valores de 63, 40, 36 and 23,5 % respectivamente reportados por Lombaert et al. (2003), Cano-Sancho et al. (2011), Romagnoli et al. (2010) e Zhang et al. (2014) em alimentação infantil a base de cereais.

A zearalenona foi encontrada em 51 (60,7 %) das amostras analisadas em níveis de concentração entre 0,64 e 60,8  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , com uma média de 6,7  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . Em 4 (4,8%) das amostras analisadas os níveis de concentração excederam o limite máximo permitido (20  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ). A incidência encontrada em nosso estudo foi maior que os valores de 33, 14, 6 and 2 % respectivamente reportados por Lombaert et al. (2003), Kostelanská et al. (2010), Rubert et al. (2012b), Romagnoli et al. (2010) em alimentação infantil a base de cereais. Os cromatogramas obtidos para algumas micotoxinas encontradas em amostras de mingau a base de milho estão mostrados na Figura 3.

**Figura 3:** Cromatogramas de algumas micotoxinas de interesse em amostras de mingau a base de milho naturalmente contaminadas.



## Conclusões

Um método analítico para determinação de 14 micotoxinas em mingau à base de cereais para consumo infantil por CLUE-EM/EM foi desenvolvido e validado. O método utilizado no tratamento das amostras é adequado às análises de rotina, uma vez que envolve apenas uma etapa simultânea de extração e limpeza dos extratos, seguida pela concentração dos extratos. O método validado foi aplicado para a determinação das micotoxinas alvo em 84 amostras de mingau a base de cereais para consumo infantil. A contaminação por fumonisinas nas amostras analisadas pode ser considerado o principal problema em relação à exposição de crianças por micotoxinas através do consumo de mingau. No entanto, a aflatoxina B1, o desoxinivalenol e a zearalenona também foram encontradas em algumas amostras com níveis de concentração que excedem o limite máximo permitido estabelecido pela legislação brasileira. A contaminação simultânea de diferentes classes de micotoxinas analisadas demonstra a importância do método analítico desenvolvido.

## Referências

- Alvito, P.C.; Sizoo, E.A.; Almeida, C.M.M.; van Egmond, H.P. Occurrence of aflatoxins and ochratoxin A in baby foods in Portugal. *Food Analytical Methods* 3: 22–30, 2010.
- Araguás, C.; González-Peñas, E.; López de Cerain, A. Study on ochratoxin A in cereal-derived products from Spain. *Food Chemistry*, 92, pp. 459–464, 2005.
- Baydar et al. Aflatoxin B1, M1 and ochratoxin A levels in infant formulae and baby foods marketed in Ankara, Turkey. *Journal of Food and Drug Analysis*, Vol. 15, No. 1, Pages 89-92, 2007.
- Belsley, D.A.; Kuh, E.; Welsch, R.E. *Regression diagnostics: identifying influential data and sources of collinearity*. New York: Wiley, 292 p., 1980.
- Beltran, E.; Ibanez, M.; Sancho, J.V.; Cortes, M.A.; Yusa, V.; Hernandez, F. UHPLC–MS/MS highly sensitive determination of aflatoxins, the aflatoxin metabolite M1 and ochratoxin A in baby food and milk. *Food Chemistry*, 126 (2), 737-744, 2011.
- 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. Publicada no D.O.U em 22 de fevereiro de 2011.

Brown, B.M.; Forsythe, A.B. Robust tests for the equality of variances. *Journal of the American Statistical Association* 69: 364-367, 1974.

Caldas, E. D.; Silva, A. C. Mycotoxins in corn-based food products consumed in Brazil: an exposure assessment for fumonisins. *J Agric Food Chem.*, 55 (19): 7974–80, 2007.

Cano-Sancho, G.; Gauchi, J-P., Sanchis, V.; Marín, S.; Ramos, A.J. Quantitative dietary exposure assessment of the Catalonian population (Spain) to the mycotoxin deoxynivalenol. *Food Additives and Contaminants*, 28(8), 1098–1109, 2011.

Castro, M. F.; Shephard, G. S.; Sewram, V.; Vicente, E.; Mendonça, T. A.; Jordan, A. C. Fumonisin in Brazilian corn based foods for infant consumption. *Food Addit. Contam.*, 21, 693-699, 2004.

Chu, F.S. Mycotoxins: food contamination, mechanism, carcinogenic potential and preventive measures. *Mutation Research*. 259(3-4):291-306, 1991.

Cigić, I.K.; Prosen, H. An Overview of Conventional and Emerging Analytical Methods for the Determination of Mycotoxins. *Int. J. Mol. Sci.* 10: 62-115, 2009.

D'Arco, G., Fernández, F. M., Font, G.; Damiani, P.; Mañes, J. Analysis of fumonisins B1, B2 and B3 in corn-based baby food by pressurized liquid extraction and liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1209(1–2), 188–194, 2008.

Dall'Asta, C.; Galaverna, G.; Mangia, M.; Sforza, S.; Dossena, A.; Marchelli, R. Free and bound fumonisins in gluten-free food products. *Mol Nutr Food Res.*, 53(4): 492-9, 2009.

Dombrink-Kurtzman, M. A.; Dvorak, T. J. Fumonisin Content in Masa and Tortillas from Mexico. *J. Agric. Food Chem.* 47, 622–627, 1999,

Draper N.; Smith, H. *Applied regression analysis*. New York: Wiley, 706 p., 1998.

Durbin J.; Watson, G.S. Testing for serial correlation in least squares regression ii. *Biometrika*, 38, 1-2, 159-178, 1951.

EC (European Commission). Commission decision 2002/657/EC of 12 August 2002. Implementing Council Directive 96/23/EC concerning performance of analytical methods and the interpretation of results. *Official Journal of the European Communities*, Brussels, 2002, L 221/8.

EC (European Commission). Commission Regulation (EC) No. 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*, L 70, 2006, pp. 12-34.

EC (European Commission). Guidance document on analytical quality control and validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed. SANCO/12571/2013, 2014.

Fang, L.X.; Xiong, A.Z.; Wang, R.; Ji, S.; Yang, L.; Wang, Z.T. A strategy for screening and identifying mycotoxins in herbal medicine using ultra-performance liquid chromatography with tandem quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Separation Science* 36: 3115-22, 2013.

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 Chem.* 117 (4): 705-712, 2009.

García-Campaña, A.; Cuadros-Rodríguez, L.; Aybar-Muñoz, J.; Alés-Barrero, F. Chemometric protocol to validate an analytical method in the presence of corrigible constant and proportional systematic errors. *Journal of AOAC International* 80: 657-664, 1997.

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.

Horwitz, W.; Latimer, G.W. Official methods of analysis of AOAC International, AOAC International, Gaithersburg, Md., 18<sup>th</sup> edition, 2005.

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

IARC, 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.

Jia, W.; Chu X.; Ling, Y.; Huang, J.; Chang, J. Multi-mycotoxin analysis in dairy products by liquid chromatography coupled to quadrupole orbitrap mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1345, 107–114, 2014.

Juan, C.; Raiola, A.; Manes, J.; Ritieni, A. Presence of mycotoxin in commercial infant formulas and baby foods from Italian market. *Food Control*, 39, 227, 2014.

Kabak, B. Ochratoxin A in cereal-derived products in Turkey: occurrence and exposure assessment. *Food and Chemical Toxicology*, 47, 348–352, 2009.

Köppen, R.; Koch, M.; Siegel, D.; Merkel, S.; Maul, R.; Nehls, I. Applied Microbiology and Biotechnology Determination of mycotoxins in foods: current state of analytical methods and limitations. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 86(6), 1595-612, 2010.

Kostelanská M.; Sosnovcová I.; Ondrej L.; Hajslová J. Determination of mycotoxins in infant and baby food using UPLC-MS/MS analytical method. Proceedings of 6 th ISC Modern Analytical Chemistry. Prague, 2010.

Krska, R.; Schubert-Ullrich, P.; Molinelli, A.; Sulyok, M.; Macdonald, S.; Crews, C. Mycotoxin analysis: An update. *Food Additives and Contaminants* 25: 152, 2008.

Lacina, O.; Zachariasova, M.; Urbanova, J.; Vaclavikova, M.; Cajka, T.; Hajslova, J. Critical assessment of extraction methods for the simultaneous determination of pesticide residues and mycotoxins in fruits, cereals, spices and oil seeds employing ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A*, 1262:8-18, 2012.

Lombaert, G.A.; Pellaers, P.; Roscoe, V.; Mankotia, M.; Neil, R.; Scott, PM. Mycotoxins in infant cereal foods from the Canadian retail market. *Food Addit Contam.* 20: 494-504, 2003.

Mahnine, N.; Meca, G.; Fernández-Franzón, M.; Mañes, J.; Zinedine, A. Occurrence of fumonisins B1, B2 and B3 in breakfast and infant cereals from Morocco. *Phytopathologia Mediterranea*, 51, 1, 193–197, 2012.

Mavungu, D.D.J; Monbaliu, S.; Scippo, M.L.; Maghuin-Rogister, G.; Schneider, Y.J.; Larondelle, Y.; Callebaut, A.; Robbens, J.; Van Peteghem, C.; De Saeger, S. LC-MS/MS multi-analyte method for mycotoxin determination in food supplements. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess.* 26(6):885-95, 2009.

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

Mol, H. G.; Plaza-Bolaños, P.; Zomer, P.; de Rijk, T. C.; Stolker, A. A.; Mulder, P. P. Toward a Generic Extraction Method for Simultaneous Determination of Pesticides, Mycotoxins, Plant Toxins, and Veterinary Drugs in Feed and Food Matrixes. *Anal. Chem.*, 80, 9450–9, 2008.

Murphy, P. A.; Hendrich, S.; Landgren, C.; Bryant, C.M. Food Mycotoxins: An Update. *Journal of Food Science*, 71, 5, 2006.

Ozden, S.; Akdeniz, A.S.; Alpertunga, B. Occurrence of ochratoxin A in cereal-derived food products commonly consumed in Turkey. *Food Control*, 25, pp. 69–74, 2012.

Peraica, M.; Radic, B.; Lucic, A.; Pavlovic, M. Toxic effects of mycotoxins in humans. *Bulletin of the World Health Organization*, 77 (9), 754-766, 1999.

Plattner, R.D. HPLC/MS analysis of fusarium mycotoxins, fumonisins and deoxynivalenol. *Nat. Toxins* 7: 365-370, 1999.

Romagnoli, B.; Ferrari, M.; Bergamini, C. Simultaneous determination of deoxynivalenol, zearalenone, T-2 and HT-2 toxins in breakfast cereals and baby food by high-performance

liquid chromatography and tandem mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*, 45, 1075-1080, 2010.

Rubert, J.; Dzuman, Z.; Vaclavikova, M.; Zachariasova, M.; Soler, C.; Hajslova, J. Analysis of mycotoxins in barley using ultra high liquid chromatography high resolution mass spectrometry: Comparison of efficiency and efficacy of different extraction procedures. *Talanta*, 99, 712–719, 2012(a).

Rubert, J.; Soler, C.; Mañes, J. Application of an HPLC–MS/MS method for mycotoxin analysis in commercial baby foods. *Food Chemistry*. 33(1):176–183, 2012(b).

Ryan, T.A.; Joiner, B.L. Normal probability plots and tests for normality. The State College: Pennsylvania State University, 1976.

Saeger, S. Determining Mycotoxins and Mycotoxigenic Fungi in Food and Feed. Woodhead Publishing Series in Food Science, *Technology and Nutrition*: Number 203. Published by Woodhead Publishing Limited, Cambridge, UK, 2011.

Souza, S.V.C.; Junqueira, R.G. A procedure to assess linearity by ordinary least squares method. *Analytica Chimica Acta* 552(1-2): 25-35, 2005.

Sulyok, M.; Krska, R.; Schuhmacher, R. A liquid chromatography/tandem mass spectrometric multi-mycotoxin method for the quantification of 87 analytes and its application to semi-quantitative screening of moldy food samples. *Anal Bioanal Chem*, 389, 1505–1523, 2007.

Tam, J.; Mankotia, M.; Mably, M.; Pantazopoulos, P.; Neil, R.J.; Calway, P.; Scott, P.M. Survey of breakfast and infant cereals for aflatoxins B1 , B2 , G1 and G2. *Food Additives and Contaminants*, 23(7), 693-699, 2006.

Tamura, M.; Matsumoto, K.; Watanabe, J.; Lida, J.; Nagatomi, Y.; Mochizuki, N. High Throughput Quantitative Analysis of Multi-mycotoxin in Beer-based Drinks using UHPLC-MS/MS. Shimadzu corporation, First edition, September 2012.

Tamura, M.; Uyama, A.; Mochizuki, N. Development of a multi-mycotoxin analysis in beer-based drinks by a modified QuEChERS method and ultra-high-performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *Anal Sci.*, 27(6):629-35, 2011.

Turner, N. W.; Subrahmanyam, S.; Piletsky, S. A. Analytical methods for determination of mycotoxins: A review. *Analytica Chimica Acta*, vol. 632, issue 2, 26, pages 168-180, 2009.

Zachariasova, M.; Cajka, T.; Godula, M.; Malachova, A.; Veprikova, Z.; Hajslova, J. Analysis of multiple mycotoxins in beer employing (ultra)-high-resolution mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 24: 3357–3367, 2010.



Zhang, K.; Wong, J.W.; Krynitsky, A.J.; Trucksess, M.W. Determining mycotoxins in baby foods and animal feeds using stable isotope dilution and liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(36), 8935-8943, 2014.

#### **4.5 MANUSCRITO 5: DETERMINATION OF FREE AND HIDDEN FUMONISINS IN PORRIDGE CORN-BASED FOR INFANT CONSUMPTION BY ULTRA-HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY-TANDEM MASS SPECTROMETRY**

André Victor Sartori, Maria Heloísa Paulino de Moraes, Rosana Pereira dos Santos, Yuri Pereira de Souza, Armi Wanderley da Nóbrega

##### **ABSTRACT**

The aim of this study was to investigate the use of ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UHPLC-MS/MS) for the determination of free and hidden fumonisins in porridge corn-based for infant consumption. Hidden fumonisins were determined after an alkaline hydrolysis step was introduced into a classical procedure for the determination of fumonisins in foods. Satisfactory recoveries ranged from 76 to 113%; the relative standard deviations were lower than 17% for the validated method. The validated method was applied in the analysis of twenty-five porridge corn-based food samples for infant consumption. Free and hidden fumonisins were found in all analyzed samples. Concentration levels from 25 to 1500 µg/kg were found for the free fumonisins (B1 + B2). The concentrations of free fumonisins (B1+B2) found in thirteen (13) samples (52%) exceeded the limits of the Brazilian legislation (200 µg/kg). When hidden fumonisins were taking into account, twenty two (22) of the samples (88%) were not in accordance with the Brazilian legislation.

