

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

Eloiza Rodrigues Pimentel De Sá Soilo

**FUMONISINAS E FUMONISINAS HIDROLISADAS EM CERVEJA:
DESENVOLVIMENTO, VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO E AVALIAÇÃO DA
CONTAMINAÇÃO**

Rio de Janeiro

2019

Eloiza Rodrigues Pimentel De Sá Soilo

**FUMONISINAS E FUMONISINAS HIDROLISADAS EM CERVEJA:
DESENVOLVIMENTO, VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO E AVALIAÇÃO DA
CONTAMINAÇÃO**

Dissertação apresentada ao curso de Mestrado Acadêmico do Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, da Fundação Oswaldo Cruz, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientadora: Dra. Silvana do Couto Jacob

Colaborador: Dr. André Victor Sartori

Rio de Janeiro

2019

Catálogo na fonte

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Biblioteca

Eloiza Rodrigues Pimentel De Sá Soilo

**FUMONISINAS E FUMONISINAS HIDROLISADAS EM CERVEJA:
DESENVOLVIMENTO, VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO E AVALIAÇÃO DA
CONTAMINAÇÃO**

Dissertação apresentada ao curso de Mestrado Acadêmico do Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, da Fundação Oswaldo Cruz, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Aprovado em: ____/____/____.

BANCA EXAMINADORA

Bernardete Ferraz Spisso (Doutora)
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS/FIOCRUZ)

Otniel Freitas-Silva (Doutor)
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA)

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

ORIENTADORES

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

André Victor Sartori (Doutor)
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS/FIOCRUZ)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus pelo seu amparo e presença em todos os momentos da minha vida.

Aos meus pais, pelo apoio e amor incondicional, por sempre me ajudarem e não me deixarem fraquejar nas horas mais difíceis. Agradeço a vocês por tudo que fizeram e ainda fazem por mim. Amo vocês.

Ao Vinícius, meu marido, por todo amor, carinho, companheirismo, compreensão e paciência.

Ao Bob, meu companheiro fiel, que esteve sempre ao meu lado durante toda a confecção deste trabalho.

À minha orientadora, Silvana do Couto Jacob pela sua paciência e orientação.

Ao meu co-orientador André Sartori que me auxiliou em todos os momentos e foi fundamental para o desenvolvimento desse trabalho.

À chefe do laboratório de micotoxinas, Maria Heloisa, pelo seu apoio e carinho.

Aos meus amigos do laboratório de micotoxinas, Rosana Santos, Nínive Alves e Yuri, que foram fundamentais para o meu aprendizado durante o mestrado, e pela grande ajuda para a realização deste trabalho.

RESUMO

A cerveja é a bebida alcoólica mais consumida no Brasil e no mundo, apresentando relevância econômica e cultural em diversos países. Ao longo dos anos, a cerveja tem se tornado alvo de pesquisas devido à presença de micotoxinas, substâncias tóxicas produzidas como metabólitos secundários de fungos, que podem estar presentes na bebida, devido à utilização de matérias primas contaminadas durante o processo de produção. Uma vez que estas matérias primas são suscetíveis à contaminação por *Fusarium spp.*, produtores de fumonisinas, e que no Brasil não existe legislação para fumonisinas em cerveja. Neste estudo foi desenvolvido e validado um método analítico para a determinação das fumonisinas B1 (FB1) e B2 (FB2) e fumonisinas B1 e B2 hidrolisadas (HFB1 e HFB2) em cervejas do tipo *pilsen*, por cromatografia líquida de ultra-eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial (CLUE-EM/EM). As fumonisinas foram extraídas utilizando o método QuEChERS com modificações. Recuperações satisfatórias (89,9 a 99,9%) com desvios padrão relativos inferiores a 10% foram obtidos para todas as micotoxinas alvo. O método apresentou sensibilidade adequada com limites de quantificação de 0,035 a 0,284 ng/mL para todas as fumonisinas estudadas. O método validado foi aplicado na análise de 20 amostras de cerveja obtidas no comércio do Município do Rio de Janeiro. As FB1 e FB2 foram encontradas em 75% e 65% das amostras analisadas respectivamente, em níveis de concentração de 0,110 a 6,861 ng/mL para FB1 e de 0,041 a 0,616 ng/mL para FB2. As HFB1 e HFB2 foram encontradas respectivamente, em 10% e 15% das amostras analisadas, com nível de concentração de até 0,330 ng/mL para HFB1 e para HFB2 valores menores que o limite de quantificação. Os resultados encontrados nesse estudo demonstram a importância de se estabelecer uma regulamentação para micotoxinas em cerveja no Brasil e nos demais países, e alerta para a necessidade do controle da qualidade das matérias primas utilizadas no processo de fabricação de cerveja.

Palavras chave: Cerveja. QuEChERS. Fumonisinas. CLUE-EM/EM.

ABSTRACT

Beer is the most consumed alcoholic beverage in Brazil and in the world, presenting economic and cultural relevance in several countries. Over the years, beer has become the target of research due to the presence of mycotoxins, toxic substances produced as secondary metabolites of fungi, which may be present in the beverage due to the use of contaminated raw materials during the production process. Since these raw materials are susceptible to contamination by / producers of fumonisins, and that in Brazil there is no legislation for fumonisins in beer. In this study, an analytical method was developed for the determination of fumonisins B1 (FB1) and B2 (FB2) and hydrolysed fumonisins B1 and B2 (HFB1 and HFB2) in pilsen beers by ultra-efficient liquid chromatography coupled to spectrometry (CLUE-EM / EM). Fumonisins were extracted using the modified QuEChERS method. Satisfactory recoveries (89.9 to 99.9%) with relative standard deviations of less than 10% were obtained for all target mycotoxins. The method presented adequate sensitivity with quantification limits of 0.035 to 0.284 ng / mL for all fumonisins studied. The validated method was applied in the analysis of 20 samples of beer marketed in Municipality of Rio de Janeiro. FB1 and FB2 were found in 75% and 65% of the analyzed samples respectively at concentration levels of 0.110 to 6.861 ng / mL for FB1 and 0.041 to 0.616 ng / mL for FB2. HFB1 and HFB2 were found respectively in 10% and 15% of the analyzed samples, with a concentration level up to 0.330 ng / mL for HFB1 and for HFB2 values lower than the limit of quantification. The results found in this study demonstrate the importance of establishing a regulation for mycotoxins in beer in Brazil and in other countries, and warns of the need to control the quality of the raw materials used in the brewing process.

Key words: Beer. QuEChERS. Fumonisins. LC-MS/MS

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1: Fluxograma básico do processo de produção de cerveja. | 20 |
| Figura 2: Estrutura química das fumisininas B1, B2..... | 27 |
| Figura 3: Estrutura química das fumonisinas hidrolisadas B1, B2..... | 29 |
| Figura 4: Fluxograma do preparo das amostras..... | 49 |
| Figura 5: Cromatograma demonstrando o aumento da seletividade para HFB2 com gradiente de 55% a 80% com tempo de: a) 3 min, b) 4 min, c) 5 min, d) 6 min, d) 7 min. | 57 |
| Figura 6: Gráfico demonstrando as recuperações dos métodos avaliados..... | 59 |
| Figura 7: Cromatogramas demonstrando a seletividade do método para a determinação de fumonisinas (FB1= 1ng/mL, FB2= 1ng/mL, HFB1= 0,1ng/mL, HFB2= 0,1ng/mL no extrato final de cerveja). | 60 |
| Figura 8: Cromatogramas demonstrando a ausência do efeito memória para as fumonisinas, gradiente iniciando com 55% de metanol: a) solução padrão das fumonisinas (10ng/mL), b) solvente (ACN/ácido fórmico 0,1%, 50:50 v/v)..... | 61 |
| Figura 9: Gráfico demonstrando o efeito matriz do método, comparando as curvas em matriz e solvente. | 66 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1: Classificação das cervejas no Brasil. | 16 |
| Tabela 2: Limites máximos tolerados de micotoxinas em adjuntos cervejeiros e cevada..... | 25 |
| Tabela 3: Ocorrência de fumonisinas em cervejas de diversos países..... | 33 |
| Tabela 4: Principais métodos de tratamento de amostras e detecção de fumonisinas em cerveja..... | 42 |
| Tabela 5: Condições do espectrômetro de massas. | 56 |
| Tabela 6: Resultados da validação do método utilizado na determinação de fumonisinas e fumonisinas hidrolisadas nas amostras de cerveja <i>pilsen</i> | 62 |
| Tabela 7: Resultado da precisão intermediária. | 63 |
| Tabela 8- Equações das curvas de calibração e extensão do efeito matriz. | 64 |
| Tabela 9: Concentração encontrada para as fumonisinas nas amostras de cerveja analisadas. | 67 |

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

| | |
|------------|--|
| ANOVA | Análise de variância |
| ANVISA | Agência Nacional de Vigilância Sanitária |
| CCD | Cromatografia em camada delgada |
| CLAE-DF | Cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por fluorescência |
| CLAE-EM | Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas |
| CLAE-EM/EM | Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial |
| CLAE-EMAR | Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas de alta resolução |
| CLUE-EM/EM | Cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial |
| CG-DCE | Cromatografia a gás com detecção por captura de elétrons |
| CG-EM | Cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas |
| CIA | Coluna de imunoafinidade |
| DON | Desoxinivalenol |
| DON -3G | Desoxinivalenol -3-glucósido |
| DPR | Desvio padrão relativo |
| DIC | Detector por ionização em chama |
| ESI | Ionização por eletrospray |
| EFSA | <i>European Food Safety Authority</i> |
| FB1 | Fumonisina B1 |
| FB2 | Fumonisina B2 |
| FB's | Fumonisinas |
| HFB1 | Fumonisina B1 hidrolisada |
| HFB2 | Fumonisina B2 hidrolisada |
| HFB's | Fumonisinas hidrolisadas |
| HPLC | <i>High performance liquid chromatography</i> |
| HT2 | Toxina HT-2 |
| IARC | <i>International Agency for Reseach on Cancer</i> |
| INCQS | Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde |

| | |
|-----|--|
| LD | Limite de detecção |
| LMT | Limite máximo tolerado |
| LQ | Limite de quantificação |
| NCM | <i>N</i> -(carboximetil) fumonisina B1 |
| ND | Não detectado |
| OTA | Ocratoxina A |
| PSA | Amina primária-secundária |
| PBS | <i>Phosphate buffered saline</i> (tampão fosfato-salino) |
| TOF | Tempo de voo |
| T2 | Toxina T-2 |
| ZEA | Zearalenona |

SUMÁRIO

| | | |
|----------|--|-----------|
| 1 | INTRODUÇÃO | 14 |
| 1.1 | A cerveja | 16 |
| 1.2 | Micotoxinas | 21 |
| 1.3 | Regulamentação de micotoxinas em alimentos | 23 |
| 1.4 | Fumonisinias | 26 |
| 1.5 | Fumonisinias hidrolisadas | 28 |
| 1.6 | Ocorrência de fumonisinias em cerveja | 30 |
| 1.7 | Métodos analíticos para determinação de micotoxinas em alimentos | 35 |
| 1.8 | Validação do método analítico | 44 |
| 1.8.1 | Seletividade/Especificidade | 44 |
| 1.8.2 | Exatidão e precisão | 44 |
| 1.8.3 | Limites de detecção e quantificação | 45 |
| 1.8.4 | Linearidade | 45 |
| 1.8.5 | Efeito Matriz | 45 |
| 1.9 | Justificativa | 45 |
| 2 | OBJETIVOS | 46 |
| 2.1 | Objetivo geral | 46 |
| 2.2 | Objetivos específicos | 46 |
| 3 | METODOLOGIA | 47 |
| 3.1 | Reagentes e solventes | 47 |
| 3.2 | Preparo das soluções padrão | 47 |
| 3.3 | Coleta das amostras | 48 |
| 3.4 | Preparo das amostras | 48 |

| | |
|--|----|
| 3.5 Tratamento de amostras empregadas na otimização do método analítico..... | 49 |
| 3.6 Tratamento das condições cromatográficas | 51 |
| 3.7 Instrumental (CLUE-EM/EM)..... | 51 |
| 3.8 Validação do método analítico | 52 |
| 3.8.1 Seletividade/Especificidade | 52 |
| 3.8.2 Exatidão e precisão | 52 |
| 3.8.3 Limites de detecção e quantificação | 53 |
| 3.8.4 Linearidade..... | 54 |
| 3.8.5 Efeito Matriz | 54 |
| 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 55 |
| 4.1 Otimização das condições do espectrômetro de massas | 55 |
| 4.2 Otimização das condições cromatográficas..... | 56 |
| 4.3 Otimização do método de tratamento das amostras | 57 |
| 4.4 Validação de métodos analíticos | 59 |
| 4.4.1 Seletividade/Especificidade | 60 |
| 4.4.2 Exatidão e Precisão..... | 61 |
| 4.4.3 Limites de quantificação e detecção | 63 |
| 4.4.4 Linearidade..... | 63 |
| 4.4.5 Efeito matriz | 64 |
| 4.5 Análise das amostras..... | 67 |
| 5 CONCLUSÃO | 72 |
| REFERÊNCIAS | 74 |

1 INTRODUÇÃO

Micotoxinas são substâncias tóxicas naturalmente produzidas pela metabolização de diversos fungos filamentosos, predominantemente por espécies dos gêneros *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium*. Encontradas como contaminantes de alimentos em todo o mundo, as micotoxinas têm causado significativas perdas econômicas para a agricultura e problemas para a saúde pública devido à capacidade de induzirem toxicidade ao homem e animais (CHU, 1991; MURPHY et al., 2006). Estudos apontam a existência de mais de 300 tipos de micotoxinas isoladas e caracterizadas, porém apenas algumas possuem potencial e relevância toxicológica, são elas: aflatoxinas, desoxinivalenol, zearalenona, patulina, fumonisinas e ocratoxina A (BRASIL, 2017; FAO, 2004; HUSSEIN; BRASSEL, 2001).

A contaminação de alimentos por micotoxinas ocorre principalmente por condições inadequadas utilizadas nos processos de produção, processamento, transporte e armazenamento de alimentos, os quais possibilitam o crescimento de fungos produtores de micotoxinas (MAGAN; OLSEN, 2004; VIDAL et al., 2013). Dentre os alimentos com maior ocorrência de micotoxinas destacam-se o milho, trigo, arroz, amendoim, café, frutas, farinha de mandioca, vinho, cerveja, condimentos, leite e seus derivados (AMAYA; SABINO, 2002).

A cerveja é a bebida alcoólica mais consumida no mundo. O Brasil é um dos maiores consumidores de cerveja, ocupando a terceira posição no ranking mundial, com um consumo anual superior a 10,3 bilhões de litros da bebida (MARCUSO; MULLER, 2017).

Entre as micotoxinas mais frequentemente encontradas nesta bebida, destacam-se o desoxinivalenol (DON) e zearalenona (ZEA), ocratoxina A (OTA), aflatoxinas (AFs) e as fumonisinas B1 e B2 (FB1 e FB2) (PIACENTINI et al., 2015; PASCARI et al., 2018). A presença de fumonisinas em cerveja tem sido reportada em diversos países (SCOTT; LAWRENCE, 1995; TORRES et al, 1998; HLYWKA; BULLERMAN, 1999; DASKO et al, 2005, BERTUZZI et al. 2011).

As fumonisinas são um grupo de micotoxinas, sendo as fumonisinas B1 e B2 as de maior relevância toxicológica. Estas micotoxinas são produzidas pelas

espécies *Fusarium verticillioides*, *Fusarium proliferatum* e são encontradas, predominantemente, em milho e produtos à base de milho. (CHARMELY et al., 1994). Estas micotoxinas têm sido associadas ao aumento do risco de carcinoma esofágico em humanos (CHU; LI, 1994). Estudos de Stockmann e Savolainen (2008) evidenciaram que a FB1 está diretamente ligada ao câncer de fígado, demonstrando ser hepatocarcinogênica, hepatotóxica e nefrotóxica em experimentos realizados com ratos. Além disso, são substâncias citotóxicas e inibem a síntese de DNA (ácido desoxirribonucleico) (CREPPY et al., 2004).

No Brasil há poucos estudos acerca da contaminação de fumonisinas hidrolisadas em cerveja e não há dados registrados no país (KAWASHIMA et al., 2006).

Tendo em vista a toxicidade dessas substâncias muitos estudos têm sido publicados com o objetivo de desenvolver métodos analíticos para determinação de micotoxinas em alimentos (KOPPEN et al., 2010; SAEGER, 2011; TURNER et al., 2009). Entretanto, novas técnicas de detecção mais sensíveis e seletivas tem surgido com o intuito de criar métodos mais rápidos, simples e com menor custo. A cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial (CLUE-EM/EM) é uma técnica altamente seletiva que se enquadra nas características citadas acima além de possibilitar a análise simultânea de diferentes classes de micotoxinas em diversas matrizes de alimentos (SULYOK et al., 2007; MOL et al., 2008; CHIARADIA, 2008; FRENICH et al., 2009; LACINA et al., 2012).

A determinação de micotoxinas e sua aplicação no monitoramento de cerveja é de extrema importância para subsidiar ações de vigilância sanitária possibilitando a avaliação dos níveis de exposição a micotoxinas pelo consumo dessa bebida. Neste contexto, este estudo tem como objetivo avaliar a presença de fumonisinas e fumonisinas hidrolisadas em amostras de cerveja comercializadas no Município do Rio de Janeiro. Um método analítico utilizando a técnica de CLUE-EM/EM foi desenvolvido e validado para ser aplicado na análise das amostras.

1.1 A cerveja

A cerveja é uma bebida alcoólica mundialmente difundida, de sabor e odor característicos, apresenta-se como a bebida preferida por milhares de pessoas ao redor do mundo. Estudos indicam que a produção da cerveja teve seu início por volta de 8000 a.C, há evidências de que a prática da cervejaria originou-se na região da Mesopotâmia e anos depois chegou ao Egito, onde foram criados outros tipos de cervejas e divulgadas para os países orientais e posteriormente à Europa, tornando-se cada vez mais popular entre essas regiões. No Brasil, a cerveja chegou por volta de 1808 trazida pela colonização portuguesa. (VENTURINI, 2005).

De acordo com o Decreto 6.871 a cerveja é definida como sendo a bebida obtida pela fermentação alcoólica de mosto, oriundo de malte de cevada e água potável, por ação de levedura, com adição de lúpulo. As cervejas são classificadas quanto ao seu extrato primitivo (extrato do mosto de malte de origem da cerveja), coloração, teor alcoólico, proporção de malte de cevada e quanto à fermentação, conforme a tabela 1 (BRASIL, 2009).

Tabela 1: Classificação das cervejas no Brasil.

| Classificação | |
|-------------------------------------|--|
| Fermentação | - Alta fermentação - Baixa fermentação |
| *Extrato primitivo | - Leve (acima de 5,0% até 10,5% em peso) - Comum (acima de 10,5% até 12,5% em peso) - Extra (acima de 12,5% até 14,0% em peso) - Forte (acima de 14,0% em peso) |
| Teor alcoólico | - Sem álcool (menor que 0,5% em volume de etanol) - Alcoólica (igual ou maior que 0,5% em volume de etanol) |
| Cor | - Clara (menos de 20 unidades EBC- European Brewery Convention) - Escura (20 ou mais unidades EBC) - Colorida (não definida pela EBC) |
| Proporção de malte de cevada | - Puro malte (igual a 100% em peso) - Cerveja (maior ou igual a 55% em peso) - “Cerveja de...” seguida do nome do vegetal predominante (maior 20% e menor que 55% em peso) |

*Quantidade de substâncias dissolvidas (extrato) do mosto, que deu origem à cerveja – (parágrafo 1º do artigo 38 do Decreto 6.871). Fonte: BRASIL, 2009.

Com sabor e aroma inconfundíveis, a cerveja é composta basicamente por água (90%), além disso, possui sais minerais como cálcio e magnésio (essenciais para se obter uma cerveja estável e de bom paladar), zinco, cloreto, malte, lúpulo, leveduras e adjuntos cervejeiros. É uma bebida rica em vitaminas, sobretudo as do complexo B (B1, B2, B5). Ao contrário das demais bebidas alcoólicas, a cerveja proporciona um aumento da diurese, provocada pelas resinas amargas do lúpulo solubilizadas, e quanto ao teor alcoólico (2 a 6%) é considerada como bebida de baixo teor alcoólico. O seu consumo moderado apresenta benefícios ao organismo, tais como: estimula o fluxo sanguíneo nos músculos, rins e pulmões, diminuição na retenção de líquidos, diminui em até 60% o risco de lesões coronárias e facilita a digestão (COIMBRA et al., 2009; AmBev, 2011; SLEIMAN et al., 2010).

Atualmente existem mais de 20 mil tipos de cervejas, que são diferenciadas de acordo com o tipo de fermentação, baixa ou alta. Dentre as mais conhecidas, encontram-se: *Altbier, Barley Wine, Belgian Ale, Bitter, Brown, Ale, Pale Ale, Porter, Stout, Scottish, Abadia, Bock Doppelbock, Münchener, Lager e Pilsen*. A maior parte das cervejas produzidas no mundo é fermentada a baixas temperaturas, aproximadamente de 9 a 14°C, sendo denominadas *Lager*, com teor alcoólico entre 4 e 5% podendo ser de cor clara, avermelhada ou escura, é o tipo de cerveja mais consumida no mundo. Alguns dos tipos mais conhecidos são *Pilsener* ou *Pilsen, Vienna, Dortmund, Einbeck, Bock, Export, Munich* e *Ice*, parte delas fazendo referência às cidades onde foram desenvolvidas as fórmulas. As cervejas fermentadas sob altas temperaturas, aproximadamente 22°C, são denominadas *Ale*, gerando um produto de sabor forte, com teor alcoólico entre 4 e 8%, podendo ser de cor clara, avermelhada ou escura. Existem diversas subdivisões de cerveja *Ale*, a exemplo das amargas, meio amargas, claras, escuras, porter, stout dentre inúmeras outras (BORTOLI et al, 2013; MORADO, 2009; ROSA; AFONSO, 2015).

