

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

Felipe Stanislau Candido

**DETERMINAÇÃO DE MICOTOXINAS EM CASTANHA DE CAJU (ANACARDIUM
OCCIDENTALE) UTILIZANDO UM MÉTODO QUECHERS MODIFICADO E CLUE-
EM/EM**

Rio de Janeiro

2021

Felipe Stanislau Candido

DETERMINAÇÃO DE MICOTOXINAS EM CASTANHA DE CAJU (*Anacardium occidentale*) UTILIZANDO UM MÉTODO QUECHERS MODIFICADO E CLUE-EM/EM

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 a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientador: Armi Wanderley da Nóbrega

Co-orientador: André Victor Sartori

Rio de Janeiro

2021

Catálogo na Fonte

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
Biblioteca

Candido, Felipe Stanislau

Determinação de micotoxinas em castanha de Caju (*Anacardium occidentale*) utilizando um método QUECHERS modificado e CLUE-EM/EM . / Felipe Stanislau Candido. - Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2021.

95 f. : il. ; fig. ; tab.

Dissertação (Mestrado Acadêmico em Vigilância Sanitária) - Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2021.

Orientador: Armi Wanderley da Nóbrega.

Co-orientador: André Victor Sartori.

1. Anacardium. 2. QuEChERS. 3. Espectrometria de Massas Sequencial. I. Título.

Determination of mycotoxins in cashew nut (*Anacardium occidentale*) using a modified QUECHERS and CLUE-EM/EM METHOD.

"O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001."

Felipe Stanislau Candido

DETERMINAÇÃO DE MICOTOXINAS EM CASTANHA DE CAJU (*Anacardium occidentale*) UTILIZANDO UM MÉTODO QUECHERS MODIFICADO E CLUE-EM/EM

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 a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Aprovado em 28/06/2021.

BANCA EXAMINADORA

Dr. Carlos Adam Conte Junior – Presidente.
Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Dr. Márcia Nogueira da Silva de la Cruz.
Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Dr. Marco Antonio Mota da Silva.
Fundação Centro Universitário da Zona Oeste do Rio de Janeiro.

ORIENTADORES

Dr. Armi Wanderley da Nóbrega – Orientador.
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde.

Dr. André Victor Sartori – Co-Orientador.
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde.

RESUMO

A castanha de caju é uma das principais castanhas produzidas e consumidas no Brasil, tendo ainda relevância para exportação. A presença de micotoxinas do grupo das aflatoxinas em nozes foi monitorada e regulamentada em vários países, porém, estudos e métodos analíticos para a determinação simultânea de diferentes classes de micotoxinas em castanha de caju ainda são incipientes. Este estudo teve como objetivo contribuir com as ações de vigilância sanitária, desenvolvendo e validando um método analítico para determinação de diferentes classes de micotoxinas por cromatografia líquida ultraeficiente acoplada à espectrometria de massa sequencial (CLUE-EM / EM) e avaliando a contaminação de amostras de castanha de caju. A preparação da amostra foi realizada usando a primeira etapa do método modificado Quick Easy Cheap Effective Rugged e Safe (QuEChERS), sem usar etapas futuras de limpeza do extrato. A partição tripla (água / acetonitrila / hexano) foi empregada na etapa de *salting out*. A seletividade do método proposto também foi testada para outras castanhas e considerada adequada. Recuperações consideradas satisfatórias (70,18 a 110,29%) e desvios-padrão relativos abaixo de 8,9% foram obtidos para todas as substâncias, exceto para Fumonisina B1 e B2. Limites de quantificação para as micotoxinas alvo entre 0,0040 µg / kg (STG) e 0,59 µg / kg (0,59) foram observados. Ainda assim, a sensibilidade do método analítico para aflatoxinas é adequada para atender às regulamentações mais restritivas. O método validado foi aplicado para determinar as micotoxinas alvo em amostras de castanha de caju adquiridas na região metropolitana do Rio de Janeiro, RJ. Aflatoxinas M1, G2, G1, B2, B1, Ocratoxina A e Esterigmatocistina foram detectados respectivamente em 26,6%, 10%, 16,6%, 30%, 30%, 30% e 50% das amostras. Os valores de concentração encontrados para aflatoxinas foram inferiores aos níveis máximos permitidos de acordo com a legislação brasileira preconizada pela Anvisa.

Palavras-chave: Castanha de Caju, QuEChERS, Espectrometria de Massas Sequencial

ABSTRACT

Cashew nuts are one of the main nuts produced and consumed in Brazil and are still relevant for export. The presence of mycotoxins from the aflatoxin group in nuts has been monitored and regulated in several countries. Studies and analytical methods for the simultaneous determination of different classes of mycotoxins in cashew nuts are still incipient. This study aimed to contribute to health surveillance actions, by developing and validating an analytical method for determining different classes of mycotoxins by ultra-efficient liquid chromatography coupled with sequential mass spectrometry (CLUE-EM / EM) and by evaluating contamination of cashew nut samples. The sample preparation was performed using the first step of modified Quick Easy Cheap Effective Rugged and Safe (QuEChERS) method, without using future extract cleaning steps. Triple partitioning (water / acetonitrile / hexane) was employed in the salting out step. The selectivity of the proposed method was also tested for other nuts and considered adequate. Recoveries considered satisfactory (70,18 to 110,29%) and relative standard deviations below 8,9% were obtained for all substances, except for Fumonisin B1 and B2. Quantification limits for the target mycotoxins between 0,0040 µg / kg (Sterigmatocystin) and 0,59 µg / kg (Alternariol) were observed. Still, the sensitivity of the analytical method for aflatoxins is adequate to meet the most restrictive regulations. The validated method was applied to determine the target mycotoxins in samples of cashew nuts acquired in the metropolitan region of Rio de Janeiro, RJ. Aflatoxins M1, G2, G1, B2, B1, Ochratoxin A and Sterigmatocystin were respectively detected in 26,6%, 10%, 16,6%, 30%, 30%, 30% and 50% of the samples. The concentration values found for aflatoxins were lower than maximum permitted levels according to Brazilian legislation preconized by ANVISA.

Keywords: Cashew Nut, QuEChERS, Tandem Mass Spectrometry

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Principais aflatoxinas tóxicas	18
Figura 2 - Estrutura das Fumonisinias B1 e B2	19
Figura 3 - Figura 3 - Estrutura química da Ocratoxina A	21
Figura 4 - Estrutura da ZEA	22
Figura 5 - Estrutura do DON.....	23
Figura 6 - STG e seus derivados Orto-Metil-Esterigmatocistina (OMSTG) e Aflatoxinas G1 e B1	24
Figura 7 - Estruturas do Alternariol e do Alternariol Monometil Éter	25
Figura 8 - Cromatograma de íons totais exemplificando o efeito de distorção cromatográfica secundária para os analitos DON, 3-ADON, 15-ADON, OTA E ZEA	54
Figura 9 - Cromatogramas de íons totais exemplificando a distorção cromatográfica ocorrida no analito OTA após 10 injeções utilizando método de clean-up PSA+C18	54
Figura 10 - Cromatogramas totais de íons para OTA demonstrando a eficiência do gradiente de eluição na seletividade (amostra de castanha de caju fortificada com 10 ng/g de OTA), a) gradiente de eluição de 15 min terminando em 80% do solvente orgânico da fase móvel b) gradiente de eluição de 15 min terminando em 100% do solvente orgânico da fase móvel	55
Figura 11 - Cromatogramas de uma amostra de castanha de caju naturalmente contaminada por AFG2 (0,673 ng/g), AFM1 (0,565 ng/g), AFG1 (1,429 ng/g), AFB2 (2,018 ng/g), AFB1 (4,926 ng/g), OTA (4,815 ng/g) e STG (0,353 ng/g)	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação IARC para as principais micotoxinas	16
Tabela 2 - LMT para micotoxinas em nozes estabelecido pela RDC 487/2021	28
Tabela 3 - LMT para micotoxinas em nozes estabelecido pela agência EFSA	29
Tabela 4 - LMT para micotoxinas em nozes estabelecido pelo Codex	29
Tabela 5 - Dados de ocorrência das principais micotoxinas nas diferentes matrizes de nozes	31
Tabela 6 - Condições analíticas do sistema MS/MS	44
Tabela 7 - Procedimentos de extração avaliados	45
Tabela 8 - Resultados dos cálculos de REC (%), RSD (%) e Efeito Matriz (%) do método de escolha (Método 14)	57
Tabela 9 - Valores de concentração encontrados no estudo de estabilidade (ng/g)	59
Tabela 10 - Resultados de %REC (%RSD) obtidos do procedimento de exatidão (recuperação) e de precisão intra-dia	61
Tabela 11 - Resultados encontrados no estudo de precisão intermediária	62
Tabela 12 - Resultados obtidos nos estudos de efeito de matriz	63
Tabela 13 - Resultados dos Limites de Detecção e Quantificação para a matriz castanha de caju	65
Tabela 14 - Resultado das amostras comerciais de castanha de caju onde foram obtidos pelo menos 1 micotoxina	66
Tabela 15 - Ingestão Diária Provável Média (APDI) e Ingestão Diária Provável Máxima (MPDI) de micotoxinas na castanha de caju	72
Tabela 16 - Ingestão Diária Máxima Provisória Tolerável (PMTDI, %)	72

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1 - Cálculo do parâmetro de recuperação	47
Equação 2 - Cálculo do desvio padrão relativo	47
Equação 3 - Equação de obtenção do efeito matriz relativo (%)	47
Equação 4 - Cálculo da média relativa percentual (%)	48
Equação 5 - Cálculo da Recuperação (REC%)	50
Equação 6 - Cálculo do RSD% do estudo de precisão.....	50
Equação 7 - Cálculo do Efeito matriz.....	51
Equação 8 - Cálculo da Ingestão Diária Provável Média (ADPI).....	52
Equação 9 - Cálculo da Ingestão Diária Provável Máxima.....	52

LISTA DE SIGLAS

AF - Aflatoxinas

AFB1 – Aflatoxina B1

AFB2 – Aflatoxina B2

AFG1 – Aflatoxina G1

AFG2 – Aflatoxina G2

AFM1 – Aflatoxina M1

AFT – Aflatoxinas Totais

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

CCD – Cromatografia em Camada Delgada

CG – Cromatografia com Fase Gasosa

CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

CLUE – Cromatografia de Ultra Eficiência

DNA - Ácido Desoxiribonucléico

DON - Deoxinivalenol

EFSA - Autoridade Europeia para a Segurança Alimentar

ELISA - Ensaio de Imunoabsorção Enzimática

FB1 – Fumonisina B1

FB2 – Fumonisina B2

FDA – Food and Drugs Administration

FIESP – Federação das Indústrias de São Paulo

FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz

IARC - Agência Internacional de Pesquisa em Câncer

INCQS - Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia

LACENS - Laboratórios Centrais de Saúde Pública

LMT – Limite Máximo Tolerado

LOD – Limite de Detecção

LOQ – Limite de Quantificação

M/Z – Relação Massa/Carga

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

ML – *Maximum Level*

MRC – Material de Referência Certificado

MS/MS – Espectrometria de Massas Sequencial

OTA – Ocratoxina A

pH – Potencial *Hidrogeniônico*

PNCRC - Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes

PROMAC - Programa de Monitoramento de Aditivos e Contaminantes

Psi - *Pound Force Per Square Inch*

Q1 – Primeiro Quadrupolo

Q2 – Segundo Quadrupolo

Q3 – Terceiro Quadrupolo

QQQ – Triplo Quadrupolo

QUECHERS - *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*

RDC - Resolução da Diretoria Colegiada

SISLAB - Sistema Nacional de Laboratórios de Saúde Pública

SNVS – Sistema Nacional de Vigilância Sanitária

SUS – Sistema Único de Saúde

WHO - *World Health Organization*

ZEA - Zearalenona

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1 Vigilância sanitária brasileira de alimentos	15
2.2 Micotoxinas: aspectos gerais e toxicológicos	16
2.2.1 Aflatoxinas: b1, b2, g1, g2 e m1	17
2.2.2 Fumonisinias b1 e b2 e fumonisinias hidrolisadas b1 e b2 Erro! Indicador não definido. 19	
2.2.3 Ocratoxina a	20
2.2.4 Zearalenona	21
2.2.5 Tricotecenos: desoxinivalenol, desoxinivalenol 3 e 15 – acetil e desoxinivalenol – 3 – glicosídeo	22
2.2.6 Esterigmatocistina	23
2.2.7 Toxinas de <i>alternária</i> : alternariol e alternariol – monometil – éter	24
2.2.8 Multi-micotoxinas.....	25
2.3 Aspectos gerais de nozes e castanha de caju (<i>ANACARDIUM OCCIDENTALE</i>)	25
2.4 Regulamentação de micotoxinas em nozes	26
2.5 Ocorrência de micotoxinas em nozes	30
2.6 Cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada á espectrometria de massas sequencial (UPLC-MS/MS)	35
2.7 Método quechers de tratamento de amostra para determinação de resíduos de micotoxinas	36
2.8 Validação de métodos analíticos	37
2.9 Exposição à substâncias potencialmente tóxicas	39
3 OBJETIVOS	40
3.1 Objetivo geral	40
3.2 Objetivos específicos.....	40
4 METODOLOGIA	41
4.1 Reagentes e solventes.....	42
4.2 Padrões analíticos.....	42
4.3 Preparo das soluções padrão	42
4.4 Equipamentos e acessórios	42

4.5 Condições instrumentais	43
4.5.1 Condições cromatográficas	43
4.5.2 Condições espectrométricas	43
4.6 Avaliação de métodos de tratamento de amostra	45
4.6.1 Seleção das condições a serem estudadas	45
4.6.2 Obtenção da amostra referência e da amostra branca	46
4.6.3 Obtenção da amostra fortificada no início do procedimento.....	46
4.7 Método de tratamento das amostras	48
4.8 Amostras de castanha de caju	49
4.9 Validação do método analítico	49
4.9.1 Seletividade	49
4.9.2 Exatidão e Precisão.....	49
4.9.3 Efeito Matriz	50
4.9.4 Linearidade.....	51
4.9.5 Limites de Detecção (LOD) e Quantificação (LOQ)	52
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES	53
5.1 Otimização das condições instrumentais	53
5.2 Otimização do método de pré-tratamento das amostras	55
5.3 Avaliação dos métodos de tratamento das amostras	56
5.4 Avaliação da estabilidade das micotoxinas no extrato final	58
5.5 Validação do método analítico	60
5.5.1 Seletividade	60
5.5.2 Exatidão e Precisão.....	60
5.5.3 Efeito Matriz	62
5.5.4 Linearidade.....	64
5.5.5 Limites de Detecção (LOD) e de Quantificação (LOQ).....	64
5.6 Controle interno de qualidade	65
5.7 Análise das amostras	66
5.8 Avaliação da exposição e do risco	70
6 CONCLUSÕES	73
REFERÊNCIAS	74
APÊNDICE A	84
APÊNDICE B	87
APÊNDICE C	88

APÊNDICE D	89
APÊNDICE E	90
APÊNDICE F	91
APÊNDICE G	93
APÊNDICE H.....	94
APÊNDICE I	95

1 INTRODUÇÃO

Devido aos benefícios à saúde humana, o consumo de nozes vem se tornando cada vez mais significativo na dieta. Apesar dos benefícios nutricionais as nozes são propícias a presença de diversos contaminantes, incluindo as micotoxinas (Chemical contaminants and residues in food, 2017).

As micotoxinas são um grupo de substâncias de origem fúngica, produzidas geralmente por fungos dos gêneros *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium* (MURPHY et al., 2006) e com efeitos tóxicos para humanos e animais. As micotoxinas com maior ocorrência em alimentos e toxicologicamente significantes são as aflatoxinas B1 (AFB1), B2 (AFB2), G1 (AFG1), G2 (AFG2) e M1 (AFM1), as fumonisinas B1 (FB1) e B2 (FB2), a ocratoxina A (OTA), a zearalenona (ZEA) e o desonivalenol (DON) (WHO, 2018). Sua ocorrência se dá naturalmente no solo, no ar e nos alimentos, desde a produção até seu armazenamento. Diversos alimentos como as nozes, tanto *in natura* quanto seus derivados processados, podem estar contaminados por micotoxinas, estando presentes desde o campo até o produto final processado, pois há evidências que elas são resistentes inclusive ao processamento na indústria (HYMERY et al., 2014), causando a depreciação do produto (HERZOG-SOARES; FREIRE, 2004).

A segurança alimentar a nível global está regularmente comprometida devido a presença das micotoxinas nos alimentos. Estas atingem a agricultura mundial, sendo considerados relativamente onipresentes na dieta humana (D'MELLO, 2003; DE RUYCK et al., 2015). Portanto, diversas agências e/ou organizações fixam limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas que podem estar presentes nos alimentos, em especial aquelas que são mais prejudiciais à saúde humana como as Aflatoxinas. Porém, sabe-se que a ocorrência de uma única micotoxina pode não ocorrer de forma isolada. O que se tem é a co-ocorrência de uma ou mais micotoxinas, que podem representar uma ameaça alimentar a quem consome.

Devido aos riscos apresentados, é de suma importância o monitoramento das nozes não apenas devido seu consumo apresentar certa tendência de popularização, mas também pela produção brasileira sinalizar tendência de crescimento, podendo expor a população à efeitos agudos e crônicos causados pela ingestão de micotoxinas. Diversos estudos têm demonstrado a co-ocorrência de micotoxinas em alimentos, em diversos tipos de nozes em diversas partes do

mundo, na contramão das legislações mundiais que contemplam apenas as Aflatoxinas. Neste sentido, faz-se necessário o desenvolvimento de métodos analíticos sensíveis, precisos e robustos a fim de se monitorar a co-ocorrência das micotoxinas mais relevantes nessas diversas matrizes de nozes.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Vigilância sanitária brasileira de alimentos

No Brasil, a prática regulatória da segurança de alimentos está inserida nas ações de vigilância sanitária, onde primeiramente se deu a partir da lei 8.080, de 19 de setembro de 1990 que regulamenta o Sistema Único de Saúde (SUS), e que define estas ações como:

[...] um conjunto de ações capaz de eliminar, diminuir ou prevenir riscos à saúde e de intervir nos problemas sanitários decorrentes do meio ambiente, da produção e circulação de bens e da prestação de serviços de interesse da saúde (BRASIL, 1990).