**Keywords:** Porridge, Infant food, fumonisin, hidden fumonisin, UHPLC-MS/MS

## Introduction

Fumonisin is a mycotoxin produced by some species of *Fusarium* fungi, mainly *F. verticillioides* and *F. proliferatum* (Creppy, 2002). Among the several known fumonisins, fumonisins B1 and B2 are the most significant as natural contaminants of foods due to their toxicity (Rheeder et al., 2002; Lino et al., 2004). Regarding carcinogenicity studies, the fumonisin B1 was classified by International Agency for Research on Cancer as a possible carcinogen to humans, including it in Group 2B (IARC, 2002).

Higher incidence and high fumonisin contamination levels have mainly been found in cereals cultivated in tropical and subtropical regions, and corn has been considered the food with the highest contamination risk. Because the resistance of fumonisins to various conditions used in the processing of foods, these mycotoxins have also been found as contaminants in several cereal-based products (Tseng et al., 1997; Kim et al., 2002; Velluti et al., 2001; Lino et al., 2007), including cereal-based infant foods (Mahnine et al., 2012).

In addition to the occurrence of free fumonisins, some studies have shown that fumonisins can also be present in foods in the form of conjugates and/or linked to macromolecules. These usually are not quantified by the analytical methods currently used in the routine analysis of foods regarding fumonisins and they are commonly called hidden fumonisins (Galaverna et al., 2009; Howard et al., 1998; Poling et al., 2002; Humpf, Voss, 2004; Dall'Asta et al., 2008; Cirlini et al., 2012). There are some evidences that hidden fumonisins can be converted to the free forms in the gastrointestinal tract and may represent an important source of exposure to fumonisin (Dallasta et al., 2009). This discovery attracted, thus, great interest of public health authorities in recent years.

Thermal processing of food in the presence of fumonisin has been considered the main mechanism of hidden fumonisins formation. However, hidden fumonisins have also been found in raw corn (Oliveira et al., 2015; Dall'Asta et al., 2010).

Alkaline hydrolysis has been used as an additional step to traditional analytical methods for the determination of total fumonisins, which is defined as the sum of free and hidden fumonisins present in the samples (Kim et al., 2003; Park et al., 2004; Dall'Asta et al., 2008).

Corn is one of the main cereals grown in Brazil, present in significant proportion in population diet through its direct consumption or processed products such as cornmeal, cakes, breads, biscuits and porridge. As in other countries, studies conducted in Brazil have

shown high incidence and high contamination levels of fumonisins in corn and corn-based products (Machinski, Soares, 2000; Rodriguez-Amaya, Sabino, 2002; Castro et al, 2004; Scaff, Scussel, 2004; Bittencourt et al., 2005; Kawashima, Smith, 2006; Caldas and Silva, 2007; Queiroz et al, 2012; Westhuizen et al. 2003; Hirooka et al., 1996; Ono et al. 1999; Mallmann et al, 2001). However, contamination may be underestimated since these mycotoxins may also be present in the form of hidden mycotoxins. Due to increased vulnerability of children to the toxic effects of mycotoxins, it is important to develop adequate analytical methods to determine the contamination of corn-based foods by fumonisins, including its hidden forms.

The aim of this study was to investigate the contamination levels of fumonisins and hidden fumonisins in corn-based porridge samples available in the market in the metropolitan area of Rio de Janeiro. Analytical methods using the ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (UHPLC-MS/MS) were developed and validated for use in the sample analysis.

## **Material and Methods**

### **Reagents and chemicals**

Acetonitrile and methanol (HPLC-grade) were purchased from J T Baker (Phillipsburg, NJ, USA). Ammonium formate (>99%) and formic acid (mass spectrometry grade) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Hexane (purity > 96%) was obtained from Merck (Darmstadt, Germany). Ultrapure water was obtained from Milli-Q Gradient water system (Millipore, Bedford, MA, USA).

### **Standard solutions**

Stock solutions of fumonisins B1 and B2 (50 µg/mL) in acetonitrile/water 1:1 (v/v) were purchased from Fluka / Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). The hydrolyzed fumonisins B1 and B2 were prepared in the laboratory by hydrolysis of fumonisins B1 and B2 commercially obtained based on the procedure described by Dallasta et al. (2009). An aliquot (5mL) of a standard solution containing fumonisins B1 and B2 (50 µg/mL) in acetonitrile / water 1:1 (v/v) was evaporated to dryness under a gentle flow of nitrogen at 40 °C. The residue was redissolved in 5 mL solution of 2 M KOH and left to react for 12 h at room temperature. The hydrolyzed fumonisin were extracted three times with 10 mL of ethyl acetate. The extracts

were combined and evaporated to dryness under a gentle flow of nitrogen at 40 °C. The residues were redissolved in 5 mL of methanol. The concentration of hydrolyzed fumonisins B1 and B2, calculated considering reaction yield of 100%, were 28.1 and 27.6 µg/mL, respectively. All the stock solutions were stored at -18 °C.

### UHPLC-MS/MS analysis

Liquid chromatography was performed using an ACQUITY UPLC™ system (Waters). A BEH C18 column (100 mm x 2.1 mm i.d., 1.7 µm particle size) was used as the stationary phase. The column temperature was maintained at 35 °C. Methanol (Phase B) and solution of formic acid 0.3% (Phase A) were used as mobile phases. The elution gradient started with 60% of mobile phase B, increased to 80% in 3 min and held in 80% for 1 min. The system was then re-equilibrated for 2 min in 60% of mobile phase B. The flow rate was set at 0.3 mL min<sup>-1</sup>. The injection volume was 5 µL.

The detection was performed using a tandem quadrupole mass spectrometer (Waters, Quattro Premier™ XE) equipped with an electrospray ionization (ESI) source operated in positive mode. The source parameters were capillary voltage 3.5 kV, extractor voltage 3 V, rf lens 0.1 V, multiplier 750 V, desolvation temperature of 350 °C, source temperature of 120 °C. Nitrogen was used as cone and desolvation gas at a flow of 50 L h<sup>-1</sup> and 750 L h<sup>-1</sup>, respectively. Argon was used as collision gas at a pressure of 4 x 10<sup>-3</sup> mbar. The two ion transitions selected (*m/z*) for each mycotoxin and acquisition conditions performed are shown in Table 1 and 2.

**Table 1:** The selected ion transitions and acquisition MS/MS parameters.

Micotoxinas	t <sub>R</sub> (min)	Q ( <i>m/z</i> )	q ( <i>m/z</i> )	Q/q <sup>a</sup>	Energia de colisão <sup>b</sup> (eV)	Volt. do cone (V) <sup>b</sup>	Nº janela de aquisição	Dwell time (s)
Hydrolyzed fumonisin B1	1.60	406.3>370.3	406.3>388.3	1.2 (±0.2)	20 / 20	30	1	0.05
Fumonisin B1	1.75	722.2>334.3	722.2>352.3	1.2 (±0.2)	40 / 40	50	1	0.05
Hydrolyzed fumonisin B2	2.47	390.3>372.3	390.3>354.3	1.3 (±0.3)	20 / 20	30	2	0.02
Fumonisin B2	2.72	706.2>336.3	706.2>318.3	2.0 (±0.4)	35 / 35	50	2	0.02

<sup>a</sup> Relative ion transitions intensities (Q/q) and maximum permitted tolerances (given in bracket).

<sup>b</sup> Values are given in the order quantifier transition ion / qualifier transition ion.  
Interchannel delay and interscan delay were both 0.005 s

**Table 2:** The selected ion transitions and acquisition MS/MS parameters.

Micotoxinas	$t_R$ (min)	Q ( $m/z$ )	q ( $m/z$ )	Q/q <sup>a</sup>	Energia de colisão <sup>b</sup> (eV)	Volt. do cone (V) <sup>b</sup>	Nº janela de aquisição	Dwell time (s)
Hydrolyzed fumonisin B1	1.60	406.3>370.3	406.3>388.3	1.2 (±0.2)	20 / 20	30	1	0.2
Hydrolyzed fumonisin B2	2.47	390.3>372.3	390.3>354.3	1.3 (±0.3)	20 / 20	30	2	0.2

<sup>a</sup> Relative ion transitions intensities (Q/q) and maximum permitted tolerances (given in bracket).

<sup>b</sup> Values are given in the order quantifier transition ion / qualifier transition ion.

Interchannel delay and interscan delay were both 0.005 s

## Sample preparation

### Free and hydrolyzed fumonisins

Free and hydrolyzed fumonisins B1 and B2 naturally present in samples were analyzed using the following procedure: To 3 g of the sample, weighed in a 50 mL centrifuge tube, it was added 5 mL of hexane. Then, 5 mL of solution 3% formic acid and 10 mL of acetonitrile were added. The tube was shaken for 2 min using a vortex (IKA Works) and then sonicated for 10 min. The sample was then centrifuged at 3000 rpm for 7 min (Hitach- HIMAC CF 7D2). An aliquot of 5 mL of the acetonitrile/water phase was evaporated to dryness under a gentle flow of nitrogen at 50 °C (Turbo-Vac LV) and then the residue was dissolved with 1 mL of methanol/water (1:1, v/v). The solution thus obtained was filtered through a 0.22 µm polyethylene filter before injection (5 µL).

### Total fumonisins

The following procedure was used on preparing the samples to be analyzed for total fumonisins (Dall'Asta et al., 2009): to 1 g of the sample, weighed in a 50 mL centrifuge tube, it was added 20 mL of a 2 M KOH solution; the sample was shaken for 60 min (Burrel, Wist Actio Shaker, Model 75); 20 mL of acetonitrile was then added, the tube shaken for 2 min more using a vortex (IKA Works) and then centrifuged at 3000 rpm for 7 min (Hitach- HIMAC CF 7D2) to separate the liquid phases. An aliquot of 5 mL of the acetonitrile phase was evaporated to dryness under a gentle flow of nitrogen at 50 °C (Turbo-Vac LV) and then the residue was dissolved with 1 mL of methanol/water (1:1, v/v). The solution thus obtained was filtered through a 0.22 µm polyethylene filter before injection (5 µL).

## **Porridge samples**

A total of 25 samples of corn-based porridge for infant consumption from 7 different companies representing 8 different brands were purchased randomly in local supermarkets in metropolitan region of Rio de Janeiro, RJ, Brazil from 2012 to 2014. The samples were stored in its original packing at -20 °C until analysis.

## **Results and discussion**

### **Validation of the analytical methods**

Two analytical methods were validated: one for the direct determination of free fumonisins naturally present in the samples and the other for the determination of total fumonisins after an alkaline treatment of the samples (alkaline hydrolysis).

The identification of the mycotoxins was performed by comparing chromatographic retention times for the samples and for standard solutions. Confirmations were performed by comparing the signal intensity ratios of the two ion transitions of each analyte in the sample with those obtained using standard solution (Table 1 and 2).

The trueness and intra-day precision of the method for determination of free and hydrolyzed fumonisins were evaluated by recovery studies using porridge samples spiked with the mycotoxins at four concentration levels with four replicates for each level. With respect to the method for the determination of total fumonisins, trueness and intra-day precision were studied using porridge samples spiked with hydrolyzed fumonisins at three concentration levels with three replicates for each level. The results are shown in Table 3 and 4, with precisions indicated by relative standard deviations (RSD) and trueness by the recovery values. The results were evaluated according to the European Commission Decision 2002/657/EC (EC, 2002). The recovery values ranged from 76 to 113 %, with RSD lower than 17% for all mycotoxins studied. The RSD for intermediate precision (inter day, n= 3) was always lower than 12% for the two analytical method. Hence, the method showed good trueness and precision for the concentration levels evaluated.

**Table 3:** Validation of the method for the determination of free fumonisins naturally present in the samples.

Mycotoxins	LOD	LOQ	5 µg/kg		50 µg/kg			100 µg/kg		200 µg/kg	
			Rec	<sup>a</sup> RSD	Rec	<sup>a</sup> RSD	<sup>b</sup> RSD	Rec	<sup>a</sup> RSD	Rec	<sup>a</sup> RSD
Fumonisin B1	0.54	1.81	83.8	6	88.4	17	10	107.5	7	103.0	5
Hydrolyzed fumonisin B1	0.95	3.18	93.2	10	95.3	5	12	89.4	7	82.5	6
Hydrolyzed fumonisin B2	0.92	3.07	91.8	15	87.8	4	9	84.6	7	76.0	7
Fumonisin B2	0.45	1.51	81.9	9	85.2	12	8	113.2	9	102.4	3

LOD, Limit of detection (µg/kg); LOQ, Limit of Quantification (µg/kg); Rec(%), recovery; <sup>a</sup>RSD (%) relative standard deviation (intra-day, n=4); <sup>b</sup>RSD (%) relative standard deviation (inter-day, n=3 days).

**Table 4:** Validation of the method for the determination of total fumonisins (after alkaline hydrolysis).

Mycotoxins	LOD	LOQ	20 µg/kg			200 µg/kg		400 µg/kg	
			Rec	RSD <sup>a</sup>	RSD <sup>b</sup>	Rec	RSD <sup>a</sup>	Rec	RSD <sup>a</sup>
Hydrolyzed fumonisin B1	2.9	9.8	89.4	10	11.4	100.0	4	97.0	2
Hydrolyzed fumonisin B2	2.3	7.5	96.6	7	8.1	103.0	4	99.8	2

LOD, Limit of detection (µg/kg); LOQ, Limit of Quantification (µg/kg); Rec(%), recovery; <sup>a</sup>RSD (%) relative standard deviation (intra-day, n=3); <sup>b</sup>RSD (%) relative standard deviation (inter-day, n=3 days).

To compensate the matrix effects, standard addition method was used for quantification of the target compounds in the analyzed samples. The approximate concentration of the target compounds in each samples was initially determined using calibration curves prepared in solvent (methanol: water 1:1, v/v) at concentration levels ranging from 10 to 200 ng/mL for fumonisins B1 and B2, and of 5 to 100 ng/mL for hydrolyzed fumonisins B1 and B2; standard additions were performed through the fortification of the sample extracts at four concentration levels.

Porridge samples spiked with the target compounds in the lowest concentration level used in the recovery studies were used to determine of LOD and LOQ. The results are shown in Tables 3 and 4.