A cerveja é produzida a partir do malte, produto resultante da germinação parcial dos grãos da cevada, dentre as matérias-primas utilizadas para a produção de cervejas, o malte de cevada é o mais utilizado para fornecer os carboidratos necessários às leveduras durante a fermentação, processo pelo qual é produzido o álcool e o gás carbônico característicos da bebida. Existem diversos tipos de malte a partir de cevada, no Brasil as grandes maltarias produzem geralmente o tipo *Pilsen*. Para a produção de diferentes tipos de maltes é necessário além de secar o grão, tostá-lo ou torrâ-lo, de acordo com as características que desejadas, resultando em

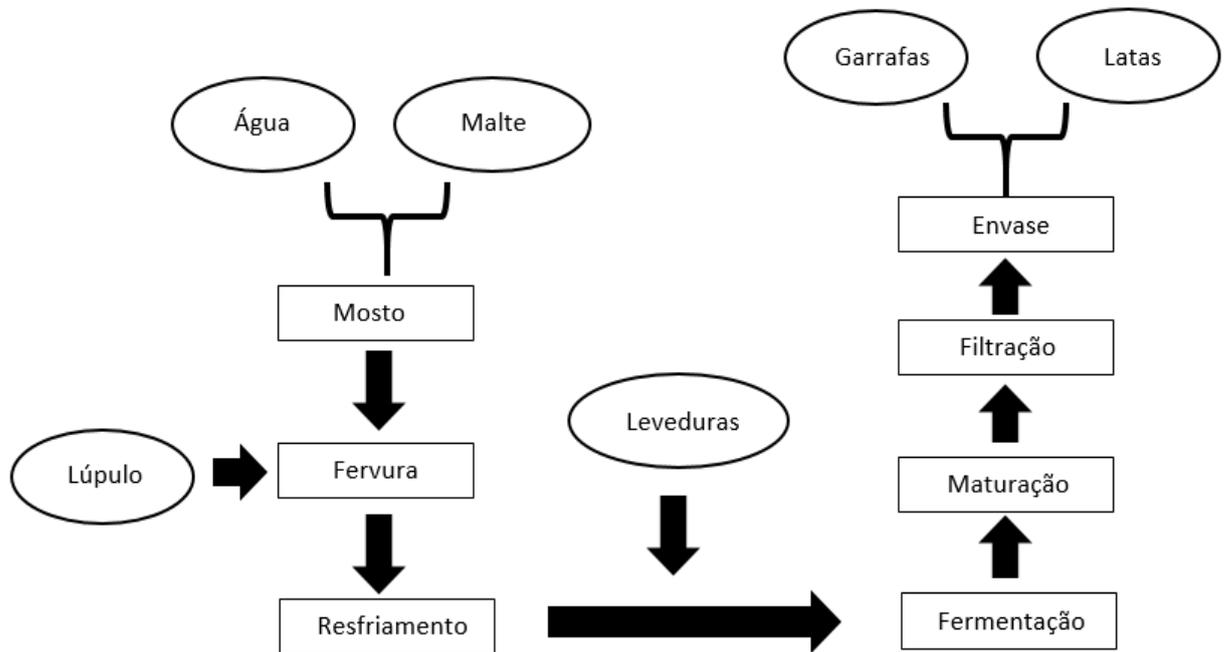
maltes de diferentes cores, aromas e sabores, que podem ser usados para cervejas de estilos variados. Essas torras podem dar características sensoriais que lembram café, cacau, chocolate, caramelo, entre outros. Em alguns tipos especiais da bebida adicionam-se frutas, sucos de frutas, ervas, especiarias, grãos, temperos, vegetais e amêndoas que fornecem sabores únicos à bebida (D'AVILA et al., 2012; MEGA et al, 2011).

Para corrigir propriedades que não foram atingidas durante a produção de cerveja, ocorre frequentemente um procedimento denominado complementação do mosto (mistura do malte moído com a água) com adição de adjuntos cervejeiros (D'AVILA et al., 2012). A legislação brasileira permite que parte do malte de cevada seja substituída por outras fontes de carboidratos fermentáveis (adjuntos cervejeiros) em uma proporção de até 45% em peso, consideram-se adjuntos cervejeiros a cevada cervejeira e os demais cereais aptos para o consumo humano, malteados ou não malteados, bem como os amidos e açúcares de origem vegetal. Os adjuntos podem ser de origem amilácea (arroz, trigo, centeio, mandioca, milho, aveia e sorgo), sendo o milho e o arroz os mais empregados pelas cervejarias brasileiras, e adjuntos açucarados (maltose e cana). O emprego de adjuntos é uma alternativa viável para a diminuição de custos de cervejarias e para a complementação de carboidratos do malte de cevada, desde que não se ultrapassem as quantidades máximas estabelecidas. A indústria cervejeira tem muitas razões para a aplicação de adjuntos, incluindo melhor disponibilidade no mercado local, modificação da cerveja e, o mais importante, o preço mais baixo deste produto no Brasil (DHELLOT; KOBAWILA, 2013; GLATTHAR et al, 2005). O uso de 30% de milho adjunto pode fornecer uma redução de 8% nos custos totais de produção, embora este número possa variar dependendo dos preços locais de matérias-primas e outros custos de produção (BACA, 2001). Contudo, a aplicação de adjuntos apresenta algumas desvantagens, sendo a contaminação por fungos e a produção de micotoxinas, uma das mais relevantes, resultando em um impacto negativo no produto final, principalmente por causa dos problemas de saúde associados à micotoxina (LANCOVA et al., 2008; BRASIL, 2009; MEGA et al, 2011; ROSA; AFONSO, 2015).

O processamento industrial de cerveja pode ser dividido em operações essenciais: moagem do malte; mosturação ou tratamento enzimático do mosto (é a mistura do malte moído com a água cervejeira na tina de mostura); filtração (a separação da parte sólida da parte líquida, o mosto cervejeiro); fervura

(desnaturação proteica, a concentração do mosto, eliminação de compostos sulfurosos e adição de lúpulo, responsável pelo sabor amargo); tratamento do mosto (remoção do precipitado, resfriamento e aeração); fermentação (adição de leveduras); maturação (geração de sabores e aromas característicos) e clarificação (remoção de partículas sólidas e clareamento da cerveja) (SILVA, 2005). Essa sequência de etapas requer muito conhecimento teórico e prático, pois estão envolvidas diversas reações químicas e bioquímicas, necessitando de um cuidadoso acompanhamento (MORADO, 2009). Cada planta fabril possui suas características particulares, que dependem do volume de produção. Venturini e Waldemar, (2000) citam ainda como parte do processo, a filtração, pasteurização e o envasamento das bebidas. A Figura 1 ilustra o fluxograma básico do processo de produção da cerveja, desconsiderando as particularidades da unidade produtora planta fabril.

Figura 1: Fluxograma básico do processo de produção de cerveja.



Fonte: adaptado de ROSA; AFONSO, 2015.

O setor cervejeiro é um dos mais relevantes da economia brasileira. Com mais de 2,2 milhões de pessoas empregadas ao longo da cadeia produtiva, é um dos maiores empregadores do Brasil. As cervejarias encontram-se localizadas majoritariamente nas regiões Sul e Sudeste do país, que somam 83% de todos os estabelecimentos (CERVBRASIL, 2016).

Atualmente, o Brasil produz cerca de 140 milhões de hectolitros (mi hl) de cerveja por ano, o que coloca o país em terceiro lugar no ranking mundial atrás apenas da líder China (460 mi hl) e dos EUA (221 mi hl) e à frente da Alemanha (95 mi hl) e da Rússia (78 mi hl) (CERVBRASIL, 2016; MARCUSSO; MÜLLER, 2017).

A cerveja é a bebida alcoólica mais consumida no mundo e no Brasil; o mercado brasileiro consome anualmente mais de 10,3 bilhões de litros da bebida, esses dados conferem ao Brasil competir entre os maiores consumidores de cerveja do mundo, na terceira posição. A China está em primeiro lugar com consumo anual de 35 bilhões de litros/ano, seguida pelos Estados Unidos (23 bilhões de litros/ano) e da Alemanha (10,7 bilhões de litros/ano). Em termos de consumo *per capita* (litros por pessoa por ano), o Brasil ocupa a décima sétima posição no ranking mundial com consumo de 62 litros/pessoa/ano. A República Tcheca retém a liderança com

um consumo de 158 litros/pessoa/ano (CERVBRASIL, 2016; CERVIERI, 2014; MARCUSSO; MÜLLER, 2017).

Ao longo dos anos, a cerveja tem se tornado alvo de pesquisas devido à presença de micotoxinas, substâncias tóxicas, que podem estar presentes na bebida. Os cereais utilizados na produção de cerveja, em especial cevada, trigo e milho, podem ser contaminados por diferentes micotoxinas; a contaminação pode ocorrer tanto no campo como durante o armazenamento, (condições inadequadas de umidade e temperatura) e durante a maltagem (COSTA et al., 2005). A cevada e o trigo podem ser contaminados por ocratoxina A (OTA), tricotecenos (TCT), zearalenona (ZEA), desoxinivalenol (DON) e raramente por aflatoxinas (AFs); enquanto o milho, por fumonisinas (FBs) e aflatoxinas (BERTUZZI et al., 2011).

1.2 Micotoxinas

Micotoxinas são metabólitos secundários produzidos por fungos filamentosos, cujas características são bem definidas: amplo espectro de toxicidade, baixo peso molecular, termoestáveis e atuam em baixas concentrações. Encontradas como contaminantes de alimentos em todo o mundo, as micotoxinas têm causado significativas perdas econômicas para a agricultura e problemas para a saúde pública devido à capacidade de induzirem toxicidade ao homem e animais (CHU, 1991; MURPHY et al., 2006). A produção de micotoxinas depende do crescimento fúngico, entretanto, nem todos os fungos produzem toxinas, portanto a presença de fungos no alimento não implica que toxinas foram produzidas, por outro lado, a ausência de sinais visíveis de emboloramento não significa que o alimento está livre de toxinas, uma vez que as mesmas podem persistir após o desaparecimento dos fungos (IAMANAKA et al., 2010). Frequentemente, a qualidade dos alimentos produzidos pode ser afetada por fatores climáticos, danos físicos, secagem, transporte e armazenamento inadequados, promovendo a presença de fungos nos alimentos, podendo gerar altos índices de micotoxinas e de perda da qualidade dos mesmos (MARQUES et al., 2009; STEFANELLO et al., 2012).

Estudos publicados relatam uma estimativa de que até 50% dos alimentos agrícolas produzidos no mundo podem estar contaminados por micotoxinas (MAGAN; OLSEN, 2004; FREIRE et al., 2007; VIDAL et al., 2013).

Dentre os alimentos com maior ocorrência destacam-se o milho, trigo, arroz, amendoim, café, frutas e seus produtos derivados farinha de mandioca, cerveja, especiarias, leite e seus derivados (HUSSEIN; BRASEL, 2001; ZAIN, 2011; DIDWANIA; JOSHI, 2013; BENKERROUM, 2016). As micotoxinas são produzidas principalmente por cinco gêneros de fungos: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Claviceps* e *Alternaria*. As aflatoxinas (B1, B2, G1, G2 e M1), ácido fusárico, fumonisinas (B1 e B2), ocratoxinas (A, B e C), patulina, citrinina, zearalenona e tricotecenos têm sido consideradas as micotoxinas mais relevantes, devido à toxicidade e sua ocorrência em alimentos, sendo regulamentadas em alimentos em 8 diversos países (CHARMLEY et al., 1994; FAO, 2004). Diversas pesquisas têm demonstrado a presença de micotoxinas em alimentos (DRUSCH; RAGAB, 2003; CRUZ et al., 2010; DIDWANIA; JOSHI, 2013).

A contaminação de micotoxinas por seres humanos e animais ocorre, principalmente, através da ingestão de produtos vegetais contaminados, bem como pelo consumo de leite e seus derivados (FREIRE et al., 2007).

A exposição às micotoxinas pode produzir diversos efeitos danosos nos organismos humano e animal: comprometimento do sistema imunológico, das funções hepáticas e renais, do sistema nervoso central, do trato digestivo, e até provocar a morte (HUSSEIN; BRASEL, 2001; DIDWANIA; JOSHI, 2013). Os efeitos mais críticos são carcinogenicidade (potencial de causar câncer), mutagenicidade (capacidade de alterar o material genético de um organismo), teratogenicidade (capacidade de produzir malformações no feto) e imunossupressão (diminuição da resposta imunológica de um organismo). E em menor grau de toxicidade, inclui redução do apetite e diarreia em seres humanos (CREPPY, 1999; ZAIN, 2011; MARIN et al., 2013). A toxicidade das micotoxinas é classificada pela Agência Internacional para a Investigação em câncer (IARC), de acordo com o seu grau de carcinogenicidade, em diferentes grupos: grupo 1: carcinogênica para humanos; grupo 2: (A) provável carcinógeno para humanos; (B) possível carcinógeno para humanos; grupo 3: não classificável quanto à carcinogenicidade em humanos.

Em geral, prevenir a formação desses metabólitos tóxicos é de extrema importância para a saúde da população; o conhecimento do tipo de associação que o fungo exerce com o alimento, ou seja, se as micotoxinas serão formadas antes ou depois da colheita, envolvendo o mecanismo de produção das micotoxinas, garante o direcionamento das ações de controle de acordo com os tipos de fungos

produtores, pré ou pós-colheita. Haja vista que as micotoxinas não são completamente eliminadas durante o processamento de alimentos, portanto, a melhor estratégia para seu controle ainda é a prevenção (IAMANAKA et al., 2010).

1.3 Regulamentação de micotoxinas em alimentos

Atualmente, uma preocupação latente das indústrias cervejeiras é o crescimento de fungos filamentosos nos grãos utilizados para produção de malte. Isso ocorre devido ao manejo inadequado da matéria prima durante o armazenamento (excesso de umidade), a condensação e o aquecimento. Nos períodos de pré-colheita, no transporte e armazenamento dos grãos, as condições climáticas também são consideradas muito importantes na formação de fungos.

O crescimento fúngico pode resultar na contaminação por micotoxinas, além de irreparáveis perdas econômicas na produção agrícola, devido ao desvio de qualidade.

Devido aos efeitos graves que essas substâncias podem causar aos seres humanos e animais, diversos países já tem níveis máximos de micotoxinas estabelecidos em suas legislações.

No Brasil, somente no ano de 2006 foi o estabelecido limite máximo tolerável (LMT) de 10000 µg/kg para o somatório de fumonisinas B1 e B2 em grãos de milho e subprodutos destinados à alimentação animal (BRASIL, 2006), anteriormente, a regulamentação de micotoxinas estabelecida para milho era restrita apenas às aflatoxinas (B1 + B2 + G1 + G2) (BRASIL, 1996). Em 2011, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), órgão responsável pela segurança sanitária de serviços e produtos, publicou a Resolução RDC nº 07, contemplando um maior número de micotoxinas e alimentos na legislação brasileira, incluindo fumonisinas em milho, milho pipoca e produtos derivados (BRASIL, 2011).

É observado na legislação uma ausência de regulamentação para os níveis de micotoxinas em cerveja, com níveis máximos definidos apenas para matérias-primas (BRASIL, 2011; CE no 1881/2006). Na tabela 2 são apresentados os limites máximos tolerados (LMTs) das micotoxinas que podem ser encontradas nos grãos de cevada, bem como em alimentos que são utilizados como adjuntos cervejeiros, no Brasil.

Quanto à legislação internacional, também são encontrados LMTs para micotoxinas em produtos à base de milho estabelecido por legislação. Nos Estados Unidos, a recomendação para o somatório das fumonisinas B1, B2 e B3 em produtos à base de milho degerminado (fubá, farinha de milho) é de 2000 µg/kg (NGFA, 2011). A Comunidade Europeia estabeleceu o LMT de 400 µg/kg para fumonisinas (B1 + B2) em alimentos à base de milho para consumo humano direto, exceto para farinha de milho, sêmola de milho, grits, gérmen de milho e óleo de milho refinado (CE, 2006). Em nível internacional, em 2014, o *Codex Alimentarius* estabeleceu um limite de 4000 µg/kg para fumonisinas (B1 + B2) em grãos de milho não processados (FAO/WHO, 2014).

É importante ressaltar que ainda não existem limites máximos toleráveis para fumonisinas em grãos de cevada, tampouco para micotoxinas em cerveja nas legislações brasileira e internacional. Tal fato demonstra a necessidade de novos estudos e monitoramento dessas micotoxinas, tendo em vista principalmente a qualidade dos produtos e a saúde do consumidor.

Tabela 2: Limites máximos tolerados de micotoxinas em adjuntos cervejeiros e cevada.

| Micotoxina | Alimento | LMT (µg/kg) |
|--------------------------|---|--------------------|
| Fumonisin (B1+B2) | - Milho em grão para posterior processamento | 5000 |
| | - Farinha de trigo, massas, crackers e produtos de panificação, cereais e produtos de cereais exceto trigo e incluindo cevada malteada . | 100 |
| Zearalenona | - Arroz beneficiado e derivados | 100 |
| Ocratoxina A | - Cereais para posterior processamento, incluindo grão de cevada | 20 |
| | - Trigo integral, trigo para quibe, farinha de trigo integral, farelo de trigo, farelo de arroz, grão de cevada . | 1000 |
| Desoxinivalenol | - Farinha de trigo, massas, crackers, biscoitos de água e sal, e produtos de panificação, cereais e produtos de cereais exceto trigo e incluindo cevada malteada . | 750 |

Fonte: BRASIL, 2017.

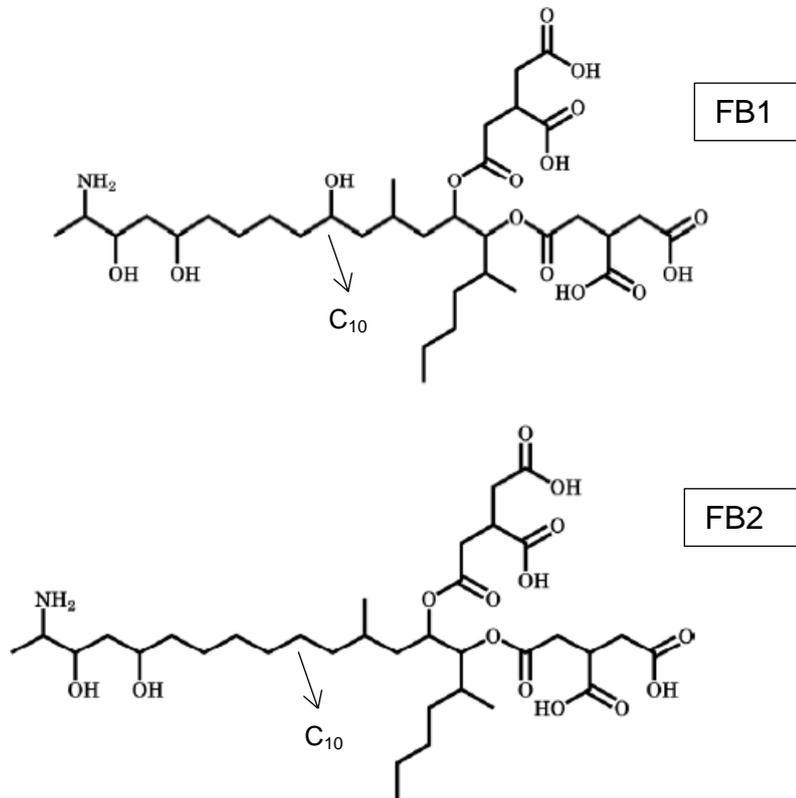
1.4 Fumonisinias

As fumonisinias são micotoxinas produzidas por diversas espécies do gênero *Fusarium*, especialmente por *Fusarium verticillioides*, *Fusarium proliferatum* essas são encontradas, predominantemente, em milho e produtos à base de milho, entretanto os metabólitos das fumonisinias têm sido encontrados em tipos de grãos, incluindo cevada, aveia e trigo. (SCOTT, 2012; CHARMELY et al., 1994).

São conhecidos mais de 28 análogos das fumonisinias, a fumonisinina B1 (FB1) é predominante e geralmente representa 60% ou mais do total de fumonisinias em milho, ao passo que FB2 e FB3 ocorrem em menores quantidades, sendo FB2 as mais prevalentes. Isoladas pela primeira vez em 1988 a partir de culturas de *Fusarium verticillioides* e denominadas fumonisinias B1 (FB1) e B2 (FB2) (GELDERBLUM et al., 1988). Posteriormente, as fumonisinias B3 (FB3) e B4 (FB4) foram descritas por Cawood e colaboradores (1991). As fumonisinias são separadas em quatro grupos principais: séries A, B, C e P, e apresentam metabólitos (incluindo B3, B4, B5, B6, A1 e A2), que possuem ocorrência em concentrações muito mais baixas do que FB1 ou FB2, e são consideradas menos importantes do ponto de vista toxicológico (BEZUIDENHOUT et al., 1988).

As fumonisinias são moléculas polares, solúveis em água, metanol e acetonitrila. As fumonisinias do grupo B, especialmente FB1, FB2 e FB3, são os analitos de ocorrência natural encontrados com maior frequência nas amostras de milho contaminadas. A fumonisinina B1 apresenta estrutura química complexa, é a mais tóxica micotoxina dentre as demais, que não apresentam estruturas cíclicas ou anéis de difícil metabolização e excreção pelo organismo contaminado, é representada por um diéster de propano-1, 2, 3-ácido tricarbóxico e 2-amino-12, 16-dimetil-3, 5, 10, 14, 15-pentahidroieicosano, já a fumonisinina B2 é caracterizada pela ausência da hidroxila na posição C₁₀ (LINO, 2006). A figura 2 representa a estrutura química das fumonisinias.