Com a criação da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) através da lei nº 9.782, de 26 de janeiro de 1999, esta tornou-se a agência reguladora brasileira e um dos entes federais do Sistema Nacional de Vigilância Sanitária (SNVS), vinculados ao Ministério da Saúde. Delegou-se a ela a atuação no controle sanitário da produção e da comercialização de produtos e serviços submetidos à vigilância sanitária (COSTA; ROZENFELD, 2000), onde incluem-se os alimentos e seus contaminantes (FIGUEIREDO; RECINE; MONTEIRO, 2017).

O controle sanitário de alimentos é dependente das unidades integrantes da Rede Nacional de Laboratórios de Vigilância Sanitária que faz parte do Sistema Nacional de Laboratórios de Saúde Pública (SISLAB), onde realizam-se análises laboratoriais relacionadas às funções do SNVS. Este elemento é composto por uma cadeia de laboratórios onde o componente federal é composto pelo Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS), entidade da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), e aos laboratórios de saúde pública municipais e estaduais (LACENS) (BRASIL, 2004; 2007). A importância do componente laboratorial no controle sanitário de contaminantes em alimentos se dá majoritariamente na vigilância pós-mercado dos produtos comercializados, através de ações de inspeção e fiscalização de produtos. Para subsidiar essas ações, os laboratórios devem contar com uma estrutura adequada para a análise química do produto de forma a averiguar a qualidade de produto que são de interesse em saúde pública. Para tal, são necessários principalmente instrumentos analíticos adequados

aos fins que se destinam e métodos analíticos acreditados para garantir confiabilidade as análises realizadas (MARINS; TANCREDI; GEMAL, 2014).

2.2 Micotoxinas: aspectos gerais e toxicológicos

Uma das formas de se referenciar o risco que uma determinada micotoxina oferece a saúde dos seres humanos é através da classificação feita pela Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (*International Agency Research on Cancer – IARC*) que leva em consideração o potencial efeito carcinogênico de uma substância, as separando em uma escala de periculosidade. Sabe-se, através de estudos epidemiológicos, que algumas micotoxinas são capazes de causar neoplasia malignas através da incidência de mutações no DNA, principalmente do fígado. Carcinógenos do grupo 1 são os potencialmente nocivos e os do grupo 3 são os menos nocivos (Tabela 1) (IARC, 2002). Apesar do efeito carcinogênico ser o mais notório, a exposição às micotoxinas também pode causar outros efeitos tóxicos como citotóxico, neurotóxico, nefrotóxico, estrogênico e imunossupressor (ABRUNHOSA et al., 2016) e seus efeitos de variação aguda a crônica (BRERA et al., 2008).

Casos de surto de micotoxicose são bastante associados à países pobres onde alimentos básicos como amendoim, milho e nozes estão constantemente expostos a altos níveis de micotoxinas. Nos casos onde as medidas de controle de micotoxinas foram adotadas, este fez-se sobre a necessidade de que se atenda às necessidades das regulamentações de exportação e não com a visão de proteção da saúde pública. Como consequência, a população vulnerável produz e consome alimentos locais altamente contaminados, ocasionando em surtos (WILD; GONG, 2010).

Tabela 1 - Classificação IARC para as principais micotoxinas

Classificação	Efeito	Micotoxina
Grupo 1	Carcinogênico em humanos	Aflatoxinas B1, B2, G1, G2
Grupo 2B	Possivelmente carcinogênico em humanos	Fumonisin B1, B2 Ocratoxina A
Grupo 3	Não carcinogênico em humanos	Tricotecenos

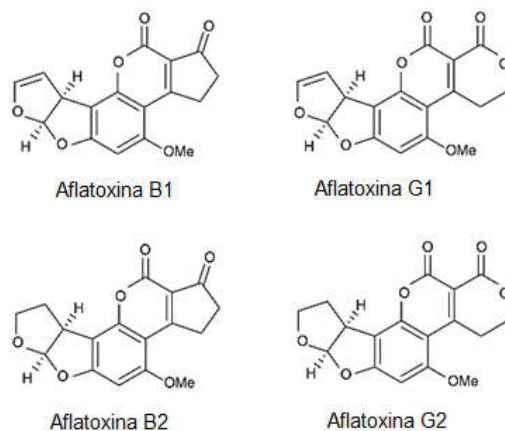
Fonte: Adaptado de IARC, 2002.

2.2.1 Aflatoxinas: B1, B2, G1, G2 e M1

As aflatoxinas (AFs) são um importante grupo de micotoxinas produzidas principalmente por *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* e *Aspergillus nomius*. As AFB1, AFB2, AFG1 e AFG2 têm sido consideradas as substâncias proeminentes desta classe (Figura 1) (IQBAL; ASI; ARIÑO, 2017). A exposição às AFs pode causar efeitos tóxicos agudos e crônicos em humanos bem como em animais (SAHOO et al., 2001). O fígado é o principal órgão afetado, porém altos níveis de AFs também são encontrados em outros órgãos importantes como cérebro, rim e coração (WILD; MONTESANO, 2009). A AFB1 tem destaque como um carcinógeno humano, sendo classificada pela IARC no Grupo 1 (IARC, 2002). As AFB2, AFG1 e AFG2, assim como a AFB1, podem apresentar efeitos tóxicos para a região cutânea, respiratória e mucosa, desencadeando processos inflamatórios (ROMANI, 2004).

Estruturalmente, as AFs são derivadas policetídicos difuranocumarínicos onde para os tipos AFBs um grupamento bifurano está ligado a um lado do núcleo cumarínico e um anel pentanona está ligado ao outro lado, enquanto em AFGs há a substituição da pentanona por um anel lactônico (Figura 1). Elas são solúveis numa série de solventes orgânicos polares como metanol, etanol e acetona, mas em contrapartida são insolúveis em solventes apolares. Sua via biossintética nos fungos envolve 18 etapas enzimáticas onde o fungo *A. flavus* produz AFB1 e AFB2 e o *A. parasiticus* produz tanto AFB1 e AFB2 quanto AFG1 e AFG2. Em ordem de toxicidade, elas se apresentam da seguinte forma: AFB1 > AFG1 > AFB2 > AFG2. Tratando-se de nozes, a Castanha do Brasil e o Pistache são exemplos dos alimentos altamente suscetíveis a contaminação por ATs (CABALLERO, 2003; KUMAR et al., 2017).

Figura 1 – Principais aflatoxinas tóxicas



Fonte: Adaptado de SCHRENK, 2012.

Segundo RICHARD (2008), a descoberta das Aflatoxinas se deu na Inglaterra em 1960 após o surto de uma doença desconhecida até então denominada Turkey “X” disease que acometeu perus após o consumo de farinha de amendoim importada do Brasil. Um dos primeiros grandes casos de surto de aflatoxicose em humanos ocorreu na Índia, levando a morte de 106 pessoas após estimativas apontarem a ingestão estimada entre 2 e 6 mg diárias de aflatoxina (KRISHNAMACHARI et al., 1975). Somente no Kenya, desde 1981 já houveram 3 surtos de aflatoxicose sendo a última ocorrida em 2004 onde ocorreu a morte de 125 pessoas, representando 39% dos contaminados (PROBST; NJAPAU; COTTY, 2007). BATTILANI e colaboradores (2016) estimam que devido às mudanças climáticas, ocorra um aumento da ocorrência de AFB1 em milho nos próximos anos o que acarretaria um problema de segurança de alimentar na Europa. Recentemente, no ano de 2016 houve um caso de aflatoxicose na Tanzânia, resultando em 68 casos com 20 mortos. O surto foi atribuído ao consumo de milho cultivado em casa. As amostras analisadas apresentaram nível de contaminação para Aflatoxinas nas faixas de 10 - 51,10 µg/kg e 2,4 - 285 µg/kg nas respectivas casas onde as amostras foram coletadas (KAMALA et al., 2018).

A Aflatoxina M1 (AFM1) é o metabólito hidroxilado proveniente da AFB1, onde aproximadamente 0,3 e 6,2% de AFB1 pode ser metabolizado em AFM1 (IQBAL et

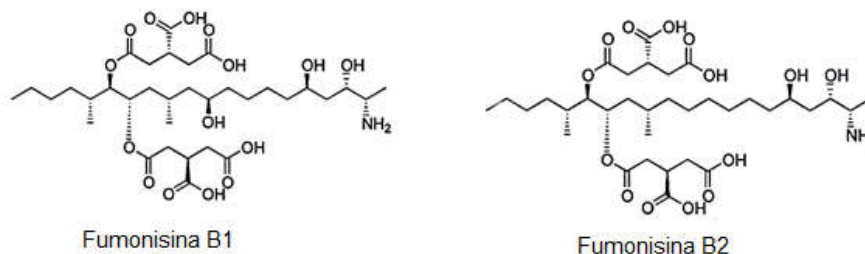
al., 2015). Na literatura existem inúmeros trabalhos de ocorrência de AFM1 em leite e produtos lácteos, porém estudos de ocorrência desta micotoxina em produtos vegetais são bem escassos. Apesar da principal via de formação da AFM1 ser através do metabolismo de mamíferos, esta também pode ser produzida em pequenas quantidades por alguns tipos de fungos (BRÄSE et al., 2009).

2.2.2 Fumonisinhas B1 e B2 e Fumonisinhas Hidrolisadas B1 e B2

As fumonisinhas são micotoxinas produzidas por fungos da espécie *Fusarium*, tais como *Fusarium verticillioides* e *proliferatum*, e são classificadas no Grupo 2B segundo a classificação IARC (2002). Elas são possivelmente carcinogênicas, onde alguns compostos são conhecidos, mas as FB1 e FB2 são os mais abundantes e a FB1 a mais predominante (RHEEDER; MARASAS; VISMER, 2002). O mecanismo de toxicidade da fumonisinha B1 se dá através da semelhança estrutural com esfingolipídios celulares, o que acarreta distúrbios no metabolismo desses lipídios. Também há evidências que ela seja nefrotóxica, neurotóxica e hepatotóxica (SCOTT, 2012).

A FB1 é o diéster de propano-1,2,3-ácido tricarbóxico e 2S-amino-12S,16R-dimetilo-3S,5R,10R,14S,15R-pentahidroieicoisano enquanto a FB2 é o análogo dióxi C-10 onde os grupos hidroxilas em C-14 e 15 estão esterificados pelo grupamento carboxílico terminal do ácido tricarbóxico (Ácido propano-1,2,3-tricarboxílico) (Figura 2). Elas são bastante polares e, portanto, insolúveis em solventes orgânicos apolares, tendo boa solubilidade em água e em soluções de acetonitrila ou metanol em água (POZZI et al., 2002; WAŚKIEWICZ; BESZTERDA; GOLIŃSKI, 2012).

Figura 2 - Estrutura molecular das Fumonisinhas B1 e B2



Fonte: Adaptado de CHEMICAL..., 2012.

De acordo com ADAM e colaboradores (2017), há evidências da relação entre a ocorrência de Fumonisinias e a incidência de câncer esofágico em populações da África e da China. SUN e colaboradores (2007) estudaram a relação da exposição de Fumonisina B1 e a incidência de câncer esofágico e hepático em humanos, analisando amostras de milho coletadas nas cidades de Huaian e Fusui, cidades com alta incidência para ambos os tipos de câncer em toda a China. Segundo a conclusão dos autores, a alta concentração de FB1 nas amostras analisadas, em consonância com outros estudos, indicam uma provável relação entre a alta ocorrência de FB1 e a carcinogênese hepática e esofágica.

Dentro do universo das fumonisinias ainda há a possibilidade da ocorrência de formas ocultas das mesmas. As “*Hidden Fumonisinins*” são aquelas das quais decorrem geralmente a partir do processamento dos alimentos, mas também podem estar presentes em pequenas quantidades em alimentos não processados o que por consequência pode acarretar a subestimação do conteúdo total de fumonisinias no alimento (OLIVEIRA et al., 2015). As formas hidrolisadas das FB1 e FB2 (HFB1 e HFB2) são obtidas a partir da hidrólise alcalina das FB1 e FB2 ligadas covalentemente ou não aos alimentos (GALAVARNA et al., 2009). Estas também podem exercer efeitos tóxicos através de sua liberação na digestão do trato gastrointestinal e por isso, sua relevância toxicológica deve ser considerada em monitoramentos e estudos de exposição (FALAVIGNA et al., 2012; SHIER, 2000).

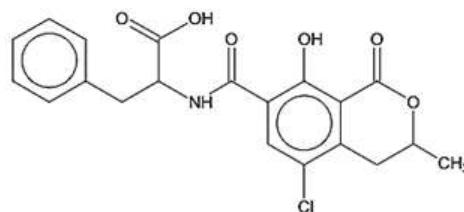
2.2.3 Ocratoxina A

Fungos do tipo *Aspergillus* e *Penicillium* estão envolvidos na produção de OTA. Existe evidência de que a OTA provoca nefrotoxicidade e câncer renal em animais, porém estudos em humanos são poucos conclusivos (BUI-KLIMKE; WU, 2014) e ela é possivelmente carcinogênica para humanos, sendo classificada no grupo 2B (IARC, 2002). Também de acordo com BUI-KLIMKE & WU (2015) a OTA causa imunotoxicidade, aumento da peroxidação lipídica e inibição da respiração mitocondrial.

Quimicamente, a OTA (figura 3) é um pentacetídeo derivado da família das diidroocumarinas acoplada a β -fenilalanina. Esta é um ácido fraco e solúvel em solventes polares, como os álcoois, em pH ácido e neutro e insolúvel em solventes

apolares. A OTA também é solúvel em soluções alcalinas, demonstrando melhores recuperações nessas soluções (EL KHOURY; ATOUI, 2010).

Figura 3 - Estrutura química da Ocratoxina A



Ocratoxina A

Fonte: Adaptado de DUARTE; PENA; LINO, 2010.

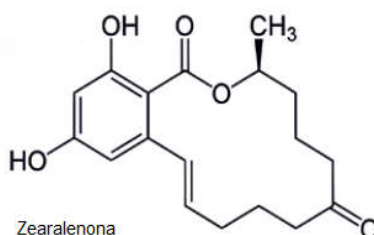
A OTA está relacionada à patogênese de tumores renais e nefropatias. Há ocorrência dessas doenças em regiões como nos Balcãs, Tunísia e países do Norte da África. No ano de 1972 demonstrou-se a correlação da OTA sendo o agente etiológico do caso da nefropatia endêmica nos Balcãs. Com o passar dos anos, diversos estudos reforçaram sua nefrotoxicidade até que em 2015, por sua vez sua exposição tornou-se um problema de saúde devido a nefropatias endêmicas e a causa de tumores do trato urinário em humanos (MALIR et al., 2016).

2.2.4 Zearalenona

A Zearalenona de acordo com ZHANG e colaboradores (2018) é a micotoxina com atividade estrogênica mais prevalente e capaz de afetar a reprodução animal, bem como ser um problema de saúde pública devida a sua toxicidade. Devido a sua similaridade estrutural com o estrogênio, a ZEA pode causar desregulação funcional em tecidos e órgãos com receptores para estrogênio, como glândulas mamárias, útero, ossos e cérebro (HUEZA et al., 2014). Estruturalmente, a ZEA é um macrolídeo micoestrógeno lactônico de quatorze integrantes condensado com 1,3-dihidroxibenzeno, estrutura associada a atividade estrogênica (Figura 4) (National Center for Biotechnology Information, 20-?). Ela é insolúvel em água, contudo é solúvel em soluções alcalinas. Esta também apresenta solubilidade alguns solventes

orgânicos como etanol (EFSA PANEL ON CONTAMINANTS IN THE FOOD CHAIN (CONTAM) et al., 2017a).

Figura 4 - Estrutura molecular da ZEA



Fonte: Adaptado de CHEMICAL ..., 2012.

Segundo MARAGOS (2010), as estimativas de ingestão de ZEA sugerem que as populações foram expostas em níveis seguros nos países onde estudos de exposição foram efetuados. Porém, o autor chama atenção para a relativa vulnerabilidade de populações que consomem, em grandes quantidades, alimentos propensos a contaminação assim como em determinadas áreas onde o alto nível de contaminação é inabitual. O autor ainda destaca que devido a muitas estimativas da exposição a ZEA não serem relatadas, a significância dela na saúde humana ainda não é plenamente determinada.

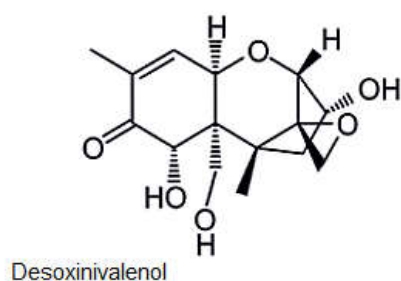
2.2.5 Tricotecenos: Desoxivalenol, Desoxivalenol 3 e 15 – Acetil e Desoxivalenol – 3 – Glicosídeo

O DON é uma micotoxina da classe dos tricotecenos. Esta é um grupo de micotoxinas, que assim como as fumonisinas, são produzidos por fungos do gênero *Fusarium*. Segundo a classificação IARC, o DON é classificado no Grupo 3, ou seja, não carcinogênico para humanos (IARC, 1993). Apesar de não carcinogênico, o consumo acidental de DON tem suas consequências como vômitos, diarreias, dores de cabeça e tontura (SOBROVA et al., 2010).

Quimicamente, o DON é um sesquiterpenóide tetracíclico bastante polar devido à presença de 3 hidroxilas as quais são atribuídos os seus efeitos tóxicos,

com destaque para a intensa emese (Figura 5) (CALORI-DOMINGUES et al., 2007; SOBROVA et al., 2010). Segundo RAGHAVENDER & REDDY (2009), o primeiro caso de surto causado por tricotecenos ocorreu na Índia em 1987. Neste caso, BHAT e colaboradores (1989) relatam que a causa do surto ocorreu devido ao consumo de pão produzido a partir de trigo mofado, o que acarretou distúrbios gastrointestinais na população. Nas amostras de trigo analisadas, haviam diversas quantidades de tricotecenos, inclusive DON.

Figura 5 - Estrutura do DON



Fonte: Adaptado de CHEMICAL..., 2012.