## Sample analysis

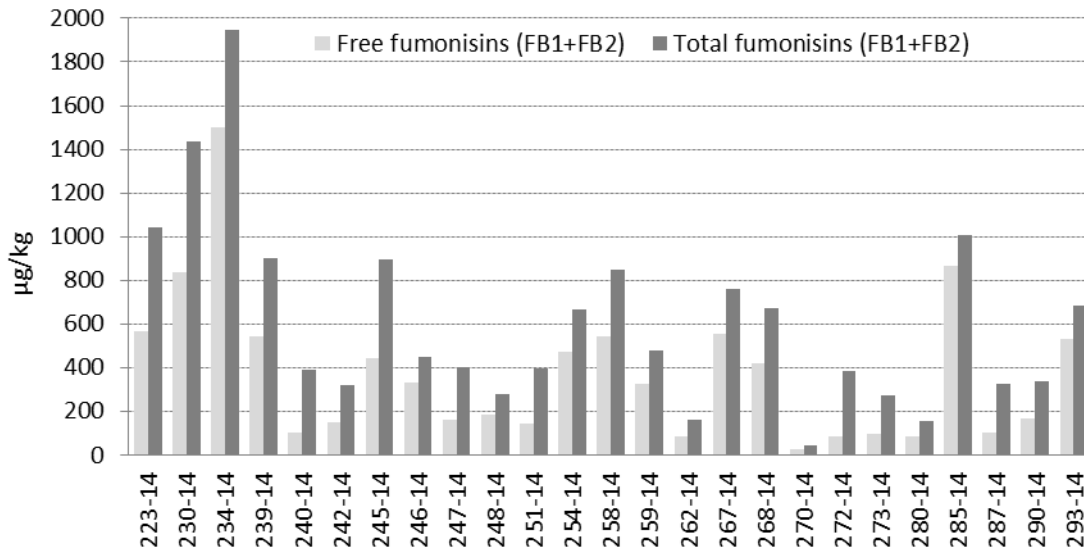
Validated analytical methods were used to determine free and total fumonisins in samples of corn-based porridge. Hidden fumonisins were calculated as the difference between total and free fumonisins.

Samples were analyzed first for free fumonisins and hydrolyzed fumonisins. The free fumonisins B1 and B2 were found in all analyzed samples. No hydrolyzed fumonisins, however, were found in the porridge samples before the hydrolyzing step was performed. Hence, it is concluded that fumonisins are not hydrolyzed during the industrial processing of these foods, unlike it was already demonstrated for other corn-based products (Dombrink-Kurtzman, Dvorak, 1999).

Free fumonisins B1 and B2 were found at concentration levels from 18 to 1119  $\mu\text{g}/\text{kg}$  and from 7 to 381  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , respectively. The sum of free fumonisins (FB1+ FB2) was found at concentration levels from 25 to 1500  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (372  $\mu\text{g}/\text{kg}$  in average). The concentration levels found for free fumonisins (FB1 + FB2) in thirteen (13) analyzed samples (52%) exceeded the limits (200  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) of the Brazilian regulation for the sum of the fumonisins B1 and B2 in cereal-based food for infant consumption (Brazil, 2011). However, if the contents of hidden fumonisins in samples are taking into account, the total concentration of fumonisins in 88% of the analyzed samples (22 samples) exceeded the Brazilian maximum allowed limit. The results here presented are in accordance with the results previously presented by Castro et al. (2004), who pointed out the high incidence and elevated contamination levels of free fumonisins in corn products in Brazil.

A comparison of the results here reported for free and total fumonisins B1 and B2 in corn-based porridge is presented in Figure 1. The results demonstrate the importance of hidden fumonisins as a contaminant of porridge with these mycotoxins. In fact, as seen in Figure 1, the concentration of total fumonisins was 1.2 to 4.5 times greater than the concentration of free fumonisins in all analyzed sample, with an average of 2.0 times greater. It can be seen also that the hidden fumonisins concentrations were 0.2 to 3.5 times greater than the concentration of free fumonisins in the analyzed samples. The average concentrations found for free and hidden fumonisins were similar.

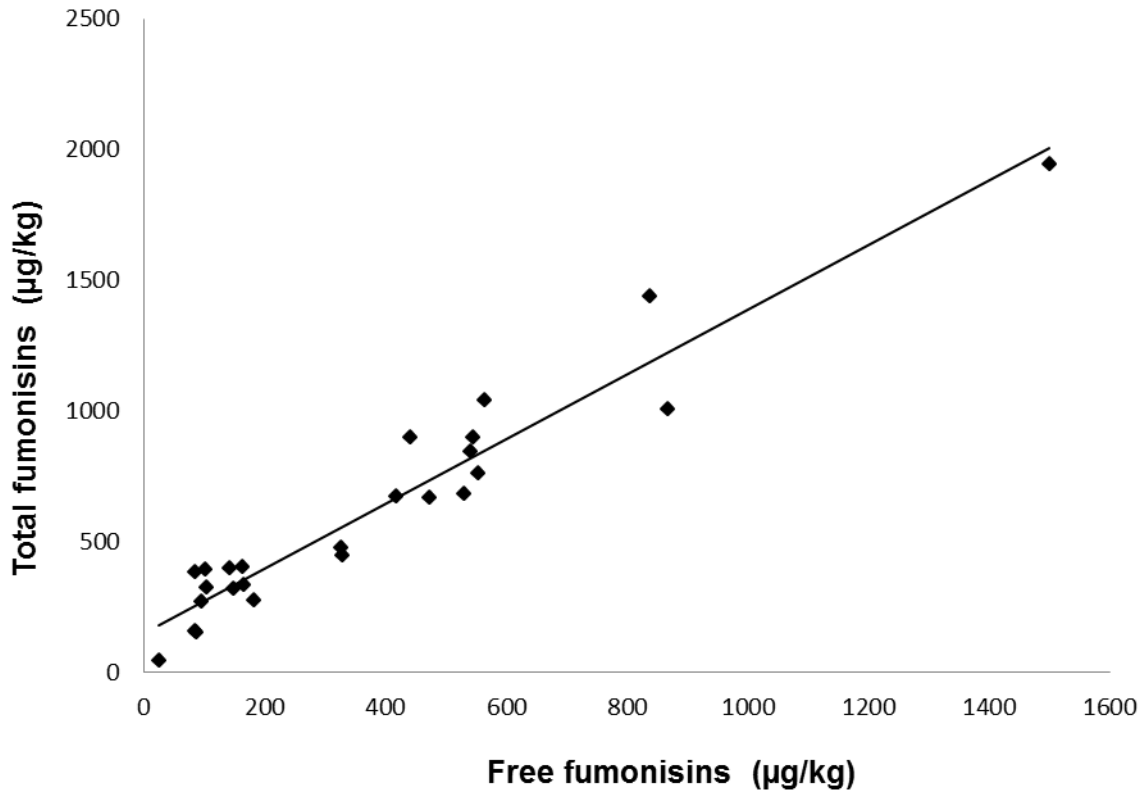
**Figure 1:** Comparison between free and total fumonisins in the analyzed samples.



The results here reported for corn-based porridge for infant consumption is supported by other studies on the concentrations of free and hidden fumonisins in corn-based products (Park et al., 2004; Kim et al., 2003; Dall'Asta et al., 2008; Oliveira et al., 2015). However, the fact that our results refer to food for infants makes it mandatory that these results be analyzed with special concern by national regulatory authorities.

With these results, a mathematical model was proposed to verify the correlation between free and total fumonisins concentrations. In previously reported studies, mathematical models derived by linear regression from experimental results were proposed to express the relationship between the concentrations of free and total fumonisins in raw maize samples (Dall'Asta et al., 2010; Oliveira et al., 2015). As it can be seen in Figure 2, the linear regression function  $y = 1.2367x + 149.9$  (with  $r^2 = 0.93$ ) expresses adequately the relationship among the variables. This function may be used to estimate the concentration of total fumonisins from analytical results corresponding to free fumonisins in corn-based porridge samples.

**Figure 2:** Linear regression of free and total fumonisins concentrations obtained in corn-based porridge for infant consumption.



## Conclusions

The validated analytical methods showed satisfactory results for the performance parameters evaluated. The majority of the analyzed samples were considered inadequate for consumption according to the Brazilian legislation. The exposure of infants to fumonisins through corn-based porridge consumption deserves special attention from public health authorities in Brazil. It is, thus, recommended that, besides free fumonisins, hidden fumonisins limits be also considered by the national regulatory authority in the discussion of mycotoxins regulations.

## References

Bittencourt, A. B. F.; Oliveira, C. A. V.; Dilkin, P.; Corrêa, B. Mycotoxin occurrence in cornmeal and flour traded in São Paulo, Brazil. *Food Control*, 16, 117-120, 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. Publicada no D.O.U em 22 de fevereiro de 2011.

Caldas, E. D.; Silva, A. C. Mycotoxins in corn-based food products consumed in Brazil: an exposure assessment for fumonisins. *J Agric Food Chem.*, 55 (19): 7974–80, 2007.

Castro, M. F.; Shephard, G. S.; Sewram, V.; Vicente, E.; Mendonça, T. A.; Jordan, A. C. Fumonisin in Brazilian corn based foods for infant consumption. *Food Addit. Contam.*, 21, 693-699, 2004.

Cirlini, M.; Dall'Asta, C.; Galaverna, G. Hyphenated chromatographic techniques for structural characterization and determination of masked mycotoxins. *J Chromatogr A*. 1255, 145-52, 2012.

Comunidade Europeia (CE). Commission decision 2002/657/EC of 12 August 2002. Implementing Council Directive 96/23/EC concerning performance of analytical methods and the interpretation of results. Official Journal of the European Communities, Brussels, 2002, L 221/8.

Creppy, E. E. Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe. *Toxicology Letters*, 127, p.19-28, 2002.

Dall'Asta, C.; Falavigna, C.; Galaverna, G.; Dossena, A.; Marchelli, R. *In vitro* digestion assay for determination of hidden fumonisins in maize. *J. Agric. Food Chem.*, 58 (22), pp 12042–12047, 2010.

Dall'Asta, C.; Galaverna, G.; Aureli, G.; Dossena, A.; Marchelli, R. LC/MS/MS method for the simultaneous quantification of free and masked fumonisins in maize and maize-based products. *World Mycotoxin Journal*, 1(3): 237-246, 2008.

Dall'Asta, C.; Galaverna, G.; Mangia, M.; Sforza, S.; Dossena, A.; Marchelli, R. Free and bound fumonisins in gluten-free food products. *Mol Nutr Food Res.*, 53(4): 492-9, 2009.

Dombrink-Kurtzman, M. A.; Dvorak, T. J. Fumonisin Content in Masa and Tortillas from Mexico. *J. Agric. Food Chem.* 47, 622–627, 1999.

Galaverna, G.; Dall'Asta, C.; Mangia, M.; Dossena, A.; Marchelli, R. Masked Mycotoxins: an Emerging Issue for Food Safety. *Czech J. Food Sci.* 27, Special Issue, 2009.

Hirooka, E. Y.; Yamaguchi, M. M.; Aoyama, S.; Sugiura, Y.; Ueno, Y. Natural occurrence of fumonisinas in brazilian corn kernels. *Food Additives and Contaminants*, v. 13, p. 173 – 183, 1996.

Howard, P. C.; Churchwell, M. I.; Couch, L. H.; Marques, M. M.; Doerge, D. R. Formation of N-(carboxymethyl)fumonisin B1 following the reaction of fumonisin B1 with reducing sugars. *J. Agric Food Chem* 46: 3546–57, 1998.

Humpf, H. U.; Voss, K. A. Effects of thermal food processing on the chemical structure and toxicity of fumonisin mycotoxins. *Mol. Nutr. Food Res.*, 48, 255–69, 2004.

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

Kawashima, L. M.; Soares, L. M. V. Occurrence of fumonisin B1, aflatoxins B1, B2, G1, and G2, ochratoxin A and zearalenone in corn products. *Cienc. Tecnol. Aliment.*, 26, 516-21, 2006.

Kim, E. K.; Scott, P. M.; Lau, B. P. Hidden fumonisin in corn flakes. *Food Addit. Contam.*, 20, 161-169, 2003.

Kim, Ek; Shon, Dh; Chung, Sh; Kim, Yb. Survey for fumonisin B1 in Korean corn-based food products. *Food Additives And Contaminants Part A-Chemistry Analysis Control Exposure*, Vol.19(5), pp.459-464, 2002.

Lino, C. M.; Silva, L. J. G.; Pena, A.; Fernández, M.; Mañes, J. Occurrence of fumonisins B1 and B2 in broa, typical Portuguese maize bread. *International Journal of Food Microbiology*, 118, 79–82, 2007.

Lino, C. M.; Silva, L. J. G.; Pena, A. S. Fumonisin: presença em alimentos, implicações na saúde e aspectos legislativos. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, 99 (552), 181-192, 2004.

Machinski, M.; Soares, L. M. V. Fumonisin B1 and B2 in Brazilian corn-based food products. *Food Addit. Contam.*, 17, 875-79, 2000.

Mahnine N.; Meca, G.; Fernández-Franzón, M.; Mañes, J.; Zinedine, A. Occurrence of fumonisins B1, B2 and B3 in breakfast and infant cereals from Morocco. *Phytopathologia Mediterranea*, 51, 1, 193–197, 2012.

Mallmann, C.A.; Santurio, J.M.; Almeida, C.A.A.; Dilkin, P. Fumonisin B1 levels in cereals and feeds from Southern Brazil. *Arq. Inst. Biol.*, São Paulo, 68(1), 41-45, 2001.

Oliveira, M. S.; Diel, A.C.L.; Rauber, R. H.; Fontoura, F. P.; Mallmann, A.; Dilkin, P.; Mallmann, C. A. Free and hidden fumonisins in Brazilian raw samples. *Food Control*, 53, 217-221, 2015.

Ono, E. Y.; Sugiura, Y.; Homechin, M.; Kamogae, M.; Vizzoni, E.; Ueno, Y.; Hirooka, E. Y. Effect of climatic conditions on natural mycoflora in fumonisins freshly harvested corn of the state of Paraná, Brazil. *Mycopathologia*, v.147, p.139–148, 1999.

Park, J. W.; Scott, P. M.; Lau, B. P.; Lewis, D. A. Analysis of heat-processed corn foods for fumonisins and bound fumonisins. *Food Addit Contam.*, 21, 12, 1168-78, 2004.

Poling, S. M.; Plattner, R. D.; Weisleder, D. J. N-(1-Deoxy-D-fructos-1-yl)fumonisin B1, the initial reaction product of fumonisin B1 and D-glucose. *Agric Food Chem*, 50, 1318–24, 2002.

Queiroz, V.A.V.; Alves, G.L.O.; Conceição, R. R. P.; Guimarães, L.J.M.; Mendes, S.M.; Ribeiro, P.E.A; Costa, R.V. Occurrence of fumonisins and zearalenone in maize stored in family farm in Minas Gerais, Brazil. *Food Control*, Vol.28(1), pp.83-86, 2012.

Rheeder, J. P.; Marasas, W. F. O.; Vismer, H. F. Production of fumonisin analogs by fusarium species. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(5), 2101-2105. 2002.