Figura 2: Estrutura química das fumonisinas B1, B2



Fonte: adaptado de TAMURA et al., (2011).

Quanto à toxicidade, os estudos sobre as fumonisinas estão dirigidos para FB1, o principal análogo produzido por *F. verticillioides* tanto em meios de cultura quanto em milho e produtos derivados naturalmente contaminados (MINAMI et al., 2004, SCOTT, 2012). O mecanismo de ação destas micotoxinas está relacionado com a sua interferência com o metabolismo da esfingosina – esfinganina (So-Sa) prejudicando assim o metabolismo dos esfingolípídeos. Os esfingolípídeos estão presentes nas membranas celulares, desempenhando um papel fundamental na regulação celular e no controle de proteínas membranares, mediando o crescimento celular, a diferenciação e a morte das células, portanto, a presença de fumonisinas no organismo altera o crescimento, diferenciação e morte das células (CIRILLO, et al., 2003; SCOTT, 2012, VOSS et al., 2017).

A fumonisina B1 tem sido associada ao aumento do risco de carcinoma hepático, por isso, foi classificada como um possível carcinógeno humano (Grupo 2B) pela Agência Internacional de pesquisa sobre câncer (2002). Isso significa que existe evidência suficiente para carcinogenicidade em estudos experimentais em

animais, mas evidência insuficiente de carcinogenicidade em humanos (BOLGER et al., 2001, IARC, 2002; VOSS et al., 2017; STOCKMANN; SAVOLAINEN, 2008).

A exposição crônica através de alimentos contaminados por FB1 causa efeitos adversos na saúde dos animais e seres humanos expostos, tais como edema pulmonar em suínos, hepatotoxicidade em cavalos e suínos e hepatocarcinoma em ratos (NORRED et al. 1993; GELDERBLOM et al. 2001; VOSS; RILEY, 2013). Muitos estudos já demonstraram o potencial neurotóxico, hepatotóxico, pneumotóxico e nefrotóxico dessa substância em animais (VOSS et al., 2017; HARRISON et al., 1990; GELDERBLOM et al., 2001; HOWARD et al., 2001; KHAN et al., 2018).

Em seres humanos, os estudos epidemiológicos têm associado o consumo de milho altamente contaminado por fumonisinas ao câncer hepático e esofágico em populações da China e África do Sul, respectivamente (MINAMI et al., 2004). As fumonisinas têm sido consideradas como suspeitas no aumento da incidência de alterações no tubo neural entre a população que vive ao longo da fronteira Texas-México (STACK, 1998).

Por serem relativamente resistentes ao calor, suportando temperaturas de até 120°C, as fumonisinas não são destruídas pelo processamento e preparo comumente utilizados em alimentos, conseqüentemente, ainda não há tecnologia disponível para assegurar que todos os alimentos e gêneros alimentícios estejam completamente isentos de fumonisinas. Entretanto, sua presença deve ser reduzida ao mínimo possível; a limpeza e seleção dos grãos, adequadamente, removem grande parte do material contaminado, reduzindo em até 84% os níveis de fumonisinas nos cereais (AFOLABI et al., 2006; FIRRAO et al., 2010; MUNKVOLD; DESJARDINS, 1997; PIETRI; ZANETTI; BERTUZZI, 2009; WESTHUIZEN et al., 2011). Além disso, deve ser realizado o contínuo monitoramento da presença desses contaminantes, para contribuir com a qualidade dos alimentos.

1.5 Fumonisinas hidrolisadas

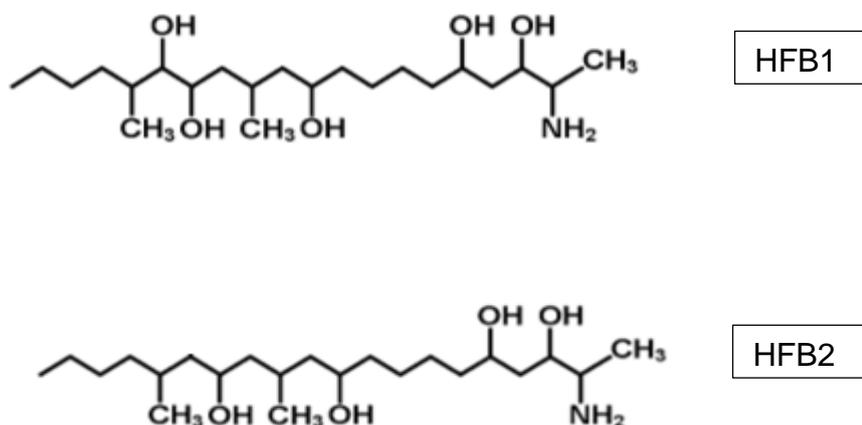
As FB1 e FB2 podem ser hidrolisadas em HFB1 e HFB2 respectivamente, por processo de hidrólise alcalina ou durante processos alimentícios utilizando temperaturas superiores a 100°C. A formação das fumonisinas hidrolisadas ocorre devido à remoção das cadeias laterais de ácidos tricarbóxicos (TCA) dos carbonos

C₁₄ e C₁₅ restando uma estrutura denominada aminopentol. A hidrólise de fumonisinas no processamento de alimentos geralmente ocorre em produtos de milho preparados por cocção em meio alcalino, denominado de nixtamalização (cozimento do alimento em meio alcalino) (HOPMANS; MURPHY, 1993; VOSS; RILEY, 2013). As fumonisinas podem ser parcialmente hidrolisadas (PHFB1, 2,3 e 4) quando apenas um grupo de ácido tricarboxílico é removido. As fumonisinas hidrolisadas ou parcialmente hidrolisadas podem ser ainda resultado do metabolismo de fumonisinas ingeridas (POLING; PLATTNER, 1999). A figura 3 representa a estrutura química das fumonisinas HFB1 e HFB2.

A quantidade de fumonisinas hidrolisadas (HFBs) e parcialmente hidrolisadas (PHFBs) em milho naturalmente contaminado é bastante inferior relativamente à quantidade de fumonisinas intactas (LINO, 2006). As fumonisinas hidrolisadas não apresentam os dois grupos de ácido tricarboxílico que nas fumonisinas intactas se encontram esterificados em C₁₄ e C₁₅; as fumonisinas parcialmente hidrolisadas apresentam apenas um grupo de ácido tricarboxílico. Os métodos utilizados nos processos de fabricação de produtos derivados do milho podem converter fumonisinas intactas em fumonisinas hidrolisadas e parcialmente hidrolisadas (POLLING; PLATTNER, 1999).

A significância toxicológica das fumonisinas hidrolisadas ainda não é bem clara, embora testes revelem menor toxicidade in vivo e maior citotoxicidade quando comparada a FB1 (GELDERBLOM et al., 1993; HUMPF; VOSS, 2004; CIRLINI et al., 2014).

Figura 3: Estrutura química das fumonisinas hidrolisadas B1, B2.



Fonte: adaptado de VOSS et al., (2009).

A hidrólise da FB1 em HFB1 também pode ser feita por bactérias específicas que codificam a carboxilesterase de tipo B (enzimas presentes no fígado responsáveis pelo metabolismo de ésteres carboxílicos produzindo ácido carboxílico e um álcool correspondente). Essa reação é utilizada como uma possível estratégia para reduzir a absorção intestinal das fumonisinas. Não obstante, vários estudos demonstraram que a HFB1 é mais absorvida pela mucosa intestinal em comparação a FB1, o que foi também confirmado por Cirlini e colaboradores (2014). De fato, neste estudo, foi observada uma diminuição significativa da quantidade de HFB1 no intestino, o que poderia ser explicado pela sua polaridade menor. Eles sugerem que a HFB1 pode ser absorvida e metabolizada, ao contrário da FB1. Cirlini et al. (2014) também destacaram que existe uma controvérsia sobre a toxicidade da HFB1 e concluíram que estudos complementares são necessários para entender a metabolização e a toxicidade da HFB1 comparado a FB1 antes de usar a estratégia de hidrolisar a FB1 como uma solução para redução da toxicidade da fumonisina B1.

1.6 Ocorrência de fumonisinas em cerveja

A presença de fumonisina na cerveja foi descrita pela primeira vez por Scott e Lawrence (1995), embora a ocorrência de fumonisina na cerveja tenha sido inesperada, devido à ausência de dados sobre contaminação por fumonisina em cevada, esses autores descobriram a partir de um estudo com 41 amostras de cervejas, quatro amostras (9,76%) contaminadas com 2 ng/mL de FB1. Em estudo subsequente, Scott e colaboradores (1997) encontraram fumonisinas em 20 de 46 (43%) amostras de cerveja analisadas, incluídos marcas canadenses, americanas, mexicanas com uma média de $5,6 \pm 13,6$ ng/mL.

Em estudo realizado na Espanha, Torres e colaboradores (1998) encontraram 14 amostras contaminadas por fumonisinas de um total de 32 amostras testadas. Nos Estados Unidos, os pesquisadores Hlywkay; Bullerman (1999), analisaram 29 marcas de cerveja com e sem álcool, as fumonisinas B1 e B2 foram encontradas em 25 amostras (86%) com concentração média de $4,0 \pm 3,6$ ng/mL, em relação a presença de álcool, as amostras continham quantidades de fumonisinas semelhantes nos tipos alcoólicos e não alcoólicos.

Um estudo realizado no Quênia, Mbugua; Gathumbi (2004), encontraram 54 amostras contaminadas por FB1 das 75 cervejas analisadas, tipo *larger (pilsen e*

tusker). As concentrações médias de FB1 encontradas foram 0,28 e 0,32 ng/mL em *tusker* e *pilsner*, respectivamente. Nesse mesmo estudo foram investigadas a presença de outras três micotoxinas: desoxinivalenol (DON), zearalenona (ZEA) e aflatoxina B1 (AFB1); as incidências de DON e ZEA foram 100% em ambas as marcas (*pilsen* e *tusker*), ao passo que para AFB1, não foi encontrada nenhuma amostra contaminada.

Diferentemente dos estudos reportados anteriormente, Dasko et al. (2005) analisaram mais 20 amostras de cerveja, na Eslováquia, e não encontraram fumonisinas.

Na Itália, foram analisadas 33 amostras de cerveja e a FB1 foi detectada em 32 das 33 amostras (97%), enquanto FB2 foi observada em 19 das 33 analisadas (57,6%). Os valores máximos de fumonisinas encontrados foram entre 30,3 e 3,9 ng/mL para FB1 e FB2, respectivamente. Ao concluir a pesquisa, foi observado que os níveis de FB1 das amostras de cerveja italianas foram significativamente maiores do que amostras de outros países (BERTUZZI et al., 2011).

Rubert e colaboradores (2013) desenvolveram uma pesquisa com 49 amostras de cerveja adquiridas em supermercados e cervejarias especializadas da Irlanda e Espanha, as fumonisinas B1 e B2 foram identificadas e quantificadas em 32% das amostras com faixa de concentração de 71,2 a 127 e 71 a 98 ng/mL respectivamente, outras 16 micotoxinas também foram investigadas. Ao final da pesquisa foi observado que as cervejas do tipo pale lager apresentaram maior incidência de micotoxinas que as demais estudadas (*stout*, *red ale* e *ale*).

Recentemente um estudo realizado na Nigéria com cervejas tradicionais da região, (marcas *burukutu* e *pito*), foram encontradas FB1 e FB2 em 64 das 99 amostras de cerveja analisadas, com média de concentração de 107ng/mL para FB1 e 68,5 ng/mL para FB2. Este estudo também analisou outras micotoxinas como DON e ZEA, bem como fumonisina B1 hidrolisada (HFB1), a HFB1 foi detectada em concentrações máximas de 152 ng/mL e 102 ng/mL em total de 11% e 9% das cervejas *burukutu* e *pito*, respectivamente. (CHILAKA, et al., 2018). Outras pesquisas acerca da contaminação por fumonisinas também foram desenvolvidas em cervejas tradicionalmente fabricadas na África, as fumonisinas (FBs) são umas das principais micotoxinas frequentemente detectadas na bebida, com 100% de ocorrência para o somatório de FB1 + FB2 (ABIA et al., 2013; EZEKIEL et al., 2014; MATUMBA et al., 2014, e SHEPHARD et al. 2005).

Em estudo recente realizado na Espanha foram analisadas 23 micotoxinas diferentes em 64 amostras de cerveja, os resultados mostraram que todas as amostras estavam contaminadas, além disso, 20,3% das amostras analisadas estavam contaminadas por micotoxinas com concentrações acima do limite de detecção. Nenhuma das amostras de cerveja sem álcool apresentou contaminação. FB1 foi encontrada em uma amostra, com concentração de 32,78 ng/mL (PASCARI et al., 2018). Peter e colaboradores (2017) realizaram um estudo sobre a contaminação de cerveja por micotoxinas em grande escala na Europa, foram analisaram 1000 amostras de cerveja, sendo 589 oriundas de produção artesanal, adquiridas em 42 países diferentes. A contaminação por fumonisinas foi observada em 14 amostras artesanais e 10 industriais. A concentração mais alta de FB1 foi detectada nas amostras do tipo lager de origem italiana (51 ng/mL), seguida por uma cerveja não alcoólica da Espanha que continha (28 ng/mL). FB2 não foi detectada em nenhuma amostra de cerveja, enquanto FB3 foi detectada em apenas 4 amostras de cerveja. A tabela 3 apresenta os estudos realizados em diferentes países sobre a presença de fumonisinas em cerveja.

Tabela 3: Ocorrência de fumonisinas em cervejas de diversos países.

| Referência | Local | Positiva/total | Fumonisinas | Faixa de concentração (ng/mL) | Método de detecção |
|------------------------------|-------------------|----------------|-------------|-------------------------------|--------------------|
| SCOTT; LAWRENCE, 1995 | Canadá | 21/41 | B1 B2 | 0,4 – 103 0,48 – 12 | CLAE/F |
| TORRES et al., 1998 | Espanha | 14/32 | B1 | 4,76 - 85,53 | ELISA |
| HLYWKAY; BULLERMAN, 1999. | EUA | 25/29 | (B1+B2) | 0,3 – 13,5 | CLAE/F |
| MBUGUA; GATHUMBI, 2004 | Quênia | 54/75 | B1 | LD – 0,78 | ELISA |
| STEPHARD et al., 2005 | África do Sul | 18/18 | B1 | 38 – 1066 | CLAE/F |
| | | 17/18 | B2 | -- | |
| | | 12/18 | B3 | -- | |
| NKWE et al., 2005 | Bostuana | 48 | B1 | ND | CLAE/F |
| GONZALEZ et al., 2009 | Espanha | 3/15 | B1 | ND | CLUE-EM/EM |
| | | | B2 | 2,8* | |
| ROGER, 2011 | Camarões | 105/120 | B1 | LD – 340 | ELISA |
| BERTUZZI et al., 2011 | Itália | 32/33 | B1 | 0,1 – 30,3 | CLUE-EM/EM |
| | | 19/33 | B2 | 0,2 – 3,9 | |
| | | 5/24 | B1 | | |
| TAMURA et al., 2011 | JAPÃO | 3/24 | B2 | < 5* | CLUE-EM/EM |
| | | 2/24 | B3 | | |
| | | | | | |
| SANCHO, 2012 | Espanha | 64/72 | B1+B2 | 36,9 µg/kg | CLAE/F |
| MATUMBA et al., 2014 | Maláui | 9/9 | B1 | 1721* | CLUE-EM/EM |
| | | 8/9 | B2 | 205* | |
| | | 6/9 | B3 | 253* | |
| RUBERT et al., 2013 | Espanha e Irlanda | 10/49 | B1 | 71,2 - 1 27 | CLUE-EM/EM |
| | | | B2 | 71 – 98 | |

| Referência | Local | Positiva/total | Fumonisinias | Faixa de concentração (ng/mL) | Método de detecção |
|----------------------|-----------------|---|------------------|----------------------------------|--------------------|
| PETERS et al., 2017 | Diversos países | 14/589 artesanais 10/411 industriais | B1 B1 | 2 – 36 9 – 51 | CLUE-EM/EM |
| PASCARI et al., 2018 | Espanha | 1/64 | B1 | 32,78* | CLAE-EM/EM |
| CHILAKA et al., 2018 | Nigéria | 20/99 12/99 10/99 | B1 B2 HFB1 | 63 – 316 44 – 203 57 – 152 | CLUE-EM/EM |

LD = limite de detecção;

*=média da concentração;

ND = não detectado.

Fonte: Do autor, 2019.

Apesar da evidência de alta incidência do gênero *Fusarium* na cerveja, pouca informação está disponível sobre a ocorrência dessas toxinas nas cervejas tradicionais do Brasil. A escassez de estudos acerca da contaminação de fumonisinas em cerveja, é significativa. Atualmente há registro de três pesquisas publicadas no país. O primeiro estudo foi realizado em 2007 na cidade de Campinas, a presença de FB1 e de ocratoxina A (OTA) foi investigada em amostras de cerveja fabricadas no Brasil. FB1 foi pesquisada em 58 amostras de cerveja provenientes de 30 fábricas localizadas em nove Estados, vinte e cinco amostras (43,1%) continham FB1 em concentrações de 1 a 40 ng/mL (KAWASHIMA et al., 2007).

Piacentini e colaboradores (2015a) avaliaram a qualidade e ocorrência de desoxinivalenol e fumonisinas das cervejas artesanais, do tipo lager e ale, adquiridas no sul do Brasil. A presença de DON e FB1 foi confirmada em 17 (32%) e 8 (15,09%) das 53 amostras analisadas, respectivamente. A faixa de contaminação por FB1 foi de 29 a 285 ng/mL.

Outro estudo também realizado por Piacentini e colaboradores (2017), analisou a influência de fumonisina B1 e desoxinivalenol na qualidade das cervejas industriais no Brasil. DON não foi detectado em nenhuma das amostras analisadas, enquanto a FB1 foi encontrada em 56 (49%) das 114 amostras com nível de contaminação de 201,70 a 1568,62 ng/mL.

1.7 Métodos analíticos para determinação de micotoxinas em alimentos

A segurança alimentar é uma preocupação constante para a saúde pública. Em resposta a um crescente número de surtos alimentares e às preocupações dos consumidores, é primordial aperfeiçoar os programas de monitoramento e otimizar os métodos analíticos de forma a garantir a segurança alimentar e, eventualmente, prevenir ou reduzir as doenças transmitidas pelos alimentos. Em geral, os métodos usados para analisar as micotoxinas são baseados na extração com solventes, limpeza (extração em fase sólida (EFS), colunas de imunoafinidade (CIA), dentre outros) e, em seguida, etapas de separação, detecção, quantificação e confirmação (BERTHILLER et al., 2014).

Para estabelecer a presença de substâncias tóxicas em uma amostra, primeiro é necessário extrair toxinas da matriz e depois analisar o extrato por técnica adequada. O objetivo desta etapa é a separação da micotoxina de interesse dos

demais componentes da amostra através da solubilização com um solvente adequado. A escolha do solvente extrator depende do tipo de matriz e do sistema de limpeza e detecção a ser utilizado posteriormente (CIGIC; PROSEN, 2009). As fumonisinas são extraídas por misturas entre água e solventes orgânicos, porém, melhores resultados são obtidos quando se emprega misturas mais polares como, por exemplo, MeOH:H₂O (80:20) (QUEIROZ et al., 2012) e H₂O:ACN:MeOH (50:25:25) (DALL'ASTA et al., 2008; PARK et al., 2004).

Após a etapa de extração, ocorre a etapa de purificação (*clean-up*), na qual, é realizada a remoção dos possíveis interferentes. Os principais procedimentos para limpeza são a partição líquido-líquido, a precipitação com adição de sais metálicos, o uso de colunas de extração em fase sólida e as colunas de imunoafinidade (SCOTT, 1995). A cerveja apresenta uma matriz complexa; contendo água, carboidratos, substâncias proteicas, sais minerais e álcool; o álcool é um subproduto de fermentação e pode fortemente influenciar a extração de micotoxinas. Por essa razão, diversos métodos de tratamento de amostra para a determinação de micotoxinas em cerveja têm sido desenvolvidos. Quando necessário, a purificação é feita com o auxílio de EFS (KAWASHIMA; SOARES, 2006; RUBERT et al., 2013) ou CIA (PARK et al., 2004; QUEIROZ et al., 2012), colunas de troca aniônica forte (SAX), colunas de fase reversa C18 (PIACENTINI et al. 2017; TAMURA et al. 2011). O método QuEChERS (sigla dos termos em inglês Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe – que significa rápido, fácil, barato, eficaz, robusto e seguro) também tem sido utilizado para extração de micotoxinas em cerveja, permitindo eliminar analitos interferentes e evitar diluição da amostra. A metodologia QuEChERS foi inicialmente desenvolvida, em 2003 por Anastassiades e Lehotay, para análise de agrotóxicos, contudo, também permite a detecção simultânea de vários grupos de micotoxinas, além de outros analitos, em diferentes matrizes, incluindo cerveja (CARRASCO et al., 2015; REJCZAK; TUZIMSKI, 2015; TAMURA et al. 2011).

O método QuEChERS possui muitas vantagens sobre os métodos tradicionais de preparo de amostra para determinação de resíduos em alimentos, dentre elas podemos citar: altos percentuais de recuperação são obtidos para um grande número de analitos de diferentes polaridade e volatilidade. Originalmente, esse método envolve extração inicial em acetonitrila, etapa de partição após a adição de sal e uma etapa de limpeza utilizando extração em fase sólida dispersiva.