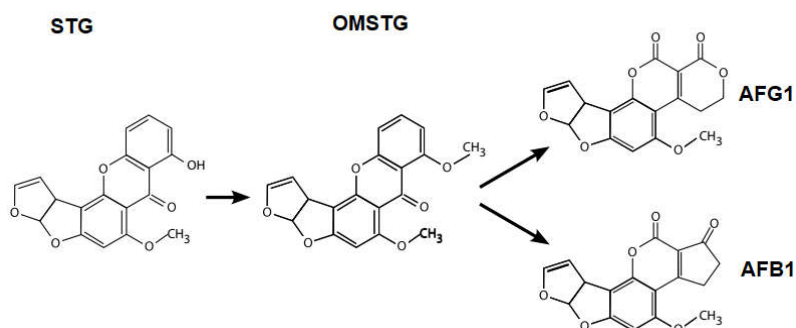
Tratando-se de metabólitos ditos “mascarados” que ultimamente têm atraído a atenção dos pesquisadores, existem dois metabólitos de origem fúngica derivados do DON que podem ocorrer na forma 3 e 15 acetilados: 3-Acetil-Desoxivalenol (3ADON) e 15-Acetil-Desoxivalenol (15ADON), e um metabólito de origem vegetal, o DON – 3 – Glicosídeo (DON-3G) (ALIZADEH et al., 2016). Tais metabólitos podem causar toxicidade aguda e crônica caso ingeridos, tendo como principais sintomas além de vômitos, a nefrotoxicidade, hepatotoxicidade e neurotoxicidade no caso das formas acetiladas (YAN et al., 2020). Já para DON-3G, espera-se os mesmos efeitos tóxicos possíveis para DON uma vez que este é clivado para a sua forma aglicona no intestino (EFSA PANEL ON CONTAMINANTS IN THE FOOD CHAIN (CONTAM) et al., 2017b).

2.2.6 Esterigmatocistina

A Esterigmatocistina (STG) é uma micotoxina produzida por fungos do gênero *Aspergillus*, sendo a conhecida como precursora da AFB1 e AFG1, possuindo diversas semelhanças estruturais e tóxicas com ela (Figura 6) (VERŠILOVSKIS; DE

SAEGER, 2010; DÍAZ NIETO et al., 2018). Sua classificação IARC está em 2B como possivelmente carcinogênico para humanos apesar de haver evidências desta apresentar suposto potencial efeito mutagênico, carcinogênico e teratogênico, além de ser um possível fator de risco para câncer esofágico (WANG et al., 2013).

Figura 6 - STG e seus derivados Orto-Metil-Esterigmatocistina (OMSTG) e Aflatoxinas G1 e B1



Fonte: Adaptado de CARBONE et al., 2007.

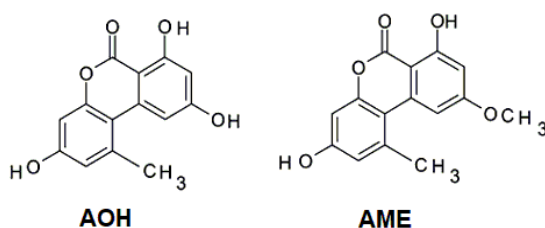
A ocorrência de STG não é tão habitual como as AFTs possivelmente devido aos métodos de detecção não serem tão sensíveis para detectá-la, sendo encontrada em alimentos estocados como café, queijo e trigo (BIANCHINI; BULLERMAN, 2014; CHREVATIDIS, 2003). Sua significância no meio científico também é baixa pois não há evidências que sua ingestão cause algum efeito tóxico devido sua baixa solubilidade em água (PITT, 2014). Segundo JOINT FAO/WHO EXPERT COMMITTEE ON FOOD ADDITIVES; FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS; WORLD HEALTH ORGANIZATION (2017) a escassez de dados sobre STG aumentou a incerteza sobre a avaliação da exposição desta micotoxina, assim como reconheceu a limitação dos dados obtidos para estimativa de exposição dietética e toxicológicos, tendo um dos limitantes o alto limite de detecção desta micotoxina em dados de ocorrência.

2.2.7 Toxinas de *Alternária*: Alternariol e Alternariol – Monometil – Éter

As toxinas de *Alternária* são um grupo de micotoxinas produzidas por fungos do gênero *Alternaria spp.* capazes de crescer inclusive sob baixa temperatura o que impacta a qualidade dos produtos desde a colheita, passando pelo transporte e

estocagem inclusive sob refrigeração. O Alternariol (AOH) e o Alternariol Monometil Éter (AME) (Figura 7) são dois dos principais metabólitos secundários produzidos por esse gênero de fungos (OSTRY, 2008). Dentre os alimentos que estes podem ser encontrados estão os tomates, trigo e pecans (SCHROEDER; COLE, 1977; LÓPEZ et al., 2016; XU et al., 2016). Estudos *in vitro* sugerem que estas toxinas exercem efeitos tóxicos como mutagenicidade e genotoxicidade e fetotoxicidade e teratogenicidade em roedores.

Figura 7 - Estruturas do Alternariol e do Alternariol Monometil Éter



Fonte: Adaptado de MOTTA; SOARES, 2000.

2.2.8 Multi-Micotoxinas

A co-ocorrência de micotoxinas é algo comum devido ao fato de que um tipo de fungo pode produzir diversas micotoxinas, ou uma micotoxina específica poder ser sintetizada por diversas espécies de fungos. Isso indica que a exposição está mais associada a uma mistura de micotoxinas do que uma substância isolada (HEUSSNER; BINGLE, 2015). A co-ocorrência pode resultar em efeito aditivo (ação independente), aditivo de dose (forma de ação semelhante) e desvio de aditivo (ação sinérgica ou antagônica (RUIZ et al., 2011).

ALASSANE-KPEMBI e colaboradores (2017) analisaram mais 80 publicações referentes aos efeitos combinados das micotoxinas e a conclusão alcançada pelo estudo foi que na maioria dos trabalhos analisados, o sinergismo entre as micotoxinas produzidas pela espécie *Fusarium* (Fumonisinhas, ZEA, Tricotecenos) foi enfatizada. SOBRAL e colaboradores (2018) investigou os efeitos sinérgicos das micotoxinas AFB₁, DON, FB₁, e OTA *in vitro* em células epiteliais intestinais e hepáticas. Segundo o estudo, foi observado que apesar do DON não apresentar efeito carcinogênico para humanos, este apresenta forte efeito sinérgico em combinação as outras micotoxinas analisadas o que indica perigo a saúde.

2.3 Aspectos gerais de nozes e castanha de caju (*Anacardium occidentale*)

Nozes são frutos secos, geralmente com uma semente, na qual sua parede torna-se dura quando se alcança a maturidade de seu desenvolvimento. Tratando-se de sementes oleosas, diferentemente do amendoim (*Arachis hypogaea*), as nozes não são classificadas como legumes apesar destes possuírem composição nutricional semelhante (ALASALVAR; SHAHIDI, 2009). Segundo o Codex os tipos de nozes englobam diversas classes de interesse comercial, tais como amêndoas (*Prunus spp.*), castanha (*Castanea spp.*), castanha-do-Brasil (*Bertholletia Excelsa*), castanha de caju (*Anacardium occidentale*), avelã (*Corylus avellana*), macadâmia (*Macadamia spp.*), noz pecã (*Carya illinoensis*), pinhas (*Pinus spp.*), pistache (*Pistacia vera*) e noz (*Juglans regia*) (CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION, 2005).

O seu consumo promove alguns benefícios à saúde tais como ao menor risco de incidência de doenças crônicas como doenças cardiovasculares, alguns tipos de câncer e diabetes, e também como fonte de vitaminas (ácido fólico, niacina, vitaminas E e B₆), minerais (magnésio, selênio e potássio), e substâncias bioativas (carotenoides e fitoesteróis) (DAVIS, 2013). Na busca de uma dieta saudável, o consumo de nozes promove a redução de peso corporal e gordura da região abdominal, apesar de serem ricas em gorduras em sua composição (AUSTRALIA, 2019).

Os benefícios das nozes justificam o seu consumo tornando-se motivo para sua demanda. No Brasil, o mercado de nozes é especialmente promissor. Segundo estimativas do site da Fiesp em 10 anos é estimado que o Brasil gere uma receita de US\$ 1 bilhão com a exportação de nozes nativas e exóticas e que o consumo interno aumente em até 8% (LOPES, 2017).

A castanha de caju é uma noz de grande importância internamente para a região nordeste, responsável pela geração de empregos e desenvolvimento desta região. O Brasil representa 2,4% da produção mundial de castanha de caju nos deixando na 6ª posição entre os maiores produtores dessa commodity (BRAINER; VIDAL, 2020). Dados de 2019 apontaram que o consumo de castanha de caju mundial foi da ordem de 830,47 mil toneladas, mantendo uma tendência positiva de crescimento desde 2012 (Shahbandeh, 2021).

2.4 Regulamentação de micotoxinas em nozes

As regulamentações para o controle dos níveis de micotoxinas em alimentos têm sido embasadas em dados de ocorrência, de consumo e no conhecimento sobre o efeito tóxico das mesmas. Dessa maneira, as aflatoxinas (AFB1), (AFB2), (AFG1), (AFG2), as fumonisinas (FB1) e (FB2), a (OTA), a (ZEA) e o (DON) foram algumas das classificadas como mais significativas, tendo seus níveis de contaminação regulamentados em diversos países para diversas categorias de alimentos (FAO, 2004). O termo que exprime o limite de segurança é definido como pelo Codex como *Maximum level (ML)* ou Limite Máximo Tolerado (LMT) no Brasil. Ambos tratam da concentração máxima de micotoxinas permitida que pode estar presente numa comódite (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2021; CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION, 2015). Estima-se que aproximadamente 100 países tenham regulamentações que fixam LMTs para as principais micotoxinas que ocorrem nos alimentos. Internacionalmente, autoridades de saúde pública como a *US Food and Drug Administration (FDA)* e a *European Food Safety Authority (EFSA)* adotam regulamentações rigorosas para micotoxinas (ALSHANNAQ; YU, 2017). Dentre as aproximadamente 400 micotoxinas identificadas, as AFs são as mais importantes e onipresentes, sendo a AFB1 a mais tóxica (VAN DE PERRE et al., 2015). Tratando-se de nozes, as aflatoxinas são as principais e únicas micotoxinas regulamentadas para esta matriz e em diversas legislações os valores estão expressos apenas para Aflatoxinas Totais ($AFT_{\text{Totais}} = AFB1 + AFB2 + AFG1 + AFG2$) ou AFB1.

No Brasil, a resolução RDC 487/2021 da ANVISA fixa os limites máximos tolerados (LMT) para as principais micotoxinas em diversos alimentos como café, especiarias, cereais, amendoim, incluindo as nozes e castanhas. A tabela 2 aponta o LMT de AFT_{Totais} para os tipos de nozes regulados no Brasil, tendo seus valores variando de 10 a 20 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ dependendo da comódite (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2021). Essa resolução está adequada ao MERCOSUL, englobando outros países como a Argentina, o Paraguai e o Uruguai (FREIRE, F.C.O. et al., 2007). Além da ANVISA, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) também tem o seu próprio escopo de monitoramento para tipos de nozes através do Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes em Produtos de Origem Vegetal (PNCRC/Vegetal), instituído pela Instrução

Normativa SDA/MAPA nº 42, de 31 de dezembro de 2008 (BRASIL, 2009), fixando em 2017 LMTs de Aflatoxinas Totais para amêndoa, avelã, castanha de caju, castanha do Brasil e Pistache (BRASIL, 2017b).

Tabela 2 - LMT para micotoxinas em nozes estabelecido pela RDC 487/2021

Matriz	Orgão Regulador	Micotoxina	LMT (µg/Kg)
Castanhas: nozes, pistachios, avelãs e amêndoas			10
Castanha-do-Brasil com casca para consumo direto	ANVISA	AFT	20
Castanha-do-Brasil sem casca para consumo direto			10
Castanha-do-Brasil sem casca para processamento posterior			15
Amêndoa			
Avelã			
Castanha do Caju	MAPA	AFT	10
Castanha do Brasil			
Pistachio			

Legenda: AFT: Aflatoxinas Totais (B1+B2+G1+G2).

Fonte: AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2021; BRASIL, 2017b.

A União Europeia (EU) estabeleceu os níveis LMTs tanto para AFB1 individualmente quanto para AFTotais sendo categórica na divisão entre amêndoas/pistaches, avelãs/castanha do Brasil e nozes, destinadas ao

processamento ou direto para consumo humano. Seus limites para AFB1 variam de 2 a 12 µg/Kg e para AFTotais de 4 a 15 µg/Kg (Tabela 3) (EU, 2010).

Tabela 3 - LMT para micotoxinas em nozes estabelecido pela agência EFSA

Matriz	Micotoxina	LMT (µg/Kg)
Amêndoas e pistache para triagem ou processamento		12 / 15
Amêndoas e pistache destinadas ao consumo humano direto		8 / 10
Avelãs e castanhas do Brasil para triagem ou processamento		8 / 15
Avelãs e castanhas do Brasil destinadas ao consumo humano direto	AFB1 / AFT	5 / 10
Nozes, exceto as listadas para triagem e processamento		5 / 10
Nozes, com exceção das destinadas a consumo humano direto		2 / 4

Legenda: AFT: Aflatoxinas Totais (B1+B2+G1+G2).
Fonte: UNIÃO EUROPEIA, 2010.

O manual do Codex Alimentarius recomenda LMTs para Aflatoxinas totais (B1 + B2 + G1 + G2) em alguns tipos de nozes conforme evidência toxicológica das mesmas em provocar carcinogênese. Os valores de LMTs recomendados variam entre 10 e 15 µg/Kg dependendo da commodity e o processamento da mesma (Tabela 4) (CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION, 2015).

Tabela 4 - LMT para micotoxinas em nozes estabelecido pelo Codex

Matriz	Micotoxina	LMT (µg/Kg)
Amendoa (sem casca) – pronto para o consumo		10
Amendoa (sem casca) - processamento	AFT	15

Castanha do Brasil – pronto para o consumo	10
Castanha do Brasil - processamento	15
Avelã (sem casca) – pronto para o consumo	10
Avelã (sem casca) - processamento	15
Pistache (sem casca) – pronto para o consumo	10
Pistache (sem casca) - processamento	15

Legenda: AFT: Aflatoxinas Totais (B1+B2+G1+G2).
 Fonte: CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION, 2015.

2.5 Ocorrência de micotoxinas em nozes

A tabela 5 aponta dados de ocorrência das micotoxinas mais relevantes para a saúde humana em alguns tipos de nozes. A ocorrência de micotoxinas nesses alimentos está reportada em países da América do Norte, América do Sul, Europa, Ásia e Oriente Médio. A contaminação por aflatoxina ocorre mais frequentemente em climas tropicais ou subtropicais à medida que a ocorrência dessa micotoxina ocorre regularmente em espécies de nozes (Chemical contaminants and residues in food, 2017). Juntamente às Aflatoxinas, a OTA e o DON estão entre as micotoxinas mais disseminadas (SOUBRA et al., 2009), podendo ocorrer em diversos alimentos. Dados de ocorrência de Fumonisinias em outros alimentos que não milho e seus derivados são mais raros, pois, pouca importância foi dada até recentemente (BRAUN; WINK, 2018).

Tabela 5 - Dados de ocorrência das principais micotoxinas nas diferentes matrizes de nozes (continua)

Matriz	País	Micotoxina (s) Encontrada (s)	N.º amostras analisadas (Positivas)	Conc. média (µg/kg)	Conc. máxima (µg/kg)	Referência
Amendoa sem casca	Paquistão	AFT	10 (3)	2,13	3,4	LUTTFULLAH; HUSSAIN, 2011
Amendoa	Portugal	AFB2 / FB1 / DON	14 (6 / 2 / 5)	0,32 / 2,49 / 2,85	1,92 / 5,99 / 7,93	CUNHA; SÁ; FERNANDES, 2018
Amendoa	República do Chipre	AFB1 / AFB2 / AFG1 / AFG2	50 (5)	32,9/ 6,0/ 23,6/ 2,2	144,2/ 10,3/ 78,2/ 5,1	CHRISTOFIDOU et al., 2015
Amêndoa	Estados Unidos	AFB1	9 (1)	0,3	0,3	LIAO et al., 2015
Avelã	Portugal	AFG2 / DON	7 (6 / 6)	2,6 / 56,01	3,78 / 71,89	CUNHA; SÁ; FERNANDES, 2018
Castanha de caju	Brasil	AFT	70 (2)	> 4	20	MILHOME et al., 2014
Castanha de caju	México	AFB1 / AFT	17 (3 / 16)	0,02 / 1,36	0,17 ± 0,30 / 6,89 ± 11,71	FRANCISCO ROJO, 2015
Castanha de Caju	Portugal	AFG2 / DON	3 (3 / 3)	3,0 / 135,8	3,99 / 336,5	CUNHA; SÁ; FERNANDES, 2018
Castanha do Brasil (com casca)	Brasil (São Paulo)	AFB1/ AFB2/ AFG1/AFG2	4	0,07/ <LOD/ 0,15/ 0,01	0,22/ 0,02/ 0,35/ 0,04	IAMANAKA et al., 2014

Tabela 5 - Dados de ocorrência das principais micotoxinas nas diferentes matrizes de nozes (continuação)

Matriz	País	Micotoxina (s) Encontrada (s)	N.º amostras analisadas (Positivas)	Conc. média (µg/kg)	Conc. máxima (µg/kg)	Referência
Castanha do Brasil (com casca)	Brasil (Manaus)	AFB1/ AFB2/ AFG1/AFG2	29	0,18/ <LOD/ 0,62/ 0,01	2,29/ 0,20/ 4,58/ 0,33	IAMANAKA et al., 2014
Castanha do Brasil (com casca)	Brasil (Belem)	AFB1/ AFB2/ AFG1/AFG2	11	2,72/ 0,42/ 2,03/ 0,31	24,83/ 3,56/ 17,93/ 1,89	IAMANAKA et al., 2014
Castanha do Brasil (sem casca)	Brasil (São Paulo)	AFB1/ AFB2/ AFG1/AFG2	17	0,13/ <LOD/ 0,11/ <LOD	0,40/ 0,04/ 0,33/ 0,04	IAMANAKA et al., 2014
Castanha do Brasil (sem casca)	Brasil (Manaus)	AFB1/ AFB2/ AFG1/AFG2	22	<LOD/ N.D/ <LOD/ N.D	0,03/ N.D/ 0,01/ N.D	IAMANAKA et al., 2014
Castanha do Brasil (sem casca)	Brasil (Belem)	AFB1/ AFB2/ AFG1/AFG2	12	11,03/ 0,16/ 2,54/ 0,16	111,52/ 1,04/ 26,27/0,73	IAMANAKA et al., 2014
Castanha do Brasil	Portugal	FB1	2 (1)	60,63	60,63	CUNHA; SÁ; FERNANDES, 2018
Castanha do Brasil	República de Chipre	AFB1	6 (1)	3,0	3,0	CHRISTOFIDOU et al., 2015
Noz	Iran	AFT	43 (39)	14,4 ± 8,4	38,1	OSTADRAHIMI et al., 2014
Noz	Malásia	AFB1 / AFB2	3 (1)	13,5 / 3,63	13,5 / 3,63	LEONG et al., 2010