Rodriguez-Amaya, D. B.; Sabino, M. Mycotoxin research in Brazil: the last decade in review. *Brazilian Journal of Microbiology*, 33: 1-11, 2002.

Scaff, R. M. C.; Scussel, V. M. Fumonisin B1 and B2 in corn-based products commercialized in the state of Santa Catarina-southern Brazil. *Braz. Arch. Biol. Technol.*, 47, 911-19, 2004.

Tseng, T.C.; Liu, C.Y. Occurrence of fumonisin B1 and B2 in corn-based foodstuffs in Taiwan market. *Mycopathologia*, Vol.137(1), pp.57-61, 1997.

Velluti, A.; Marin, S.; Sanchis, V.; Ramos, A.J. Occurrence of fumonisin B1 in Spanish corn-based foods for animal and human consumption. *Food Science and Technology International*, 7(5), 433-437, 2001.

Westhuizen, L.V.D.; Shephard, G.S.; Scussel, L.L.F.C.; Vismer, H.F.; Rheeder, J.P.; Marasas, W.F.O. Fumonisin contamination and Fusarium incidence in corn from Santa Catarina, Brazil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.51, p. 5574-5578, 2003.

## 5 CONCLUSÕES GERAIS

Neste estudo, métodos analíticos foram desenvolvidos e validados para a determinação simultânea de várias micotoxinas com sensibilidade adequada ao controle da contaminação de alimentos atendendo às regulamentações mais restritivas. Os métodos desenvolvidos são relativamente simples e utilizam poucas etapas de tratamento da amostra, minimizando ou evitando etapas de limpeza dos extratos.

Um método QuEChERS modificado foi utilizado para tratamento das amostras na determinação das aflatoxinas M1, M2, B1, B2, G1, G2 e ocratoxina A em leite e fórmulas infantis. Os métodos envolvem uma simples etapa simultânea de extração e limpeza dos extratos, seguida da concentração dos extratos e análise por CLUE-EM/EM. Pela primeira vez esta técnica de tratamento de amostra, utilizando hexano para retirar gorduras na etapa de particionamento, foi aplicada na análise de micotoxinas em alimentos (leite e fórmulas infantis). Os métodos utilizados no tratamento das amostras de leite e fórmulas infantis são semelhantes. No entanto, para aumentar a sensibilidade do método analítico, utilizou-se um fator de diluição da amostra menor para as amostras de fórmulas infantis. Além disso, a sensibilidade do método para fórmulas infantis foi melhorada através do aumento da proporção de fase aquosa no gradiente inicial da cromatografia.

Para determinação das micotoxinas em amostras de alimentos infantis a base de cereais (mingau), foram avaliados diversos métodos de extração encontrados na literatura, com algumas modificações para a viabilização da análise no laboratório e diminuição do tempo de análise. No entanto, os resultados obtidos empregando estes métodos não foram satisfatórios, principalmente para as fumonisinas hidrolisadas. Assim, um método de extração foi otimizado obtendo resultados satisfatórios para todas as micotoxinas alvo. O método desenvolvido é simples e rápido, envolvendo uma etapa simultânea de extração e limpeza dos extratos, seguida de concentração dos extratos e análise por CLUE-EM/EM.

A presença de efeito matriz significativo para a maioria das micotoxinas alvo foi o grande desafio desse estudo. Para que quantificações confiáveis pudessem ser obtidas, a utilização de curvas de calibração em matriz foi utilizada. Esta abordagem demonstrou ser relativamente simples e não onerosa para utilização em monitoramentos de diferentes tipos

de alimentos. No entanto, o efeito matriz deve ser rigorosamente estudado na etapa de validação, principalmente, quando os métodos são aplicados a produtos de diferentes fabricantes. Quando a composição dos produtos não é claramente declarada pelos fabricantes, a quantificação dos analitos utilizando curvas de calibração em matriz é prejudicada. Assim, o método de adição padrão apresenta-se como uma alternativa para quantificações confiáveis.

A otimização das condições cromatográficas demonstraram resposta interessante quanto à diminuição do efeito matriz, principalmente aumentando o tempo do gradiente utilizado na cromatografia. Além de aumentar o tempo de análise, o aumento do tempo do gradiente utilizado prejudica a sensibilidade do método. No entanto, no desenvolvimento de métodos analíticos onde a sensibilidade requerida é menos restritiva ou empregando equipamentos com maior sensibilidade analítica, o aumento do tempo do gradiente pode ser considerado para minimizar ou resolver o problema do efeito matriz.

O efeito memória para as fumonisinas apresentou-se como um dos principais desafios no desenvolvimento do método analítico. No entanto, este problema não tem sido investigado na maioria dos estudos reportados na literatura para determinação destas micotoxinas. Neste estudo foi demonstrado que a injeção de soluções com a matriz pode amenizar o efeito memória obtido para as fumonisinas. Assim, estes resultados apontam um promissor caminho para futuros estudos com o objetivo de amenizar ou eliminar o efeito memória observado para estas substâncias.

O método QuEChERS modificado com adição de hexano para retirar lipídios na etapa de particionamento, utilizado com sucesso na análise de micotoxinas em leite e fórmulas infantis, apresenta grande potencial para ser aplicado na análise de aflatoxinas e ocratoxina A em matrizes com alto teor de lipídeos. A aplicabilidade deste método foi demonstrada na análise de aflatoxinas M2, M1, G2, G1, B2 e B1 em amendoim e produtos derivados.

Os métodos analíticos desenvolvidos foram aplicados com sucesso na determinação de micotoxinas em leite, fórmulas infantis e alimentos infantis a base de cereais (mingau). Foram obtidos resultados inéditos quanto à contaminação de alimentos consumidos no Brasil, demonstrando a importância dos métodos multimicotoxinas desenvolvidos.

A presença de aflatoxina M2 em amostras de leite consumidas no país foi demonstrada pela primeira vez. Além disso, todas as amostras que foram positivas para aflatoxina M2 também foram positivas para aflatoxina M1, sendo um novo dado para futuros



estudos de avaliação de risco do consumo desse alimento por crianças no Brasil.

Quanto à contaminação de fórmulas infantis pela aflatoxina M1, os inéditos resultados encontrados no presente estudo apontam a importância da realização de mais estudos de monitoramento para subsidiar a discussão a cerca da possível regulamentação desta micotoxina em fórmulas infantis no Brasil.

A maioria das amostras analisadas de mingau a base de cereais para consumo infantil foram consideradas impróprias para consumo em relação a pelo menos uma micotoxina analisada. As fumonisinas (B1+B2), a aflatoxina B1, o desoxinivalenol e zearalenona foram encontradas em níveis de concentração que excedem o LMT estabelecido pela legislação brasileira. A contaminação simultânea de diferentes classes de micotoxinas analisadas demonstra a importância do método analítico desenvolvido.

A presença de fumonisinas em mingau a base de milho pode ser considerada um importante problema de saúde pública já que os níveis de contaminação encontrados excedem o LMT vigente no Brasil para a maioria das amostras analisadas. Ainda, foi demonstrado que a presença de fumonisinas mascaradas pode contribuir significativamente com a exposição devido aos altos níveis de concentração encontrados.

Os resultados encontrados neste estudo podem subsidiar as autoridades de saúde pública na discussão para o estabelecimento de regulamentações para o controle de micotoxinas em alimentos.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUILERA-LUIZ, M.M.; PLAZA-BOLANOS, P.; ROMERO-GONZALEZ, R.; VIDAL, J.L.M.; FRENICH, A.G. Comparison of the efficiency of different extraction methods for the simultaneous determination of mycotoxins and pesticides in milk samples by ultra high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, 399: 2863-75, 2011.

ALMEIDA, M.I.; ALMEIDA, N.G.; CARVALHO, K.L.; GONCALVES, G.A.A; SILVA, C.N; SANTOS, E.A; GARCIA, J.C; VARGAS, E.A. Co-occurrence of aflatoxins B1, B2, G1 and G2, ochratoxin A, zearalenone, deoxynivalenol, and citreoviridin in rice in Brazil. **Food Additives and Contaminants**, 29(4), 694-703, 2012.

ALVITO, P.C.; SIZOO, E.A.; EGMOND, H.P.V.; ALMEIDA, C.M.M. Occurrence of aflatoxins and ochratoxin A in baby foods in Portugal. **Food Analytical Methods**, 3(1), 22-30, 2010.

ANDRADE P D; SILVA J L G; CALDAS E D. Simultaneous analysis of aflatoxins B1, B2, G1, G2, M1 and ochratoxin A in breast milk by high-performance liquid chromatography/fluorescence after liquid-liquid extraction with low temperature purification (LLE-LTP). **Journal of Chromatography A**, 1304: 61-68, 2013.

ARAGUÁS C.; GONZÁLEZ-PEÑAS E.; LÓPEZ DE CERAIN A. Study on ochratoxin A in cereal-derived products from Spain. **Food Chemistry**, 92, 459-464, 2005.

AZZIZ-BAUMGARTNER, E.; LINDBLADE, K.; GIESEKER, K.; SCHURZ ROGERS, H.; KIESZAK, S.; NJAPAU, H.; SCHLEICHER, R.; MCCOY, L.F.; MISORE, A. Case-control study of an acute aflatoxicosis outbreak, Kenya, 2004. **Env Hlth Perspect**, 113:1779-1783, 2005.

BANKOLE, S A; SCHOLLENBERGER, M; DROCHNER, W. Survey of ergosterol, zearalenone and trichothecene contamination in maize from Nigeria. **Journal of Food Composition and Analysis**, 23(8), 837-842, 2010.

BAYDAR, T.; ERKEKOGLU, P.; SIPAHI, H.; SAHIN, G. Aflatoxin B1, M1 and Ochratoxin A Levels in Infant Formulae and Baby Foods Marketed in Ankara, Turkey. **Journal of Food and Drug Analysis**, 15 (1), 89-92, 2007.

BAYMAN, P.; BAKER, J.L.; DOSTER, M.A.; MICHAILIDES, T.J.; MAHONEY, N.E. Ochratoxin production by the *Aspergillus ochraceus* group and *Aspergillus alliaceus*. **Appl Environ Microbiol**. 68(5): 2326-2329, 2002.

BELTRAN, E.; IBANEZ, M.; SANCHO, J.V.; CORTES, M.A.; YUSA, V.; HERNANDEZ, F. UHPLC–MS/MS highly sensitive determination of aflatoxins, the aflatoxin metabolite M1 and ochratoxin A in baby food and milk. **Food Chemistry**, 126 (2), 737-744, 2011.

BENESOVA, K; BELAKOVA, S; MIKULIKOVA, R; SVOBODA, Z. Monitoring of selected aflatoxins in brewing materials and beer by liquid chromatography/mass spectrometry. **Food Control**, 25(2), 626-630, 2012.

BENNETT, J.W.; KLICH, M. Mycotoxins. **Clin. Microbiol. Rev.**, 16, 497–516, 2003.

BILANDZIC N; BOZIC D; DOKIC M; SEDAK M; KOLANOVIC B S; VARENINA I; TANKOVIC S; CVETNIC Z. Seasonal effect on aflatoxin M1 contamination in raw and UHT milk from Croatia. **Food Control**, 40, 260–264, 2014.

BIRCAN, C. Incidence of ochratoxin A in dried fruits and co-occurrence with aflatoxins in dried figs. **Food and Chemical Toxicology**, 47(8), p.1996(6), 2009.

BOLECHOVA M; BENESOVA K; BELAKOVA S; CASLAVSKY J; POSPICALOVA M; MIKULIKOVA R. Determination of seventeen mycotoxins in barley and malt in the Czech Republic. **Food Control**, 47, p.108(6), 2015.

BRÄSE S; ENCINAS A; KECK J; NISING CF. Chemistry and Biology of Mycotoxins and Related Fungal Metabolites. **Chem. Rev.**, 109: 3903-3990, 2009.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). 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 n. 7, de 18 de fevereiro de 2011 que dispõe limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos. DOU: 30 de dezembro de 2013, Seção 1.

BRASIL. Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária. Portaria n. 183, art 1. Adotar regulamento técnico do MERCOSUL sobre limites máximos de aflatoxinas admissíveis no leite, amendoim e milho, aprovado pela resolução nº 56/94 do grupo Mercado comum do Sul de 1 de janeiro de 1995. DOU: Brasília, 25 mar. 1996.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 222, de 5 de agosto de 2002. Regulamento técnico para promoção comercial dos alimentos para lactentes e crianças de primeira infância. Disponível em:>[http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/6b6c3b004745973b9f89df3fbc4c6735/rdc\\_222.pdf?MOD=AJPERES](http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/6b6c3b004745973b9f89df3fbc4c6735/rdc_222.pdf?MOD=AJPERES)>. Acessado em: 30/12/2014.

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. Publicada no D.O.U em 22 de fevereiro de 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. Comissão Nacional de Normas e padrões para alimentos. Resolução nº 34/76. Fixa padrões de tolerância para as aflatoxinas em alimentos. Diário Oficial [da] União, Brasília, pt. I, p. 710, 19 jan. 1977. Seção I.

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. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Protocolos do Sistema de Vigilância Alimentar e Nutricional – SISVAN na assistência à saúde / Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica.– Brasília : Ministério da Saúde, 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Ações Programáticas e Estratégicas. II Pesquisa de Prevalência de Aleitamento Materno nas Capitais Brasileiras e Distrito Federal / Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Ações Programáticas e Estratégicas. – Brasília : Ministério da Saúde, 2009, 108 p.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Secretaria de Fiscalização Agropecuária. Portaria nº 7, de 9 de novembro de 1988. Estabelece os padrões mínimos das diversas matérias primas empregadas na alimentação animal. Publicado: D.O.U., 14/11/1988.

BRUNKEN G S; SILVA S M; FRANÇA G V A; ESCUDER M M L; VENANCIO S I. Fatores associados à interrupção precoce do aleitamento materno exclusivo e à introdução tardia da alimentação complementar no Centro-oeste brasileiro. **J Pediatr (Rio J.)**, 82:445-51, 2006.

BULLERMAN, L. B.; BIANCHINI, A. Stability of mycotoxins during food processing. **International Journal of Food Microbiology**, 119 (1-2), 140-146, 2007.

CALDAS E. D.; SILVA S. C.; OLIVEIRA J. N. Aflatoxinas e ocratoxina A em alimentos e riscos para a saúde humana. **Revista de Saúde Pública**, 36(3):319-23, 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. **Ciênc. Technol. Aliment.**, 27(1): 181-185, 2007.

CAMPONE L; PICCINELLI AL; CELANO R; RUSSO M; RASTRELLI L. Rapid analysis of aflatoxin M1 in milk using dispersive liquid-liquid microextraction coupled with ultrahigh pressure liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Anal Bioanal Chem.**, 405(26):8645-52, 2013.