O método de extração QuEChERS, atualmente, é o mais utilizado para a determinação de resíduos de agrotóxicos em amostras de alimentos, proporcionando exatidão e precisão aceitáveis de agrotóxicos ácidos, neutros e básicos, além disso, pode ser aplicado em qualquer laboratório, devido à simplicidade do mesmo. Ao longo dos anos pequenas modificações no método QuEChERS original, como alteração no pH da solução de extração e na etapa de purificação, foram realizadas devido aos desafios que surgiram em decorrência da complexidade de novas matrizes e analitos em estudo (PRESTES et al., 2011; REJCZAK; TUZIMSKI, 2015).

Recentemente, em um estudo de JARTÍN e colaboradores (2019) foi desenvolvido um novo método de determinação de micotoxinas em cerveja baseando-se na extração QuEChERS com modificações seguida de detecção por CLUEM-EM/EM. O método permite a identificação e quantificação de 23 micotoxinas com diferentes características químicas, e apresentou resultados de recuperação de 70 a 110% para maioria dos analitos, com LQ abaixo do nível máximo estabelecido nos regulamentos europeus. Portanto, o método proposto foi considerado apropriado para a rotina de análise de cerveja.

Com o aprimoramento das técnicas analíticas empregadas cada vez mais seletivas e sensíveis, os métodos de tratamento de amostra desenvolvidos, atualmente, possuem poucas etapas de processamento baseando-se, principalmente, na extração seguida de diluição dos extratos das amostras, caracterizando métodos de extração mais simples e rápidos (NATHANAIL et al., 2015; TOLOSA et al., 2017; WARTH et al., 2015). Devido à complexidade da matriz cerveja apenas um estudo utilizou somente a diluição do extrato (diluição isotópica estável), como método de extração e posterior injeção. Al-Taher e colaboradores (2013) desenvolveram um método rápido “*dilute and shoot*” do inglês “diluir e injetar”, para identificar e quantificar múltiplas micotoxinas em cervejas e vinhos. Esta técnica de diluição da amostra é um procedimento comumente usado para compensar o efeito matriz observado em análises por CLAE/EM-EM (VARGA et al., 2012). O uso de padrões internos marcados com isótopos parece ser a melhor ferramenta para lidar com esses efeitos e garantir resultados confiáveis. No entanto, os altos custos e a disponibilidade limitada de padrões internos rotulados isotopicamente restringem sua aplicação (MALACHOVÁ et al., 2014). Ao comparar a diluição com padrões internos marcados com isótopos e a diluição com padrão comum adicionado na

amostra, os resultados foram bastantes promissores, com valores de recuperação entre 20 a 125% para matriz cerveja com diluição comum e 61 a 131% com diluição isotópica estável, concluindo que a diluição com padrão isotópico garante resultados confiáveis, em detrimento à diluição com padrão comum.

As técnicas mais utilizadas para separação de micotoxinas são basicamente a cromatografia líquida, cromatografia gasosa (acoplada a detectores de ultravioleta, fluorescência ou espectrometria de massas) e imunoenensaio ELISA (ensaio de imun absorção enzimática). Na tabela 4 encontram-se os principais métodos de análise de micotoxinas em cerveja e seus respectivos métodos de preparação da amostra (ANFOSSI, et al., 2016).

A cromatografia em camada delgada não tem sido utilizada para determinação de micotoxinas em cerveja, este método foi muito utilizado em diversas matrizes antes do grande desenvolvimento e acessibilidade dos instrumentos de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e espectrometria de massas. Outros métodos mais sensíveis têm sido publicados na literatura, como a CLAE com detecção por ultravioleta ou fluorescência, a cromatografia gasosa com detecção por captura de elétrons (CG-DCE), detecção por ionização em chama (DIC), e por espectrometria de massas (EM) e a cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por espectrometria de massas (ANFOSSI, et al., 2016; BERTHILLER, et al., 2014; CIGIC; PROSEN, 2009).

A maioria dos estudos em cerveja utiliza a CLAE com fluorescência para determinação de micotoxinas (DASKO, et al., 2005; HLYWKAY; BULLERMAN, 1999; KAWASHIMA, et al., 2007; MABLY et al., 2005; ODHAV; NAICKER, 2002; PIACENTINI, et al., 2016; SANCHO et al., 2012; SCOTT; LAWRENCE, 1995; SHEPHARD, et al., 2005). Contudo, as fumonisinas não fluorescem e não absorvem radiação ultravioleta, conseqüentemente para serem detectadas pelos detectores comuns de CLAE necessitam uma modificação química.

Para a determinação de fumonisinas utilizando CLAE é comum o uso de derivatização do grupo 2-amino usando o-ftaldialdeído (OPA) com mercaptoetanol para torná-las fluorescentes (BERTHILLER et al., 2014; CAMARGOS et al., 1999; MACHINSKI; SOARES, 2000; PIACENTINI et al., 2017; SANCHO, 2012). Muitos estudos de determinação de fumonisinas em cerveja utilizaram o processo de derivatização, entretanto este procedimento acarreta aumento nos custos e no tempo das análises (DASKO, et al., 2005; KAWASHIMA, et al., 2007; SCOTT;

LAWRENCE, 1995; SANCHO et al., 2012; SHEPHARD, et al., 2005); o que conseqüentemente impulsiona a pesquisa por técnicas mais simples, rápidas e menor custo.

Outra técnica que necessita de derivatização para análise de fumonisinas é a CG, entretanto, tem sido utilizada com menor frequência na determinação de micotoxinas em cerveja, principalmente devido à característica polar dessas substâncias, sendo necessário incluir etapas de derivatização no processo de tratamento das amostras (ANFOSSI, et al., 2016; CARRASCO et al., 2015). Para a matriz cerveja, apenas Juan e colaboradores (2017) utilizaram a técnica de CG-EM/EM (massas sequencial) para a determinação de micotoxinas, incluindo fumonisinas.

Estudos com método de imunoensaio também são utilizados para determinação de micotoxinas em cerveja, inclusive, há vários estudos comparando os resultados obtidos por ELISA (ensaio de imunoabsorção enzimática) com métodos cromatográficos para a análise de fumonisinas em milho e derivados, incluindo a matriz cerveja (MBUGUA; GATHUMBI, 2004; SHEPHARD, 1998; SCOTT et al., 1997; ROGER, 2011). Normalmente, devido à ocorrência de reações cruzadas, o ELISA gera resultados de concentração maiores que os métodos cromatográficos, apesar de terem uma boa correlação estatística, indicando sua melhor aplicabilidade para a triagem (SYDENHAM et al., 1996). Usando essa metodologia, Torres e colaboradores (1998) investigaram fumonisinas em cervejas espanholas, obtendo o limite de detecção de 3 ng/mL e recuperação de 81% em amostras contaminadas artificialmente com 100 ng/mL fumonisinas. Outro estudo realizado no Canadá também utilizou a metodologia ELISA para determinação de fumonisinas em cerveja com resultados de recuperação entre 98,7 e 102,8% para FB1; este estudo ainda comparou o método ELISA e CLAE, concluindo que o ELISA demonstrou ter valor considerável para a triagem rápida de amostras de cerveja diretamente, sem limpeza, para fumonisinas (SCOTT et al., 1997).

Atualmente, a cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial (CLUE-EM/EM) tem sido muito utilizada para análise de micotoxinas em diversas matrizes incluindo a cerveja, em função do desenvolvimento de instrumentos mais eficientes, sensíveis e do melhoramento da tecnologia dos analisadores de massa (SULYOK et al., 2007; SONGSERMSAKUL; FAZELI, 2008). A espectrometria de massas (EM) transforma moléculas no estado

natural em íons no estado gasoso, obtendo a sua massa molecular por meio da análise da relação massa/carga (m/z) sendo detectados através de exposição a campos eletrostáticos. Para a espectrometria de massas sequencial (EM/EM), uma etapa é adicionada para detecção e identificação de uma substância desconhecida a partir da fragmentação de íons incluída antes da detecção e assim obter informação estrutural do analito (LANÇAS, 2009).

A cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas de alta resolução (CLAE-EMAR), empregando principalmente analisadores de massas como tempo de voo (TOF - do inglês *time-of-flight*) ou Orbitrap (armadilha de íons de Kingdon - Kingdon trap), também tem sido uma técnica de escolha na identificação de diversas micotoxinas em cerveja, utilizando um único método (método multimicotoxina), com isso, é importante ressaltar que com o avanço das técnicas cromatográficas, a maioria dos métodos publicados para fumonisinas envolve a inclusão de ensaios multimicotoxinas (BERTHILLER, et al., 2014; CHILAKA et al., 2018; JARTÍN et al., 2019; ZACHARIASOVA et al., 2010).

Rubert et al. (2013) compararam dois espectrômetros de massa para um método multimicotoxinas em amostras de cerveja na Europa. O método baseado na tecnologia Orbitrap foi usado para identificação de 18 micotoxinas alvo, bem como para rastrear outras micotoxinas, que não eram alvo, como enniatinas, fusaproliferina e DON-3-glucósido (DON-3G); considerando que a quantificação de micotoxinas foi realizada com o analisador do tipo triplo quadrupolo os autores concluíram que o triplo quadrupolo foi mais satisfatório para quantificação, enquanto o Orbitrap melhorou a identificação de substâncias que não são de interesse no estudo, e capacidades de triagem. Mesmo com o avanço tecnológico dos estudos de determinação de micotoxinas em cerveja, a maioria desses estudos não inclui as fumonisinas hidrolisadas, um ponto importante a ressaltar diante da toxicidade das mesmas; dentre os trabalhos publicados em cerveja, somente Chilaka e colaboradores (2018) analisaram HFB1, utilizando o QuEChERS como método de extração e CLUE-EM/EM para detecção.

A determinação de micotoxinas e sua aplicação no monitoramento de cerveja é de extrema importância para subsidiar ações de vigilância sanitária possibilitando a avaliação dos níveis de exposição a micotoxinas pelo consumo dessa bebida. Neste contexto, este estudo tem como objetivo validar um método analítico por cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas

sequencial (CLUE-EM/EM) para avaliar a presença de fumonisinas FB1 e FB2 e fumonisinas hidrolisadas HFB1 e HFB2 em amostras de cerveja.

Tabela 4: Principais métodos de tratamento de amostras e detecção de fumonisinas em cerveja.

| Referência | Origem das amostras | Fumonisinias | Método de extração | Método de detecção |
|--------------------------|---------------------|--------------|---|--------------------|
| SCOTT; LAWRENCE, 1995 | Canadá | B1/B2 | CIA | CLAE/F |
| SCOTT et al., 1995 | Canadá | B1/B2 | CIA | ELISA e CLAE/F |
| TORRES et al, 1998 | Espanha | B1 | Extração com metanol/ diluição com PBS | ELISA |
| HLYWKAY; BULLERMAN, 1999 | EUA | (B1+B2) | CIA | CLAE/F |
| MBUGUA; GATHUMBI, 2004 | Quênia | B1 | SPE com C18 +diluição com PBS | ELISA |
| DAŠKO et al., 2005 | Eslováquia | B1/B2 | CIA | CLAE/F |
| SHEPHARD et al, 2005 | África do Sul | B1/B2/B3 | EFS com C18 | CLAE/F |
| NKWE et al, 2005 | Bostuana | B1 | EFS com SAX | CLAE/F |
| KAWASHIMA et al., 2007 | Brasil | B1 | EFS com SAX | CLAE/F |
| RUDRABHATLA et al., 2008 | EUA | B1/B2/B3 | CIA | CLAE-EM/EM |
| GONZALEZ et al, 2009 | Espanha | B1/B2 | ESF com C18 | CLUE-EM/EM |
| ROGER, 2011 | Camarões | B1 | ESF com C18/diluição com PBS | ELISA |
| BERTUZZI et al., 2011 | Itália | B1/B2 | CIA/diluição com PBS | CLUE-EM/EM |

| Referência | Origem das amostras | Fumonisinias | Método de extração | Método de detecção |
|-------------------------|---------------------|---------------|---|----------------------|
| TAMURA et al., 2011 | Japão | B1/B2/B3 | QuEChERS modificado/EFS com C18 | CLUE-EM/EM |
| SANCHO, 2012 | Espanha | B1+B2 | CIA | CLAE/F |
| MATUMBA et al., 2014 | Maláui | B1/B2/B3 | EFS com C18 + CIA | CLUE-EM/EM |
| RUBERT et al., 2013 | Espanha e Irlanda | B1/B2 | EFS com C18 | CLUE-EM/EM |
| AL-TAHER et al., 2013 | Diversos países | B1/B2 | Diluição isotópica estável | CLUE-EM/EM |
| PIACENTINI et al., 2015 | Brasil | B1 | EFS com SAX | CLAE/F |
| JUAN et al., 2017 | Tunísia | B1 | QuEChERS + EFS com C18 | CG-EM/EM +CLAE-EM-EM |
| PETERS et al., 2017 | Diversos países | B1 | Não informado | CLAE-EM/EM |
| PIACENTINI et al., 2017 | Brasil | B1 | EFS com SAX | CLAE/F |
| PASCARI et al., 2018 | Espanha | B1 | Extração com solvente e sais 4 g de MgSO4 +1 g de NaCl. | CLAE-EM/EM |
| CHILAKA et al., 2018 | Nigéria | B1/B2 HFB1 | QuEChERS | CLUE-EM/EM |
| JARTÍN et al., 2019 | Espanha | B1 | QuEChERS modificado | CLUE-EM/EM |

CIA:coluna de imunoafinidade
EFS: extração em fase sólida
SAX: coluna de troca aniônica forte
Fonte: Do autor, 2019.

1.8 Validação do método analítico

A validação é o processo pelo qual é demonstrado, por meio de estudos experimentais, que o método atende às exigências das aplicações analíticas as quais ele se destina, assegurando a confiabilidade dos resultados. Para assegurar a confiabilidade do método proposto faz-se necessária a avaliação dos parâmetros de desempenho analítico estabelecidos na legislação: especificidade, seletividade, linearidade, exatidão, precisão, limite de quantificação, limite de detecção e robustez, quando pertinente (ANVISA, 2017; INMETRO, 2017).

1.8.1 Seletividade/Especificidade

A seletividade avalia a capacidade de um método de distinguir de forma inequívoca, as substâncias de interesse na presença de componentes que podem interferir na sua determinação em uma amostra complexa. Enquanto a especificidade avalia a capacidade de um método produzir resposta para apenas um analito (INMETRO, 2017).

1.8.2 Exatidão e precisão

A exatidão de um método é definida como sendo o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados em um determinado ensaio e um valor de referência aceito como verdadeiro (INMETRO, 2017).

A precisão representa a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, sob condições definidas. A precisão é avaliada pelo desvio padrão absoluto, e pode ser determinada de duas formas: repetitividade e reprodutibilidade. A repetitividade indica o efeito das variações dentro do laboratório, são realizadas sucessivas repetições do método sob as mesmas condições de medição (condições de repetitividade), com o mesmo procedimento; mesmo observador; mesmo instrumento usado sob as mesmas condições; mesmo local e repetições em curto espaço de tempo. Ao passo que a reprodutibilidade ou precisão intermediária é avaliada pelo grau de concordância entre os resultados das medições de uma mesma amostra, efetuadas sob condições variadas (mudança de analista, ou de equipamentos, ou dias diferentes, podendo até ocorrer uma combinação dessas variáveis) (ANVISA, 2017; RIBANI et al., 2004; INMETRO, 2017).

1.8.3 Limites de detecção e quantificação

O limite de quantificação (LQ) é a menor concentração do analito que pode ser quantificada em determinado experimento. Ao passo que o limite de detecção (LD) é a menor concentração do analito de interesse que pode ser detectada pela técnica instrumental utilizada (ANVISA, 2017; RIBANI et al., 2004; INMETRO, 2017).

1.8.4 Linearidade

A linearidade é a habilidade de um método analítico em produzir resultados que sejam diretamente proporcionais à concentração do analito em amostras, em uma dada faixa de concentração. A linearidade pode ser observada por meio da curva analítica, e é avaliada por intermédio da regressão linear pelo método dos mínimos quadrados (INMETRO, 2017).

1.8.5 Efeito Matriz

A matriz analisada pode conter componentes que interferem no desempenho da medição. O efeito matriz ocorre quando esses interferentes modificam os resultados obtidos da quantificação do analito com a curva de calibração construída em matriz e em solvente, podendo aumentar ou diminuir o sinal analítico. Adicionalmente a magnitude desse efeito também pode depender dos níveis de concentração (INMETRO, 2016).

1.9 Justificativa

A cerveja é a bebida alcoólica mais consumida no mundo, entretanto, se estiver contaminada por fumonisinas pode causar efeitos tóxicos ao consumidor. Considerando a importância do produto em questão, o seu elevado consumo e a carência de informações acerca da contaminação por fumonisinas em cerveja, o presente trabalho é de relevância para a saúde pública, tendo em vista o propósito de desenvolver e validar um método analítico para determinação de fumonisinas em cerveja e avaliar os níveis de contaminação da bebida para subsidiar ações de vigilância sanitária.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a presença de fumonisinas e fumonisinas hidrolisadas em cerveja.

2.2 Objetivos específicos

- a) Desenvolver um método analítico para determinação de FB1, FB2, HFB1 e HFB2 em cerveja por CLUE-EM/EM;
- b) Validar um método analítico para determinação de FB1, FB2, HFB1 e HFB2 em cerveja por CLUE-EM/EM;
- c) Aplicar o método validado na análise de amostras de cerveja comercializadas no Município do Rio de Janeiro.

3 METODOLOGIA

3.1 Reagentes e solventes

Acetonitrila e metanol (HPLC-grade), Cloreto de sódio - NaCl, Sulfato de magnésio – MgSO₄, (P. A.), ácido fórmico, formiato de amônio e acetato de etila (P. A.) foram adquiridos da Merck (Darmstadt, Germany). Água ultra-pura foi obtida através de sistema Milli-Q Gradient (Millipore, Bedford, MA, USA).

3.2 Preparo das soluções padrão

A solução padrão das fumonisinas FB1 e FB2 (50 µg/mL) em acetonitrila/água 1:1 (v/v) foram obtidas da Fluka/Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

As HFB1 e HFB2 foram preparadas no laboratório através da hidrólise das FB1 e FB2 obtidas comercialmente de acordo com o procedimento de Dall'Asta et al. (2009). Uma alíquota (1 mL) de uma solução padrão contendo as FB1 e FB2 (50 µg/mL) em acetonitrila/água 1:1 (v/v) foi evaporada à secura sob fluxo de N₂ a 40 °C; o resíduo foi redissolvido em 1 mL de solução 2 mol/L de KOH e deixado reagir por 12 h à temperatura ambiente. As fumonisinas hidrolisadas foram então extraídas da solução alcalina por três vezes com 5 mL de acetato de etila sob agitação. Os extratos provenientes das extrações foram combinados e secos sob fluxo de N₂ e o resíduo redissolvido em 1 mL de metanol. A ausência das fumonisinas foi verificada nessa solução por CLUE-EM/EM (concentrações menores que o LD) e a conversão total para as fumonisinas B1 e B2 hidrolisadas foi assumida. 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 das FB1 e FB2 hidrolisadas, respectivamente. Todas as soluções estoque foram armazenadas a -20 °C.

As soluções de trabalho das curvas de calibração foram preparadas em acetonitrila:água 1:1(v/v) com 0,1% de ácido fórmico.

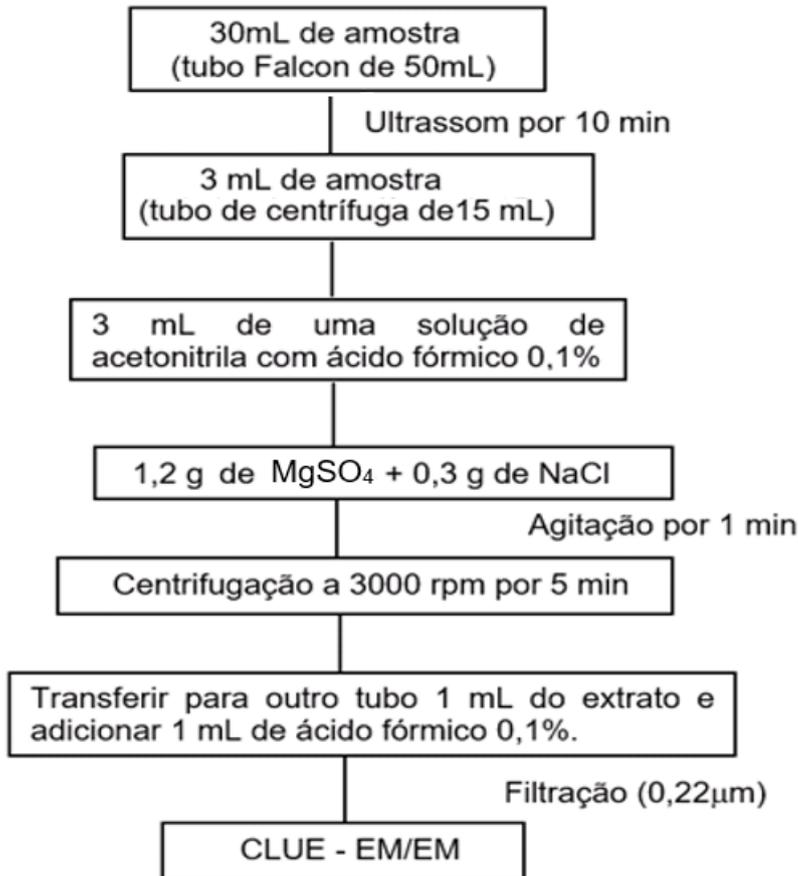
3.3 Coleta das amostras

As amostras foram adquiridas em supermercados na região metropolitana do Rio de Janeiro, entre julho e dezembro de 2018, perfazendo um total de 20 amostras representando 16 marcas de cerveja industriais do tipo *Pilsen*. Estas amostras foram utilizadas na validação dos métodos e analisadas quanto à contaminação por fumonisinas.