Tabela 5 - Dados de ocorrência das principais micotoxinas nas diferentes matrizes de nozes (continuação)

Matriz	País	Micotoxina (s) Encontrada (s)	N.º amostras analisadas (Positivas)	Conc. média (µg/kg)	Conc. máxima (µg/kg)	Referência
Noz (processada)	Malásia	AFB1 / AFB2	20 (4)	N.D	453 / 61.7	LEONG et al., 2010
Noz	Marrocos	AFB1 / AFT	20 (6 /6)	360 ± 7.6/ 730 ± 9.5	2500/ 4320	JUAN et al., 2008
Noz	Mexico	AFB1 / AFT	17 (6 / 17)	0,05 / 2,10	0,23 ± 0.25 / 12,10 ± 10,36	FRANCISCO ROJO, 2015
Noz (com casca)	Paquistão	AFT	10 (4)	6,45	13,5	LUTTFULLAH; HUSSAIN, 2011
Noz (sem casca)	Paquistão	AFT	10 (7)	3,43	10,8	LUTTFULLAH; HUSSAIN, 2011
Noz	Portugal	AFB1 / OTA / FB1 / FB2	3 (1 / 1 / 2 / 1)	1,78/10,94/ 35,17/ 143,8	1,78/ 10,94/ 57,5 / 143,8	CUNHA; SÁ; FERNANDES, 2018
Noz Pecan	México	AFB1 / AFT	16 (2/ 16)	0,09 / 0,44	0,08 ± 0,07/ 1,30 ± 0,32	FRANCISCO ROJO, 2015
Noz Pecan	Portugal	OTA / FB1 / DON	2 (1/ 1/ 1)	7,85 / 5,59 / 73,66	7,85 / 5,59 / 73,66	CUNHA; SÁ; FERNANDES, 2018
Pinha (com casca)	Paquistão	AFT	10 (2)	3,25	3,9	LUTTFULLAH; HUSSAIN, 2011
Pistache	Coréia do Sul	AFB1	4 (1)	3,41 ± 0,17	3,41 ± 0,17	CHUN et al., 2007

Tabela 5 - Dados de ocorrência das principais micotoxinas nas diferentes matrizes de nozes (conclusão)

Matriz	País	Micotoxina (s) Encontrada (s)	N.º amostras analisadas (Positivas)	Conc. média (µg/kg)	Conc. Máxima (µg/kg)	Referência
Pistache	Estados Unidos	AFB1/ AFB2/ AFG1/ OTA	10 (2/ 1/ 1/ 3)	0,85/ 0,9/ 0,5/ N.D	1,2/ 0,9/ 0,5/ 2,3	LIAO et al., 2015
Pistache	Iran	AFT	43 (1)	0,48 ± 3,1	2,08	OSTADRAHIMI et al., 2014
Pistache (Salgado)	Iran	AFT	29 (16)	22,02 ± 20,2	52,3	OSTADRAHIMI et al., 2014
Pistache	Iran	AFB1/ AFB2/ AFG1/ AFG2	100(50 /12/ 52/11)	185,89/14,62/12,18/2,36	N.D	POUR et al., 2010
Pistache	Marrocos	AFB1/ AFT	20 (9/9)	158 ± 6,3/ 163 ± 5,4	1430/ 1450	JUAN et al., 2008
Pistache (com casca)	Paquistão	AFT	10 (5)	6,34	14	LUTTFULLAH; HUSSAIN, 2011
Pistache (sem casca)	Paquistão	AFT	10 (5)	6,34	14	LUTTFULLAH; HUSSAIN, 2011
Pistache	República de Chipre	AFB1/ AFB2 / AFG1/AFG2	105 (35)	8,2/ 1,3/ 2,0/ 1,6	123,3/ 15,6/ 2,0/ 1,6	CHRISTOFIDOU et al., 2015

Nota: AFT = Aflatoxinas Totais (AFB1 + AFB2 + AFG1 + AFG2); N.D = Não Determinado; LOD = Lim. de Detecção: AFB1, AFB2, AFG1 e AFG2 = 0,02, 0,01, 0,01 e 0,01 µg/ kg respectivamente.
Fonte: IAMANAKA et al., 2014.

2.6 Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência Acoplada à Espectrometria de Massas Sequencial (UPLC-MS/MS)

Na literatura, há disponíveis diversas técnicas analíticas para análise de micotoxinas como a Cromatografia em Camada Delgada (CCD), Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), Cromatografia em Fase Gasosa (CG), Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (CLUE), Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA) e métodos rápidos de *screening* por fita (ALSHANNAQ; YU, 2017). Porém, o rumo da área tende para a aplicação de métodos e tecnologias que sejam rápidos, fáceis, robustos e que permitam a detecção e quantificação de diversos analitos com alta sensibilidade em apenas uma análise (RAHMANI; JINAP; SOLEIMANY, 2009). As técnicas de CLAE acoplada a Espectrometria de Massas Sequencial (CLAE-MS/MS), CLUE-MS/MS e de CLUE acoplado a Espectrometria de Massas de Alta Resolução (CLUE-HRMS) atualmente são as mais utilizadas para análise de micotoxinas em alimentos devido a vantagens como a alta sensibilidade e seletividade (SARTORI et al., 2015).

A CLUE é uma técnica de separação recente e automatizada oriunda da CLAE devido a tendência da química analítica em exigir análises cada vez mais rápidas e sem sacrifício da resolução cromatográfica de separação. O modo como isso foi conduzido foi a partir da redução do tamanho da partícula da fase estacionária ($< 2 \mu\text{m}$) e da coluna cromatográfica, o que no método tradicional de CLAE não era possível devido à alta pressão resultante dentro do sistema. No sistema de CLUE houve o aperfeiçoamento do sistema de bombas, injetores e detectores do sistema de CLAE possibilitando o funcionamento acima de 15000 psi de pressão, e como consequência houve a possibilidade de trabalho com pressões muito mais altas, volumes internos reduzidos, colunas capazes de atuar em maiores pressões, reduzido volume morto e injetores definidos para volumes pequenos. A grande vantagem da técnica é a redução do tempo de análise, menor consumo de fase móvel, melhor desempenho cromatográfico, comparado a CLAE. O primeiro equipamento comercial preparado para utilizar a CLUE foi um sistema *Acquitytm Ultra Performance Liquid Chromatography System* (UPLCTM) da Waters com capacidade de operação com pressão acima de 15000 psi, no ano de 2004 (MALDANER; JARDIM, 2009).

A CLAE associada ao detector que fornece a melhor resposta para os analitos de interesse, fornecem métodos rápidos e sensíveis. No estudo de micotoxinas, a Espectrometria de Massas (EM) vem ganhando cada vez mais espaço. A EM consiste na produção e separação de íons que serão separados de acordo com a sua relação massa/carga (m/z). O acoplamento do sistema cromatográfico com o de espectrometria de massas é vantajoso comparado a outros detectores, o espectrômetro de massas possui alta sensibilidade e especificidade (NAUSHAD; KHAN, 2014). Na Espectrometria de Massas sequencial (MS/MS) os íons produzidos são fragmentados, gerando um espectro de massas de íons produto. Dentre os analisadores de massa disponíveis, o triplo quadruplo (QQQ) possui vantagens como sendo de fácil operação e robusto. Seu arranjo consiste em 3 séries de 4 hastes paralelas. Dentre as diversas formas de varredura disponíveis, a operação no modo *Multiple Reaction Monitoring* (MRM) permite selecionar o íon precursor no primeiro quadrupolo (Q1), fragmentar o íon selecionado no segundo quadrupolo (Q2) e em seguida, selecionar os íons fragmentos/produtos no terceiro quadrupolo (Q3), assegurando a especificidade da técnica (WATSON; SPARKMAN, 2007).

Apesar da CLUE-MS/MS ser uma técnica inovadora, capaz de realizar análises rápidas, com alta seletividade e sensibilidade, nesta ainda sim são observados efeito matriz, uma adversidade ligada à fonte de ionização. O efeito matriz é uma interferência causada quando constituintes da matriz co-extraídos afetam o processo de ionização, o que pode resultar na supressão ou ganho de sinal do analito. Este processo pode gerar resultados falso negativos ou positivos. Uma das formas de reduzir o efeito matriz é fazendo pré-tratamento da amostra, o que reduz a presença dos interferentes no extrato a ser analisado (GOSETTI et al., 2010).

2.7 Método QuEChERS de tratamento de amostra para determinação de resíduos de micotoxinas

O principal encargo na análise química de alimentos envolve a separação do agente tóxico, geralmente em níveis muito baixos, de outras substâncias na matriz, e por conseguinte, prosseguir a sua quantificação (SHIBAMOTO; BJELDANES, 1993). Desde sua inserção em 2002, o método QuEChERS vem ganhando destaque na análise multirresíduo. QuEChERS é o acrônimo de Quick, Easy, Cheap, Effective,

Rugged e Safe (Rápido, Fácil, Barato, Efetivo, Robusto e Seguro). Esta técnica consiste numa partição líquido-líquido utilizando acetonitrila como solvente de extração com a utilização de diferentes tipos de sais que contribuem para o efeito de *salting-out*. Como resultado, têm-se a extração do analito de interesse com boas recuperações. A popularidade deste método de extração se deve a aplicabilidade à diversos tipos de matrizes, não só as ricas em água como inicialmente propuseram, mas também as com altas concentrações de lipídios (REJCZAK; TUZIMSKI, 2015).

WANG e colaboradores (2018) utilizaram o método QuEChERS para análise de diversas micotoxinas incluindo AFB1, AFB2, AFG1, AFG2, ZEA e OTA em amostras de nozes (noz, castanha, avelã, amêndoa e pinha). A abordagem foi feita utilizando acetonitrila e ácido cítrico como solvente de extração, e os sais $MgSO_4$ e NaCl para o *salting-out*. Os autores também utilizaram uma etapa posterior de purificação utilizando resina de sílica modificada com C_{18} .

ARROYO-MANZANARES e colaboradores (2013) empregaram a abordagem QuEChERS para determinação e 14 micotoxinas, incluindo FB1, FB2, ZEA, DON, OTA, AFB1, AFB2, AFG1 e AFG2 aplicável à amêndoa, noz, pistache, pinha e avelã. O método utilizou H_2O e acetonitrila acidificada com 5% de ácido fórmico como solvente de extração, e os sais $MgSO_4$ e NaCl para realizar o *salting-out*. Uma etapa posterior de microextração líquido-líquido dispersiva foi necessária para extração das aflatoxinas. O método demonstrou bons valores de recuperação com maioria na ordem de 70 e 80 por cento, sendo o mínimo de 65,8 % para a AFB2 na matriz de Macadâmia e máxima de 98,6% para ZEA na matriz pistache.

CUNHA; SÁ & FERNANDES (2018) analisaram amostras de amêndoa, castanha de caju, avelã, noz, pecã e castanha do Brasil utilizando o procedimento QuEChERS. O método utilizou H_2O e acetonitrila acidificada com 5% de ácido fórmico, adicionando-se os sais $MgSO_4$ e NaCl. Um padrão interno de $^{13}C_{15}$ -DON foi utilizado para melhorar a acurácia do método. Uma etapa posterior de purificação utilizando C_{18} e Z-Sep+ (sorvente de sílica modificada com óxido de zircônio que remove gordura e corante). O método apresentou recuperação entre 70% e 120% dentre as micotoxinas avaliadas, com desvios inferiores à 13%.

2.8 Validação de métodos analíticos

O desenvolvimento de um método analítico tem como via de regra a garantia de bons resultados. Desta forma, o processo de validação da metodologia analítica empregada endossa a confiabilidade dos resultados obtidos. Isso envolve o cumprimento de diversas etapas necessárias para fornecer evidências que os resultados alcançados são confiáveis e reproduzíveis. Os procedimentos a serem executados estão preconizados como recomendações nos manuais de diversas agências reguladoras como a Comunidade Europeia, FDA, ANVISA e INMETRO. Tais procedimentos para métodos analíticos quantitativos aplicados a análise de resíduos são: seletividade, linearidade, precisão, exatidão/recuperação, limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) e efeito matriz (PASCHOAL et al., 2008).

A seletividade é o parâmetro analítico que dita a capacidade de um método de distinguir o analito alvo com exatidão, na presença de interferentes de comportamento semelhante presentes na amostra (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2017a). O efeito matriz é causado por interferentes da matriz que podem causar resultados incorretos de quantificação. O estudo do efeito matriz se relaciona com o de seletividade no sentido de que se observem possíveis interferências causadas por componentes da matriz, o que acarreta na variação da resposta instrumental (BRASIL, 2011).

A linearidade de um método se diz respeito a faixa onde as respostas analíticas obtidas são diretamente proporcionais a concentração do analito presente na amostra (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2017a). A precisão do método demonstra o grau de dispersão entre as medidas obtidas através de múltiplas amostragens e esta é avaliada em 3 ensaios: repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade. Porém, para processos de validação de em um único laboratório ditos como “*single-laboratory validation*”, apenas a repetibilidade e a precisão intermediária são aplicados. A repetibilidade exprime as variações averiguadas numa mesma corrida analítica, expressão pelo desvio padrão intra e a precisão intermediária compreende o grau de variações averiguadas em diferentes corridas, podendo ser feita em dias diferentes e por analistas diferentes e expressa através do desvio padrão intermediário (ERMER, 2005; PASCHOAL et al., 2008).

A exatidão expressa a proximidade do resultado obtido experimentalmente com o valor verdadeiro. Esta pode ser determinada através do uso de material de referência certificado (MRC), comparando-se métodos ou através do ensaio de recuperação. Quando não há a possibilidade de utilizar o MRC, o ensaio de

recuperação é realizado. Este é preparado através da fortificação de uma amostra isenta de analito em vários níveis de concentração, onde estima-se o percentual da relação entre a concentração média medida e a concentração fortificada a partir da curva analítica (BRITO et al., 2003).

Os limites de detecção e quantificação são, respectivamente, a menor quantidade do analito que está presente numa amostra que pode ser detectado e diferenciado do ruído e que pode ser quantificado com precisão e exatidão (INMETRO, 2011).

2.9 Exposição à substâncias potencialmente tóxicas

Uma das principais formas de exposição humana à micotoxinas é por meio do consumo direto de alimentos contaminados, seja de forma primária ou secundária (DÍAZ NIETO et al., 2018). No caso de alimentos vegetais como as nozes, a cadeia de produção que vai da colheita até a estocagem contribui para que o alimento chegue ao consumo com provável contaminação. Adicionalmente, a exposição crônica constante a esses alimentos acarreta a possíveis infecções e efeitos tóxicos (OMOTAYO et al., 2019).

A observação da avaliação da exposição faz parte da análise e avaliação do risco na dieta. Deve-se identificar os prováveis efeitos adversos à saúde humana relacionados a exposição de uma determinada substância potencialmente tóxica ao consumo assim como os prováveis meios como as toxinas chegam ao alimento. Tão logo identificada como um risco, a substância deve ser quantificada através de estudos de monitoramento. A análise da exposição de uma determinada população pode ser estimada através da concentração da substância no alimento, a média do consumo da população e o peso corpóreo médio de uma faixa etária definida (JARDIM; CALDAS, 2009).

Diversos estudos têm sido realizados em diversos países inclusive no Brasil avaliando a exposição da população e o risco da ingestão de nozes contaminadas por micotoxinas, o que revela a importância dessa análise complementar nos estudos de monitoramento (VAN DE PERRE et al., 2015; WANG et al., 2018; AL JABIR et al., 2019).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a contaminação de castanha de caju por diferentes classes de micotoxinas.

3.2 Objetivos específicos

a) Desenvolver e validar um método analítico para determinação de micotoxinas de diferentes classes em castanha de caju usando um método QuEChERS e CLUE-EM/EM:

b) Aplicar o método analítico validado em amostras de castanha de caju disponíveis comercialmente;

c) Avaliar os níveis de contaminação das micotoxinas;

d) Estimar a exposição da população às micotoxinas estudadas pela ingestão de castanha de caju.

4 METODOLOGIA

4.1 Reagentes e solventes

Os procedimentos realizados neste trabalho utilizaram os seguintes reagentes: Ácido fórmico (FOA) 98-100% (Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, USA), Acetonitrila (ACN) para cromatografia líquida (J T Baker; Phillipsburg, NJ, USA), Metanol (MeOH) para cromatografia líquida (J T Baker; Phillipsburg, NJ, USA), Hexano (HEX) grau reagente (Merck; Darmstadt, Alemanha), Isopropanol (IPA) grau reagente (Merck; Darmstadt, Alemanha); Água purificada tipo 1 (Mili-Q) (Millipore, Bedford, MA, USA), Cloreto de Sódio (NaCl) anidro com pureza igual ou superior a 98% (J T Baker; Phillipsburg, NJ, USA), Sulfato de Magnésio ($MgSO_4$) anidro com pureza igual ou superior a 98% (Merck; Darmstadt, Alemanha), Citrato de Sódio sesquidratado com pureza igual ou superior a 99% (Acros Organics; Geel; Belgica), Citrato de Sódio diidratado 99% com pureza igual ou superior a 99% (Acros Organics; Geel; Belgica), Acetato de Amônio (Merck; Darmstadt, Alemanha).