CAMPBELL, H.; CHOO, T.M.; VIGIER, B.; UNDERHILL, L. Mycotoxins in barley and oat samples from eastern Canada. **Canadian Journal of Plant Science**, 80(4), 977-980, 2000.

CANO-SANCHO G.; GAUCHI J-P; SANCHIS V.; MARÍN S.; RAMOS A. J. Quantitative dietary exposure assessment of the Catalanian population (Spain) to the mycotoxin deoxynivalenol. **Food Additives and Contaminants**, 28(8), 1098–1109, 2011.

CASTILLO, M-Á; MONTES, R; NAVARRO, A; SEGARRA, R; CUESTA, G; HERNÁNDEZ, E. Occurrence of deoxynivalenol and nivalenol in Spanish corn-based food products. **Journal of Food Composition and Analysis**, 21(5), 423-427, 2008.

CASTRO, M. F.; SHEPHARD, G. S.; SEWRAM, V.; VICENTE, E.; MENDONÇA, T. A.; JORDAN, A. C. Fumonisin in Brazilian corn based foods for infant consumption. **Food Addit. Contam.**, 21, 693-699, 2004.

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.

CHEN C Y; LI W J; PENG K Y. Determination of aflatoxin M1 in milk and milk powder using high-flow solid-phase extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 53: 8474-8480, 2005.

CHEN, D; CAO, X; TAO, Y; WU, Q; PAN, Y; HUANG, L; WANG, X; WANG, Y; PENG, D; LIU, Z; YUAN, Z. Development of a sensitive and robust liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry and a pressurized liquid extraction for the determination of aflatoxins and ochratoxin A in animal derived foods. **Journal of Chromatography A**, 1253, 110-119, 2012.

CHU, F S. Mycotoxins: food contamination, mechanism, carcinogenic potential and preventive measures. **Mutation Research**, 259(3-4):291-306, 1991.

COMUNIDADE EUROPEIA (CE). Commission decision 2002/657/EC of 12 August 2002. Implementing Council Directive 96/23/EC concerning performance of analytical methods and the interpretation of results. Official Journal of the European Communities, Brussels, 2002, L 221/8.

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.

CORONEL, M. B.; MARIN, S.; CANO, G.; RAMOS, A.J.; SANCHIS, V. Ochratoxin A in Spanish retail ground roasted coffee: occurrence and assessment of the exposure in Catalonia. **Food Control**, 22(3), pp.414-419, 2011.

CORONEL, M. B.; MARÍN, S.; CANO-SANCHO, G.; RAMOS, A. J.; SANCHIS, V. Exposure assessment to ochratoxin A in Catalonia (Spain) based on the consumption of cereals, nuts,

coffee, wine, and beer. **Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment**, 29(6), pp.979-993, 2012.

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

CYRILLO, D.C.; SARTI, F.M.; FARINA, E.M.Q.; MAZZON, J.A. Duas décadas da Norma Brasileira de Comercialização de Alimentos para Lactentes: há motivos para comemorar? **Rev Panam Salud Publica**, Washington, v. 25, n. 2, 2009.

D'ARCO, G.; FERNÁNDEZ FRANZÓN, M.; FONT, G.; DAMIANI, P.; MAÑES, J. Analysis of fumonisins B1, B2 and B3 in corn-based baby food by pressurized liquid extraction and liquid chromatography/tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, 1209(1–2), 188–194, 2008.

DALL'ASTA, C.; FALAVIGNA, C.; GALAVERNA, G.; DOSSENA, A.; MARCHELLI, R. *In vitro* digestion assay for determination of hidden fumonisins in maize. **J. Agric. Food Chem.**, 58 (22), 12042–12047, 2010.

DALL'ASTA, C.; GALAVERNA, G.; AURELI, G.; DOSSENA, A.; MARCHELLI, R. LC/MS/MS method for the simultaneous quantification of free and masked fumonisins in maize and maize-based products. **World Mycotoxin Journal**, 1(3): 237-246, 2008.

DEABES, M. M.; EL-HABIB, R. E. S. Toxigenic fungi and ochratoxin A associated to nuts in Saudi Arabia. **Toxicology Letters**, Vol. 205, pp.S140-S140, 2011.

DIEKMAN, M. A.; GREEN, M. L. Mycotoxins and reproduction in domestic livestock. **Journal of Animal Science**, 70, 1615–1627, 1992.

DOMBRINK-KURTZMAN, M. A.; DVORAK, T. J. Fumonisin Content in Masa and Tortillas from Mexico. **J. Agric. Food Chem.**, 47, 622–627, 1999.

DUARTE S.C.; ALMEIDA A.M.; TEIXEIRA A.S.; PEREIRA A.L.; FALCÃO A.C.; PENA A.; LINO C.M. Aflatoxin M1 in marketed milk in Portugal: assessment of human and animal exposure. **Food Control**, 30, 411–417, 2013.

EGMOND, H. P. V; SCHOTHORST, R. C.; JONKER, M. A. Regulations relating to mycotoxins in food: perspectives in a global and European context. **Anal Bioanal Chem**, 389: 147-157, 2007.

ERKEKOGLU P.; SAHIN, G.; BAYDAR T. A special focus on mycotoxin contamination in baby foods: their presence and regulations. **FABAD J. Pharm. Sci.**, 33, 51-66, 2008.

EZEKIEL C.N.; SULYOK, M.; WARTH B.; ODEBODE A.C.; KRSKA R. Natural occurrence of mycotoxins in peanut cake from Nigeria. **Food Control**, 27 (2): 338–342, 2012.

FAO. Evaluation of certain contaminants in food: seventy-second report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. WHO technical report series, no. 959, 105 p., 2011.

FAO. Worldwide Regulations for Mycotoxins 1995. A compendium. FAO Food and Nutrition Paper 64. Rome, Italy, 1997.

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.

FILAZI, A; SIRELI, U. T. Occurrence of Aflatoxins in Food, Aflatoxins - Recent Advances and Future Prospects, Prof. Razzaghi-Abyaneh M. (Ed.), ISBN: 978-953-51-0904-4, **InTech**, 2013. Available from: <http://www.intechopen.com/books/aflatoxins-recent-advances-and-future-prospects/occurrence-of-aflatoxins-in-food>.

FINK-GREMMELS, J. Mycotoxins in cattle feeds and carry-over to dairy milk: A review. **Food Additives & Contaminants: Part A**, 25:2, 172-180, 2008.

FREIRE, F. C. O.; VIEIRA, I. G. P.; GUEDES, M. I. F.; MENDES, F. N. P. Micotoxinas: importância na alimentação e na saúde humana e animal - Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical. 2007, 48 p. Disponível em: [http://www.cnpq.br/embrapa.br/cd/jss/acervo/Dc\\_110.pdf](http://www.cnpq.br/embrapa.br/cd/jss/acervo/Dc_110.pdf). Acesso em: 24/05/2015.

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, 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. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, v. 58, p. 105-111, 1999.

GALAVERNA, G.; DALL'ASTA, C.; MANGIA, M.; DOSSENA, A.; MARCHELLI, R. Masked Mycotoxins: an Emerging Issue for Food Safety. **Czech J. Food Sci.**, 27, Special Issue, 2009.

GAREIS, M.; BAUER, J.; THIEM, J.; PLANK, G.; GRABLEY, S.; GEDEK, B. Cleavage of Zearalenone-Glycoside, a "Masked" Mycotoxin, during Digestion in Swine. **Journal of Veterinary Medicine**, Series B, 3, 236-40, 1990.

GARRIDO, N.S.; IHA, M.H.; ORTOLANI, M.R.S; FÁVARO, R.M.D. Occurrence of aflatoxins M1 and M2 in milk commercialized in Ribeirão Preto-SP, Brazil. **Food Additives and Contaminants**, 20: 70-73, 2003.

GARRIDO, CE; PEZZANI, CH; PACIN, A. Mycotoxins occurrence in Argentina's maize (*Zea mays* L.), from 1999 to 2010. **Food Control**, Vol.25(2), pp.660-665, 2012.

GAZZOTTI, T.; LUGOBONI, B.; ZIRONI, E. Determination of fumonisin B1 in bovine milk by LC-MS/MS. **Food Control**, 20, 1171-1174, 2009.

GELDERBLOM, W. C.; JASKIEWICZ, K.; MARASAS, W. F.; THIEL, P. G.; HORAK, R. M.; VLEGGAR, R.; KRIEK, N. P. Fumonisin: novel mycotoxins with cancer promoting activity produced by *Fusarium moniliforme*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.54, n.7, p.1806-1811, 1988.

GHAZANI, MH. Aflatoxin M1 contamination in pasteurized milk in Tabriz (northwest of Iran). **Food Chem Toxicol.**, 47(7):1624-5, 2009.

GOLGE, O. A survey on the occurrence of aflatoxin M1 in raw milk produced in Adana province of Turkey. **Food Control**, Vol.45, pp.150-155, 2014.

GÓMEZ-ARRANZ, E; NAVARRO-BLASCO, I. Aflatoxin M1 in Spanish infant formulae: occurrence and dietary intake regarding type, protein-base and physical state. **Food additives & contaminants. Part B, Surveillance**, 3(3), pp.193-9, 2010.

GONÇALEZ E.; FELICIO J.D.; PINTO M.M.; ROSSI M.H.; NOGUEIRA J.H.C.; MANGINELLI S. Ocorrência de aflatoxina M1 em leite comercializado em alguns municípios do Estado de São Paulo. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v.72, n.4, p.435-438, 2005.

GONG, Y.Y.; HOUNSA, A; EGAL, S.; TURNER, P.C.; SUTCLIFFE, A.E.; HALL, A.J.; CARDWELL, K.; WILD, C.P. Postweaning exposure to aflatoxin results in impaired child growth: a longitudinal study in Benin, West Africa. **Environ Hlth Perspect**, 112(13):1334–1338, 2004.

GONG, H.Z.; JI, R.; LI, Y.X.; ZHANG, H.Y.; LI, B.; ZHAO, Y.; SUN, L.; YU, F.; YANG, J. Occurrence of fumonisin B1 in corn from the main corn-producing areas of China. **Mycopathologia**, 167(1), 31-36, 2009.

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.

GULER, F.K.; HEPERKAN, D. Natural occurrence of fumonisin B1 in dried figs as an unexpected hazard. **Food and Chemical Toxicology**, 47(2), 289-292, 2009.

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*. **J Vet Diagn Invest**, 2:217–221, 1990.



HENDRICKSE, R.G. Kwashiorkor: the hypothesis that incriminates aflatoxins. **Pediatrics**, 88: 376-9, 1991.

HENNIGEN, M.R.; DICK, T. Incidence and abundance of mycotoxins in maize in Rio Grande do Sul, Brazil. **Food Addit. Contam.**, v. 12, p. 677-681, 1995.

HERZALLAH, S M. Determination of aflatoxins in eggs, milk, meat and meat products using HPLC fluorescent and UV detectors. **Food Chemistry**, 114: 1141, 2009.

HIROOKA, E. Y.; YAMAGUCHI, M. M.; AOYAMA, S.; SUGIURA, Y.; UENO, Y. Natural occurrence of fumonisinas in brazilian corn kernels. **Food Additives and Contaminants**, v. 13, p. 173-183, 1996.

HLYWKA, J.J.; BULLERMAN, L.B. Occurrence of fumonisin B1 and B2 in beer. **Food Additives and Contaminants**, 16(8), 319-324, 1999.

HOWARD, P. C.; CHURCHWELL, M. I.; COUCH, L. H.; MARQUES, M. M.; DOERGE, D. R. Formation of N-(carboxymethyl)fumonisin B1 following the reaction of fumonisin B1 with reducing sugars. **J. Agric Food Chem**, 46: 3546–57, 1998.

HUANG, B.; HAN, Z.; CAI, Z.; WU, Y.; REN, Y. Simultaneous determination of aflatoxins B1, B2, G1, G2, M1 and M2 in peanuts and their derivative products by ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Anal. Chim. Acta.**, 662: 62-68, 2010.

HUEZA, I. M.; RASPANTINI, P. C. F.; RASPANTINI, L. E. R.; LATORRE, A. O.; GÓRNIK, S. L. Zearalenone, an estrogenic mycotoxin, is an immunotoxic compound. **Toxins**, 6, 1080-1095, 2014.

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

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, 82: 301-366, 2002.

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.

IBÁÑEZ-VEA, M.; MARTÍNEZ, R.; GONZÁLEZ-PEÑAS, E.; LIZARRAGA, E.; LÓPEZ DE CERAIN, A. Co-occurrence of aflatoxins, ochratoxin A and zearalenone in breakfast cereals from spanish market. **Food Control**, 22(12), 1949-1955, 2011.

IHA, M.H.; ABE, L.T.; OKADA, M.M.; FAVARO, R.M.D. Occurrence of aflatoxins M1 and M2 in goat milk marketed commercialized in the region of Ribeirão Preto-SP, Brazil. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, 66(1): 57-62, 2007.

IHA M.H.; BARBOSA, C.B.; HECK, A.R.; TRUCKSESS, M.W. Aflatoxin M1 and ochratoxin A in human milk in Ribeirão Preto-SP, Brazil. **Food Control**, 40: 310-313, 2014.

IHA, M.H.; BARBOSA, C.B.; OKADA, I.A.; TRUCKSESS, M.W. Aflatoxin M1 in milk and distribution and stability of aflatoxin M1 during production and storage of yoghurt and cheese. **Food Control**, 29:1-6, 2013.

IQBAL, S. Z.; ASIC, M. R.; JINAPA, S.; RASHIDE, U. Detection of aflatoxins and zearalenone contamination in wheat derived products. **Food Control**, 35 (1), 223–226, 2014(a).

IQBAL, S. Z.; ASI, M. R.; ZUBER, M.; AKRAM, N.; BATOOL, N. Aflatoxins contamination in peanut and peanut products commercially available in retail markets of Punjab, Pakistan. **Food Control**, 32(1), 83, 2013.

IQBAL, S. Z.; RABBANI, T.; ASI, M. R.; JINAP, S. Assessment of aflatoxins, ochratoxin A and zearalenone in breakfast cereals. **Food Chemistry**, 157, 257-262, 2014(b).

JI, F; XU, JH; LIU, X; YIN, XC; SHI, JR. Natural occurrence of deoxynivalenol and zearalenone in wheat from Jiangsu province, China. **Food Chemistry**, 157, 393-397, 2014.

JIA, W.; CHU X.; LING, Y.; HUANG, J.; CHANG, J. Multi-mycotoxin analysis in dairy products by liquid chromatography coupled to quadrupole orbitrap mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, 1345, 107–114, 2014.