3.4 Preparo das amostras

As amostras foram preparadas baseando-se na metodologia QuEChERS descrita por RUBERT e colaboradores (2014), às quais, foram previamente tratadas no ultrassom (BRANSON/3510), em tubo Falcon de 50mL, por 10 min para a remoção do dióxido de carbono presente na cerveja; 3 mL de amostra (medidos com pipeta volumétrica) foram colocados em tubo de centrifuga com 15 mL de capacidade e fortificados com 60 μ L da solução padrão de FBs e HFBs. Em seguida, foram adicionados 3 mL de uma solução de acetonitrila com ácido fórmico 0,1%; 1,2 g de sulfato de magnésio e 0,3 g de cloreto de sódio. O tubo foi agitado por 1 min (Ultra-Turrax, IKA[®]) e centrifugado a 3000 rpm por 5 min (Hitach- HIMAC CF 7D2). À alíquota do extrato (1 mL) foi adicionado 1 mL de ácido fórmico 0,1%. A solução resultante foi homogeneizada e filtrada (filtro PTFE 0,22 μ m) no *vial* para análise. Na figura 4 está esquematizado o fluxograma do tratamento das amostras.

Figura 4: Fluxograma do preparo das amostras.



Fonte: Do autor, 2018.

3.5 Tratamento de amostras empregadas na otimização do método analítico

Para realização desse estudo, amostras de cerveja do tipo *pilsen* não contaminadas com as substâncias alvo (amostras branco) foram fortificadas em triplicata para obter concentrações de 10 ng/mL para as FBs e 4 ng/mL para as HFBS. Para avaliar a recuperação foram utilizados extratos de amostras branco fortificados com as micotoxinas em questão. Os métodos avaliados estão descritos a seguir.

Método A (CHILAKA et al., 2018, com modificações) (método QuEChERS utilizando extração com acetonitrila, incluindo etapa de secagem do extrato com sulfato de magnésio e evaporação do extrato final): cada amostra (3 mL) foi transferida volumetricamente para tubo de centrífuga com 15 mL de capacidade. Em seguida, foram adicionados 3 mL de acetonitrila, 1,2 g de sulfato de magnésio e 0,3 g de cloreto de sódio. O tubo foi então agitado por 1 min (Ultra-Turrax, IKA®) e em

seguida centrifugado a 3000 rpm (rotações por minuto) durante 5 min (Hitach-HIMAC CF 7D2). A uma alíquota de 2 mL do sobrenadante (acetonitrila) foi adicionado 0,3 g de sulfato de magnésio, e novamente o tubo foi agitado e centrifugado. Um alíquota de 1 mL do sobrenadante (acetonitrila) foi concentrada à secura sob fluxo de nitrogênio em banho maria a 45 °C. O extrato seco foi dissolvido com 2 mL de uma solução de metanol:água:ácido fórmico (50:49,9:0,1 v/v/v) e a solução resultante foi filtrada (filtro PTFE 0,22 µm) antes da análise.

Método B (RUBERT et al., 2014, com modificações) (método QuEChERS utilizando extração com acetonitrila): cada amostra (3 mL) foi transferida volumetricamente para tubo de centrífuga com 15 mL de capacidade. Em seguida, foram adicionados 3 mL de acetonitrila, 1,2 g de sulfato de magnésio e 0,3 g de cloreto de sódio. O tubo foi agitado por 1 min (Ultra-Turrax, IKA®), e centrifugado a 3000 rpm por 5 min (Hitach- HIMAC CF 7D2). Uma alíquota do extrato (1 mL) foi diluída com 1 mL de uma solução 0,2% de ácido fórmico e a solução resultante foi filtrada (filtro PTFE 0,22 µm) antes da análise.

Método C (CARRASCO et al., 2015, com modificações) (método QuEChERS utilizando extração com acetonitrila, incluindo etapa de secagem do extrato com sulfato de magnésio): cada amostra (3 mL) foi transferida volumetricamente para tubo de centrífuga com 15 mL de capacidade. Em seguida, foram adicionados 3 mL de acetonitrila, 1,2 g de sulfato de magnésio e 0,3 g de cloreto de sódio. O tubo foi agitado por 1 min (Ultra-Turrax, IKA®) e centrifugado a 3000 rpm por 5 min (Ultra-Turrax, IKA®). A uma alíquota de 2 mL do sobrenadante (acetonitrila) foi adicionado 0,3 g de sulfato de magnésio, e novamente o tubo foi agitado e centrifugado. Uma alíquota do extrato (1 mL) foi diluída com 1 mL de uma solução 0,2 % de ácido fórmico e a solução resultante foi filtrada (filtro PTFE 0,22 µm) antes da análise.

Método D (RUBERT et al., 2014, com modificações) (método QuEChERS utilizando extração com acetonitrila acidificada): cada amostra (3 mL) foi transferida volumetricamente para tubo de centrífuga com 15 mL de capacidade. Em seguida, foram adicionados 3 mL de uma solução de acetonitrila com 0,1% de ácido fórmico, 1,2 g de sulfato de magnésio e 0,3 g de cloreto de sódio. O tubo foi agitado por 1 min (Ultra-Turrax, IKA®) e então centrifugado a 3000 rpm por 5 min (Hitach- HIMAC CF 7D2). Uma alíquota do extrato (1 mL) foi diluída com 1 mL de uma solução de

ácido fórmico a 0,1% e a solução resultante foi filtrada (filtro PTFE 0,22 μm) antes da análise.

3.6 Tratamento das condições cromatográficas

A composição da fase móvel foi estudada com o objetivo de obter picos cromatográficos com formato e sensibilidade adequados para todas as micotoxinas alvo. Diferentes proporções do solvente orgânico (metanol foi selecionado para ser utilizado como solvente orgânico) no gradiente inicial (50, 55, 60, e 65 %), com um gradiente linear terminando em 70 e 80 % de solvente orgânico, bem como a adição de ácido fórmico (0,1 e 0,3 %) à fase móvel aquosa foram estudados com o intuito de obter maior sensibilidade dos picos cromatográficos. O tempo utilizado no gradiente (3, 4, 5, 6 e 7 min) também foi avaliado quanto à seletividade.

Outro ponto importante que foi avaliado refere-se à presença de efeito memória (*carry over*) nas análises de fumonisinas, esse fenômeno ocorre quando há o arraste do analito presente na amostra injetada em uma análise posterior, causando erros nos resultados e comprometendo a seletividade do método. Em estudo anterior realizado no laboratório, foi observado efeito memória para as fumonisinas em vários ciclos de injeção seguidos da injeção de uma solução padrão ou de uma amostra contaminada, utilizando os gradientes iniciando com 20 e 40, 60 e 62% de metanol (MATOS, 2015). Para avaliação do efeito memória neste estudo, foi injetada uma solução de fumonisinas B1, B2, HFB1 e HFB2 com concentração mais alta (10 ng/mL) para certificar que não há efeito memória nem mesmo em concentrações mais elevadas, logo em sequência foi injetada uma solução de ACN/ácido fórmico 0,1%, 50:50 v/v, para posteriormente comparar os cromatogramas.

3.7 Instrumental (CLUE-EM/EM)

A cromatografia foi realizada utilizando um cromatógrafo (Waters UPLC[®] I-Class ACQUITY) 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. Solução 0,1 % de ácido fórmico e metanol foram utilizados como fases móveis aquosas e orgânicas, respectivamente. O gradiente de eluição iniciou com 55 % de metanol seguido de um gradiente linear (6 min) para 80

% de metanol. A coluna foi então lavada com metanol (100 %) por 1 min e em seguida o sistema foi reequilibrado por 2 min na condição inicial da fase móvel. O volume de injeção foi de 5 μ L.

A detecção foi realizada empregando-se um espectrômetro de massas sequencial do tipo quadrupolo (Waters, Xevo[®] TQ-S) equipado com uma fonte de ionização por *electrospray* (ESI) operado em modo de ionização positivo.

3.8 Validação do método analítico

O método foi validado através da avaliação dos seguintes parâmetros de desempenho analítico: especificidade, seletividade, linearidade, exatidão, precisão, limite de quantificação e limite de detecção.

3.8.1 Seletividade/Especificidade

A seletividade do método foi avaliada comparando-se os tempos de retenção das micotoxinas estudadas, observados nas amostras com os obtidos utilizando soluções padrão. A confirmação foi realizada por comparação das razões das intensidades das transições dos íons obtidas para as micotoxinas nas amostras com as razões obtidas na solução padrão (CE, 2002).

3.8.2 Exatidão e precisão

Para os estudos de exatidão e precisão do método foram analisadas cinco amostras com o objetivo de obter amostras não contaminadas (branco) ou com baixos níveis de contaminação para as fumonisinas. Após a identificação da amostra de cerveja não contaminada, a mesma foi fortificada em três níveis de concentração: 1 ng/mL; 5 ng/mL e 10 ng/mL, com seis replicatas para cada nível estudado. Ao passo que a precisão intermediária para o método avaliado foi realizada através da análise de quatro amostras fortificadas com a concentração de 0,1 ng/mL, em 4 dias diferentes.

Os cálculos de recuperação (Rec%) e desvio padrão relativo (DPR%) dos métodos analíticos foram realizados a partir das equações 1 e 2 respectivamente.

$$\text{Rec\%} = \frac{\text{C medida}}{\text{C fortificada}} \times 100 \quad (\text{Equação 1})$$

Sendo:

Rec= Recuperação

C= Concentração

$$\text{DPR\%} = \frac{\text{DP}}{\text{CMD}} \times 100 \quad (\text{Equação 2})$$

Sendo:

DPR= Desvio padrão relativo

DP= Desvio padrão

CMD= Concentração média determinada

3.8.3 Limites de detecção e quantificação

No presente trabalho, os limites de detecção (LD) e limites de quantificação (LQ) das fumonisinas e fumonisinas hidrolisadas foram determinados pelo método da relação sinal/ruído (S/R), considerando razões de S/R de 3:1 para o LD, ou seja, o sinal produzido através da resposta da injeção de uma concentração conhecida do analito de interesse é 3 vezes maior do que o sinal produzido do ruído da linha de base do cromatograma; e 10:1 para o LQ (RIBANI et al., 2004; SAEGER et al., 2011). Esta relação (S/R) foi avaliada fortificando-se uma amostra com 0,1 ng/mL de fumonisina e fumonisina hidrolisadas. O cálculo foi concluído através do software do cromatógrafo (Waters UPLC® I-Class ACQUITY).

3.8.4 Linearidade

A linearidade das curvas de calibração em matriz foi estudada nas faixas de concentração de 0,05 ng/mL a 5 ng/mL para todas as substâncias alvo, em 8 níveis de concentração.

As curvas de calibração foram avaliadas com base em estudo de Souza e Junqueira (2005). Como premissas para a análise de regressão foram verificadas a homocedasticidade, a independência e a normalidade dos resíduos da regressão. A análise de variância foi utilizada para avaliar a falta de ajuste e a significância da regressão.

3.8.5 Efeito Matriz

O efeito matriz do método utilizado na determinação de fumonisinas e fumonisinas hidrolisadas foi realizado utilizando a preparação das curvas de calibração na matriz estudada (*matrix-matched calibration*) e em solvente, utilizando a faixa de concentração de 0,05 ng/mL a 1 ng/mL para todas as substâncias alvo, em seis níveis de concentração.

O teste t foi utilizado para avaliar a presença de efeito matriz no método analítico pela comparação das inclinações das curvas de calibração preparadas em matriz e em solvente (SOUZA, 2007).

Para avaliar a extensão do efeito matriz, os coeficientes angulares das curvas de calibração preparadas em solvente e em matriz foram comparados.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Otimização das condições do espectrômetro de massas

Os parâmetros da fonte de ionização otimizados foram: voltagem do capilar (3 kV), temperatura de dessolvatação (400 °C), temperatura da fonte (150 °C). Nitrogênio foi usado como gás do cone e gás de dessolvatação em um fluxo de 150 L/h e 750 L/h, respectivamente. Argônio foi usado como gás de colisão em um fluxo de 0,15 mL/min. As condições do espectrômetro de massas foram otimizadas por infusão das soluções padrão individuais (100 ng/mL).

O equipamento foi operado usando uma fonte *ESI* (ionização por eletrospray) em modo de ionização positivo. A voltagem do cone foi otimizada e íons protonados $[M + H]^+$ foram selecionados para todas as substâncias alvo. Energias de colisão foram otimizadas para as principais transições identificadas. As duas transições de íons mais intensas, selecionadas através da relação sinal/ruído dos picos cromatográficos, foram usadas como as transições de quantificação e confirmação. A energia do capilar foi avaliada na faixa de 0 a 4 kV; a voltagem de 3 kV apresentou a melhor resposta para todas as substâncias.

A temperatura do gás de dessolvatação (N_2) foi avaliada na faixa de 200 a 500 °C; temperaturas superiores a 400°C não ofereceram ganho de sinal e, portanto, essa temperatura foi selecionada. O fluxo do gás de dessolvatação (N_2) foi avaliado na faixa de 300 a 1200 L/h; o fluxo de 750 L/h foi selecionado já que fluxos superiores não ofereceram ganho de sinal para as substâncias. O fluxo do gás do cone (N_2) foi avaliado na faixa de 150 a 300 L/h; o fluxo foi mantido em 150 L/h já que essa foi a melhor condição de sensibilidade para as substâncias.

Após distribuição das substâncias nas respectivas janelas de aquisição, o *dwell time* foi otimizado através da injeção de solução padrão das substâncias alvo (5 ng/mL) com o objetivo de obter picos cromatográficos com um número adequado de *scans* (entre 15 e 25). As duas transições dos íons selecionadas e as condições de aquisição para as micotoxinas são apresentadas na tabela 5.

Tabela 5: Condições do espectrômetro de massas.

| Micotoxinas | Tempo de retenção (min) ^a | Transição de quantificação Q (m/z) | Transição de qualificação q (m/z) | Q/q ^b | Energia de colisão (eV) ^c | Voltagem do cone (V) | Dwell time (s) |
|-------------|--------------------------------------|------------------------------------|-----------------------------------|------------------|--------------------------------------|----------------------|----------------|
| HFB1 | 2,28 (0,0-3,20) | 406,0>369,9 | 406,0>351,9 | 1,4 (±0,3) | 20 / 20 | 64 | 0,1 |
| FB1 | 2,67 (0,0-3,20) | 722,0>351,9 | 722,0>333,9 | 1,0 (±0,2) | 36 / 40 | 86 | 0,1 |
| HFB2 | 3,94 (3,2-9,0) | 390,0>353,9 | 390,0>335,9 | 1,4 (±0,3) | 20 / 22 | 60 | 0,1 |
| FB2 | 4,45 (3,2-9,0) | 706,0>335,9 | 706,0>317,9 | 1,8 (±0,4) | 38 / 40 | 86 | 0,1 |

ESI operado em modo positivo para todas as substâncias;

^aJanelas de aquisição mostradas entre parênteses;

^bIntensidades relativas para as transições dos íons (Q/q) e o máximo de tolerância aceitável para confirmação demonstrado entre parênteses (EC, 2002);

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

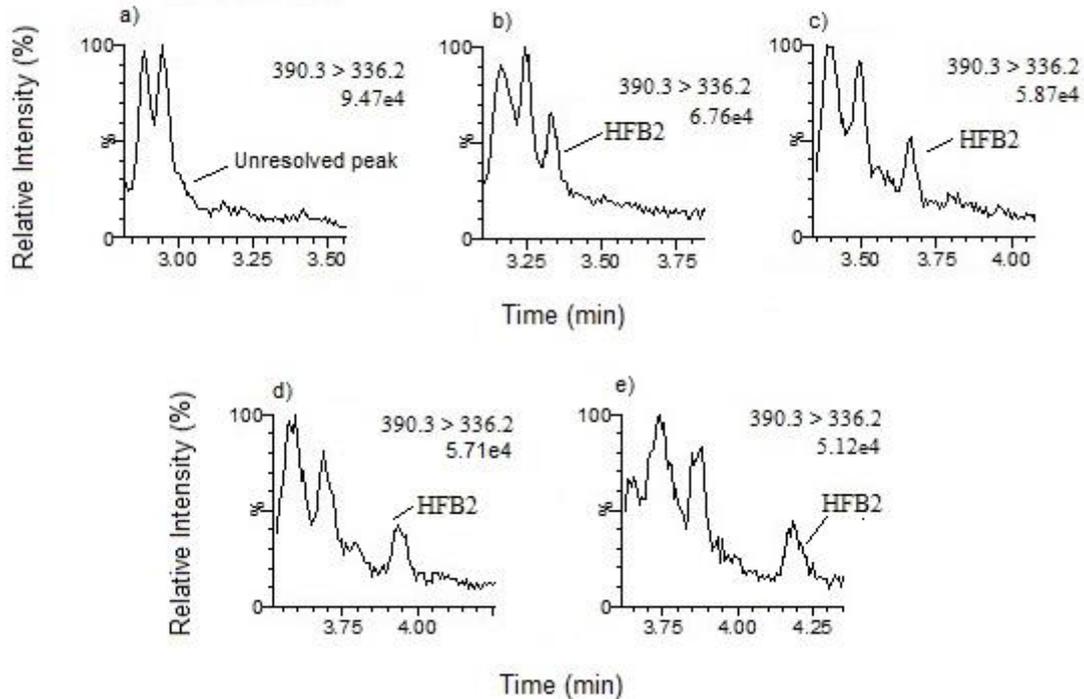
Fonte: Do autor, 2019.

4.2 Otimização das condições cromatográficas

O gradiente iniciando com 55% e terminando com 80% de metanol foi selecionado para este estudo pois apresentou seletividade e sensibilidade adequadas para todas as substâncias, diferentemente dos métodos de gradiente avaliados com início de 65 % de metanol e 35% de solução de ácido fórmico 0,1%; e 60% de metanol e 40% de solução de ácido fórmico 0,1%, que apresentaram interferentes eluindo no mesmo tempo de retenção da HFB1 e da FB2, respectivamente.

Após seleção da condição inicial (55 % de metanol) e final do gradiente (80 % de metanol), o tempo de 6 min foi selecionado, pois apresentou seletividade satisfatória no menor tempo para as micotoxinas avaliadas, conforme demonstrado na figura 5, contribuindo com aumento na agilidade nas análises, e diminuição solventes.

Figura 5: Cromatograma demonstrando o aumento da seletividade para HFB2 com gradiente de 55% a 80% com tempo de: a) 3 min, b) 4 min, c) 5 min, d) 6 min, e) 7 min.



Fonte: Do autor, 2019.

4.3 Otimização do método de tratamento das amostras

Em relação ao tratamento da amostra várias abordagens foram seguidas baseando-se em estudos reportados na literatura. Todas as amostras foram previamente degaseificadas por 10 min no ultrassom (BRANSON/3510) para a remoção do dióxido de carbono presente na cerveja. Para extração das amostras, o método QuEChERS com modificações foi avaliado a fim de se obter um método eficiente para a extração das substâncias alvo com o menor tempo de análise possível. Os extratos foram diluídos para minimizar a extensão do possível efeito de matriz (supressão/ ganho de sinal analítico).

Todos os métodos testados utilizaram o sulfato de magnésio e cloreto de sódio com acetonitrila na etapa de extração, seguida de agitação e centrifugação, sem etapa adicional de limpeza. Cabe ressaltar que a maioria dos métodos reportados na literatura tem utilizado etapas de limpeza do extrato, principalmente utilizando EFS com C18 para a matriz cerveja (CARRASCO et al., 2015; JARTÍN et al., 2019; TAMURA et al. 2011).

As modificações realizadas nos métodos estudados foram: redução da massa pesada de cerveja (de 10mL para 3mL), com isso todos os reagentes foram também reduzidos proporcionalmente diminuindo os custos com materiais; modificações no método QuEChERS também foram necessárias para adequar às necessidades do laboratório e da matriz cerveja (alteração do solvente metanol para acetonitrila); e diluição do extrato final com ácido fórmico 1:1.

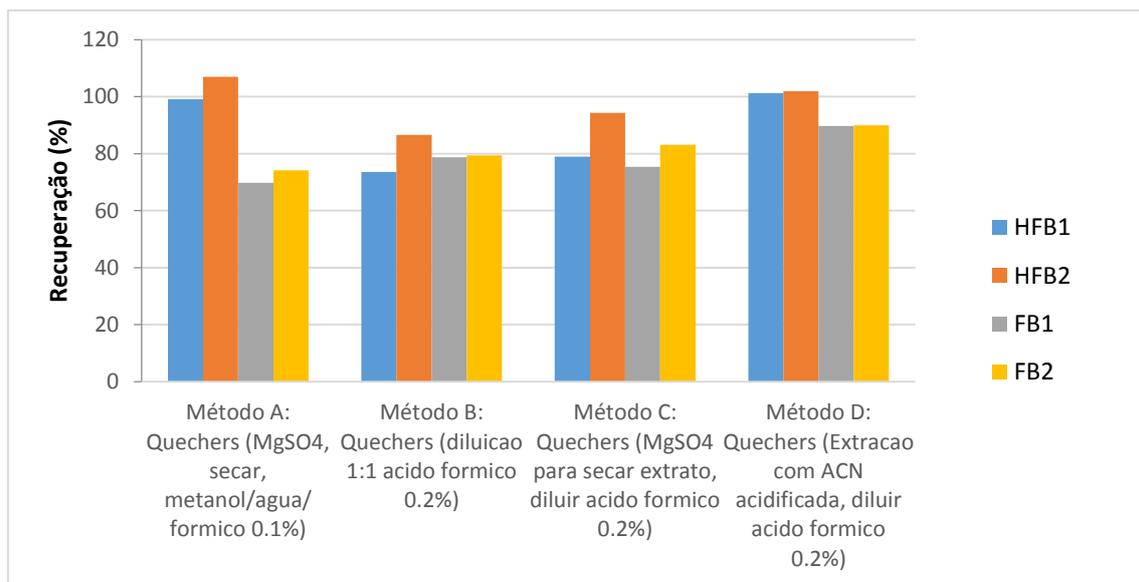
Os resultados obtidos para os métodos avaliados são apresentados na Figura 6. O Método D foi selecionado para validação, pois apresentou melhores resultados (menor erro relativo) em relação aos outros métodos avaliados, além de apresentar maior rapidez nas análises e método de extração mais simples. Por esses resultados verificou-se que a utilização de acetonitrila com ácido fórmico 0,1 % aumentou a eficiência de extração principalmente para as FB1 e FB2 comparado ao método utilizando acetonitrila sem a adição de ácido. Esse resultado da adição de ácido fórmico em ACN também foi observado por Rubert e colaboradores (2014), que após aplicação de 1% de ácido fórmico ao método QuEChERS modificado, as recuperações das micotoxinas alvo foram maiores e mais reprodutíveis, concluindo que a acidificação aumenta a migração destes analitos da fase aquosa para a camada orgânica, aumentando a eficiência da extração.