4.2 Padrões analíticos

As soluções padrão de fumonisinas B1 e B2 (50 $\mu g/ mL$) em ACN/ H_2O 1:1 (v/v) foram obtidas da empresa Fluka/SigmaAldrich (St. Louis, MO, USA). As Fumonisinas hidrolisadas (HFB1 e HFB2) foram obtidas experimentalmente através da hidrólise alcalina das FB1 e FB2 utilizando o procedimento descrito por Dall'Asta e colaboradores (2009). Um mililitro da solução padrão de FB1 e FB2 (50 $\mu g/ mL$) em acetonitrila/água 1:1 (v/v) foi evaporada à secura sob fluxo de N_2 a 40 °C. O resíduo obtido então foi redissolvido em 1 mL de solução 2 mol/ L de KOH e acondicionado à temperatura ambiente por 12 horas. As fumonisinas hidrolisadas obtidas através da reação de hidrólise foram então extraídas da solução alcalina com acetato de etila sob agitação, realizando-se 3 extrações, com um total de 5 mL de solvente. Os extratos provenientes das extrações foram combinados e secos sob fluxo de N_2 e o resíduo redissolvido em 1 mL de metanol. Certificou-se da ausência (<LD) das FB1 e FB2 nesta solução por CLUEEM/EM, e assumiu-se conversão total para formas hidrolisadas. As concentrações de HFB1 e HFB2 foram calculadas considerando-se os

fatores de conversão estequiométrica, obtendo-se 28,1 e 27,6 µg/ mL para as concentrações das fumonisinas B1 e B2 hidrolisadas, respectivamente. Todas as soluções estoque foram armazenadas em freezer a -18 °C.

Padrões analíticos de Aflatoxinas AFB1, AFB2, AFG1, AFG2 e AFM1 assim como Ocratoxina A, Alternariol, Alternariol Metil-Eter, Desoxinivalenol, Desoxinivalenol – 3 - Glicosídeo, 3 e 15 – Acetil - Desoxinivalenol e Esterigmatocistina foram obtidos da empresa Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Já o padrão analítico de Zearalenona foi obtido da empresa Biopure (Tulln, Austria).

4.3 Preparo das soluções padrão

Foi preparada a solução padrão de trabalho a partir da solução estoque de cada uma das micotoxinas utilizadas no estudo em diferentes concentrações. A solução de trabalho foi avolumada em balão volumético utilizando Acetonitrila (ACN) como solvente de diluição. A concentração final obtida foi de 500 ng/mL para cada uma das micotoxinas diluídas. O acondicionamento foi feito em freezer a -20 °C até a análise. A solução foi utilizada em temperatura ambiente para a realização da fortificação das amostras.

A partir da solução de trabalho a 500 ng/ mL foram feitas diluições sucessivas em ACN para que se obtivessem as soluções de fortificação a 200 ng/ mL e 20 ng/ mL utilizadas como soluções de fortificação do procedimento de recuperação.

4.4 Equipamentos e acessórios

Esse estudo contou com os seguintes equipamentos: balança analítica, módulo de evaporação por nitrogênio, centrífuga refrigerada 5804R (Eppendorf, EUA), agitador de tubos tipo vórtex, refrigerador com compartimento freezer -20°C, capela de exaustão, sistemas de purificação de água ultrapura tipo I, Mili-Q (Millipore, EUA), micropipetadores volumes máximos variados (5000, 1000, 100 e 20 µL), pipeta volumétrica de 2 e 3 mL, tubos tipo *Falcon*® de 15 mL de capacidade, frascos com 100 mL de capacidade, triturador de hélices com copo de aço inox, frascos de vidro com tampa e batoque, vial de fundo cônico (Waters,), filtro com membrana de PTFE de 0,22 µm, balão volumétrico de diferentes volumes, sistema de filtração a vácuo composto de bomba de sucção e kitassato.

As análises cromatográficas e espectrométricas foram realizadas em um sistema LC – MS/MS WATERS® modelo UPLC® I-Class ACQUITY e espectrômetro de massas sequencial tipo triplo quadrupolo modelo Xevo® TQ-S contendo uma fonte de ionização por eletrospray (ESI) operado nos modos positivo e negativo munidos de uma coluna cromatográfica BHE C18 (100 mm x 2,1 mm i.d, 1,7 µm).

4.5 Condições instrumentais

4.5.1 Condições cromatográficas

Foram utilizados dois gradientes cromatográficos na determinação das micotoxinas avaliadas nesse estudo devido a problemas de *carry-over* para as fumonisinas (Tamura et al., 2012). Em ambos os métodos o fluxo da fase móvel foi mantido em 0,30 mL/min durante toda programação e a temperatura da coluna mantida em 35 °C.

Para determinação de fumonisinas FB1 e FB2 e fumonisinas hidrolisadas HFB1 e HFB2 utilizou-se uma solução de água:metanol, 9:1 (v/v) com 0,1% de ácido fórmico como solução aquosa e metanol:isopropanol, 4:1 (v/v) como solvente orgânico. A programação inicial foi um gradiente de eluição começando em 55% de fase orgânica com um gradiente linear de 5 min até 80% de fase orgânica. Em seguida se manteve em 100% do solvente orgânico por 2 minutos. O gradiente foi então equilibrado na condição inicial de análise por 2 min.

Para determinação das demais micotoxinas foi utilizado como fase aquosa uma solução de água:metanol, 9:1 (v/v) com 1 mM de acetato de amônio e metanol:isopropanol, 4:1 (v/v) como solvente orgânico. A programação inicial consistiu de um gradiente mantido com 100% de solvente aquoso por 1 minuto. Em seguida, precedeu-se um gradiente indo até 70% do solvente aquoso por 8 minutos. Então realizou-se um gradiente para 20% de solvente aquoso por 7 min. A coluna foi então lavada com 100 % do solvente orgânico por 1 min e em seguida voltou-se para a condição inicial mantendo-se nessa condição por 2 min. O volume de injeção utilizado foi de 3 µL para ambos os métodos.

4.5.2 Condições espectrométricas

Foi utilizada a interface ESI-MS/MS no modo de monitoramento de reações múltiplas em ambos os modos positivos e negativos simultaneamente, fazendo a varredura de duas transições para cada analito. As condições otimizadas da fonte seguiram os seguintes parâmetros: energia do capilar de 1 kV, temperatura de dessolvatação de 500 °C, fluxo do gás de dessolvatação de 750 L/h, *Ion Energy* 1 e *Ion Energy* 2 em 3v. Argônio foi usado como gás de colisão em um fluxo de 0,15 mL/min.

Tabela 6 - Condições analíticas do sistema MS/MS

Analito	Ion precursor (m/z)	Ion Produto (m/z)	t _R (min)	Q/q	Energia do Cone (V)	Dwell Time (100 ms)
Desoxinivalenol	297	231 249	3,58	1,7	30	0,1
3-Acetil-Desoxinivalenol	339,2	213,1 231,1	7,69	1,8	20	0,1
15-Acetil-Desoxinivalenol	356,1	137 261,1 321,1	7,80	1,6	20	0,1
Alternariol	259,1	185 213,1	11,35	1,6	20	0,1
Alternariol – Monometil - Eter	273,1	128,1 258,1	12,07	1,4	10	0,1
Esterigmatocistina	325	281 310	11,98	1,2	20	0,1
Fumonisina B2 Hidrolisada	390	336 354	1,92	1,6	40	0,1
Ocratoxina	404	239 358	11,27	1,8	10	0,1
Fumonisina B1 Hidrolisada	406	352 370	1,21	1,3	40	0,1
Fumonisina B2	706	318 336	2,20	1,8	40	0,1
Fumonisina B1	722	334 352	1,29	1,1	10	0,1
Aflatoxina B1	313	269 285	10,79	1,9	10	0,1
Aflatoxina B2	315	259 287	10,59	1,1	20	0,1
Aflatoxina G1	329	243 283	10,33	2,3	50	0,1
Aflatoxina M1	329	259 273	10,02	2,6	10	0,1
Aflatoxina G2	331	245 285	9,81	1,2	30	0,1
Zearalenona	317	131 175	10,87	1,5	10	0,1

Fonte: O autor, 2021

4.6 Avaliação de métodos de tratamento de amostra

4.6.1 Seleção das condições a serem estudadas

Foram realizados inicialmente 16 métodos de extração utilizando o método QuEChERS. Oito procedimentos foram realizados utilizando apenas os sais NaCl e MgSO₄ para o *salting-out*. Em outros oito métodos foram adicionados os sais de Citrato de Sódio Sesquidratado e Diidratado juntamente aos outros sais anteriores, caracterizando-se assim o procedimento de QuEChERS do tipo Citrato. Também em oito métodos foi utilizado Hexano (HEX) (2 mL) como solvente desengordurante, estando ausente nos outros oito métodos distinguindo-se como uma contraparte. Utilizou-se solução de ácido fórmico (FOA) em acetonitrila (ACN) variando-se a concentração do aditivo em 0%, 0,1%, 1% e 5% em volume. A descrição dos métodos utilizados está representada na tabela 7.

Tabela 7 - Procedimentos de extração avaliados

	QuEChERS	Hexano (mL)	Solução de Extração
1.	NaCl + MgSO ₄	0	ACN
2.	NaCl + MgSO ₄	2	ACN
3.	NaCl + MgSO ₄ + Sais Citrato	0	ACN
4.	NaCl + MgSO ₄ + Sais Citrato	2	ACN
5.	NaCl + MgSO ₄	0	0,1% FOA em ACN
6.	NaCl + MgSO ₄	2	0,1% FOA em ACN
7.	NaCl + MgSO ₄ + Sais Citrato	0	0,1% FOA em ACN
8.	NaCl + MgSO ₄ + Sais Citrato	2	0,1% FOA em ACN
9.	NaCl + MgSO ₄	0	1% FOA em ACN
10.	NaCl + MgSO ₄	2	1% FOA em ACN
11.	NaCl + MgSO ₄ + Sais Citrato	0	1% FOA em ACN
12.	NaCl + MgSO ₄ + Sais Citrato	2	1% FOA em ACN
13.	NaCl + MgSO ₄	0	5% FOA em ACN
14.	NaCl + MgSO ₄	2	5% FOA em ACN
15.	NaCl + MgSO ₄ + Sais Citrato	0	5% FOA em ACN
16.	NaCl + MgSO ₄ + Sais Citrato	2	5% FOA em ACN

Fonte: O autor, 2021.

4.6.2 Obtenção da amostra referência e da amostra branca

Três gramas de amostra homogeneizada foram pesados em tubo tipo *Falcon* com 15 mL de capacidade. Em seguida, adicionou-se 3 mL do solvente de extração e 2 mL de Hexano. Para os procedimentos sem Hexano, ignorou-se a adição do mesmo. Logo em seguida, a mistura foi agitada em vórtex por 30 segundos e foram adicionados os sais de QuEChERS. Agitou-se por mais 1 minuto. A amostra foi levada para a centrífuga por 7 minutos a 4000 RPM em temperatura ambiente. Em seguida, coletou-se uma alíquota de 1,5 mL com pipeta de 5000 μ L e esta foi levada para evaporação gentilmente sob fluxo de N_2 sem aquecimento. A amostra foi ressuspensa em 1 mL do solvente diluente Metanol/ Acetato de Amônio (1:1; v/v). Agitou-se em vórtex por 30 segundos e em ultrassom por 1 minuto e então a alíquota foi filtrada em filtro PTFE de 0,22 μ m.

Para a amostra referência fortificada no final do procedimento, 15 μ L da solução de trabalho a 500 ng/ mL foi seca em fluxo de N_2 no vial de fundo cônico e ressuspensa em 500 μ L do extrato da matriz isento de analito. Para a amostra branca, foi utilizado apenas o extrato isento de analito filtrado.

4.6.3 Obtenção da amostra fortificada no início do procedimento

Sessenta microlitros da solução de fortificação a 500 ng/mL foram adicionados a 3 gramas de amostra. Em seguida o tubo foi agitado por alguns segundos em vórtex para melhor homogeneização com a amostra. Em seguida 3 mL da solução de extração foram adicionados assim com 2 mL de hexano. Para os procedimentos sem Hexano, ignorou-se a adição dele. Logo em seguida, a mistura foi agitada em vórtex por 30 segundos e foram adicionados os sais de QuEChERS. Agitou-se por mais 1 minuto. A amostra foi levada para a centrífuga por 7 minutos a 4000 RPM em temperatura ambiente. Em seguida, coletou-se uma alíquota de 1,5 mL com pipeta de 5000 μ L e esta foi levada para evaporação gentilmente sob fluxo de N_2 sem aquecimento. A amostra foi ressuspensa em 1 mL do solvente diluente Metanol/ Acetato de Amônio (1:1; v/v). Agitou-se em vórtex por 30 segundos e em ultrassom por 1 minuto e então a alíquota foi filtrada em filtro PTFE de 0,22 μ m para vial de fundo cônico.

4.6.4 Avaliação dos procedimentos de extração e cálculo do efeito matriz relativo

A avaliação dos procedimentos de extração foi feita através do cálculo da recuperação (REC%) e do desvio padrão relativo (RSD%). O valor de REC% foi obtido através da razão entre a média das áreas das amostras fortificadas (n=3) dividido pela média de injeção (n=3) da amostra referência fortificada no final do procedimento, multiplicado por 100. O RSD% foi obtido através da razão entre o desvio padrão das áreas das amostras fortificadas e a média das mesmas multiplicado por 100. As equações 1 e 2 ilustram o cálculo realizado:

Equação 1 - Cálculo do parâmetro de recuperação

$$REC\% = \left(\frac{\text{média das áreas das amostras fortificadas 1,2 e 3}}{\text{média das áreas das injeções da amostra referência}} \right) * 100$$

Fonte: BRASIL, 2011.

Equação 2 - Cálculo do desvio padrão relativo

$$RSD\% = \left(\frac{DP \text{ das áreas da amostra fortificada 1, 2 e 3}}{\text{média das áreas da amostra fortificada 1, 2 e 3}} \right) * 100$$

Fonte: BRASIL, 2011.

O cálculo do efeito matriz relativo foi obtido através da comparação entre razão entre a média das injeções da amostra referência fortificada no final (n=3) pela média das injeções do padrão em diluente (n=3) ambas na concentração de 30 ng/mL, multiplicados por 100 e posteriormente reduzido de 100 unidades. O cálculo realizado está discriminado na equação 3.

Equação 3 - Equação de obtenção do efeito matriz relativo %

$$\text{Efeito Matriz Relativo \%} = \left(\left(\frac{\text{média das áreas das injeções da amostra referência}}{\text{média das áreas das injeções do padrão}} \right) * 100 \right) - 100$$

Fonte: BRASIL, 2011.

4.7 Otimização dos parâmetros do sistema de analisador de massas

Foram realizados testes para otimização do sistema de analisador de massas para as micotoxinas avaliadas nesse estudo utilizando o fluxo proveniente do sistema cromatográfico. Para tal, foram feitas sucessivas injeções em duplicata de 3

μL de solução padrão a 10 ng/mL em solvente de ressuspensão MeOH: Acetato de Amônio 1 mM (1:1, v/v). Foram avaliados os seguintes parâmetros nos modos positivo e negativo: Ion Energy 1 e 2, Energia do Capilar, Energia do Cone, Temperatura do Gás de Dessolvatação e Fluxo do Gás de Dessolvatação, segundo os valores a seguir.

- Ion Energy 1 e 2:
 1. 0,1 e 0,1; 0,1 e 1; 0,1 e 2; 0,1 e 3;
 2. 1 e 0,1; 1 e 1; 1 e 2; 1 e 3;
 3. 2 e 0,1; 2 e 1; 2 e 2; 2 e 3;
 4. 3 e 0,1; 3 e 1; 3 e 2; 3 e 3;
- Energia do Capilar: 0,5; 1; 1,5; 2; 2,5; 3 (apenas em modo positivo) kV;
- Energia do Cone: 10, 20, 30, 40, 50 Volts;
- Temperatura do Gás de Dessolvatação: 300, 400 e 500 °C;
- Fluxo do Gás de Dessolvatação: 500, 750, 1000 L/ Hr.

O parâmetro utilizado na seleção da melhor condição seguiu a escolha da maior média relativa das áreas entre as injeções conforme a equação 4. Foi feito o cálculo do DP e DP relativo como forma de identificar algum desvio aberrante que pudesse levar a uma conclusão equivocada do experimento. Foi considerado para esse estudo o valor de 5% de desvio a partir da maior média obtida como parâmetro de aprovação para a condição avaliada.

Equação 4 - Cálculo da média relativa percentual (%)

$$\text{Média Relativa \%} = \frac{\text{média da duplicata de injeção}}{\text{maior média da duplicata de injeção}} \times 100$$

Fonte: Do autor, 2021.

4.8 Método de tratamento das amostras

No pré-tratamento, todo o conteúdo das amostras de castanha de caju (50 a 200g) foi processado em triturador de hélices por 3 min na potência mínima. As amostras processadas foram estocadas em freezer na temperatura de -20 °C até a análise. Na etapa de tratamento das amostras, uma alíquota de 3 g de cada amostra foi transferida para tubo tipo *Falcon* com 15 mL de capacidade e em seguida 2 mL de hexano e 3 mL da solução de extração (5% de FOA em ACN) foram adicionados

a cada tubo. Então os tubos foram agitados em vórtex por 30 s e em seguida foram adicionados 0,3 g de NaCl e 1,2 g de MgSO₄ e os tubos agitados por 1 min. Os tubos foram levados à centrífuga por 7 minutos a 4000 RPM em temperatura ambiente. Em seguida, uma alíquota de 1,5 mL do extrato de cada amostra foi evaporada à secura sob fluxo de N₂. Os resíduos foram ressuspensos com 1 mL de solução metanol: água, 1:1 (v/v) com 1 mM de acetato de amônio seguido de agitação em vórtex por 30 segundos e ultrassom por 1 minuto. Os extratos foram então filtrados em filtro PTFE de 0,22 µm e então analisados.

4.9 Amostras de castanha de caju

As 30 amostras de castanha de caju (*Anacardium occidentale*) e das demais nozes foram coletadas entre os períodos de agosto/2020 e maio/2021 e foram obtidas de mercados locais na cidade do Rio de Janeiro pelo próprio autor.

4.10 Validação do método analítico

O método analítico foi validado para castanha de caju (*Anacardium occidentale*) para os seguintes parâmetros de desempenho: seletividade, linearidade, efeito matriz, precisão (repetitividade e precisão intermediária), exatidão (recuperação), limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ).