JIANG, Y.; JOLLY, P.E.; PREKO, P.; WANG, J.S.; ELLIS, W.O.; PHILLIPS, T.D.; WILLIAMS, J.H. Aflatoxin-related immune dysfunction in health and in human immunodeficiency virus disease. **Clin Dev Immunol**, 2008: 790309, 2008.

JORGENSEN, K. Survey of pork, poultry, coffee, beer and pulses for ochratoxin A. **Food Addit Contam.**, 15(5), 550-4, 1998

JUAN, C.; RAIOLA, A.; MANES, J.; RITIENI, A. Presence of mycotoxin in commercial infant formulas and baby foods from Italian market. **Food Control**, 39, 227, 2014.

KABAK, B. Ochratoxin A in cereal-derived products in Turkey: occurrence and exposure assessment. **Food and Chemical Toxicology**, 47, 348-352, 2009.

KAWASHIMA, L. M.; SOARES, L. M. V. Incidência de fumonisina B1, aflatoxinas B1, B2, G1 e G2, ocratoxina A e zearalenona em produtos de milho. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, 26(3): 516-521, 2006.

KHATOON, S.; AYUB, N.; KHATOON, S.; HANIF, N Q.; TAHIRA, I.; SULTANA, N.; SULTANA, K. Natural occurrence of aflatoxins, zearalenone and trichothecenes in maize grown in Pakistan. **Pakistan Journal of Botany**, 44(1), 231-236, 2012.

KIM, E. K.; SHON, D. H.; RYU, D.; PARK, J. W.; HWANG, H. J.; KIM, Y. B. Occurrence of aflatoxin M1 in Korean dairy products determined by ELISA and HPLC. **Food Additives and Contaminants**, 17, 59–64, 2000.

KIM, E.K.; SHON, D.H.; CHUNG, S.H.; KIM, Y.B. Survey for fumonisin B1 in Korean corn-based food products. **Food Additives and Contaminants**, 19(5), 459-464, 2002.

KLICH, M.A. *Aspergillus flavus*: the major producer of aflatoxin. **Mol Plant Pathol.**, 8(6):713-22, 2007.

KOKKONEN, M. The challenge of LC/MS/MS multimycotoxin analysis – heracles battling the hydra? Academic Dissertation. University of Helsinki. Department of Food and Environmental Sciences, Helsinki 2011.

KÖPPEN, R.; KOCH, M.; SIEGEL, D.; MERKEL, S.; MAUL, R.; NEHLS, I. Applied Microbiology and Biotechnology Determination of mycotoxins in foods: current state of analytical methods and limitations. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 86(6), 1595-612, 2010.

KOS, J.; LEVIA, J; AURAGIA, O.; KOKIA, B.; MILADINOVIA, I. Occurrence and estimation of aflatoxin M1 exposure in milk in Serbia. **Food Control**, 38, 41(6), 2014.

KOSTELANSKÁ M.; SOSNOVCOVÁ I.; ONDREJ L.; HAJSLOVÁ J. Determination of mycotoxins in infant and baby food using UPLC-MS/MS analytical method. **Proceedings of 6th ISC Modern Analytical Chemistry**. Prague, 2010.

KUMAR, M.; DWIVEDI, P.; SHARMA, A.K.; SINGH, N.D.; PATIL, R.D. Ochratoxin A and citrinin nephrotoxicity in New Zealand White rabbits: an ultrastructural assessment. **Mycopathologia**, 163(1), 21-30, 2007.

KUNIHOLM, M.H.; LESI, O.A.; MENDY, M.; AKANO, A.O.; SAM, O.; HALL, A.J.; WHITTLE, H.; BAH, E.; GOEDERT, J.J.; HAINAUT, P.; KIRK, G.D. Aflatoxin exposure and viral hepatitis in the etiology of liver cirrhosis in the Gambia, West Africa. **Environ Health Perspect**, 116(11):1553-1557, 2008.

KURTZMAN, C. D.; HORN, B. W.; HESSETLINE, C. W. *Aspergillus nomius*, a new aflatoxin producing species related to *Aspergillus flavus* and *Aspergillus tamaris*. **Antonie van Leeuwenhoek**, 53, 158–174, 1987.

LACINA, O.; ZACHARIASOVA, M.; URBANOVA, J.; VACLAVIKOVA, M.; CAJKA, T.; HAJŠLOVA, J. Critical assessment of extraction methods for the simultaneous determination of pesticide residues and mycotoxins in fruits, cereals, spices and oil seeds employing ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, 1262:8-18. 2012.

LAFONT, P.; SIRIWARDANA, M.; LAFONT, J. Genotoxicity of hidroxy-aflatoxins M1 e M2. **Micrb. Alim. Nutr.**, 7, 1-8, 1989.

LEE, D.; LEE, K.G. Analysis of aflatoxin M1 and M2 in commercial dairy products using high-performance liquid chromatography with a fluorescence detector. **Food Control**, 50, 467-471, 2014.

LEONG, Y.-H.; ISMAIL, N.; LATIF, A. A.; AHMAD, R. Aflatoxin occurrence in nuts and commercial nutty products in Malaysia. **Food Control**, 21(3), 334-338, 2010.

LI, F.-Q.; LI, Y.-W.; WANG, Y.-R.; LUO, X.-Y. Natural occurrence of aflatoxins in chinese peanut butter and sesame paste. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 57(9), 3519-3524, 2009.

LINO, C. M.; SILVA, L. J. G.; PENA, A.; FERNÁNDEZ, M.; MAÑES, J. Occurrence of fumonisins B1 and B2 in broa, typical Portuguese maize bread. **International Journal of Food Microbiology**, 118, 2007, 79–82.

LINO, C. M.; SILVA, L. J. G.; PENA, A. S. Fumonisin: presença em alimentos, implicações na saúde e aspectos legislativos. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, 99 (552), 181-192, 2004.

LIU, Y.P.; YANG, L.X.; YANG, N.J.; DONG, B.; CAO, L.L.; WANG, K.; YANG, L.X. Occurrence of fumonisins and aflatoxins in cereals from markets of Hebei province of China. **Food Additives and Contaminants**, 5(3), 208-211, 2012.

LIU, Y.; CHANG, C.C.; MARSH, G.M.; WU, F. Population attributable risk of aflatoxin-related liver cancer: systematic review and meta-analysis. **Eur J Cancer**, 48(14): 2125-36, 2012.

LOGRIECO, A.; VISCONTI, R.; FERRACANE, A.; RITIENI, A. Natural occurrence of fumonisin B2 in red wine from Italy. **Food Additives and Contaminants**, 27(8), 1136-1141, 2010.

LOMBAERT, G.A.; PELLAERS, P.; ROSCOE, V.; MANKOTIA, M.; NEIL, R.; SCOTT, P.M. Mycotoxins in infant cereal foods from the Canadian retail market. **Food Addit Contam.**, 20: 494-504, 2003.

LONDOÑO, V.A.G.; BOASSO, A.C.; DE PAULA, M.C.Z.; GARCIA, L.P.; SCUSSEL, V.M.; RESNIK, S.; PACÍN, A. Aflatoxin M1 survey on randomly collected milk powder commercialized in Argentina and Brazil. **Food Control**, 34(2): 752–755, 2013.

LOVELACE, C.E.; NYATHI, C.B. Estimation of the fungal toxins, zearalenone and aflatoxin, contaminating opaque maize beer in Zambia. **J. Sci. Food Agric.**, 28, 288–292, 1977.

LUTFULLAH, G.; HUSSAIN, A. Studies on contamination level of aflatoxins in some cereals and beans of Pakistan. **Food Control**, 23(1), 32-36, 2012.

LUTFULLAH, G.; HUSSAIN, A. Studies on contamination level of aflatoxins in some dried fruits and nuts of Pakistan. **Food Control**, 22, 426-429, 2011.

MABLY, M.; MANKOTIA, M.; CAVLOVIC, P.; TAM, J.; WONG, L.; PANTAZOPOULOS, P.; CALWAY, P.; SCOTT, P.M. Survey of aflatoxins in beer sold in Canada. **Food Additives and Contaminants**, 22(12), 1252-1257, 2005.

MACHINSKI, M.; SOARES, L. M. V. Fumonisin B1 and B2 in Brazilian corn-based food products. **Food Addit. Contam.**, 17, 875-79, 2000.

MACHINSKI, M.; SOARES, L. M. V.; SAWAZAKI, E.; BOLONHEZI, D.; CASTRO, J. L.; BORTOLLETO, N. Aflatoxins, ochratoxin A and zearalenone in Brazilian corn cultivars. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 81(10), 1001-1007, 2001.

MAGAN, N.; OLSEN, M. Mycotoxins in food. Detection and control. CRC New York Washington, DC, 471 p., 2004.

MAHINE N, MECA G, FERNÁNDEZ-FRANZÓN M, MAÑES J, ZINEDINE A. Occurrence of fumonisins B1, B2 and B3 in breakfast and infant cereals from Morocco. **Phytopathologia Mediterranea**, 51(1), 193–197, 2012.

MAJEED, S.; IQBAL, M.; ASI, M. R.; IQBAL, S. Z. Aflatoxins and ochratoxin A contamination in rice, corn and corn products from Punjab, Pakistan. **Journal of Cereal Science**, 58(3), 446, 2013.

MAKUN, H.A.; ADENIRAN, A.L.; MAILAFIYA, S.C.; AYANDA, I.S.; MUDASHIRU, A.T.; OJUKWU, U.J.; JAGABA, A.S.; USMAN, Z.; SALIHU, D.A. Natural occurrence of ochratoxin A in some marketed Nigerian foods. **Food Control**, 31(2), 566-571, 2013.

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). **Rev. Ciên. 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. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, 68(1), 41-45, 2001.

MARAGOS, C. M.; RICHARD, J. L. Quantification and stability of fumonisins B1 and B2 in milk. **J. AOAC Int.**, 77, 1162-1167, 1994.

MARASAS, W. F. O. Discovery and occurrence of the fumonisins: a historical perspective. **Environmental Health Perspectives**, 109, 2, 2001.

MERCOSUL. Mercado Comum do Cone Sul. Resolução nº 25 de 2002. Regulamento Técnico Mercosul sobre limites máximos de aflatoxinas admissíveis no leite, amendoim e milho. Disponível em: [http://www.anvisa.gov.br/anvisa/legis/resol/2002/274\\_02rdc.htm](http://www.anvisa.gov.br/anvisa/legis/resol/2002/274_02rdc.htm). Acessado em: 26/05/2015.

MEUCCI, V.; RAZZUOLI, E.; SOLDANI, G.; MASSART, F. Mycotoxin detection in infant formula milks in Italy. **Food Additives and Contaminants**, 27(1), 64-71, 2010.

MEUCCI, V; SOLDANI, G; RAZZUOLI, E; MASSART, F. Mycotoxins occurrence in Italian formula milks. **Toxicology Letters**, 180, S192-S192, 2008.

MISSMER, S. A.; SUAREZ, L.; FELKNER, M.; WANG, E.; MERRILL, A. H. JR; ROTHMAN, K. J.; HENDRICKS, K. A. Exposure to fumonisins and the occurrence of neural tube defects along the Texas–Mexico border. **Environ Health Perspect**, 114(2): 237–241; 2006.

MOGENSEN, J.M.; LARSEN, T.O.; NIELSEN, K.F. Widespread occurrence of the mycotoxin fumonisin B2 in wine. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 58(8), 4853-4857. 2010.

MOL, H. G.; PLAZA-BOLAÑOS, P.; ZOMER, P.; DE RIJK, T. C.; STOLKER, A. A.; MULDER, P. P. Toward a Generic Extraction Method for Simultaneous Determination of Pesticides, Mycotoxins, Plant Toxins, and Veterinary Drugs in Feed and Food Matrixes. **Anal. Chem.**, 80, 9450–9, 2008.

MURPHY, P.A.; HENDRICH, S.; LANDGREN, C.; BRYANT, C.M. Food Mycotoxins: An Update. **Journal of Food Science**, 71, 5, 2006.

MUSCARELLA, M.; PALERMO, C.; ROTUNNO, T.; QUARANTA, V.; D'ANTINI, P. Survey of ochratoxin A in cereals from Puglia and Basilicata. **Veterinary Research Communications**, 28(1), 229-232, 2004.

NAVAS, S.A.; SABINO, M.; RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Aflatoxin M1 and ochratoxin A in a human milk bank in the city of São Paulo, Brazil. **Food Additives and Contaminants**, 22 (5): 457-462, 2005.

NEMATI, M.; MEHRAN, M.A.; HAMED, P.K.; MASOUD, A. A survey on the occurrence of aflatoxin M1 in milk samples in Ardabil, Iran. **Food Control**, 21: 1022-1024, 2010.

NG, W.; MANKOTIA, M.; PANTAZOPOULOS, P.; NEIL, R.J.; SCOTT, P.M. Ochratoxin A in wine and grape juice sold in Canada. **Food additives and contaminants**, 21(10), 971-81, 2004.

NGUYEN, K T N; RYU, D. Concentration of ochratoxin A in breakfast cereals and snacks consumed in the United States. **Food Control**, 40, 140-144, 2014.

NUNES I. L.; MAGAGNIN G.; BERTOLIN T. E.; FURLONG E. B. Arroz comercializado na região sul do Brasil: aspectos micotológicos e microscópicos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 23(2), p.190, 2003.

OK, H E; KIM, D M; CHUNG, M-S; PARK, K H; CHUN, H S; KIM, D; CHUNG, S H. Mycobiota and natural occurrence of aflatoxin, deoxynivalenol, nivalenol and zearalenone in rice freshly harvested in South Korea. **Food Control**, 37(1), 284-291, 2014.

OK, H; CHANG, HJ; CHOI, SW; CHO, TY; OH, KS; CHUN, HS. Occurrence and intake of deoxynivalenol in cereal-based products marketed in Korea during 2007-2008. **Food Additives and Contaminants**, 2(2), 154-161, 2009.

OLIVEIRA CA, GERMANO PM, BIRD C, PINTO CA. Immunochemical assessment of aflatoxin M1 in milk powder consumed by infants in São Paulo, Brazil. **Food Addit Contam.**,14(1):7-10, 1997.

OLIVEIRA, C.A.; ROSMANINHO, J.; ROSIM, R. Aflatoxin M1 and cyclopiazonic acid in fluid milk traded in Sao Paulo, Brazil. **Food Additives and Contaminants** 23: 196, 2006.

OLIVEIRA, L.P.M.; ASSIS, A.M.O.; GOMES, G.S.S.; PRADO, M.S.; BARRETO, M.L. Duração do aleitamento materno, regime alimentar e fatores associados segundo condições de vida em Salvador, Bahia, Brasil. **Cad Saúde Pública**, 21:1519-30, 2005.

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, C. A. F.; GONÇALVES, N. B.; ROSIM, R. E.; FERNANDES, A. M. Determination of aflatoxins in peanut products in the northeast region of São Paulo, Brazil. **International Journal of Molecular Sciences**, 10(1), 174-183, 2009.