Para o desenvolvimento desta etapa foi utilizado o estudo de avaliação da adição de ácido fórmico (0,1 e 0,3%) no preparo das soluções padrão (metanol/água, 50:50 v/v) na sensibilidade das fumonisinas, realizada por Matos (2018) cujo resultado gerou um aumento da sensibilidade para FB1, FB2, HFB1 e HFB2 com adição de ácido fórmico 0,1% em relação à solução preparada sem adição de ácido fórmico; ao passo que quando foi adicionado 0,3% de ácido fórmico gerou supressão da resposta para HFB1. Com base no estudo reportado acima, utilizou-se 0,1% de ácido fórmico para o desenvolvimento do método do presente trabalho.

A necessidade de adicionar uma etapa de limpeza do extrato também foi avaliada, entretanto, Rubert e colaboradores (2014) testaram a etapa de limpeza com a matriz leite, que apresenta substâncias complexas como as proteínas e lipídeos que não estão presentes na cerveja, e concluíram que essa etapa não melhorou a limpeza da amostra, logo, foi excluída do fluxo de trabalho. Diante disso, não foi efetuada a avaliação da etapa de limpeza no presente estudo.

Em relação ao solvente de extração, muitos aspectos devem ser considerados, entre eles: habilidade de extração de um amplo espectro de resíduos com diferentes polaridades, apresentar seletividade durante a extração, partição, compatibilidade com diferentes técnicas cromatográficas, baixo custo e dentre outros a segurança (PRESTES et al., 2011). Para este trabalho a acetonitrila foi o solvente de escolha, como no QuEChERS original, por permitir boas recuperações de micotoxinas, remoção parcial de material indesejado, e promover a extração em uma fase única quando em contato com a matriz sem a necessidade de adição de solventes apolares para que ocorra a separação entre as fases orgânica e aquosa (ANASTASSIADES; LEHOTAY et al., 2003; REJCZAK; TUZIMSKI, 2015; RUBERT et al., 2016).

Figura 6: Gráfico demonstrando as recuperações dos métodos avaliados.



Fonte: Do autor, 2018.

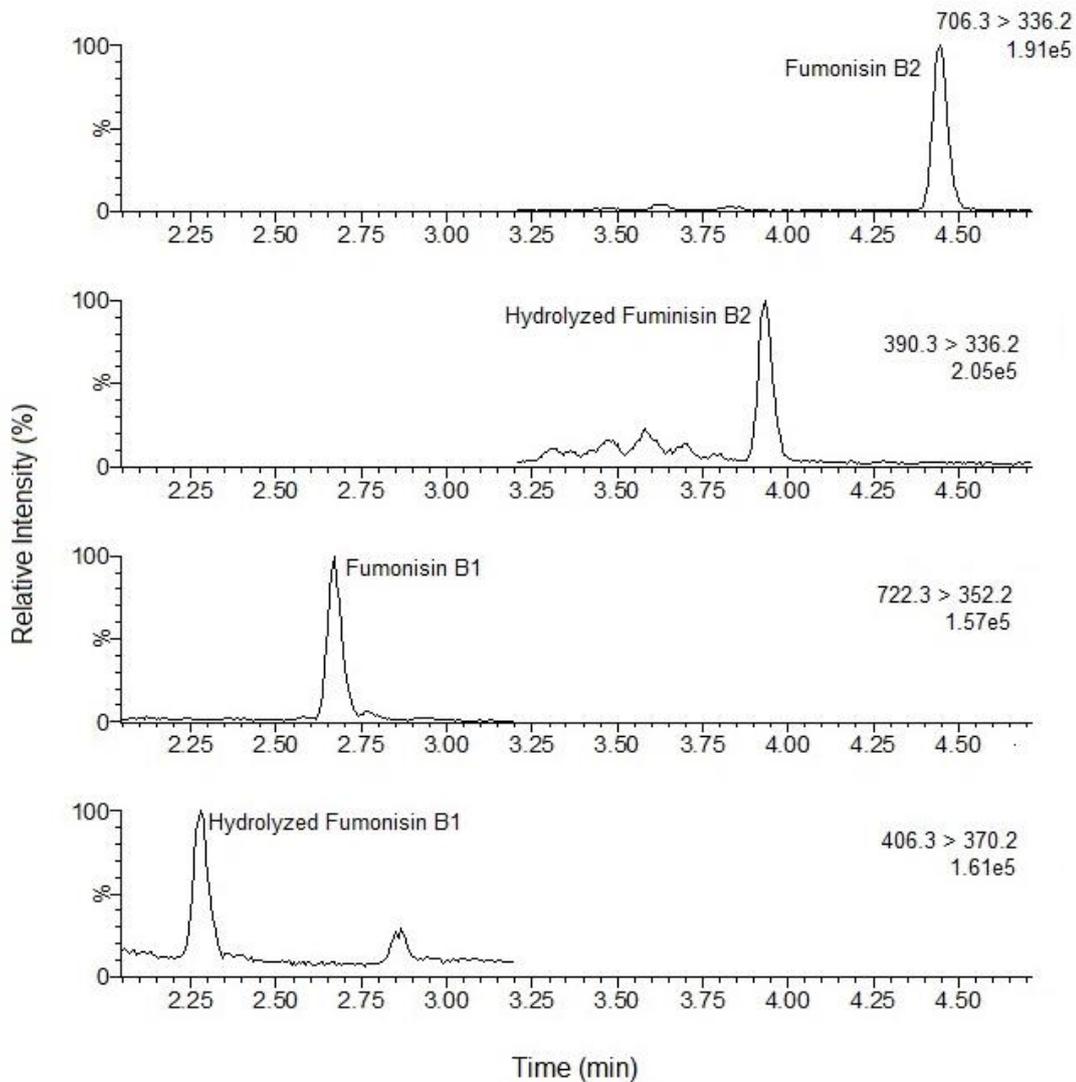
4.4 Validação de métodos analíticos

Nesse estudo foi validado um método analítico para a determinação direta de fumonisinas e fumonisinas hidrolisadas (naturalmente encontradas na amostra). Os parâmetros de desempenho dos métodos estudados foram: seletividade, linearidade, efeito matriz, precisão (repetitividade e precisão intermediária), exatidão (recuperação), limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ).

4.4.1 Seletividade/Especificidade

O método avaliado demonstrou seletividade para todas as fumonisinas estudadas. Não foram observados sinais interferentes eluindo no tempo de retenção das micotoxinas verificadas. Na Figura 7 são mostrados os cromatogramas obtidos para amostras de cerveja analisadas pelo método desenvolvido nesse estudo.

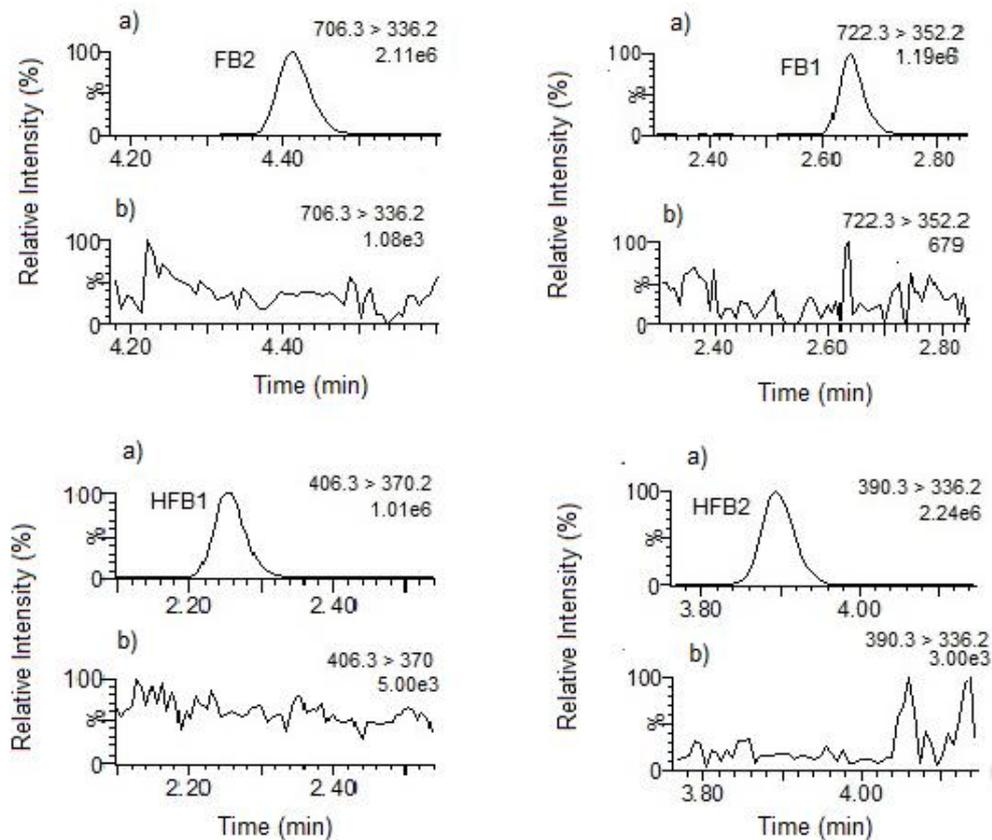
Figura 7: Cromatogramas demonstrando a seletividade do método para a determinação de fumonisinas (FB1= 1ng/mL, FB2= 1ng/mL, HFB1= 0,1ng/mL, HFB2= 0,1ng/mL no extrato final de cerveja).



Fonte: Do autor, 2018.

Durante as análises de determinação de fumonisinas é esperado que haja ocorrência de efeito memória para essas micotoxinas, conforme tem sido relatado em alguns estudos com matrizes variadas (PLATTNER et al., 1999; TAMURA et al., 2012). Este problema pode ocasionar falsos positivos nas análises de rotina e, portanto, deve ser investigado. Contudo, ao avaliar a ocorrência de efeito memória para as fumonisinas pode-se observar a ausência deste efeito nas condições propostas pelo método, como demonstra a figura 8.

Figura 8: Cromatogramas demonstrando a ausência do efeito memória para as fumonisinas, gradiente iniciando com 55% de metanol: a) solução padrão das fumonisinas (10ng/mL), b) solvente (ACN/ácido fórmico 0,1%, 50:50 v/v).



Fonte: Do autor, 2018.

4.4.2 Exatidão e Precisão

Os resultados obtidos estão demonstrados nas tabelas 6 e 7, nas quais, a repetibilidade e a precisão intermediária são expressas pelo desvio padrão relativo (DPR%) e a exatidão pelos valores de recuperação percentual, nas condições de

repetibilidade (mesmo dia e mesmo analista), obtido através da equação 1, anteriormente citada. A Recuperação e a repetibilidade foram realizadas em 3 níveis de concentração, sendo que o terceiro nível (10 ng/mL) está fora do intervalo de linearidade estudado, que foi de 0,05 a 5 ng/mL; isso foi necessário, pois durante o preparo, a amostra é diluída no extrato final, logo, uma amostra com 10 ng/mL de concentração inicial equivale a 5 ng/mL no extrato final que compreende a faixa de concentração estudada na linearidade. A precisão intermediária foi avaliada em um nível apenas, com concentração diferente da repetibilidade; para tanto, foi utilizada uma concentração mais baixa (0,1 ng/mL), a fim de obter bons resultados a partir de concentrações mais críticas. Os resultados foram avaliados de acordo com os critérios adotados na União Europeia (CE, 2002, 2006). Os valores de recuperação encontrados, utilizando o método de determinação de fumonisinas e fumonisinas hidrolisadas, foram entre 89,9 e 99,9%. O DPR obtido para os estudos de repetibilidade e precisão intermediária foi inferior a 10% para as micotoxinas estudadas, atendendo aos critérios de aceitação estabelecidos pela Comunidade Europeia. Dessa forma, pode-se considerar que o método desenvolvido apresentou exatidão e precisão adequadas para a matriz estudada.

Tabela 6: Resultados da validação do método utilizado na determinação de fumonisinas e fumonisinas hidrolisadas nas amostras de cerveja *pilsen*.

| Micotoxinas | LD (ng/mL) | LQ (ng/mL) | 1 ng/mL | | 5 ng/mL | | 10 ng/mL | |
|-------------|---------------|---------------|---------|------------------|---------|------------------|----------|------------------|
| | | | Rec | ^a DPR | Rec | ^a DPR | Rec | ^a DPR |
| HFB1 | 0,085 | 0,284 | 99,9 | 3,0 | 96,7 | 2,7 | 99,1 | 4,1 |
| FB1 | 0,015 | 0,049 | 99,2 | 3,0 | 95,4 | 2,1 | 92,8 | 3,8 |
| HFB2 | 0,014 | 0,046 | 89,9 | 4,2 | 98,1 | 3,3 | 99,3 | 4,4 |
| FB2 | 0,011 | 0,035 | 92,5 | 3,9 | 94,7 | 2,6 | 91,8 | 3,7 |

HFB1: fumonisina B1 hidrolisada; HFB2: fumonisina B2 hidrolisada; FB1: fumonisina B1; FB2: fumonisina B2; LD: Limite de detecção (ng/mL); LQ: Limite de quantificação (ng/mL); Rec (%), recuperação; ^aDPR (%) desvio padrão relativo ("no dia", n=6).

Fonte: Do autor, 2019.

Tabela 7: Resultado da precisão intermediária.

| Micotoxinas | 0,1 ng/mL |
|-------------|------------------|
| | ^a DPR |
| HFB1 | 3,6 |
| FB1 | 7,3 |
| HFB2 | 5,9 |
| FB2 | 4,9 |

HFB1: fumonisina B1 hidrolisada;

HFB2: fumonisina B2 hidrolisada;

FB1: fumonisina B1; FB2: fumonisina B2;

^aDPR (%) desvio padrão relativo (“entre-dias”, n=4).

Fonte: Do autor, 2019.

4.4.3 Limites de quantificação e detecção

Para a determinação dos limites de quantificação e detecção, foi calculada a relação sinal/ruído (S/R) para cada uma das fumonisinas considerando o LD 3 x (S/R) e o LQ 10 x (S/R). A amostra não contaminada foi fortificada seguindo o procedimento apresentado nos estudos de exatidão e precisão (descrito anteriormente). Os resultados correspondentes às concentrações injetadas de 1 ng/mL foram utilizados para estabelecer a relação (S/R), através do software do CLUE-EM/EM. A tabela 6 demonstra os valores encontrados de LQ e LD das fumonisinas nas amostras analisadas.

4.4.4 Linearidade

Na avaliação da linearidade das curvas analíticas utilizadas na quantificação das amostras, a homocedasticidade dos resíduos foi confirmada para todas as curvas avaliadas (p -valores $>0,05$), pelo teste de Levene modificado (BROWN; FORSYTHE, 1974). A independência dos resíduos foi avaliada pela estatística de Durbin-Watson (DURBIN; WATSON, 1951), e confirmada para todas as curvas de calibração avaliadas (p -valores $> 0,05$). A normalidade dos resíduos foi verificada pelo teste de Ryan-Joiner (RYAN; JOINER, 1976), e também foi confirmada (p -valores $>0,05$). Foram verificados significativos resultados da regressão (p -valores $<0,001$) e falta de ajuste não significativa (p -valores $>0,05$) pela análise de variância

(ANOVA) (DRAPER; SMITH, 1998). Com isso, pode-se concluir que as curvas de calibração avaliadas foram lineares para as faixas de concentração estudadas.

4.4.5 Efeito matriz

As curvas em matriz foram construídas na faixa de concentração de 0,05 a 1 ng/mL, todas as premissas (homocedasticidade, independência, normalidade dos resíduos e ajuste ao modelo linear) das curvas de calibração utilizadas na realização desta análise foram atendidas, indicando linearidade na faixa de concentração estudada; seguindo estritamente o protocolo de avaliação descrito na avaliação da linearidade. As equações das curvas de calibração em solvente e em matriz com seus respectivos coeficiente de determinação e a extensão do efeito matriz são mostrados na tabela 8.

Tabela 8- Equações das curvas de calibração e extensão do efeito matriz.

| Micotoxina | Curva em Solvente | R ² | Curva em matriz | R ² | Efeito matriz (%) ^a |
|-------------|-------------------|----------------|-------------------|----------------|--------------------------------|
| FB1 | $y=11936x-18,562$ | 0,9991 | $y=10238x+99,488$ | 0,9977 | -14 |
| FB2 | $y=30060x-102,51$ | 0,9992 | $y=26059x-104,8$ | 0,9988 | -13 |
| HFB1 | $y=26871x+25,765$ | 0,9996 | $y=25484x+37,173$ | 0,9996 | -5 |
| HFB2 | $y=56724x-324,46$ | 0,9997 | $y=56256x-14,314$ | 0,9991 | 0,8 |

a: (+) aumento do sinal; (-) supressão do sinal; R²: coeficiente de determinação.

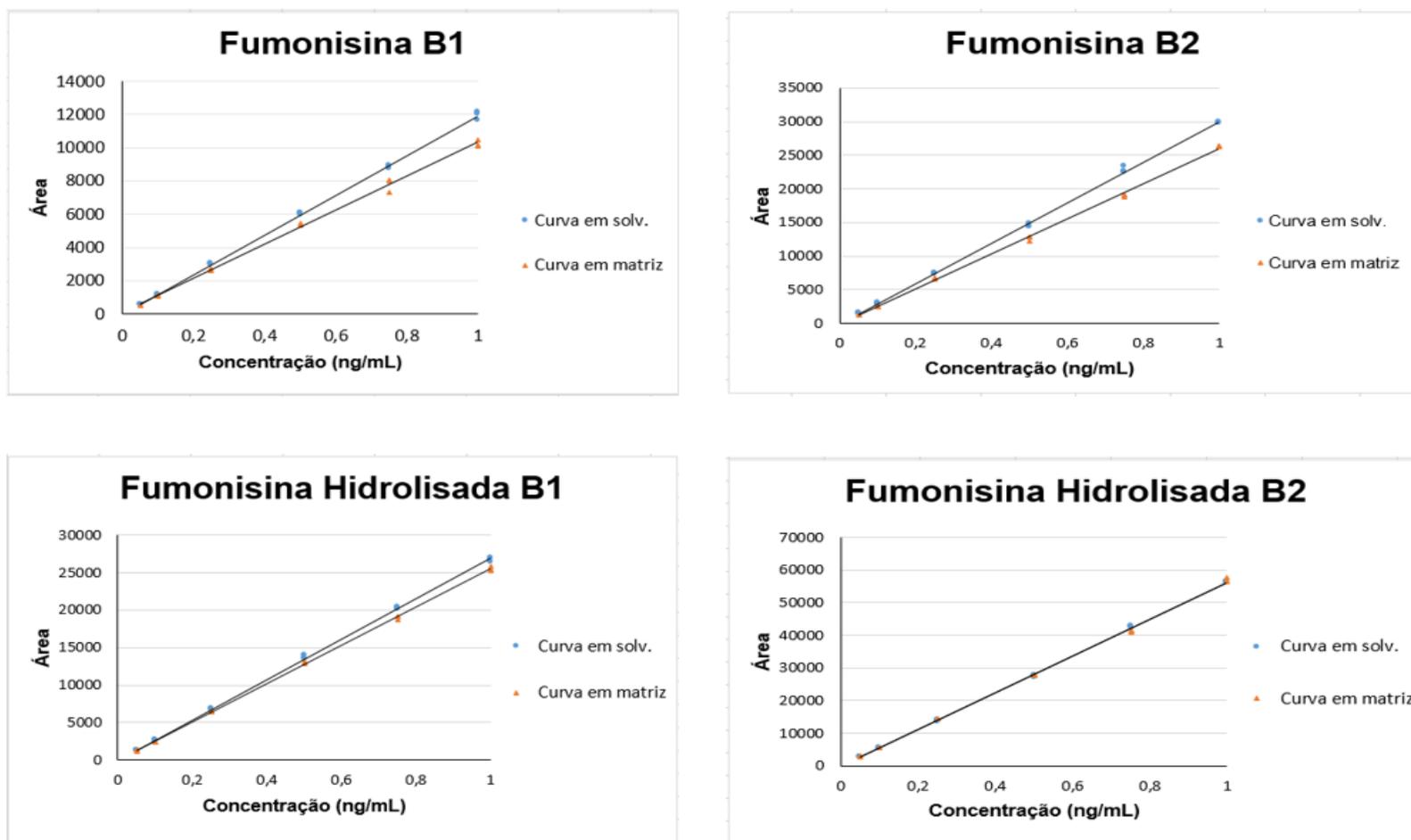
Fonte: Do autor, 2019.