4.10.1 Seletividade

Para o ensaio de seletividade, foram avaliadas amostras de castanha de caju isentas de analito ou com baixa contaminação, onde a relação sinal/ruído é menor que 3 para as duas transições. Para tal, foi necessário comparar os tempos de retenção das amostras com o tempo de retenção da solução padrão a 10 ng/mL afim de confirmar se não há nenhum sinal com o mesmo tempo de retenção da amostra nas duas transições.

4.10.2 Exatidão e Precisão

A exatidão do método foi obtida através do ensaio de recuperação devido a indisponibilidade de Materiais de Referência Certificados ou qualquer outro ensaio de proficiência. Para o ensaio, uma amostra isenta de analito foi fortificada em 3 níveis de concentração (30, 10 e 1 ng/g) em sextuplicata. Cada réplica foi injetada três vezes e foi tirada uma média de injeção, excluindo-se valores destoantes. As médias das sextuplicatas para cada micotoxina foi avaliada contra uma solução em mesmo nível de fortificação de uma amostra referência fortificada no final do procedimento. Assim, obteve-se a quantidade percentual de analito que foi recuperado do processo de extração. O cálculo feito para se obter o valor da recuperação foi feito utilizando-se a equação 5.

Equação 5 - Cálculo da Recuperação (REC%)

$$REC \% = \left(\frac{\text{média das áreas das amostras fortificadas 1,2,3,4,5 e 6}}{\text{média das áreas de injeção da amostra referência}} \right) * 100$$

Fonte: BRASIL, 2011.

A partir do estudo de recuperação foi também obtido os valores para o estudo da precisão para os três níveis de fortificação. Avaliou-se a dispersão dos dados obtidos entre as 6 réplicas fortificadas no início do procedimento através do cálculo do desvio padrão relativo (RSD%) segundo a equação 6.

Equação 6 - Cálculo do RSD% do estudo de precisão

$$RSD\% = \left(\frac{DP \text{ das áreas da amostra fortificada 1, 2, 3, 4, 5 e 6}}{\text{média das áreas de injeção da amostra fortificada}} \right) * 100$$

Fonte: BRASIL, 2011.

Para o ensaio da precisão intermediária, foram realizadas 6 extrações sob diferentes condições de repetibilidade no nível de fortificação intermediário de 10 ng/g considerado nível crítico do método. O ensaio foi realizado em 6 dias distintos, um dia para cada fortificação. A partir dos dados das áreas obtidas em triplicata para cada réplica, foi feita a determinação do RSD%.

4.10.3 Efeito Matriz

Para investigar os efeitos de matriz, foram preparadas curvas de calibração em matriz e em solução de metanol:água (1: 1, v / v) com acetato de amônio 1 mM em seis níveis de concentração, nas faixas de concentração de 0,1 a 15 ng mL⁻¹ para AFM1, AFG1, AFG2, AFB1, AFB2, OTA, ZEA, STG, FB1, FB2, HFB1 e HFB2 e de 1 a 15 ng mL⁻¹ para AOH e AME. Inicialmente o teste F foi usado para verificar a homogeneidade dos resíduos das curvas de calibração (Snedecor & Cochran, 1996). As inclinações das curvas de calibração em solvente e matriz foram então comparadas usando o teste t (Armitage & Berry, 1994).

A extensão do efeito matriz também foi avaliada comparando os coeficientes angulares das curvas de calibração preparadas em solvente e em matriz de acordo com a equação 7 a seguir (SARTORI et. al., 2015).

Equação 7 - Cálculo do Efeito matriz

$$\text{Efeito Matriz} = \left(\frac{\text{Coef. Angular na matriz} - \text{Coef. angular no solvente}}{\text{Coef. angular no solvente}} \right) * 100$$

Fonte: SARTORI et. al., 2015.

4.10.4 Linearidade

As curvas analíticas para avaliação da linearidade foram preparadas em matriz na faixa de concentração de 0,05 a 15 ng/mL. A linearidade foi avaliada por meio das curvas de calibração preparadas em matriz nos níveis de concentração descritos acima (Souza e Junqueira, 2005). O teste de resíduos padronizados Jackknife foi utilizado na investigação de supostos *outliers* (Belsley et al. 1980). A avaliação da homocedasticidade dos resíduos para todas as curvas de calibração foi feita aplicando-se o teste de Levene modificado (Brown e Forsythe, 1974). A independência dos resíduos para todas as curvas de calibração foi verificada através do teste estatístico do tipo Durbin-Watson (Durbin e Watson 1951). A normalidade dos resíduos para todas as curvas de calibração foi verificada através da aplicação do teste de Ryan-Joiner (Ryan e Joiner 1976). A significância da regressão e a falta de ajuste foram realizadas por uma análise de variância (ANOVA) (Draper e Smith 1998).

4.10.5 Limites de Detecção (LOD) e Quantificação (LOQ)

Os parâmetros de LOD e LOQ foram avaliados através da relação de Sinal/Ruído. Para o ensaio, utilizou-se uma amostra isenta de analito fortificada na concentração de 8 ng/g. Para a avaliação, obedeceu-se ao critério de maior que 3 para o LOD e maior que 10 para o LOQ (EDIAGE et al., 2011).

4.10.6 Avaliação da exposição e do risco

A Ingestão Diária Provável Média (APDI) e a Ingestão Diária Provável Máxima (MPDI) foram calculados usando os níveis médios de micotoxinas e as concentrações dos níveis máximos encontrados nas amostras, que foram multiplicados pelo consumo diário de castanha de caju no Brasil usando dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE e (2019) e recomendações diárias para ingestão de castanhas a fim de reduzir o risco de doenças cardiovasculares (GUASCH-FERRÉ et al, 2017; AUNE, 2019), dividido por 70Kg (MAGRINE et al, 2011; SOUZA et al, 2015; SANTOS et al, 2018; KUJBIDA et al, 2019) do peso corporal (pc) de um adulto, conforme descrito nas equações 8 e 9. O cálculo da ingestão diária máxima tolerável provisória (PMTDI) foi com base na ingestão tolerável para OTA e AFB1 (KUIPER-GOODMAN, 1995, 1998; JECFA, 2011).

Equação 8 - Cálculo da Ingestão Diária Provável Média (ADPI)

$$APDI \text{ (ng kg}^{-1} \text{ peso corpóreo}^{-1}) = \frac{\text{concentração média (ng)} \times \text{consumo diário(g)}}{\text{peso corpóreo (Kg)}}$$

Fonte: MAGRINE et al, 2011.

Equação 9 - Cálculo da Ingestão Diária Provável Máxima

$$MPDI \text{ (ng kg}^{-1} \text{ peso corpóreo}^{-1}) = \frac{\text{nível máximo de concentração da micotoxina (ng)} \times \text{consumo diário (g)}}{\text{peso corpóreo (Kg)}}$$

Fonte: MAGRINE et al, 2011.

Para os dados abaixo do limite de detecção (LOD) do método, os valores LOD encontrados para cada micotoxina analisada foram utilizados de acordo com a

recomendação do Programa Europeu de Monitoramento e Avaliação da Exposição a Substâncias Potencialmente Perigosas (GEMS / Food - EURO, 1995).

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Otimização das condições instrumentais

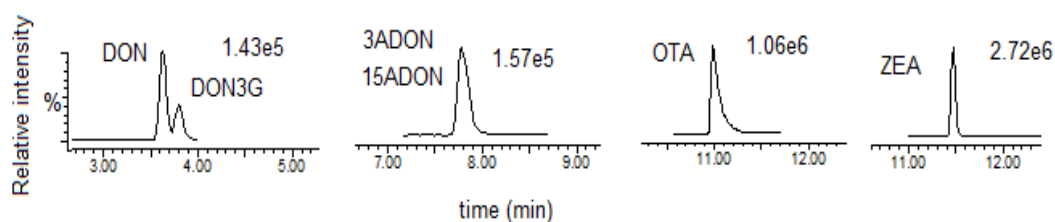
Nesta etapa, foi realizado um extenso trabalho de análise e seleção das melhores condições cromatográficas e do analisador de massas. Para embasar a escolha do parâmetro otimizado, a seleção se baseou nos valores de média relativa.

Os parâmetros que influenciam a formação de sinais estáveis através da evaporação de solvente oriundo da fase móvel e formação de íons em fase gasosa são as voltagens, temperatura, nebulizador e gás de dessolvatação (BOŽOVIĆ; KULASINGAM, 2013). A partir do estudo de otimização, os melhores valores de *Ion Energy*, energia do capilar, energia do cone, temperatura e fluxo do gás de dessolvatação foram encontrados. Os dados das médias relativas e do desvio padrão encontram-se nos Apêndices A, B, C, D e E. A partir dos dados obtidos das médias relativas encontradas com base nas integrações dos sinais cromatográficos, os parâmetros otimizados foram de 3 para o *Ion Energy* 1 e 2 (modo positivo e negativo), 1 kV para a energia do capilar, energia do cone variável conforme apresentado na tabela 6 da sessão 4.5.2, temperatura de 500 °C do gás de dessolvatação e fluxo de 750 L/Hr do gás de dessolvatação.

No otimização do método cromatográfico foi utilizada a lavagem da coluna pós corrida (*post-run*) para evitar problemas cromatográficos secundários de distorção dos picos, utilizando-se o solvente quaternário MeOH:H₂O:IPA:ACN (1:1:1:1, v/v/v/v). Após seleção do método a ser validado foi observado que o mesmo apresentava efeito secundário de distorção cromatográfica principalmente para os analitos DON, OTA, ZEA, 15-ADON e 3-ADON (Figura 9). Mesmo com a aplicação de diferentes métodos de *clean-up* usando PSA, C18 ou a mistura dos dois, a distorção cromatográfica foi observada após 10 injeções (Figura 10). Para evitar a necessidade de realizar a lavagem da coluna no modo *post-run* foi testado a adição de isopropanol como aditivo na fase móvel B na proporção MeOH:IPA (4:1, v/v) (NIELSEN et al., 2015). O problema da distorção cromatográfica secundária foi

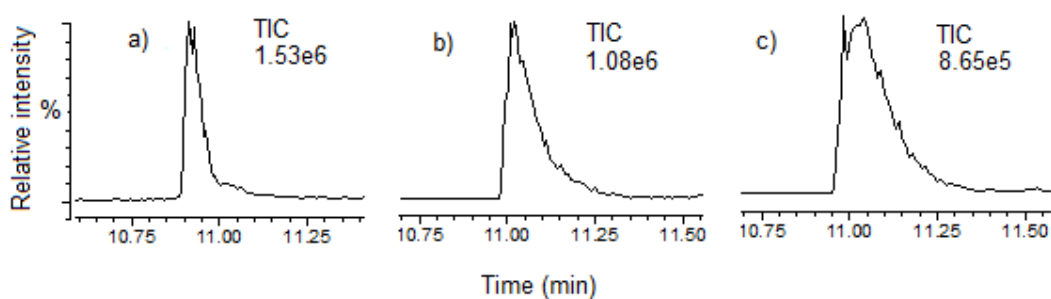
solucionado evitando-se assim as lavagens no modo *post-run* e, conseqüentemente, evitando-se o uso do método de *pre-run* para condicionar a coluna cromatográfica.

Figura 8 - Cromatograma de íons totais exemplificando o efeito de distorção cromatográfica secundária para os analitos DON, 3-ADON, 15-ADON, OTA E ZEA



Fonte: O autor, 2021.

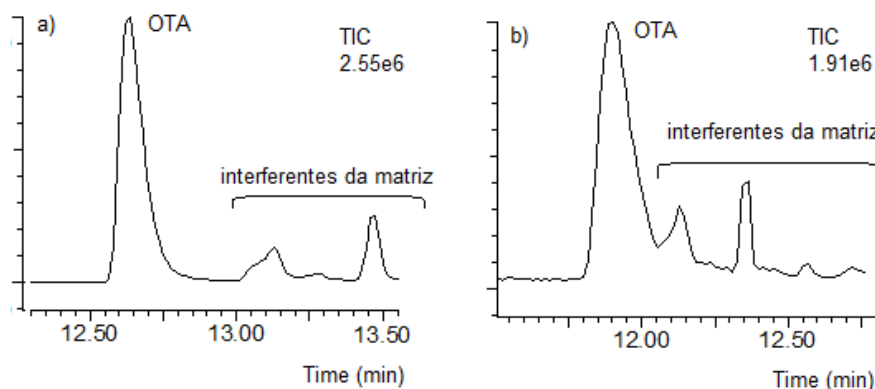
Figura 9 - Cromatogramas de íons totais exemplificando a distorção cromatográfica ocorrida no analito OTA após 10 injeções utilizando método de *clean-up* PSA+C18



Fonte: O autor, 2021.

O fluxo da fase móvel também foi otimizado na porção final da cromatografia, próximo ao t_R da OTA no extrato fortificado. Utilizando um gradiente de 80% de fase orgânica e maior tempo de cromatografia foi melhor para a resolução do sinal cromatográfico da OTA frente aos interferentes da matriz, comparado a utilizar 100% de solvente orgânico na mesma janela de tempo, conforme ilustrado na figura 11.

Figura 10 - Cromatogramas totais de íons para OTA demonstrando a eficiência do gradiente de eluição na seletividade (amostra de castanha de caju fortificada com 10 ng/g de OTA), a) gradiente de eluição de 15 min terminando em 80% do solvente orgânico da fase móvel b) gradiente de eluição de 15 min terminando em 100% do solvente orgânico da fase móvel



Fonte: O autor, 2021.

5.2 Otimização do método de pré-tratamento das amostras

Neste trabalho foi utilizado a técnica de *slurry-mixing* como procedimento de pré-tratamento da amostra. Através dela, foi possível processar o conteúdo completo da embalagem evitando-se algumas desvantagens do uso de moedores industriais e da ocorrência de “amanteigamento” da amostra devido seu alto teor de gordura.

O método de homogeneização da amostra de estudo é uma etapa crítica no processo uma vez que a distribuição das micotoxinas nos alimentos é heterogênea. A heterogeneidade da amostra é um fator que pode acarretar erros de amostragem (MILIĆEVIĆ; ŠKRINJAR; BALTIC, 2010). Para minimizar o erro na amostragem, as amostras de nozes devem ser processadas completamente até que se atinja a total homogeneização (Comunidade Europeia, 1998). Alíquotas das amostras após pré-tratamento foram testadas quando ao tamanho de partículas usando peneiras granulométricas. O procedimento de pré-tratamento (3 min) foi considerado adequado com 99,9% das partículas com diâmetro inferior a 0,5 mm e 0,1% das partículas com diâmetro entre 0,5 e 1mm, evidenciando a eficiência do método de pré-tratamento para a homogeneidade das matrizes avaliadas.

MIRÓ e colaboradores (2019) descreveram a proporção de água de o dobro da quantidade de amostra em massa no processo de *slurry-mixing*. As amostras foram processadas seguindo esta proporção o que se mostrou eficiente na homogeneização completa da amostra e na facilidade da retirada de sub-amostras para os experimentos realizados. Cabe destacar que a adição de água na amostra seca foi vantajosa nesta etapa também, pois, a etapa de extração necessita da mesma para que ocorra o fenômeno de partição.

A aplicabilidade deste procedimento também foi avaliada em outras nozes: Castanha do Brasil (*Bertholletia excelsa*), Macadamia (*Macadamia integrifolia*), Amendoa (*Prunus dulcis*), Pinhão (*Araucaria angustifolia*), Avelã (*Corylus avellana*), Pistache (*Pistacia vera*), castanha de Baru (*Dipteryx alata*), Noz (*Juglans regia* L.), Noz Pecã (*Carya illinoensis*). A quantidade de água para Castanha de Baru (*Dipteryx alata*) foi aumentada para proporção 4:1 (água:amostra) devido a problemas de homogeneidade com a proporção de 2:1.

5.3 Avaliação dos métodos de tratamento das amostras

A triagem de candidatos a métodos de extração de micotoxinas em tipos de nozes resultou na avaliação de 16 métodos do tipo QuEChERS adaptado e sem etapas posteriores de *clean-up*. Foi dada preferência miniaturização do processo de extração devido a diversas vantagens sem que houvesse perdas na eficiência do método.

O método QuEChERS em si já é de rápida execução na rotina laboratorial. Sua miniaturização promove uso reduzido de consumíveis com menor geração de resíduos comparados as extrações convencionais que utilizam maiores quantidades de sais e solventes de extração. Neste estudo a etapa de extração pode ser realizada em um unico tubo do tipo *Falcon* com capacidade de 15 mL.

A utilização de hexano como solvente desengordurante foi baseado no estudo realizado por Sartori e colaboradores (2015b) onde obteve-se uma partição tripla (água/acetoneitrila/hexano). A remoção de gordura com hexano em uma única etapa é útil pois espera-se que haja a remoção de co-extrativos lipídicos em uma única etapa, não havendo necessidade de empregar outros processos caros e prolongados de *clean-up* (HAN et al., 2016).

Os resultados obtidos dos 16 procedimentos de extração se encontram na Apêndice F. A escolha do método 14 de extração para a etapa seguinte da validação se deu pelo valor de REC% estar entre os valores de referência de 80% e 110% e RSD% de até 22% na concentração fortificada de 30 ng/g para a maioria das micotoxinas avaliadas nesse estudo (CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION, 2009) conforme ilustrado na tabela 8.

Tabela 8 - Resultados dos cálculos de REC (%), RSD (%) e Efeito Matriz (%) do método de escolha (Método 14)

Micotoxina	Rec (%)	RSD (%)	Efeito Matriz (%)
FB1 (+)	72,1	6,32	15,6
HFB1 (+)	63,6	9,69	26,0
FB2 (+)	71,2	4,09	1,3
HFB2 (+)	79,0	11,06	33,7
DON (H+)	80,6	5,47	-26,1
DON-3-G (-acetato)	29,5	15,28	-8,6
3-ADON (+H)	91,0	6,12	-3,3
15ADON (+NH4)	80,8	17,25	5,6
AFM1 (+)	92,7	2,99	-20,3
AFG2 (+)	101,2	4,02	-40,9
AFG1 (+)	90,1	14,93	-66,0
AFB2 (+)	93,9	2,33	-48,3
AFB1 (+)	85,8	19,28	-49,1
OTA (+)	87,4	1,90	-35,8
ZEA (-)	102,0	2,59	-43,2
STG (+)	86,0	20,50	-36,7
AOH (+)	85,0	3,38	-2,4
AME (+)	78,3	6,05	-32,6

Fonte: O autor, 2021.