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. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 61(1), 1-6, 2002.

ONO, E. Y.; SUGIURA, Y.; HOMECHIN, M.; KAMOGAE, M.; VIZZONI, E.; UENO, Y.; HIROOKA, E. Y. Effect of climatic conditions on natural mycoflora in fumonisins freshly harvested corn of the state of Paraná, Brazil. **Mycopathologia**, v.147, p.139–148, 1999.

OVEISI, M.R.; JANNAT, B.; SADEGHI, N.; HAJIMAHMOODI, M.; NIKZAD, A. Presence of aflatoxin M1 in milk and infant milk products in Tehran, Iran. **Food Control**, 18: 1216-1218, 2007.

OZDEN, S.; AKDENIZ, A.S.; ALPERTUNGA, B. Occurrence of ochratoxin A in cereal-derived food products commonly consumed in Turkey. **Food Control**, 25, 69–74, 2012.

PATTONO, D.; GALLO, P.F.; CIVERA, T. Detection and quantification of ochratoxin A in milk produced in organic farms. **Food Chemistry**, 127(1): 374-377, 2011.

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

PEREIRA, M.M.G.; CARVALHO, E.P.; PRADO, G.; ROSA, C.A.R.; VELOSO, T.; SOUZA, L.A.F.; RIBEIRO, J. M. M. Aflatoxinas em alimentos destinados a bovinos e em amostras de leite da região de Lavras, Minas Gerais – Brasil. **Ciência e Agrotecnologia**, 26 (1), 106-112, 2005.

PETZINGER, E.; ZIEGLER, K. Ochratoxin A from a toxicological perspective. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, 23(2), 91-98, 2000.

PFOHL-LESZKOWICZ, A.; PETKOVA-BOCHAROVA, T.; CHERNOZEMSKY, I.N.; CASTEGNARO, M. Balkan endemic nephropathy and associated urinary tract tumours: a review on aetiological causes and the potential role of mycotoxins. **Food Addit Contam.**, 19(3): 282-302, 2002.

PFOHL-LESZKOWICZ, A.; MANDERVILLE, R.A. Ochratoxin A: An overview on toxicity and carcinogenicity in animals and humans. **Molecular Nutrition & Food Research**, 51(1), 61-99, 2007.

POLING, S. M.; PLATTNER, R. D.; WEISLEDER, D. J. N-(1-Deoxy-D-fructos-1-yl)fumonisin B1, the initial reaction product of fumonisin B1 and D-glucose. **Agric Food Chem**, 50, 1318–24, 2002.

PRADO, G.; OLIVEIRA, M.S.; ABRANTES, F.M.; SANTOS, L.G.; SORAES, C.R.; VELOSO, T. Ocorrência de aflatoxina M1 em leite consumido na cidade de Belo Horizonte - Minas Gerais / Brasil - agosto/98 à abril/99. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, 19, 3, 1999.

PRADO, G.; OLIVEIRA, M. S.; FERREIRA, S. O.; CORRÊA, T. B. S.; AFFONSO, B. R. R. Ocorrência natural de desoxinivalenol e toxina T-2 em milho pós-colheita. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, 17(3), 1997.



PRANDINI, A.; TANSINI, G.; SIGOLO, S.; FILIPPI, L.; LAPORTA, M.; PIVA, G. On the occurrence of aflatoxin M1 in milk and dairy products. **Food and Chemical Toxicology**, 47: 984, 2009.

QUEIROZ, V.A.V.; ALVES, G.L.O.; CONCEIÇÃO, R.R.P.; GUIMARÃES, L.J.M.; MENDES, S.M.; RIBEIRO, P.E.A.; COSTA, R.V. Occurrence of fumonisins and zearalenone in maize stored in family farm in Minas Gerais, Brazil. **Food Control**, 28(1), 83-86, 2012.

REN, Y.; ZHANG, Y.; SHAO, S.; CAI, Z.; FENG, L.; PAN, H.; WANG, Z. Simultaneous determination of multi-component mycotoxin contaminants in foods and feeds by ultra-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**. 1143:1-2: 48-64, 2007.

REZAEI, M.; PARVIZ, M.; GORJI, M.E.; SHARIATIFAR, N.; HOSEINI, M.A.; HABIBI, S. Occurrence of aflatoxin M1 in milk in Qom, Iran. **Italian Journal of Food Science**, 26(3), 325-328, 2014.

RHEEDER, J. P.; MARASAS W. F. O.; VISMER H. F. Production of fumonisin analogs by fusarium species. **Applied and Environmental Microbiology**, 68(5), 2101-2105, 2002.

ROMAGNOLI, B.; FERRARI, M.; BERGAMINI, C. Simultaneous determination of deoxynivalenol, zearalenone, T-2 and HT-2 toxins in breakfast cereals and baby food by high-performance liquid chromatography and tandem mass spectrometry. **Journal of Mass Spectrometry**, 45, 2010, 1075-1080.

ROMERO-GONZALEZ, R.; FRENICH, A.G.; VIDAL, J.L.M.; PRESTES, O.D.; GRIO, S.L. Simultaneous determination of pesticides, biopesticides and mycotoxins in organic products applying a quick, easy, cheap, effective, rugged and safe extraction procedure and ultra-high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, 1218, 1477-1485, 2011.

Rosa, C.A.; Magnoli, C.E.; Fraga, M.E.; Dalcero, A.M.; Santana, D.M. Occurrence of ochratoxin A in wine and grape juice marketed in Rio de Janeiro, Brazil. **Food Additives & Contaminants**, 21(4), 358-364, 2004.

ROSMANINHO, J. F.; OLIVEIRA, C. A. F.; REIS, T. A.; CORRÊA, B. Aflatoxina M1 e ácido ciclopiazônico em leites de consumo comercializados no Município de São Paulo, SP, Brasil. **Braz. J. Food Technol.**, III JIPCA, 55-59, 2006.

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. **Appl Environ Microbiol.**, 56(10): 3225–3226, 1990.

RUBERT, J.; DZUMAN, Z.; VACLAVIKOVA, M.; ZACHARIASOVA, M.; SOLER, C.; HAJŠLOVA, J. Analysis of mycotoxins in barley using ultra high liquid chromatography high resolution mass spectrometry: Comparison of efficiency and efficacy of different extraction procedures. **Talanta**, 99, 712–719, 2012(a).

RUBERT, J.; SOLER, C.; MAÑES, J. Application of an HPLC–MS/MS method for mycotoxin analysis in commercial baby foods. **Food Chemistry**, 33(1):176–183, 2012(b).

RYU, D.; HANNA, M.A.; BULLERMAN, L.B. Stability of zearalenone during extrusion of corn grits. **J. Food Prot.**, 62, 1482–1484, 1999.

SABINO, M.; PRADO, G.; INOMATA, E.I.; PEDROSO, M.O.; GARCIA, R.V. Natural occurrence of aflatoxins and zearalenone in maize in Brazil. Part II. **Food Addit Contam.**, 6(3):327-31, 1989.

SABINO, M.; PRADO, G.; COLEN, G. Ocorrência de aflatoxinas, ocratoxina A e zearalenoma em milho de Minas Gerais: Parte I / Occurrence of aflatoxins, ochratoxin A and zearalenome in corn grain from Minas Gerais state Brazil. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 46(1/2):65-71, 1986.

SALDIVA, S.R.D.M.; VENANCIO, S.I.; GOUVEIA, A.G.C.; CASTRO, A.L.S.; ESCUDER, M. M.L.; GIUGLIANI, E.R.J. Influência regional no consumo precoce de alimentos diferentes do leite materno em menores de seis meses residentes nas capitais brasileiras e Distrito Federal. **Cad. Saúde Pública**, 27(11):2253-2262, 2011.

SANDERMANN, H. J. Bound and unextractable pesticidal plant residues: chemical characterization and consumer exposure. **Pest Manag Sci.**, 60, 7, 613-23, 2004.

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.

SAUVANT, C.; SILBERNAGL, S.; GEKLE, M. Exposure to ochratoxin A impairs organic anion transport in proximal-tubule-derived opossum kidney cells. **J Pharmacol Exp Ther.**, 287(1):13-20, 1998.

SAVA, V.; REUNOVA, O.; VELASQUEZ, A.; HARBISON, R.; SÁNCHEZ-RAMOS, J. Acute neurotoxic effects of the fungal metabolite ochratoxin-A. **Neurotoxicology**, 27(1), 82-92. 2006.

SCAGLIONI, P.T.; BECKER-ALGERI, T.; DRUNKLER, D.; BADIALE-FURLONG, E. Aflatoxin B1 and M1 in milk. **Analytica Chimica Acta**, 829: 68–74, 2014.

SCOTT, P.M. Mycotoxins Transmitted into beer from contaminated grains during brewing. **J. AOAC Int.**, 79, 875-882, 1996.

SEKIYAMA, B. L.; RIBEIRO, A. B.; MACHINSKI, P. A.; JUNIOR, M. M. Aflatoxins, ochratoxin A and zearalenone in maize-based food products. **Brazilian Journal of Microbiology**, 36:289-294, 2005.

SETYABUDI, F.M.C.S.; NURYONO, N.; WEDHASTRI, S.; MAYER, H.K.; RAZZAZI-FAZELI, E. Limited survey of deoxynivalenol occurrence in maize kernels and maize-products collected from Indonesian retail market. **Food Control**, 24(1-2), 123-127, 2012.

SHERIF, O. S.; SALAMA, E. E.; ABDEL-WAHHAB. Mycotoxins and child health: the need for health risk assessment. **Int. Journal of Hygiene and Environmental Health**, 212 (4), 347-368, 2009.

SHIER, W.T.; ABBAS, H.K.; BADRIA, F.A. Structure-activity relationships of the corn fungal toxin fumonisin B1: implications for food safety. **Journal of Natural Toxins**, 6, 225-242, 1997.

SHUNDO, L.; NAVAS, S.A.; LAMARDO, L.C.A.; RUVIERI, V.; SABINO, M. Estimate of aflatoxin M1 exposure in milk and occurrence in Brazil. **Food Control**, 20 (7), 655–657, 2009.

SHUNDO, L.; SABINO, M. Aflatoxin M1 in milk by immunoaffinity column cleanup with TLC/HPLC. **Brazilian Journal of Microbiology**, 37:164-167, 2006.

SILVA, S. C.; SILVA, L.R.; MATHIAS, L.F.B. O tempo médio entre o nascimento e a primeira mamada: o ideal e o real. **Revista Eletrônica de Enfermagem**, 10 (3):654-61, 2008. Disponível em: <http://www.fen.ufg.br/revista/v10/n3/v10n3a11.htm>. Acessado em: 26/05/2015.

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

SORENSEN, L.K.; ELBAEK, T.H. Determination of mycotoxins in bovine milk by liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, 820, p.183, 2005.

SOTO, J.B.; FERNANDEZ-FRANZON, M.; RUIZ, M.J.; JUAN-GARCIA, A. Presence of ochratoxin A (OTA) mycotoxin in alcoholic drinks from southern European countries: Wine and Beer. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 62 (31), 2014.

SOUZA, M. L. M. Determinação simultânea de micotoxinas em milho e ração para frangos pelo método multianalito por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas tandem. /Maria de Lourdes Mendes de Souza. - Rio de Janeiro: UFRJ/NPPN, 2009 xv, 116f.:il.31cm.

SPEIJERS, G.J.A.; SPEIJERS, M.H.M. Combined toxic effects of mycotoxins. **Toxicology Letters**, 153(1), 91–98, 2004.

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**, 23(2), 384-388, 2012.

SULYOK, M.; KRASKA, R.; SCHUHMACHER, R. A liquid chromatography/tandem mass spectrometric multi-mycotoxin method for the quantification of 87 analytes and its application to semi-quantitative screening of moldy food samples. **Anal Bioanal Chem**, 389, 1505–1523, 2007.

TAM, J.; MANKOTIA, M.; MABLY, M.; PANTAZOPOULOS, P.; NEIL, R.J.; CALWAY, P.; SCOTT, P.M. Survey of breakfast and infant cereals for aflatoxins B1 , B2 , G1 and G2. **Food Additives and Contaminants**, 23(7), 693-699, 2006.

TAMURA, M.; UYAMA, A.; MOCHIZUKI, N. Development of a multi-mycotoxin analysis in beer-based drinks by a modified QuEChERS method and ultra-high-performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. **Anal Sci.**, 27(6), 629-35, 2011.

TEKINSEN, K.K.; EKEN, H.S. Aflatoxin M1 levels in UHT milk and kashar cheese consumed in Turkey. **Food and Chemical Toxicology**, 46(10), 3287-3289, 2008.

TERRA, M.F.; PRADO, G.; PEREIRA, G.E.; EMATNE, H.J.; BATISTA, L.R. Detection of ochratoxin A in tropical wine and grape juice from Brazil. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 93(4), 890-894, 2013.

TOFFA, D.D.; MAHNINE, N.; OUAFFAK, L.; EL ABIDI, A.; EL ALAOUI FARIS, F.Z.; ZINEDINE, A. First survey on the presence of ochratoxin A and fungi in raw cereals and peanut available in the Republic of Niger. **Food Control**, 32(2), 558-562, 2013.

TSENG, T.C.; LIU, C.Y. Occurrence of fumonisin B1 and B2 in corn-based foodstuffs in Taiwan market. **Mycopathologia**, 137(1), 57-61, 1997.

TURNER, N.W.; SUBRAHMANYAM, S.; PILETSKY, S.A. Analytical methods for determination of mycotoxins: A review. **Analytica Chimica Acta**, 632 (2), 168-18, 2009.

TURNER, P.C.; COLLINSON, A.C.; CHEUNG, Y.B.; GONG, Y.; HALL, A.J.; PRENTICE, A.M.; WILD, C.P. Aflatoxin exposure in útero causes growth faltering in Gambian infants. **Int J Epidemiol.**, 36(5), 1119–1125, 2007.

TURNER, P.C.; MOORE, S.E.; HALL, A.J.; PRENTICE, A.M.; WILD, C.P. Modification of immune function through exposure to dietary aflatoxin in Gambian children. **Env Hlth Perspect.**, 111:217-220, 2003.

VANESA, D.; ANA, P. Occurrence of ochratoxin A in coffee beans, ground roasted coffee and soluble coffee and method validation. **Food Control**, 30(2), 675-678, 2013.

VARGA, J.; FRISVAD, J.C.; SAMSON, R.A. Two new aflatoxin producing species, and an overview of *Aspergillus* section *Flavi*. **Stud. Mycol.**, 69, 57–80, 2011.