O método utilizado na determinação de fumonisinas em cerveja apresentou supressão do sinal analítico das fumonisinas B1 (-14 %), B2 (-13 %) e HFB1 (-5 %), demonstrando que a presença da matriz reduz a ionização para essas substâncias. Para HFB2 foi observado um pequeno aumento do sinal analítico (0,8 %). O efeito matriz em baixo potencial observado em nosso estudo, mesmo sem a utilização de método de limpeza dos extratos, pode ser justificado devido ao relativo extenso tempo de gradiente (6 min) utilizado no método cromatográfico, sendo eficiente na separação dos analitos alvo de possíveis interferentes presentes na matriz. A Figura 9 apresenta a comparação dos gráficos das curvas de calibração preparadas em matriz e em solvente.

Pelo teste t não foi verificada diferença significativa ($p > 0,05$) entre as inclinações das curvas de calibração em matriz e em solvente para HFB2 demonstrando ausência de efeito matriz para essa substância. Para as FB1, FB2 e HFB2 foram observadas diferenças significativas entre as inclinações das curvas de calibração em matriz e em solvente ($p < 0,05$) demonstrando presença de efeito matriz para esses analitos.

Para compensar o efeito matriz as amostras analisadas na rotina foram quantificadas utilizando curvas de calibração em matriz.

Figura 9: Gráfico demonstrando o efeito matriz do método, comparando as curvas em matriz e solvente.



Fonte: Do autor, 2019.

4.5 Análise das amostras

O método analítico validado para determinação de fumonisinas e fumonisinas hidrolisadas foi aplicado nas análises de 20 amostras de cervejas industrializadas adquiridas no Município do Rio de Janeiro. Os resultados foram comparados a outros estudos publicados, visto que, não há limites máximos tolerados (LMTs) de fumonisinas estabelecidos para a bebida. As amostras foram quantificadas utilizando curvas de calibração preparadas em matriz. Os resultados encontrados estão apresentados na tabela 9.

Tabela 9: Concentração encontrada para as fumonisinas nas amostras de cerveja analisadas.

| Cód. amostras | FB1 (ng/mL) | FB2 (ng/mL) | HFB1 (ng/mL) | HFB2 (ng/mL) |
|----------------------|--------------------|--------------------|---------------------|---------------------|
| A#1 | 0,134 | ≥LD | nd | nd |
| A#2 | ≥LD | nd | nd | nd |
| A#3 | 0,588 | 0,063 | 0,330 | ≥LD |
| A#4 | 0,307 | 0,048 | ≥LD | ≥LD |
| A#5 | 6,861 | 0,616 | nd | nd |
| A#6 | 0,335 | 0,041 | nd | nd |
| A#7 | 0,259 | 0,044 | nd | nd |
| A#8 | 3,62 | 0,433 | nd | ≥LD |
| A#9 | 0,534 | 0,056 | nd | nd |
| A#10 | 2,027 | 0,223 | nd | nd |
| A#11 | nd | nd | nd | nd |
| A#12 | nd | nd | nd | nd |
| A#13 | 0,407 | 0,067 | nd | nd |
| A#14 | ≥LD | nd | nd | nd |
| A#15 | 0,202 | 0,042 | nd | nd |
| A#16 | 4,610 | 0,458 | nd | nd |
| A#17 | 0,298 | 0,052 | nd | nd |
| A#18 | 0,188 | 0,042 | nd | nd |
| A#19 | 0,110 | nd | nd | nd |
| A#20 | nd | nd | nd | nd |

nd: não detectado; LD: limite de detecção.

Fonte: Do autor, 2019.

As fumonisinas B1 e B2 foram encontradas em 75% e 65% das amostras analisadas respectivamente, em níveis de concentração de 0,110 a 6,861 ng/mL (média: 1,208 ng/mL) para FB1 e de 0,041 a 0,616 ng/mL (média: 0,157 ng/mL) para FB2. Essa diferença entre a contaminação de FB1 e FB2 segue o padrão geral de contaminação por fumonisinas em milho e alimentos à base de milho, onde a FB1 é tipicamente presente em níveis mais elevados do que a FB2 (DOKO et al. 1995;

SCOTT et al., 1997). A alta incidência de fumonisinas encontrada neste estudo pode ser explicada pela utilização de cereais não malteados (por exemplo, o milho) para produção da bebida. De acordo com estudos anteriores, os adjuntos cervejeiros não malteados são suscetíveis à contaminação por micotoxinas e conseqüentemente ocorre a transferência para a cerveja (TORRES et al., 1998).

Todas as amostras de cerveja utilizadas para as análises deste estudo apresentaram como ingredientes cereais não malteados no rótulo. Estudos anteriores demonstraram que países subdesenvolvidos como o Brasil costumam exportar as melhores fontes (grãos) produzidas. Os grãos de qualidade média são para o consumo da população e os demais, ou seja, a pior parte da produção é destinada aos adjuntos e alimentos processados (LESLIE; LOGRIECO, 2014). Isso pode explicar a alta incidência de fumonisinas no produto final, encontrada no presente estudo.

Em relação aos níveis de concentração, os resultados encontrados neste estudo estão bem abaixo dos níveis encontrados nos estudos reportados na tabela 3, páginas 40 e 41.

Diversos estudos têm demonstrado altas contaminações de fumonisinas em cervejas tradicionais produzidas, principalmente na África; Abia et al. (2013), Matumba et al. (2014), Chilaka et al. (2018), Roger (2011) e Shephard et al. (2005). Matumba et al (2014) relataram taxa de incidência de 100% de fumonisinas em seus estudos, com concentração média de 1898 µg/kg, além disso, 5 amostras de cerveja apresentaram quantidades de FBs superiores ao limite máximo (1000 µg/kg) estabelecido pelo Regulamento (CE) n.º 1126/2007 para produtos à base de milho para consumo humano direto.

A mesma tendência foi relatada em cervejas produzidas a partir de milho Xhosa em Transkei, Sul da África (concentração máxima de 1329 ng/mL para o somatório de FB1+FB2+FB3) (SHEPHARD et al., 2005); Chilaka et al. (2018) detectaram FB1 em 22% e 18% das cervejas do tipo burukutu e pito (cervejas tradicionais, produzidas na região), com concentração máxima de 316 ng/mL (média: 138 ng/mL) e 194 ng/mL (média: 114 ng/mL), respectivamente; apenas 13% das cervejas burukutu e 11% de pito foram contaminadas por FB2.

As fumonisinas (FBs) são algumas das principais micotoxinas frequentemente detectadas em cervejas tradicionais produzidas na África (ABIA et al., 2013; EZEKIEL et al., 2014; MATUMBA et al., 2014; SHEPHARD et al., 2005). Em

decorrência disto, a África do Sul é uma das regiões endêmicas de alta incidência de câncer de esôfago, visto que, esta doença é altamente ligada ao consumo de alimentos contaminados por fumonisinas (RHEEDER et al.,1992). Uma curiosidade relatada nos estudos de Shephard et al. (2005) salienta que a maior parte da África é quente e úmida, facilitando a infecção e crescimento fúngico da gênero *Fusarium*. Além disso, os produtores da região de Eastern Cape, selecionam os milhos de boa qualidade para cozinhar, enquanto o milho deteriorado (apresentando fungos) é usado para fabricação de cerveja. Acredita-se que o milho deteriorado acrescenta um sabor desejável e peculiar à cerveja.

Os altos níveis de fumonisinas em cerveja reportados nos estudos citados acima também podem ser explicados através da estabilidade desta micotoxina ao calor (ALBERTS et al., 1990) e da resistência ao processo de fermentação de levedura do milho e mosto (BOTHAST et al., 1992; SCOTT et al., 1995).

Estudos na Europa também detectaram fumonisinas em cerveja, porém em níveis mais baixos que na África; Bertuzzi et al. (2011) detectaram fumonisina B1 em 97% das amostras (n = 32) níveis máximos de 30,3 ng/mL e FB2 em 57,6% das amostras (n= 19) com nível máximo de 3,9 ng/mL, e concluíram que as cervejas produzidas na Itália apresentaram concentrações significativamente maiores de FBs que os demais países da Europa, provavelmente causada pela alta ocorrência destas toxinas no milho produzido na Itália (Pietri et al., 2010). Em outros países europeus, por exemplo, a Croácia, a Polónia, a França e Roménia, os níveis de FBs no milho são geralmente mais baixos, provavelmente devido às baixas temperaturas que diminuem a proliferação de fungos, principalmente da gênero *Fusarium*.

Na Espanha, Pascari et al. (2018) encontraram FB1 em apenas 1 das 64 amostras de cerveja analisadas com concentração de 32,78 ng/mL.

Dasko et al. (2005) não encontraram FBs em cervejas eslovacas produzidas usando apenas cevada, um dado importante a se considerar, pois confirma a contaminação da cerveja através do uso de milho infectado.

Sancho et al. (2011) realizaram um estudo na Espanha e detectaram uma média de contaminação de 39,6 µg/kg de fumonisinas (FB1+FB2) nas amostras de cerveja analisadas.

Estudos mais antigos, realizados na Europa, detectaram fumonisinas em 43,8% nas cerveja espanholas (n = 32) com níveis de 4,8 a 85,5 ng/mL (Torres et al., 1998). Scott e Lawrence (1995) encontraram FB1 em 10 de 40 amostras de

cerveja analisadas (25%) com concentração mais alta igual a 59 ng/ml. Em um estudo subsequente, Scott et al. (1997) detectaram fumonisinas B1 e B2 em 20 de 46 (43%) amostras de cervejas canadense, norte-americana e mexicana com níveis variando de 0,2 a 64 ng/mL.

No Brasil, estudos da contaminação por fumonisinas em cerveja também apresentaram baixos níveis de contaminação. Em 2007, um estudo realizado com cervejas de 5 estados diferentes, 43,1% das cervejas industriais analisadas estavam contaminadas por FB1 com níveis variando de 1 a 40 ng/mL (KAWASHIMA et al. 2007). Esses dados de contaminação estão bem acima dos valores encontrados nas amostras comercializadas no RJ, no presente estudo, ainda que tenha sido realizado com menor número de amostras. Em 2017 Piacentini e colaboradores encontraram concentrações elevadas de FB1 em cervejas industriais, destoando dos resultados anteriores. A FB1 foi detectada em aproximadamente 50% das amostras (56 positivas de 114 amostras analisadas) com níveis variando de 201,70 ng/mL a 1568,62 ng/mL (média: 367,47 ng/mL).

As HFB1 e HFB2 foram encontradas, no presente estudo, em 10% e 15% das amostras respectivamente, apresentando concentração de até 0,330 ng/mL para HFB1, e abaixo do LQ para HFB2. As concentrações encontradas para FB1 em nosso estudo foram até 20 vezes maiores que a concentração encontrada para a forma hidrolisada. As concentrações de HFB2 não foram quantificadas, pois se encontraram abaixo do limite de quantificação.

Apenas um estudo apresentou dados de contaminação de fumonisinas hidrolisadas Chilaka e colaboradores (2018) detectaram altas concentrações de HFB1 em cervejas tradicionais da África, com valores máximos de 152 ng/mL e 102 ng/mL em 11% e 9% nas cervejas burukutu e pito, respectivamente.

Embora o HFB1 tenha sido considerado inicialmente como toxina formada durante o processamento alcalino de alimentos, estudos mostraram também a ocorrência em outros produtos alimentícios processados, bem como cereais em bruto (ADETUNJI et al., 2014; HOPMANS; MURPHY, 1993). Estudos sobre a administração oral de HFB1 em diferentes espécies animais mostrou que HFB1 tem menor potencial tóxico quando comparado a FB1 (GRENIER et al. 2012; VOSS et al., 2009), assim, a degradação de fumonisinas em formas hidrolisadas pode ser uma estratégia para uma redução da exposição a fumonisinas, porém, Cirlini et al (2014) evidenciaram a necessidade de mais estudos para concluir tal afirmação.

De acordo com regulamentos nacionais e internacionais, a cevada malteada pode ser substituída por adjuntos cervejeiros em uma quantidade máxima de aproximadamente 50%. O milho, que é o principal grão disponível e escolhido no Brasil para melhorar e acelerar o processo de fermentação na indústria cervejeira, é altamente susceptível à contaminação pelo gênero *Fusarium*, o principal produtor de fumonisinas. (BERTUZZI et al., 2011; KAWASHIMA et al., 2007; PIACENTINI et al., 2017). Como consequência do uso de milho na fabricação de cerveja, as fumonisinas podem portanto, ocorrer no produto final em grande potencial, como foi detectado neste estudo, com 75% das amostras analisadas para fumonisina B1. O reconhecimento dos problemas causados pelas micotoxinas nos alimentos é, sem dúvida, o primeiro passo para a implementação de legislações com a finalidade de estabelecer LMTs e de programas que permitam a adoção de medidas apropriadas para a prevenção e a redução da contaminação.

5 CONCLUSÃO

Neste estudo foi desenvolvido e validado um método analítico utilizando um método QuEChERS modificado para o tratamento das amostras e a técnica de CLUE/EM-EM para detecção e quantificação de fumonisinas e fumonisinas hidrolisadas em cerveja.

Diversas modificações do método QuEChERS foram avaliadas e melhores resultados de recuperação foram obtidos com a adição de ácido fórmico na etapa de extração/partição principalmente para as FB1 e FB2.

Devido à presença de interferentes, o método cromatográfico foi otimizado para obter seletividade adequada no menor tempo de análise possível evitando etapas adicionais de limpeza do extrato. Assim, foi possível estabelecer um método analítico para determinação de fumonisinas em cerveja sem a necessidade de purificação dos extratos, por exemplo, utilizando colunas de imunoafinidade ou extração em fase sólida. A ausência de etapas de purificação, além de reduzir o tempo de análise, reduz significativamente o custo das análises, sendo o método desenvolvido atraente para ser implementado por outros laboratórios.

O método proposto foi capaz de determinar as fumonisinas alvo em amostras de cerveja de diferentes fabricantes sem a presença de interferentes demonstrando ser um método adequado para análises de rotina.

Os resultados obtidos para as amostras de cerveja analisadas, provenientes do comércio do Município do Rio de Janeiro, demonstraram alta incidência (> 70%) principalmente das FB1 e FB2. Os níveis de concentração encontrados estão de acordo com a maioria dos estudos reportados na literatura.

As HFB1 e HFB2 foram encontradas nas amostras analisadas indicando a possível hidrólise das fumonisinas durante o processo de fabricação cervejeiro. Esse é o primeiro estudo demonstrando a ocorrência de fumonisinas hidrolisadas em amostras de cerveja do Brasil.

Os resultados obtidos neste estudo demonstraram alta incidência de contaminação por fumonisinas em cervejas industriais, possivelmente provenientes das matérias primas utilizadas na fabricação, como os cereais não malteados.

Os resultados encontrados no estudo estão de acordo com outros estudos previamente publicados na literatura e indicam a necessidade de estratégias para

controlar a contaminação de fumonisinas na matéria-prima e conseqüentemente a contaminação presente na bebida final.

Os resultados encontrados nesse trabalho podem ser utilizados em estudos de avaliação da exposição a fumonisinas pela ingestão de cerveja subsidiando a discussão sobre a possível regulamentação dos níveis máximos toleráveis destes contaminantes em cerveja levando em consideração o elevado consumo e a importância econômica da bebida.

REFERÊNCIAS

ABIA, W. A., et al. Determination of multi-mycotoxin occurrence in cereals, nuts and their products in Cameroon by liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). **Food Control**, v.31, n.2, p. 438–453, 2013.

AFOLABI C. G. et al. Effect of sorting on incidence and occurrence of fumonisins and *Fusarium verticillioides* on maize from Nigeria. **Journal of Food Protection**, v. 69, p. 2019-2023, 2006.

ANFOSSI, L. Mycotoxin detection. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 37, p. 120-126, 2016.

AL-TAHER, F., et al. Rapid Method for the Determination of Multiple Mycotoxins in Wines and Beers by LC-MS/MS Using a Stable Isotope Dilution Assay. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n.10, p. 2378-84, 2013.

ALBERTS, J. F., et al. Effects of temperature and incubation period on production of fumonisin B1 by *Fusarium moniliforme*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, 1729-1733, 1990.

ANASTASSIADES, M.; LEHOTAY, S. J. Fast and Easy Multiresidue Method Employing Acetonitrile Extraction/Partitioning and “Dispersive Solid-Phase Extraction” for the Determination of Pesticide Residues in Produce. **Journal of AOAC international**, v. 86, n. 2, p. 412-430, 2003.

SILVA, A. J. B. Cerveja. In: VENTURINI FILHO, W. G. Tecnologia de bebidas: matéria-prima, processamento, BPF/APPCC, legislação, mercado. São Paulo: Edgard Blucher. c. 15, p. 347-382, 2005.

AMAYA D. B. R; MIRNA SABINO. Mycotoxin research in Brazil: the last decade in review. **Brazilian Journal of Microbiology**, 33: 1-11, 2002.

AMBEV. COMPANHIA DE BEBIDAS DAS AMÉRICAS - Cervejas. Disponível em: <http://www.ambev.com.br/Sociedade_.aspx> Acesso em: 15/07/2018.

BACA, E. The role of unmalted adjuncts in the creation of sensory characteristics of beer. In Proceedings of the school fermentation technology, p. 113-126, 2001.

BAZILIO, F. S. et al. Uso de planilha eletrônica na verificação da adequação de curva de calibração ao modelo linear. **Analytica**, 2011.

BEZUIDENHOUT, S. C. et al. Structure Elucidation of the Fumonisin, Mycotoxins from *Fusarium moniliforme*. **Journal of the Chemical Society, Chemical Communications**, 1988.

BELSLEY, D. A. et al. Regression diagnostics: identifying influential data and sources of collinearity. **New York: Wiley**, p. 292, 1980.

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

BRASIL. Decreto nº 6.871, de 04 de junho de 2009. Regulamenta a Lei nº 8.918, de 14 de julho de 1994, dispõe sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 04 de jun. 2009.

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. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 25 mar. 1996.

_____. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RDC nº 138, de 8 de fevereiro de 2017. Altera a Resolução da Diretoria Colegiada- RDC nº 7, de 18 de fevereiro de 2011, que dispõe sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos, para alterar os LMT da micotoxina deoxinivalenol (DON) em trigo e produtos de trigo prontos para oferta ao consumidor e os prazos para sua aplicação. **Diário Oficial da União**, Brasília, 9 de fevereiro de 2017.

_____. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. Resolução RDC nº 166, DE 24 de julho de 2017. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, 25 de julho de 2017.

_____. Portaria nº 130, 24 de maio de 2006. O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento institui o Grupo de Trabalho sobre Micotoxinas em produtos destinados à alimentação animal. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 25 mai. Seção 2, p. 5. 2006.

BERTUZZI, T., et al. Mycotoxin occurrence in beer produced in several European countries. **Food Control**, v.22, n. 12, p. 2059–2064, 2011.

BERTILHER, F. et al. Developments in mycotoxin analysis: an update for 2012-2013. **World Mycotoxin Journal**, v. 7, n. 1, p. 3-33, 2014.

BENKERROUM, N. Mycotoxins in dairy products: a review. **International Dairy Journal**, v. 62, p. 63-75, 2016.

BOTHAST, R. J., et al. Fate of fumonisin B1 in naturally contaminated corn during ethanol fermentation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, p. 233- 236, 1992.

BORTOLI, D. A. S.; et al. Leveduras e produção de cervejas: revisão. **Bioenergia em Revista - Diálogos**, Piracicaba, v. 1, n. 1, p. 45-58, 2013.

BOLGER, M. et al. Fumonisins. Safety evaluation of certain mycotoxin in food. International Programme on Chemical Safety World Health Organization. Geneva. **FAO Food and Nutrition Paper**, v. 74, *WHO - Food Additives Series*, 47, p. 103-279, 2001.

CAWOOD, M.E. et al. Isolation of the fumonisin mycotoxins: a quantitative approach. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 39, p. 1958-1962, 1991.

CARRASCO, R. Y., et al. Occurrence of *Fusarium* mycotoxins and their dietary intake through beer consumption by the European population. **Food Chemistry**, v.178, n.1881, 149-155, 2015.

CAMARGOS, S. M. et al. Avaliação de métodos para determinação de fumonisinas B₁ e B₂ em milho. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 58, n. 2, p. 71-79, 1999.

CERVBRASIL - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DA CERVEJA.
Anuário, 2016.

Disponível:[http://www.cervbrasil.org.br/arquivos/anuario2016/161130_CervBras il-Anuario2016_WEB.pdf](http://www.cervbrasil.org.br/arquivos/anuario2016/161130_CervBras%20il-Anuario2016_WEB.pdf). Acesso em: 19/08/2018

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

CERVIERI, J.O. et al. **O setor de bebidas no Brasil**. In: BNDES Setorial, pp. 93-130. BNDES: Rio de Janeiro, 2014.

CHIARADIA, M. C.; et al. O estado da arte da cromatografia associada à espectrometria de massas acoplada à espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos em alimentos. **Química Nova**, v. 31, n. 3, p. 623-636, 2008.

CHILAKA, C. A., et al. Occurrence of *Fusarium* mycotoxins in cereal crops and processed products (ogi) from Nigeria. **Toxins**, v. 8, n. 342, p. 1-18, 2016.

CHILAKA, C. A. et al. Quantification of *Fusarium* Mycotoxins in Nigerian Traditional Beers and Spices using a Multi-mycotoxin LC-MS/MS Method, **Food Control**, v. 87, p. 203-210, 2018.

CHARMLEY, L. L., et al. Factors responsible for economic losses due to *Fusarium* mycotoxin contamination of grain, foods and feedstuffs. in: *Mycotoxins in Grains*. Miller J.D. e Trenholm H. L. (eds). St. Paul, MN: Eagan Press. p.471, 1994.