Os métodos que utilizaram tampão citrato não apresentaram recuperações interessantes para o grupo das Fumonisinias. Inclusive há a desvantagem de ter que adicionar mais dois tipos de sais em um espaço reduzido. Observou-se também que

o maior volume de ácido fórmico na solução de extração foi benéfico na extração das Fumonisinias. Como elas possuem grupamentos ácido carboxílico, a adição de ácido ao solvente de extração mantém as mesmas na não ionizada, o que favorece a migração dessas espécies para a fase orgânica (NAKHJAVAN; AHMED; KHOSRAVIFARD, 2020).

Na etapa de desenvolvimento foi realizado o cálculo do efeito matriz relativo. Os dados obtidos se encontram no Apêndice G. Como forma de referenciar a intensidade do efeito matriz, foi adotada a escala descrita por ALCÁNTARA-DURÁN e colaboradores (2019) onde baseado em diversos outros autores, concluiu-se que de 0% - ± 10 o efeito matriz é desprezível, entre $\pm 10\%$ e $\pm 20\%$ como suave, entre $\pm 20\%$ e $\pm 50\%$ efeito médio e forte para mais de $\pm 50\%$. Comparando o método 14 de escolha com a sua contraparte sem hexano (método 13), apenas o analito AFB1 apresentou forte supressão de sinal em ambos os métodos (-66% e -70,9, respectivamente). Mesmo sem ganho aparente no valor do efeito matriz, escolheu-se o método 14 com hexano devido a este produzir um extrato mais limpo.

5.4 Avaliação da estabilidade das micotoxinas no extrato final

A estabilidade das micotoxinas alvo no extrato final das amostras, nas condições de temperatura do amostrador do cromatógrafo (18 °C), foi avaliada por um período de 6 dias. Extratos das amostras com as micotoxinas alvo foram analisados diariamente e um extrato foi mantido na temperatura de referência (-20°C). A análise de resíduos da regressão linear foi empregada para avaliar os resultados. As micotoxinas foram consideradas estáveis nas condições estudadas quando a inclinação (coeficiente angular) da regressão não foi significativa (ABNT ISO GUIA 35). Os resultados obtidos no tratamento estatístico dos dados gerados no estudo de estabilidade (Tabela 9) evidenciam que o valor do intervalo de confiança para o coeficiente angular abrange o valor zero (0), para um nível de confiança de 95%. Conclui-se, portanto, que este é um valor possível ao coeficiente angular da curva que descreve a estabilidade e, portanto, as micotoxinas alvo mostraram-se suficientemente estáveis nas condições estabelecidas nos estudos.

Tabela 9 - Valores de concentração encontrados no estudo de estabilidade (ng/g)

Micotoxinas	Tempo (dias)							Coef. Angular	Lim. Inferior	Lim. Superior
	0	1	2	3	4	5	6			
DON	10,16	10,34	10,02	10,29	10,84	10,49	10,18	0,04214	-0,09269	0,17697
3ADON	9,17	9,17	10,32	10,32	10,60	10,29	9,74	0,15107	-0,10905	0,41119
15ADON	9,84	10,24	10,63	10,21	10,65	9,80	10,10	-0,00286	-0,18303	0,17732
AFM1	8,96	8,78	9,22	9,06	9,27	9,29	9,24	0,06286	-0,00458	0,13029
AFG2	9,73	9,58	10,32	10,00	10,26	10,24	10,10	0,08464	-0,03006	0,19934
AFG1	9,50	8,48	9,25	9,11	9,15	9,31	10,01	0,11036	-0,09855	0,31927
AFB2	10,50	9,05	9,65	9,64	9,52	9,76	10,86	0,08464	-0,22891	0,39819
AFB1	9,15	8,60	9,04	9,11	9,25	9,44	9,20	0,07286	-0,03675	0,18246
OTA	8,38	8,99	9,45	9,31	9,42	9,44	8,81	0,7714	0,12092	0,27521
ZEA	5,97	8,00	7,92	8,15	8,10	8,02	6,22	0,10607	-0,47172	0,68386
STG	7,30	7,62	7,61	7,51	7,40	7,22	7,41	-0,02429	-0,09808	0,5103
AOH	7,96	9,28	9,96	9,58	9,90	9,85	6,92	-0,07286	-0,69115	0,54543
AME	7,69	8,15	8,30	8,44	8,36	8,11	7,75	0,00571	-0,15005	0,16148
FB1	6,90	6,34	6,68	7,01	7,11	6,59	6,96	0,03964	-0,09808	0,17737
HFB1	6,53	6,41	6,86	7,04	7,20	6,83	6,95	0,08714	-0,02150	0,19578
FB2	7,17	6,97	7,41	7,75	7,82	7,25	7,09	0,02607	-0,14497	0,19578
HFB2	8,42	8,66	8,24	8,58	8,76	8,48	8,97	0,06464	-0,03835	0,16764

Fonte:

O

autor,

2021

5.5 Validação do método analítico

5.5.1 Seletividade

A seletividade do método analítico também avaliada e confirmada para Castanha do Brasil (*Bertholletia excelsa*), Macadamia (*Macadamia integrifolia*), Amendoa (*Prunus dulcis*), Pinhão (*Araucaria angustifolia*), Avelã (*Corylus avellana*), Pistache (*Pistacia vera*), Castanha de Baru (*Dipteryx alata*), Noz (*Juglans regia L.*), Noz Pecã (*Carya illinoensis*) e amendoim (*Arachis hypogaea*).

5.5.2 Exatidão e Precisão

Os resultados da exatidão (recuperação) e de precisão (repetibilidade) estão compilados na tabela 10 para a matriz castanha de caju. A avaliação foi feita seguindo os critérios da Comunidade Europeia (CE, 2002, 2006). Os dados obtidos no ensaio de recuperação ficaram entre 65,9% e 110,29%, sendo a FB1 com recuperação fora do critério de aceitação nos níveis 2 e 3 e a FB2 para o nível 2. A precisão intradia apresentou valores entre 1,30% e 8,88% sendo considerados valores ótimos. Em síntese, o método se tornou adequado para a maioria das micotoxinas exceto para DON-3-G que não apresentou valores de recuperação acima de 30%, com precisão adequada para todas as micotoxinas.

Tabela 10 - Resultados de %REC (%RSD) obtidos do procedimento de exatidão (recuperação) e de precisão intra-dia

Micotoxinas	Níveis de Fortificação		
	1 ng/g	10 ng/g	30 ng/g
DON	86,40 (6,5)	80,21 (4,2)	83,86 (2,5)
3ADon	87,79 (3,9)	92,27 (2,2)	90,26 (1,5)
15ADon	89,82 (6,9)	91,54 (1,3)	94,61 (2,5)
AFM1	84,56 (6,1)	86,39 (3,8)	89,62 (2,9)
AFG2	94,71 (5,0)	86,32 (3,0)	88,72 (3,8)
AFG1	89,25 (4,2)	76,72 (6,3)	80,64 (2,7)
AFB2	97,67 (4,0)	87,30 (1,5)	86,52 (4,8)
AFB1	83,21 (4,0)	78,06 (6,1)	77,42 (3,5)
OTA	86,72 (6,7)	110,29 (2,2)	92,23 (2,7)
ZEA	91,91 (6,1)	89,28 (3,0)	92,04 (2,8)
STG	72,07 (3,5)	72,13 (5,2)	70,18 (4,5)
AOH	89,81 (4,8)	84,12 (2,3)	93,85 (4,3)
AME	86,47 (6,9)	73,19 (5,4)	73,22 (3,3)
FB1	90,27 (6,9)	65,90 (5,9)	66,04 (5,3)
HFB1	79,40 (6,1)	80,10 (3,6)	72,10 (5,3)
FB2	76,61 (8,9)	66,90 (5,8)	76,56 (4,1)
HFB2	88,63 (5,4)	77,92 (2,9)	81,56 (2,9)

Fonte: O autor, 2021.

A avaliação da precisão intermediária foi considerada satisfatória na análise inter-dia para os valores de %RSD obtidos em 6 dias diferentes. Os valores dos desvios encontrados estão na faixa de 1,5% e 6,8% para as micotoxinas OTA e FB2, respectivamente. Os dados se encontram na tabela 11.

Tabela 11 - Resultados encontrados no estudo de precisão intermediária

Micotoxinas	Resultados das análises nos diferentes dias							Rec%	RSD%
	Dia 1 (ng/g)	Dia 2 (ng/g)	Dia 3 (ng/g)	Dia 4 (ng/g)	Dia 5 (ng/g)	Dia 6 (ng/g)	Média (ng/g)		
DON	10,30	10,16	9,37	10,04	10,33	10,93	10,19	101,9	5,0
3ADON	9,70	9,86	10,32	9,89	10,18	10,01	9,99	99,9	2,3
15ADON	9,77	10,31	11,10	10,58	10,73	10,28	10,46	104,6	4,4
AFM1	8,92	9,12	9,39	9,02	9,15	9,14	9,12	91,2	1,7
AFG2	9,67	10,14	10,79	10,11	10,08	10,09	10,15	101,5	3,5
AFG1	9,06	9,28	9,65	9,35	9,14	9,23	9,28	92,8	2,2
AFB2	9,41	9,43	9,75	9,40	9,24	9,19	9,40	94,0	2,1
AFB1	9,23	9,02	8,69	9,00	9,25	9,20	9,07	90,7	2,3
OTA	8,95	9,13	9,38	9,25	9,16	9,14	9,17	91,7	1,5
ZEA	8,06	7,66	7,60	7,97	7,85	7,92	7,84	78,4	2,3
STG	7,90	7,57	7,77	7,67	7,43	7,53	7,65	76,5	2,3
AOH	9,13	9,65	9,41	9,97	9,77	9,69	9,60	96,0	3,1
AME	8,49	7,82	8,06	8,17	8,47	8,18	8,20	82,0	3,1
FB1	6,25	6,51	7,14	6,35	7,01	7,03	6,72	67,2	5,8
HFB1	6,35	6,54	6,95	6,63	7,07	7,25	6,80	68,0	5,1
FB2	6,80	6,25	7,32	7,18	7,56	7,36	7,08	70,8	6,8
HFB2	7,75	8,19	8,23	8,15	8,48	8,53	8,22	82,2	3,4

Fonte: O autor, 2021.

5.5.3 Efeito Matriz

Foi observado homogeneidade ($p > 0,05$) das variâncias dos resíduos das curvas de calibração preparadas em solvente e em matriz para todas as micotoxinas estudadas (Snedecor & Cochran, 1989). Assim, as inclinações das curvas de calibração em solvente e matriz foram comparadas usando o teste t para variâncias combinadas (Armitage & Berry, 1994). Por esse teste foram observadas diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as inclinações das curvas de calibração preparadas em solvente e em matriz para todas as micotoxinas alvo, exceto para FB2 (Tabela 12).

Tabela 12 - Resultados obtidos nos estudos de efeito de matriz

Micotoxinas	*ng/mL	Inclinações das curvas de calibração			Efeito Matriz (%) Método final	t calculado	p - valor
		Matriz	Solvente				
DON	1 a 15	540,2	1016		-47	26,719	2,52E-15
3ADON	1 a 15	1578,7	2155		-27	10,467	5,29E-08
15ADON	1 a 15	327,6	523,9		-37	19,622	1,34E-13
AOH	1 a 15	2936,8	3812,9		-23	7,927	1,52E-06
AME	1 a 15	4108	5363,1		-23	16,213	1,81E-10
AFM1	0,1 a 15	35333,5	46177,6		-23	31,913	1,30E-16
AFG2	0,1 a 15	17461,5	22543,7		-23	11,386	1,08E-10
AFG1	0,1 a 15	59923,6	82805,3		-28	16,208	5,72E-13
AFB2	0,1 a 15	45019,3	73037,1		-38	68,03	3,72E-22
AFB1	0,1 a 15	91053,3	131278,7		-31	19,302	2,80E-15
OTA	0,1 a 15	31164,2	43323,6		-28	27,539	4,11E-19
ZEA	0,1 a 15	11083	17737,5		-38	39,096	1,53E-22
STG	0,1 a 15	96903	138750,5		-30	20,521	6,60E-15
FB1	0,1 a 15	6088,8	5869,6		4	3,39	4,40E-03
HFB1	0,1 a 15	27736	30852,9		-10	3,242	5,90E-03
FB2**	0,1 a 15	15587,7	16145		-3	1,751	9,91E-02
HFB2	0,1 a 15	49808,8	62799,6		-21	19,977	1,09E-11

*Faixa de concentração estudada no estudo de efeito de matriz

** Não há efeito de matriz significativo apenas para essa substância ($p > 0,05$)

Fonte: O autor, 2021.

5.5.4 Linearidade

Nos estudos de linearidade foram confirmadas a homocedasticidade, a independência e a normalidade dos resíduos para todas as curvas de calibração ($p > 0,05$). Encontrou-se alta significância da regressão ($p < 0,001$) e falta de ajuste não significativa ($p > 0,05$), atestando a linearidade das curvas avaliadas.

A ampla faixa de concentração utilizada no estudo de linearidade do método proposto abrange uma relativa extensa faixa de concentrações, sendo adequado para análise de amostras em concentrações próximas ou superiores aos limites máximos permitidos para aflatoxinas em nozes bem como para ser usado em estudos de avaliação de risco.

5.5.5 Limites de Detecção (LOD) e de Quantificação (LOQ)

As amostras de castanha de caju fortificadas com as substâncias alvo com os menores níveis de concentração utilizados nos estudos de recuperação descritos anteriormente para determinação do LOD e LOQ, foram avaliadas considerando-se as razões de sinal/ruído de 3 e 10, respectivamente. A sensibilidade também foi avaliada para outras nozes. Os resultados obtidos estão demonstrados nos Apêndices H e I para todas as matrizes de tipos de nozes avaliadas neste estudo. Os dados obtidos para a matriz castanha de caju se encontram na tabela 13. A sensibilidade do método proposto foi considerada adequada para análises de rotina das micotoxinas alvo em castanha de caju, atendendo-se aos limites máximos tolerados para as micotoxinas regulamentadas (Brasil, 2011; CE, 2006; FAO, 2004).

Tabela 13 - Resultados dos Limites de Detecção e Quantificação para a matriz castanha de caju

Micotoxina	LOD (ng/g)	LOQ (ng/g)
AOH	0,18	0,59
AME	n.d	n.d
DON	n.d	n.d
AFB1	0,0083	0,0276
AFB2	0,0081	0,027
STG	0,0012	0,004
AFG1	0,006	0,02
AFM1	0,007	0,023
AFG2	0,015	0,051
3ADON	0,04	0,14
15ADON	0,04	0,14
OTA	0,0144	0,048
ZEA	0,02	0,083
HFB2	0,02	0,07
HFB1	0,03	0,1
FB2	0,01	0,03
FB1	0,03	0,1

n.d = não determinado

Fonte: O autor, 2021.

5.6 Controle interno de qualidade

Como garantia da qualidade dos resultados analíticos foram adotadas algumas medidas na rotina de análise das amostras.

Nesse sentido, para todas as amostras que apresentaram contaminação por pelo menos uma micotoxina, foi analisada mais uma alíquota para confirmação dos resultados. Todas as contaminações encontradas nas amostras de castanha de caju foram confirmadas na segunda alíquota analisada.

Para verificar a eficiência do método analítico uma amostra de castanha de caju fortificada com as micotoxinas (10 ng/g) foi analisada em cada batelada de amostras. Essas amostras foram injetadas ao longo das bateladas e quantificadas utilizando as mesmas curvas de calibração usadas na análise das amostras de rotina. Recuperações entre 67,2% (FB1) e 103,6% (DON), com RSD% inferiores a 8,4% (FB1) foram obtidas para as amostras controle analisadas durante a rotina.

Também foram preparados brancos de reagentes/solventes para verificar a ausência de interferentes nos reagentes/solventes usados no preparo das amostras

na análise de rotina. Como resultado, foi confirmado a ausência de interferentes nos reagentes/solventes foi confirmada em todas as amostras de branco de reagentes analisadas.

5.7 Análise das amostras

O método analítico validado foi aplicado na determinação das micotoxinas alvo em amostras de castanha de caju coletadas do comércio do município do Rio de Janeiro. Os resultados foram avaliados de acordo com a RDC nº 487/2021, legislação vigente no Brasil para controle de micotoxinas em alimentos (Brasil, 2011). O resultado das amostras onde foi encontrado pelo menos uma micotoxina estão descritos na tabela 14.

Tabela 14 - Resultado das amostras comerciais de castanha de caju onde foram obtidos pelo menos 1 micotoxina

Amostra	Micotoxina encontrada (ng/g)						
	AFM1	AFG2	AFG1	AFB2	AFB1	OTA	STG
03/21	-	-	-	-	-	-	0,039
06/21	-	-	-	-	-	-	0,007
07/21	-	-	-	-	-	0,117	0,018
09/21	-	-	0,046	0,161	0,692	0,655	0,089
10/21	-	-	-	-	-	-	0,097
11/21	0,565	0,673	1,429	2,018	4,926	4,815	0,353
12/21	-	-	-	-	-	-	0,014
17-21	0,165	0,112	0,085	0,111	0,227	0,088	0,029
18-21	0,027	-	-	0,085	0,078	0,105	0,034
19-21	0,023	-	-	0,044	0,078	-	0,009
20-21	0,021	-	-	0,038	0,048	0,146	0,011
21-21	-	-	-	0,04	0,028	0,105	0,017
24-21	0,135	0,156	0,0432	0,371	0,077	0,632	0,026
27-21	0,033	-	0,082	0,133	0,403	0,141	0,013
28-21	-	-	-	-	-	-	0,009

Fonte: O autor, 2021.