VARGAS, E.A.; PREIS, R.A.; CASTRO, L.; SILVA, C.M.G. Co-occurrence of aflatoxins B1, B2, G1 and G2, zearalenone and fumonisin in Brazilian corn. **Food Addit. Contam.**, 18, p. 981-986, 2001.

VELLUTI, A.; MARIN, S.; SANCHIS, V.; RAMOS, A.J. Occurrence of fumonisin B1 in Spanish corn-based foods for animal and human consumption. **Food Science and Technology International**, 7(5), 433-437, 2001.

WANG, Y.T.; XIAO, C.X.; GUO, J.; YUAN, Y.H.; WANG, J.G.; LIU, L.P.; YUE, T.L. Development and application of a method for the analysis of 9 mycotoxins in maize by HPLC-MS/MS. **Journal of Food Science**, 78(11), M1752-M1756, 2013.

WESTHUIZEN L.V.D.; SHEPHARD, G.S.; SCUSSEL, L.L.F.C.; VISMER, H.F.; RHEEDER, J.P.; MARASAS, W.F.O. Fumonisin contamination and Fusarium incidence in corn from Santa Catarina, Brazil. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 51, 5574-5578, 2003.

WHO. World Health Organization. Infant and Young Child Nutrition. Fity-Fourth World Health Assembly, WHA54.2. Geneva: World Health Organization; 2001.

WU, H.C.; WANG, Q.; YANG, H.I.; AHSAN, H.; TSAI, W.Y.; WANG, L.Y.; CHEN, S.Y.; CHEN, C.J.; SANTELLA, R.M. Aflatoxin B1 Exposure, Hepatitis B Virus Infection and Hepatocellular Carcinoma in Taiwan. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, 18(3): 846–853, 2009.

ZACHARIASOVA, M.; CAJKA, T.; GODULA, M.; MALACHOVA, A.; VEPRIKOVA, Z.; HAJLSLOVA, J. Analysis of multiple mycotoxins in beer employing (ultra)-high-resolution mass spectrometry. **Rapid Commun Mass Spectrom**, 24: 3357-3367, 2010.

ZHANG, K.; WONG, J.W.; KRYNITSKY, A.J.; TRUCKSESS, M.W. Determining mycotoxins in baby foods and animal feeds using stable isotope dilution and liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 62(36), 8935-8943, 2014.

ZHANG, K.; WONG, J.W.; KRYNITSKY, A.J.; TRUCKSESS, M.W. Determining mycotoxins in baby foods and animal feeds using stable isotope dilution and liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 62(36), 8935-8943, 2014.

ZHANG, K.; WONG, J.W.; HAYWARD, D.G.; VACLAVIKOVA, M.; LIAO, C-D; TRUCKSESS, M.W. Determination of mycotoxins in milk-based products and infant formula using stable isotope dilution assay and liquid chromatography tandem mass spectrometry. **J. Agric. Food Chem.**, 61, 6265-6273, 2013.

ZHONG, Q.D.; LI, G.H.; WANG, D.B.; SHAO, Y.; LI, J.G.; XIONG, Z.H.; WU, Y.N. Exposure assessment to ochratoxin A in Chinese wine. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 62(35), 8908-891, 2014.

ZINEDINE, A.; SORIANO, J.M.; JUAN, C.; MOJEMMI, B.; MOLTÓ, J.C.; BOUKLOUZE, A.; CHERRAH, Y.; IDRISSE, L.; EL AOUAD, R.; MAÑES, J. Incidence of ochratoxin A in rice and dried fruits from Rabat and Salé area, Morocco. **Food additives and contaminants**, 24(3), 285-91, 2007(a).

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**, 45, 1-18, 2007(b).

APÊNDICE A - Resultado das amostras de leite em pó integral contaminadas com aflatoxina M1 e/ou aflatoxina M2 (Manuscrito 1).

<b>Cód. amostras</b>	<b>Aflatoxina M2 (µg/kg)</b>	<b>Aflatoxina M1 (µg/kg)</b>
<b>01-10</b>	>LD	0,3000
<b>04-10</b>	>LD	0,7400
<b>05-10</b>	>LD	1,1900
<b>06-10</b>	<LD	>LD
<b>07-10</b>	<LD	0,2900
<b>08-10</b>	>LD	0,7000
<b>09-10</b>	<LD	>LD
<b>10-10</b>	<LD	>LD
<b>11-10</b>	<LD	>LD
<b>12-10</b>	>LD	0,4400
<b>13-10</b>	>LD	0,5300
<b>14-10</b>	<LD	>LD
<b>15-10</b>	<LD	>LD
<b>16-10</b>	<LD	>LD
<b>17-10</b>	<LD	>LD
<b>18-10</b>	>LD	0,5900
<b>19-10</b>	>LD	0,6000
<b>20-10</b>	>LD	0,5600
<b>90-10</b>	>LD	0,4900
<b>93-10</b>	>LD	>LD
<b>95-10</b>	<LD	0,2700
<b>118-10</b>	<LD	0,3500
<b>119-10</b>	<LD	>LD
<b>91-10</b>	>LD	0,7300
<b>89-10</b>	<LD	0,3000
<b>92-10</b>	<LD	0,2900
<b>94-10</b>	<LD	>LD
<b>127-10</b>	<LD	0,2800
<b>128-10</b>	<LD	>LD
<b>129-10</b>	<LD	>LD
<b>130-10</b>	<LD	>LD
<b>132-10</b>	<LD	>LD
<b>133-10</b>	>LD	0,3900
<b>134-10</b>	<LD	0,2700
<b>135-10</b>	<LD	>LD
<b>136-10</b>	<LD	0,2600
<b>350-14</b>	<LD	0,2750
<b>351-14</b>	<LD	>LD
<b>352-14</b>	<LD	>LD
<b>353-14</b>	<LD	>LD

<b>Cód. amostras</b>	<b>Aflatoxina M2 (µg/kg)</b>	<b>Aflatoxina M1 (µg/kg)</b>
<b>354-14</b>	<LD	>LD
<b>355-14</b>	<LD	>LD
<b>356-14</b>	<LD	0,3750
<b>358-14</b>	>LD	0,7400
<b>359-14</b>	<LD	>LD
<b>363-14</b>	>LD	0,6100
<b>364-14</b>	>LD	0,4900
<b>365-14</b>	<LD	0,3150
<b>367-14</b>	<LD	>LD
<b>370-14</b>	<LD	0,2500
<b>371-14</b>	<LD	>LD
<b>372-14</b>	>LD	0,6400
<b>373-14</b>	<LD	>LD

LD: limite de detecção.



APÊNDICE B - Resultado das amostras de leite UHT integral contaminadas com aflatoxina M1 e/ou aflatoxina M2 (Manuscrito 1).

Cód. amostras	Aflatoxina M2 (µg/kg)	Aflatoxina M1 (µg/kg)
338-14	<LD	>LD
340-14	<LD	0,024
341-14	>LD	0,042
343-14	>LD	0,029
344-14	<LD	>LD
346-14	>LD	>LD
166-14	<LD	>LD
167-14	<LD	>LD
168-14	<LD	>LD
170-14	<LD	>LD
171-14	<LD	>LD

LD: limite de detecção.

APÊNDICE C - Resultado das amostras de fórmulas infantis contaminadas com a aflatoxina M1 (Manuscrito 3).

<b>Cód. amostras</b>	<b>Aflatoxina M1<sup>a</sup>(µg/kg)</b>
43-14	>LD
46-14	>LD
52-14	>LD
63-14	0,022
100-14	>LD
104-14	>LD
68-14	>LD
73-14	0,021
75-14	0,022
110-14	0,044
112-14	>LD
120-14	0,022
124-14	>LD

<sup>a</sup> Considerando a reconstituição do produto de acordo com informações do rótulo;

LD: limite de detecção.

APENDICE D - Resultados encontrados para as fumonisinas B1 e B2 livres nas amostras de mingau a base de milho analisadas (Manuscrito 5).

<b>Cód. Amostras</b>	<b>Fumonisina B1 livre (µg/kg)</b>	<b>Fumonisina B2 livre (µg/kg)</b>	<b>Fumonisinas (FB1+FB2) livres (µg/kg)</b>
223-14	480	84	564
230-14	717	122	839
234-14	1119	381	1500
239-14	427	117	544
240-14	77	24	101
242-14	120	29	149
245-14	341	99	441
246-14	258	71	329
247-14	125	38	163
248-14	135	46	181
251-14	114	28	141
254-14	357	115	472
258-14	397	145	541
259-14	227	100	327
262-14	68	16	84
267-14	418	136	553
268-14	332	86	418
270-14	18	7	25
272-72	67	17	85
273-14	76	18	94
280-14	70	16	87
285-14	655	213	867
287-14	84	20	104
290-14	130	34	164
293-14	387	143	530

APÊNDICE E - Resultados encontrados para as fumonisinas B1 e B2 totais nas amostras de mingau a base de milho analisadas (FB1+FB2, calculada através das fumonisinas hidrolisadas após hidrólise das amostras) (Manuscrito 5).

<b>Cód. Amostras</b>	<b>Fumonisina B1 total (µg/kg)</b>	<b>Fumonisina B2 total (µg/kg)</b>	<b>Fumonisinias (FB1+FB2) totais (µg/kg)</b>
223-14	829	211	1040
230-14	1236	200	1436
234-14	1484	460	1945
239-14	713	186	899
240-14	250	143	392
242-14	178	144	322
245-14	605	293	897
246-14	349	99	448
247-14	292	110	403
248-14	225	52	277
251-14	277	120	398
254-14	521	147	668
258-14	648	198	846
259-14	373	106	479
262-14	129	30	159
267-14	575	187	762
268-14	542	132	674
270-14	33	11	44
272-72	245	138	383
273-14	183	88	270
280-14	118	34	152
285-14	779	230	1009
287-14	234	93	327
290-14	191	145	336
293-14	528	157	686

APÊNDICE F - Resultados para as fumonisinas B1 e B2 mascaradas encontradas nas amostras de mingau a base de milho (Manuscrito 5).

<b>Cód. Amostras</b>	<b>Fumonisina B1 mascarada (<math>\mu\text{g}/\text{kg}</math>)</b>	<b>Fumonisina B2 mascarada (<math>\mu\text{g}/\text{kg}</math>)</b>	<b>Fumonisinias (FB1+FB2) mascaradas (<math>\mu\text{g}/\text{kg}</math>)</b>
223-14	350	127	476
230-14	519	79	598
234-14	365	80	445
239-14	286	69	355
240-14	173	119	292
242-14	58	116	173
245-14	263	193	456
246-14	91	28	119
247-14	167	72	239
248-14	90	6	96
251-14	164	93	256
254-14	165	31	196
258-14	252	53	305
259-14	146	6	152
262-14	61	14	75
267-14	157	52	208
268-14	210	46	256
270-14	16	4	20
272-72	178	120	298
273-14	107	69	176
280-14	48	18	66
285-14	124	17	141
287-14	150	73	224
290-14	60	111	171
293-14	141	15	156



Cód.	Produto	DON	AFM2	AFM1	AFG2	AFG1	AFB2	AFB1	OTA	ZEA	STG	FB1	FB2	FB1+FB2	HFB1	HFB2
264-14	Mingau a base de arroz	66,7	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	32,2	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
269-14	Mingau a base de arroz	27,3	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	11,1	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
282-14	Mingau a base de arroz	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	4,5	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
284-14	Mingau a base de arroz	11,0	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	9,2	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
286-14	Mingau a base de arroz	>LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	3,6	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
289-14	Mingau a base de arroz	>LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	2,2	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
216-14	Farinha de aveia	87,0	<LD	<LD	<LD	>LD	<LD	>LD	<LD	5,3	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
217-14	Farinha de aveia	>LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
212-14	Mingau a base de aveia	37,6	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	3,2	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
238-14	Mingau a base de aveia	25,1	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	3,1	<LD	8,0	4,4	12	2,7	4,2
243-14	Mingau a base de aveia	70,3	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	4,1	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
260-14	Mingau a base de aveia	20,7	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
295-14	Mingau a base de aveia	>LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
218-14	Farinha láctea (trigo)	37,4	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
220-14	Farinha láctea (trigo)	39,5	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	2,3	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
221-14	Farinha láctea (trigo)	22,9	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	2,2	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
222-14	Mingau de Arroz e Aveia	7,2	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
227-14	Mingau de Arroz e Aveia	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
228-14	Mingau de Arroz e Aveia	11,3	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
229-14	Mingau de Arroz e Aveia	14,8	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	>LD	<LD	2,6	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
252-14	Mingau de Arroz e Aveia	6,7	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	2,3	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
253-14	Mingau de Arroz e Aveia	12,4	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
261-14	Mingau de Arroz e Aveia	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
266-14	Mingau de Arroz e Aveia	>LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
288-14	Mingau de Arroz e Aveia	10,4	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	2,6	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
292-14	Mingau de Arroz e Aveia	>LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	2,5	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
213-14	Mingau a base de Multicereais	160,1	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	4,5	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
219-14	Mingau a base de Multicereais	273,4	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	7,4	<LD	21,7	8,1	30	<LD	<LD
236-14	Mingau a base de Multicereais	55,7	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
241-14	Mingau a base de Multicereais	63,0	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	3,0	<LD	4,6	2,5	7	<LD	<LD
250-14	Mingau a base de Multicereais	92,8	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	9,6	4,3	14	<LD	<LD
255-14	Mingau a base de Multicereais	26,0	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	2,8	<LD	15,7	6,6	22	<LD	<LD
256-14	Mingau a base de Multicereais	43,8	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	7,4	3,2	11	<LD	<LD
265-14	Mingau a base de Multicereais	22,7	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	2,4	<LD	7,5	3,6	11	<LD	<LD
271-14	Mingau a base de Multicereais	332,5	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	6,3	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
275-14	Mingau a base de Multicereais	91,9	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	3,4	<LD	10,5	3,9	14	<LD	<LD
279-14	Mingau a base de Multicereais	171,1	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	3,3	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
281-14	Mingau a base de Multicereais	75,0	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	2,7	<LD	3,9	<LD	4	<LD	<LD
291-14	Mingau a base de Multicereais	228,9	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	4,3	<LD	3,5	<LD	4	<LD	<LD
294-14	Mingau a base de Multicereais	62,8	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	2,6	<LD	5,8	3,1	9	<LD	<LD

<LD: não detectada; >LD: detectada; DON: desoxinivalenol; AFM2: aflatoxina M2; AFM1: aflatoxina M1; AFG2: aflatoxina G2; AFG1: aflatoxina G1; AFB2: aflatoxina B2; AFB1: aflatoxina B1; FB1: fumonisina B1; FB2: fumonisina B2; HFB1: fumonisina B1 hidrolisada; HFB2: fumonisina B2 hidrolisada; OTA: ocratoxina A; ZEA: zearalenona; STG: esterigmatocistina.