CHU, F. S.; LI, G. Y. Simultaneous occurrence of fumonisin B1 and other mycotoxins in moldy corn collected from the People's Republic of China in regions with high incidences of esophageal cancer. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, n.3, p.847-852, 1994.

CHU, FS. Mycotoxins: food contamination, mechanism, carcinogenic potential and preventive measures. **Mutation Research**, v. 259, p. 291-306, 1991.

CIRLINI, M. et al. Hydrolysed fumonisin B1 and N-(deoxy-D-fructos-1-yl)-fumonisin B1: stability and catabolic fate under simulated human gastrointestinal conditions. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, p. 1-6, 2014.

CIGIC, I. K.; PROSEN, H. An Overview of Conventional and Emerging Analytical Methods for the Determination of Mycotoxins. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 10, p. 62-115, 2009.

COSTA, T. P., GERMANO, P. M. L., GERMANO, M. I. S. Segurança alimentar e a cerveja: o perigo das micotoxinas. **Higiene Alimentar**. v. 19, n. 137, p. 39-44, 2005

COIMBRA, et al. Cerveja e saúde. Disponível em:
http://www.ff.uc.pt/~mccast/nutricao/material/Cerveja_saúde.pdf. Acessado em: 19/08/2018.

CIRILLO, T. et al. Natural co-occurrence of deoxynivalenol and fumonisins B1 and B2 in Italian marketed foodstuffs. **Food Additives and Contaminants**, v. 20, n. 6, p. 566-571, 2003.

CREPPY, E. E., et al. Human ochratoxicosis in France. **Journal of Toxicology and Toxin Review**, v. 18, p. 277-293, 2004.

CRUZ, F. M. L. et al.. Mycotoxins in fruits and their processed products: Analysis, occurrence and health implications. **Journal of Advanced Research**, v. 1, p. 113-122, 2010.

CURI, et al. Produção de cerveja utilizando cevada e maltose de milho como adjunto de malte: análises físico-química, sensorial e isotópica. UNESP. V.11, p.279-287, 2008.

D'AVILA, R. F., et al. Adjuntos utilizados para produção de cerveja: características e aplicações. **Estudos Tecnológicos em Engenharia**, v. 8, n. 2, p. 60-68, 2012.

DALL'ASTA, C. et al. *In Vitro* Digestion Assay for Determination of Hidden Fumonisin in Maize. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 12042-12047, 2010.

DHELLOT, J.; KOBAWILA, S. C. Physico-chemical characterization of brew during the brewing corn malt in the production of maize beer in Congo. **Advanced Journal of Food Science and Technology**, v. 5, n. 6, p. 671-677, 2013.

DASKO, L. et al. Determination of ochratoxin A in beer. **Journal of Food Sciences**, v. 23, n. 2, p. 69-73, 2005.

DIDWANIA, N.; JOSHI, M. Mycotoxins: a critical review on occurrence and significance. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 5, n. 3, p. 1014-1019, 2013.

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

DOKO, M. B., et al. Incidence and levels of fumonisin contamination in maize genotypes grown in Europe and Africa. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 43, p. 429-434, 1995.

DRUSCH, S.; RAGAB, W. Mycotoxins in Fruits, Fruit Juices, and Dried Fruits. **Journal of Food Protection**, v. 66, n.8, p. 1514-1527, 2003.

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

EZEKIEL, C. N., et al. Fate of mycotoxins in two popular traditional cereal-based beverages (*kunu-zaki* and *pito*) from rural Nigeria. **LWT - Food Science and Technology**, v.60, n.1, p. 137–141, 2014.

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.

FIRRAO, G. et al. Prediction of milled maize fumonisin contamination by multispectral image analysis. **Journal of Cereal Science**, v. 52, n. 2, p. 327-330, 2010.

FRENICH, A. G., et al. High-throughput determination of pesticide residues in food commodities by use of ultra-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 390, n. 3, p. 947-959, 2008.

FREIRE, F. et al. Micotoxinas: importância na alimentação e na saúde humana e animal. **Embrapa Agroindústria Tropical**, n. 110, 48 p., 2007.

GARCÍA-CAMPAÑA, A. et al. Chemometric protocol to validate an analytical method in the presence of corrigible constant and proportional systematic errors. **Journal of AOAC International**, v. 80, p. 657-664, 1997.

GLATTHAR, J. et al. Unmalted triticale cultivars as brewing adjuncts: effects of enzyme activities and composition on beer wort quality. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 85, n. 4, p.647-654, 2005.

GELDERBLOM, W. C. A. et al. Novel Mycotoxins with Cancer-Promoting Activity Produced by *Fusarium moniliforme*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 54, n. 7, 1988.

GELDERBLOM, W.C.A. et al. Toxicity of culture material of *Fusarium verticillioides* strain MRC 826 to nonhuman primates. **Environmental Health Perspectives**, v.109 n. 2, p. 267-276, 2001.

GONZÁLEZ, R. R. et al. Application of Conventional Solid-Phase Extraction for Multimycotoxin Analysis in Beers by Ultrahigh-Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 9385-9392, 2009.

GRENIER, B., et al. The low intestinal and hepatic toxicity of hydrolyzed fumonisin B1 correlates with its inability to alter the metabolism of sphingolipids. **Biochemical Pharmacology**, v. 83, n. 10, p. 1465-1473, 2012.

HARRISON L.R. et al. Pulmonary edema and hydrothorax in swine produced by fumonisin B1, a toxic metabolite of *Fusarium verticilloides*. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 2, p. 217-221, 1990.

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

HOPMANS, E.C. E MURPHY, P.A. Detection of fumonisins B1, B2 , and B3 and hydrolysed fumonisin B1 in corn-containing foods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 41, p. 1655-1658, 1993.

HOWARD P.C. et al. Compensatory regeneration as a mechanism for renal tubule carcinogenesis of fumonisin B₁ in the F344/N/Nctr BR rat. **Environmental Health Perspectives**, v. 109, p.309-314, 2001.

HUMPF, H. U.; VOSS, K. A. Effects of thermal food processing on the chemical structure and toxicity of fumonisin mycotoxins. **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 48, p. 255-269, 2004.

HUSSEIN, H. S.; BRASSEL, J. M. Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. **Toxicology, Limerick**, v.167, p.101-134, 2001.

IARC. Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans - Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene. Lyon, França: World Health Organization, v. 82, 2002. Disponível em: <<http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol82/mono82.pdf>>.

IAMANAKA, B. T. et al. Micotoxinas em alimentos. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agrônômica**, vol. 7, p.138-161, 2010.

INMETRO. Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia. **Orientações sobre Validação de Métodos Analíticos**: DOQ-CGCRE-08, Rev. 06, 2017.

JARTÍN, G. J. M., et al. A QuEChERS based extraction procedure coupled to UPLC-MS/MS detection for mycotoxins analysis in beer. **Food Chemistry**, n. 275, p. 703-710, 2019.

JUAN, C. et al. Multi-mycotoxin determination in barley and derived products from Tunisia and estimation of their dietary intake. **Food and Chemical Toxicology**, v. 103, p.148-156, 2017.

KOPPEN, R. et al. Applied Microbiology and Biotechnology Determination of mycotoxins in foods: current state of analytical methods and limitations. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 86, n. 6, p. 1595-612, 2010.

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. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 3, p. 516-521, 2006.

KAWASHIMA, L. M. et al. Fumonisin B 1 and ochratoxin A in beers made in Brazil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, p. 317-323, 2007.

KHAN, R. B. et al. Fumonisin B₁ induces oxidative stress in oesophageal (SNO) cancer cells. **Toxicon**, v. 141, p. 104-111, 2018.

LACINA, O. et al. 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**, v. 1262, p. 8-18, 2012.

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

LANCOVA, K. et al. Transfer of *Fusarium* mycotoxins and ‘masked’deoxynivalenol (deoxynivalenol-3-glucoside) from field barley through malt to beer. **Food Additives and Contaminants**, v. 25, n. 6, p. 732-744, 2008.

LINO, C. M. et al. Metodologias Analíticas para Determinação das Fumonisinias em Milho e Alimentos à Base de Milho. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 293-299, 2006.

MABLY, M. et al. Survey of aflatoxins in beer sold in Canada. **Food Additives and Contaminants**, v. 22, n.12, p. 1252-1257, 2005.

MATOS, N. A. V. **Fumonisinias livres e mascaradas em milho e produtos à base de milho no Brasil**. 2018. 132 f. Dissertação (Mestrado em Vigilância Sanitária) – Programa de Pós graduação em vigilância sanitária, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2018.

MALACHOVÁ, A. et al. Analytical Strategies for the Determination of Deoxynivalenol and its Modified Forms in Beer: A Mini Review. **Kvasny Prumysl**, v. 61, p. 46-50, 2015.

MAGAN, N.; OLSEN, M. Mycotoxins in food. Detection and control. Woodhead publishing limited, p. 471, 2004.

MACHINSKI, J. R., M.; SOARES, V. L. M. Fumonisinias B₁ and B₂ in Brazilian corn-based food products. **Food Additives and Contaminants**, v. 17, n. 10, p. 875-879, 2000.

MARCUSSO, E. F.; MÜLLER, C. V. Anuário da cerveja no Brasil: O ministério da agricultura informando e esclarecendo. Ministério da Agricultura, 2017. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/inspecao/produtos-vegetal/pasta-publicacoes-DIPOV/AnuariodacervejanoBrasil09.01.pdf>. Acesso em: 16/12/2018.

MARCUSSO, E. F.; MÜLLER, C. V. A cerveja no Brasil: O ministério da agricultura informando e esclarecendo. Ministério da Agricultura, 2017. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/inspecao/produtos-vegetal/pastapublicacoes-DIPOV/a-cerveja-no-brasil-28-08.pdf>. Acesso em: 16/12/2018.

MARQUES, O. J. et al. Incidência fúngica e contaminações por micotoxinas em grãos de híbridos comerciais de milho Fungos e aflatoxinas em milho armazenado em função da umidade de colheita. **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 31, n.4, p. 667-675, 2009.

MARIN, S. et al. Mycotoxins: Occurrence, toxicology, and exposure assessment. **Food and Chemical Toxicology**, v. 60, p. 218-237, 2013.

MATUMBA, L. et al. A limited survey of mycotoxins in traditional maize based opaque beers in Malawi. **Food Control**, v.36, n.1, p. 253–256, 2014.

MEGA, J. F. et al. A produção da cerveja no brasil. **Revista CITINO**. v.1, n. 1, p. 34-42, 2011.

MOL, H. G. et al. Toward a Generic Extraction Method for Simultaneous Determination of Pesticides, Mycotoxins, Plant Toxins, and Veterinary Drugs in Feed and Food Matrixes. **Analytical Chemistry**, v. 80, p. 9450-9459, 2008.

MORADO, R. Larousse da cerveja. São Paulo. Larousse do Brasil, 2009.

MINAMI, L. et al. Fumonisin: efeitos toxicológicos, mecanismos de ação e biomarcadores para avaliação da exposição. **Revista Semina: Ciências Agrárias** v. 25, p. 207-224, 2004.

MUNKVOLD, G. P., DESJARDINS. A. E. Fumonisin in maize: can we reduce their occurrence? **Plant Disease**, v. 81, p. 556–565, 1997.

MURPHY, P. A., et al. Food mycotoxins: an update. **Journal of Food Science**, v. 71, p. 51-65, 2006.

MBUGUA, S. K., GATHUMBI, J. K. The contamination of Kenyan lager beers with *Fusarium* mycotoxins. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 110, p. 227–229, 2004.

NATHANAIL, A. V. et al. Simultaneous determination of major type A and B trichothecenes, zearalenone and certain modified metabolites in Finnish cereal grains with a novel liquid chromatography-tandem mass spectrometric method. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 407, p. 4745-4755, 2015.

NKWE, D. O. et al. Fungi, aflatoxins, fumonisin B1 and zearalenone contaminating sorghum-based traditional malt, wort and beer in Botswana. **Mycopathologia**, v.160, p. 177-186, 2005.

NORRED, W. P. Fumonisin mycotoxins produced by *Fusarium moniliforme*. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, v. 38, p. 309-328, 1993.

ODHAV. B.; NAICKER, V. Mycotoxins in South African traditionally brewed beers. **Food Additives and Contaminants**, v.19, n. 1, p. 55-61, 2002.

PARK, J. W. et al. Analysis of heat-processed corn foods for fumonisins and bound fumonisins. **Food Additives and Contaminants**, v. 21, n. 12, p. 1168-78, 2004.

PASCARI, X., et al. Survey of mycotoxins in beer and exposure assessment through the consumption of commercially available beer in Lleida, Spain, **LWT - Food Science and Technology**, v. 92, p. 87-89, 2018.

PETERS, J. et al. Mycotoxin profiling of 1000 beer samples with a special focus on craft beer. **PLoS ONE**, v. 12, n.10, p. 1-27, 2017.

PIACENTINI, K. C., et al. Quality and occurrence of deoxynivalenol and fumonisins in craft beer. **Food Control**, v.50, p. 925-929, 2015.

PIACENTINI, K. C. et al. Mycotoxin analysis of industrial beers from Brazil: The influence of fumonisin B1 and deoxynivalenol in beer quality. **Food Chemistry**, v. 218, p. 64-69, 2017.

PIETRI, A.; ZANETTI, M.; BERTUZZI, T. Distribution of aflatoxins and fumonisins in dry-milled maize fractions. **Food Additives and Contaminants**, v. 26, n. 3, p. 372-380, 2009.

PIETRI, A.; et al. (2010). Transfer of aflatoxin B1 and fumonisin B1 from naturally contaminated raw materials to beer during an industrial brewing process. **Food Additives and Contaminants**, v. 27, n. 10, p. 1431-1439, 2010.

PLATTNER, R. D. HPLC/MS analysis of *Fusarium* mycotoxins, fumonisins and deoxynivalenol. **Journal of Natural Toxins**, v. 7, p. 365-370, 1999.

POLING, S. M.; PLATTNER, R. D. Rapid purification of fumonisins and their hydrolysis products with solid-phase extraction columns. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, p. 2344-2349, 1999.

PRESTES, O. D. et al. QuEChERS: possibilidades e tendências no preparo de amostra para determinação multirresíduo de pesticidas em alimentos. **Scientia Chromatographica**, v. 3, n.1, p. 51-64, 2011.

QUEIROZ, V.A.V. et al. Occurrence of fumonisins and zearalenone in maize stored in family farm in Minas Gerais, Brazil. **Food Control**, v. 28, n. 1, p. 83-86, 2012.

REBELLO, F. F. P. Produção de cerveja. *Revista Agrogeoambiental*, Inconfidentes, n. 3, p.145-155, 2009.

REJCZAK, T.; TUZIMSKI, T. A review of recent developments and trends in the QuEChERS sample preparation approach. **Open Chemistry**, v. 13: 980-1010, 2015.

RHEEDER, J. P., et al. *Fusarium moniliforme* and fumonisins in corn in relation to human oesophageal cancer in Transkei. **Phytopathology**, v. 82, p. 353-357, 1992.

RIBANI, M. et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

ROSA, N. A.; AFONSO, J. C. A Química da Cerveja. **Química Nova na Escola**, vol. 37, nº 2, p. 98-105, 2015.

ROGER, D. D. Deoxynivanol (DON) and fumonisins B1 (FB1) in artisanal sorghum opaque beer brewed in north Cameroon. **African Journal of Microbiology Research**, vol. 5, n. 12, p. 1565-1567, 2011.

RUBERT, J. et al. Mass spectrometry strategies for mycotoxins analysis in European beers. **Food Control**, v. 30, p.122-128, 2013.

RUBERT, J. et al. Evaluation of mycotoxins and their metabolites in human breast milk using liquid chromatography coupled to high resolution mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, n. 820, p. 39-46, 2014.

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 Wood head Publishing Limited, Cambridge, UK, 2011.

SANCHO, C. G. et al. Occurrence of fumonisins in Catalonia (Spain) and an exposure assessment of specific population groups. **Food Additives and Contaminants**, v. 29, n. 5, p. 799-808, 2012.

SARTORI, A. V. **Desenvolvimento, validação e aplicação de métodos analíticos para determinação de micotoxinas em leite, fórmulas infantis, alimentação infantil a base de cereais e amendoim por cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial**. 2015. 176 f. Tese (Doutorado em Vigilância Sanitária) - Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2015.

SLEIMAN, M., et al. Determinação do percentual de malte e adjuntos em cervejas comerciais brasileiras através de análise isotópica. **Ciência e Agrotecnologia**, n. 34, p. 163-172, 2010.

SCOTT, P. M.; LAWRENCE, G. A. Analysis of beer for fumonisins. **Journal of Food Protection**, v. 58, p. 1379 - 1382, 1995.

SCOTT, P. M. Recent research on fumonisins: a review. **Food Additives and Contaminants** , v.29, p. 242-248, 2012.

SCOTT, P. M., et al. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay for analysis of beer for fumonisins. **Food Additives and Contaminants**, v.14, n.5, 445-450, 1997.

SHEPHARD, G. S., et al. Fumonisin mycotoxins in traditional Xhosa maize beer in South Africa. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.53, n.24, p. 9634-9637, 2005.

SILVA, D. P. **Produção e Avaliação Sensorial de Cerveja Obtida a Partir de Mostos com Elevadas Concentrações de Açúcares**. 2005. 177f. Tese (doutorado) - Faculdade de Engenharia Química de Lorena. Departamento de Biotecnologia, São Paulo, 2005.

SONGSERMSAKUL, P.; FAZELI, R. E. A review of recent trends in applications of liquid chromatography-mass spectrometry for determination of mycotoxins. **Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies**, v. 31, n. 1, p. 1641-1686, 2008.

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

SOUZA, S. V. C. **Procedimento para validação intralaboratorial de métodos de ensaio delineamento e aplicabilidade em análises de alimentos**. 2007. 297 f. Tese (Doutorado em Ciência de alimentos) – Faculdade de farmácia da UFMG, Universidade federal de Minas Gerais, Minas Gerais, 2007.

SYDENHAM, E. W.; et al. Liquid chromatographic determination of fumonisin B1, B2 and B3 in corn: AOAC-IUPAC collaborative study. **Journal AOAC International**, v. 79, p. 688-696, 1996.

SULYOK, M. et al. A liquid chromatography/tandem mass spectrometric multi-mycotoxin method for the quantification of 87 analytes and its application to semi-quantitative screening of moldy food samples. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 389, p. 1505-1523, 2007.

STACK, M. E. Analysis of fumonisin B1 and its hydrolysis product in tortillas. **Journal AOAC International**, v. 81, n. 4, p. 737-740, 1998.

STOCKMANN, J. H.; SAVOLAINEN, K. A review of the toxic effects and mechanisms of action of fumonisin B1. **Human and Experimental Toxicology**, v. 27, n. 11, p. 799-809, 2008.

STEFANELLO, J. et al. Incidência de fungos em grãos de milho em função de diferentes épocas de aplicação foliar de fungicida. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 42, n. 4, p. 476-48, 2012.

TAMURA, M. et al. 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 Analytical Sciences**, v. 27, p.629-635, 2011.

TAMURA, M. et al. High Throughput Quantitative Analysis of Multi-mycotoxin in Beer-based Drinks using UHPLCMS/MS. **Shimadzu corporation**, First edition, September, 2012.

TORRES, M. R., et al. Occurrence of fumonisins in Spanish beers analyzed by an enzyme-linked immunosorbent assay method. **International Journal of Food Microbiology**, v. 39, p. 139-143, 1998.

TOLOSA, J. et al. Multi-Mycotoxin Analysis in Durum Wheat Pasta by Liquid Chromatography Coupled to Quadrupole Orbitrap Mass Spectrometry. **Toxins**, v. 9, n. 59, 2017.

TURNER, N. W., et al. Analytical methods for determination of mycotoxins: A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 632, n. 2, p. 168-18, 2009.

VARGA, E., et al. Stable isotope dilution assay for the accurate determination of mycotoxins in maize by UHPLCMS/MS. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, n. 402, p. 2675-2686, 2012.

VIDAL, J. C., et al. Electrochemical affinity biosensors for detection of mycotoxins: A review. **Biosensors and Bioelectronics**, v 49, P.146-158, 2013.

VENTURINI, F., WALDEMAR, G. (2000) < <http://www.ebah.com.br/processo-defabricacao-de-cerveja-doc-a44521.html>> Acesso em: 10/07/2018.

VOSS, K. A., et al. Reproductive and sphingolipid metabolic effects of fumonisin B1 and its alkaline hydrolysis product in LM/Bc mice: Hydrolyzed fumonisin B1 did not cause neural tube defects. **Toxicological Sciences**, v. 112, n. 2, p. 459-467, 2009.

VOSS, K. A., et al. Fumonisin. Reproductive and Developmental Toxicology, **IX. Phytotoxins, mycotoxins and zootoxins**. v.47, p. 925-943, 2017.

VOSS, K. A., RILEY, R. T. Fumonisin Toxicity and Mechanism of Action: Overview and Current Perspectives. **Food Safety**. v. 1, n. 1, p. 49-69, 2013.

WESTHUIZEN, V. D. L., et al. Fumonisin contamination and *Fusarium* incidence in corn from Santa Catarina, Brazil. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.51, n.18, 5574-5578, 2003.

WARTH, B. et al. Deoxynivalenol-sulfates: identification and quantification of novel conjugated (masked) mycotoxins in wheat. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 407, p. 1033-1039, 2015.

ZACHARIASOVA, M., et al. Analysis of multiple mycotoxins in beer employing (ultra)-high-resolution mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v.24, n.22, p.3357-3367, 2010.

ZAIN, M.E. Impact of mycotoxins on humans and animals. **Journal of Saudi Chemical Society**, v.15, p.129-144, 2011.