A AFB1 foi encontrada em 30% das amostras analisadas, na faixa de concentração de 0,028 a 4,926 ng/g, com concentração média de 0,729 ng/g. A AFB1 é uma das micotoxinas de maior ocorrência em tipos de nozes, sendo reportada em diversos trabalhos isoladamente ou simultaneamente a outras micotoxinas do grupo das Aflatoxinas. FRANCISCO ROJO (2015) estudou a

ocorrência em amostras castanha de caju do México onde aproximadamente 19% das amostras contaminadas continham AFB1 com concentração média de 0,17 ng/g, além de encontrar AFB1 também em 35% de amostras de Noz com concentração média de 0,05 ng/g e em 12,5% de amostras de Noz Pecan com concentração média de 0,02 ng/g. CHUN e colaboradores (2007) encontraram AFB1 em 1 dentre 4 amostras de pistache da Coréia do Sul com concentração de 3,41 ng/g. CUNHA e colaboradores (2018) num estudo realizado em Portugal encontraram AFB1 em 1 amostra de Noz com concentração de 1,78 ng/g. CHRISTOFIDOU e colaboradores (2015) acharam AFB1 em 10% de amostras de Amendoa, 35% de amostras de Pistache e em 16,6% de amostras de Castanha do Brasil na República do Chipre com concentrações médias de 32,9, 8,2 e 3,0 ng/g, respectivamente. LIAO e colaboradores (2015) encontraram AFB1 em 20% de amostras de pistache com concentração média 0,85 ng/g e em 1 amostra de amêndoa com concentração de 0,3 ng/g nos Estados Unidos. IAMANAKA e colaboradores (2014) analisaram amostras de Castanha do Brasil de 3 regiões do Brasil e encontraram AFB1 em 95 amostras onde foram encontradas concentrações médias que variam de 0,07 a 11,03 ng/g dependendo da região de coleta. JUAN e colaboradores (2008) analisaram amostras de Noz e Pistache do Marrocos e encontraram concentrações médias de 360 ng/g em 30% das amostras de nozes e de 158 ng/g em 45% das amostras de Pistache. AFB1 também foi encontrada em 50% de amostras de Pistache do Iran com concentração média de 185,89 ng/g (POUR et al., 2010). LEONG e colaboradores (2010) encontraram AFB1 em 1 amostra de Noz com concentração de 13,5 ng/g.

A AFB2 também foi encontrada em 30% das amostras analisadas, na faixa de concentração de 0,038 a 2,018 ng/g, com concentração média de 0,333 ng/g. CHRISTOFIDOU e colaboradores (2015) encontraram AFB2 em 10% de amostras de Amendoas com concentração média de 6 ng/g e em 33,3% de amostras de Pistache com concentração média de 1,3 ng/g. LIAO e colaboradores (2015) encontraram 1 amostra de Pistache com concentração de 0,9 ng/g. LEONG e colaboradores (2010) encontraram 1 amostra de Noz contaminada com AFB2 com concentração de 3,63 ng/g e em 4 amostras de produto de noz com concentração máxima de 61,7 ng/g. IAMANAKA e colaboradoras (2014) analisando amostras de castanha do Brasil encontrou AFB2 em 23 amostras em com concentrações médias de 0,42 e 0,16 ng/g e em 50 amostras em concentrações menores que o LOD (0,01

ng/g). POUR e colaboradores (2010) encontraram AFB2 em 12% de amostras com concentração média de 14,62. CUNHA e colaboradores (2018) encontraram AFB2 42,8% de amostras de Amendoas com concentração média de 0,32 ng/g.

A AFG2 foi encontrada em 10% das amostras analisadas, na faixa de concentração de 0,112 a 0,673 ng/g, com concentração média de 0,314 ng/g. CUNHA e colaboradores (2018) encontraram AFG2 em 3 amostras de castanha de caju com concentração média de 3,0 ng/g e 6 das 7 amostras de Avelã com concentração média de 56,01 ng/g. CHRISTOFIDOU e colaboradores (2015) acharam AFG2 em 5 amostras das 50 de Amendoa analisadas com concentração média de 2,2 ng/g e em 35 das 105 amostras de Pistache analisadas com concentração média de 1,6 ng/g. IAMANAKA e colaboradores (2014) encontraram AFG2 em 56 amostras das 95 amostras de Castanha do Brasil analisadas com concentração média que variam de 0,01 a 0,31 ng/g e em 17 amostras menores que o LOD (0,01 ng/g).

A AFG1 foi encontrada 17% das amostras analisadas, na faixa de concentração de 0,043 a 1,429 ng/g, com concentração média de 0,337 ng/g. CHRISTOFIDOU e colaboradores (2015) encontraram AFG1 em 5 das 50 amostras de Amendoa e em 35 dentre 105 amostras de Pistache analisadas com concentrações médias de 23,6 e 2,0 ng/g, respectivamente. LIAO e colaboradores encontraram em 1 amostra de Pistache dentre 10, AFG1 com concentração de 0,5 ng/g. IAMANAKA e colaboradores encontraram AFG1 em amostras de castanha do Brasil em concentrações médias que variam de 0,11 a 2,54 dependendo da região em 73 amostras e menor que o LOD (0,01 ng/g) em 22 amostras. POUR e colaboradores encontraram AFG1 em 52% de amostras de Pistache com concentração média de 12,18 ng/g.

Nenhuma amostra apresentou contaminação para o somatório dessas aflatoxinas B e G superior ao valor máximo permitido pela legislação vigente no Brasil (20 ng/g).

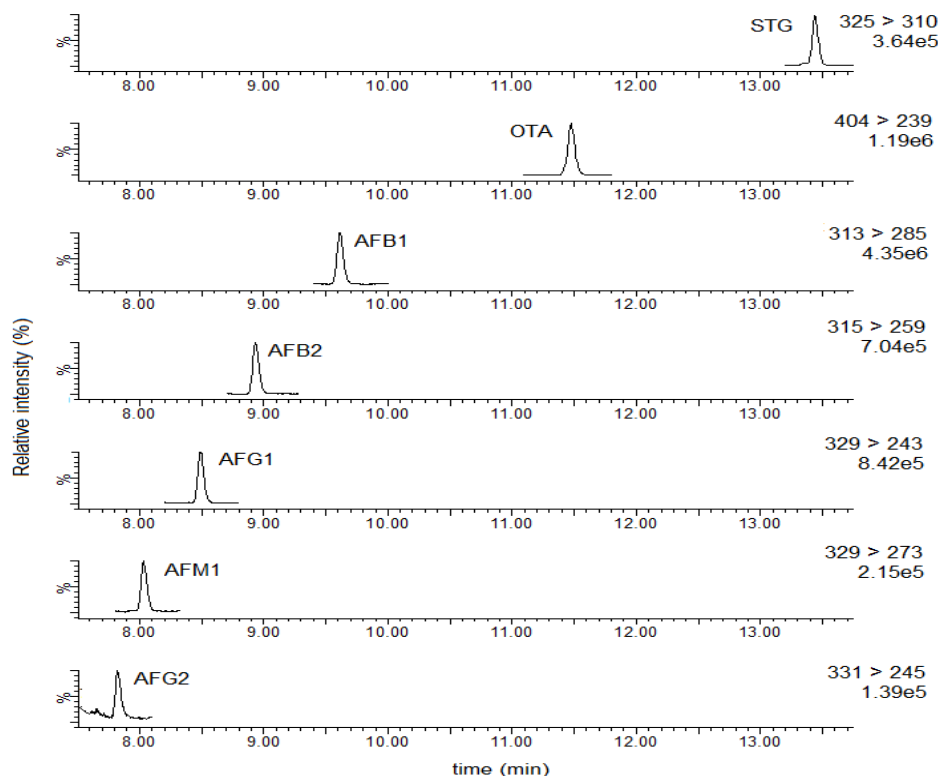
A aflatoxina M1 foi encontrada em 26,6% das amostras analisadas em concentrações de 0,021 a 0,565 ng/g e valor médio de 0,127. Estudos reportando a ocorrência de AFM1 em amostras de nozes não foram encontrados, porém SARTORI e colaboradores (2014) encontraram esta micotoxina em amostras de amendoim nas concentrações de 0,53 e 0,55 ng/g. Não foi encontrada legislação para controle de AFM1 em nozes em nenhum país do mundo.

A ocratoxina A foi encontrada em 30% das amostras analisadas, em níveis de concentração de 0,088 ng/g a 4,815 ng/g, com uma concentração média de 0,756 ng/g. CUNHA e colaboradores (2018) encontraram OTA em amostras de noz e noz pecan oriundas do comércio de Portugal com concentrações de 10,94 e 7,85 ng/g, respectivamente. LIAO e colaboradores (2015) reportaram OTA em 30% das amostras analisadas com concentração média de 2,3 ng/g.

A Esterigmatocistina foi encontrada em 50% das amostras analisadas na faixa de concentração de 0,007 a 0,353 ng/g, com valor médio de 0,051 ng/g. A STG tem sido comumente encontrada em alimentos como café, trigo, queijo, grãos e cerveja (GROOPMAN; KENSLER; WU, 2013; ZINGALES; FERNÁNDEZ-FRANZÓN; RUIZ, 2020). Não foram encontrados estudos anteriores reportando a presença de STG em nozes, dando especial relevância aos dados encontrados neste estudo. Há evidências também que não há legislação para controle de STG em nozes em nenhum país do mundo. TABATA (2020) justifica a ausência de LMT devido a baixa incidência da mesma nos alimentos, porém, fungos produtores de STG são amplamente encontrados nos mesmos. No entanto, com a utilização de equipamentos mais modernos, com maior sensibilidade a STG está se tornando uma micotoxina emergente em estudos de monitoramento.

A figura 9 ilustra uma amostra naturalmente contaminada simultaneamente pelas micotoxinas STG, OTA, AFB1, AFB2, AFG1, AFM1 E AFG2.

Figura 11 - Cromatogramas de uma amostra de castanha de caju naturalmente contaminada por AFG2 (0,673 ng/g), AFM1 (0,565 ng/g), AFG1 (1,429 ng/g), AFB2 (2,018 ng/g), AFB1 (4,926 ng/g), OTA (4,815 ng/g) e STG (0,353 ng/g)



Fonte: O autor, 2021.

5.8 Avaliação da exposição e do risco

A maioria das agências não definiu uma ingestão diária tolerável para aflatoxinas porque nenhum limite pode ser assumido para carcinógenos genotóxicos (Cano-Sancho et al., 2013). Embora, Kuiper-Goodman (1998) estimou uma ingestão diária máxima tolerável provisória (PMTDI) recomendada por Kuiper-Goodman (1998) para crianças e adultos, não portadores do vírus da hepatite B, é de 1,0 ng/kg pc/ dia. JECFA (2007) estabeleceu uma ingestão semanal tolerável provisória (PTWI) para OTA de 112 ng/kg peso corporal semana⁻¹ (16 ng/kg peso corporal por dia), mas não há PMTDI estabelecido para as outras micotoxinas encontradas neste estudo.

Os resultados obtidos em nosso estudo estão mostrados nas tabelas a seguir (Tabelas 15 e 16). O APDI para AFB1 e OTA neste estudo foi menor do que o

PMTDI estabelecido para essas micotoxinas. No entanto, considerando o valor diário recomendado para ingestão de nozes a fim de reduzir o risco de doenças cardiovasculares (GUASCH-FERRÉ et al, 2017; AUNE, 2019), os valores de AFB1 ultrapassariam o PMTDI ao considerar o valor máximo de contaminação.

No Brasil, existem poucos estudos que avaliaram o risco de ingestão de micotoxinas por meio de nozes na dieta e normalmente apenas as aflatoxinas são avaliadas. Em estudo realizado por Kujbida et al. (2019), a ingestão diária para todas as idades de amendoim e castanha de caju contaminados com AFB1 variou de 0,25 a 305,88 e 0,25 a 6,98 ng/ kg pc/ dia (consumo diário de 20 a 100 g), respectivamente. Jager et al. (2013) relataram um APDI de 13 ng/ kg pc/ dia para a soma das quatro aflatoxinas. Magrine et. al. (2011) determinaram o APDI para aflatoxina B1 e relataram um valor de 10 ng/ Kg peso corpóreo/ dia para alto consumo de amendoim. Em estudo realizado por Santos et al (2018), a ingestão diária provável estimada foi de 1280 ng/ kg pc/ dia, excedendo o PMTDI.

Os resultados do nosso estudo contribuem para demonstrar a importância do monitoramento constante das nozes por agências reguladoras com o objetivo de minimizar os riscos à saúde devido à exposição às micotoxinas, principalmente porque este alimento tem um papel importante na dieta humana. Além disso, este estudo demonstra o APDI e o MPDI de outras micotoxinas ainda não demonstradas na castanha de caju.

Tabela 15 - Ingestão Diária Provável Média (APDI) e Ingestão Diária Provável Máxima (MPDI) de micotoxinas na castanha de caju

Micotoxina	APDI (ng Kg ⁻¹ peso corpóreo dia ⁻¹)			MPDI (ng Kg ⁻¹ peso corpóreo dia ⁻¹)								
	Média			90° Percentil			95° Percentil			Valor Máximo		
	^a 0,5g dia ⁻¹	^b 20g dia ⁻¹	^c 28g dia ⁻¹	^a 0,5g dia ⁻¹	^b 20g dia ⁻¹	^c 28g dia ⁻¹	^a 0,5g dia ⁻¹	^b 20g dia ⁻¹	^c 28g dia ⁻¹	^a 0,5g dia ⁻¹	^b 20g dia ⁻¹	^c 28g dia ⁻¹
AFM1	0,0003	0,0110	0,01541	0,0004	0,0157	0,0220	0,0011	0,0432	0,0605	0,0040	0,1616	0,2262
AFG2	0,0003	0,0129	0,01802	0,0002	0,0071	0,0099	0,0010	0,0389	0,0545	0,0048	0,1924	0,2693
AFG1	0,0004	0,0175	0,02447	0,0004	0,0143	0,0200	0,0006	0,0239	0,0335	0,0102	0,4082	0,5715
AFB2	0,0008	0,0302	0,04226	0,0010	0,0387	0,0541	0,0020	0,0790	0,1105	0,0144	0,5765	0,8072
AFB1	0,0016	0,0641	0,08975	0,0017	0,0699	0,0978	0,0040	0,1605	0,2247	0,0352	1,4076	1,9706
AFLAs	0,0031	0,1246	0,1745	0,0032	0,1299	0,1819	0,0076	0,3023	0,4232	0,0646	2,5846	3,6185
OTA	0,0017	0,0677	0,09474	0,0014	0,0557	0,0780	0,0046	0,1843	0,2580	0,0344	1,3757	1,9259
STG	0,0002	0,0073	0,01028	0,0003	0,0126	0,0176	0,0007	0,0267	0,0377	0,0025	0,1008	0,1411

(a) Dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, realizados de acordo com o consumo alimentar domiciliar 2017/2018 do Brasil; (b) Recomendações diárias para ingestão de nozes para reduzir o risco de doenças cardiovasculares; (c) Recomendações diárias para a ingestão de nozes, a fim de reduzir o risco de doenças cardiovasculares.

Fonte: IBGE, 2019; AUNE, 2019; GUASCH-FERRÉ et al., 2017.

Tabela 16 - Ingestão Diária Máxima Provisória Tolerável (PMTDI, %)

Micotoxina	PMTDI (%)											
	Média			90° Percentil			95° Percentil			Valor Máximo		
	0,5g dia ⁻¹	20g dia ⁻¹	28g dia ⁻¹	0,5g dia ⁻¹	20g dia ⁻¹	28g dia ⁻¹	0,5g dia ⁻¹	20g dia ⁻¹	28g dia ⁻¹	0,5g dia ⁻¹	20g dia ⁻¹	28g dia ⁻¹
AFB1	0,2	6,4	9,0	0,4	16,1	22,5	0,2	7,0	9,8	3,5	140,8	197,1
OTA	0,01	0,42	0,59	0,03	1,15	1,61	0,01	0,35	0,49	0,21	8,60	12,04

Fonte: O autor, 2021.

6 CONCLUSÕES

Neste estudo foi possível o desenvolvimento e a validação de um método analítico miniaturizado para determinação multi-micotoxinas na matriz castanha de caju por UHPLC-MS/MS, assim como avaliar a sua aplicabilidade na rotina laboratorial.

O método miniaturizado selecionado para determinação multi-micotoxinas foi otimizado com o objetivo de reduzir o uso de consumíveis, reduzindo-se assim a quantidade de resíduos gerados pós-análise.

A homogeneização das amostras como etapa de pré-tratamento utilizando água purificada e trituração das amostras forneceu amostras altamente homogêneas e eliminou a etapa de adição da mesma na etapa de extração.

O método analítico desenvolvido atendeu aos parâmetros de validação preconizados para a maioria das micotoxinas avaliadas assim como se mostrou adequado para a rotina laboratorial na análise de amostras de castanha de caju. Também se mostrou seletivo para outros tipos de nozes, abrindo espaço para outros estudos.

A otimização das condições cromatográficas e espectrométricas foram etapas bastante cruciais neste trabalho, uma vez que forneceram resultados otimizados que serviram para a adequada sensibilidade encontrada. A utilização de isopropanol como aditivo de fase móvel possibilitou a análise de extratos com alto teor de gordura e interferentes sem impactar na sensibilidade do método e sem a necessidade da inclusão de novas etapas de limpeza do extrato e/ou paradas na rotina analítica para a limpeza do sistema cromatográfico.

Nenhuma micotoxina foi encontrada acima do LMT preconizado pela RDC nº 487/2011, apesar de 50% das amostras estarem contaminadas com pelo menos uma micotoxina. Os dados obtidos para STG e AFM1 nas amostras merecem destaque uma vez que não foram reportados em diversos estudos em diferentes partes do mundo.

Os achados deste estudo servem como subsídio para a discussão de uma possível atualização na legislação vigente, levando-se em conta uma possível inclusão de um LMT para STG, OTA e AFM1, assim como abre caminho para que outras pesquisas não somente destaquem o grupo das Aflatoxinas como principal ocorrência para esse produto.

REFERÊNCIAS

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **ISO GUIA 35**: materiais de referência: princípios gerais e estatísticos para certificação. Rio de Janeiro: ABNT, 2012.

ABRUNHOSA, L. *et al.* A Review of Mycotoxins in Food and Feed Products in Portugal and Estimation of Probable Daily Intakes. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 56, n. 2, p. 249–265, 25 jan. 2016.

ADAM, M. A. A. *et al.* Effects of different mycotoxins on humans, cell genome and their involvement in cancer. **Oncology Reports**, v. 37, n. 3, p. 1321–1336, mar. 2017.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (Brasil). **RDC Nº 166, 24 de julho de 2017**. Guia para validação de métodos analíticos. Brasília: ANVISA, 2017a.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (Brasil). **RDC Nº 487, 26 de março de 2021**. Dispõe sobre os limites máximos tolerados (LMT) de contaminantes em alimentos, os princípios gerais para o seu estabelecimento e os métodos de análise para fins de avaliação de conformidade. Brasília: ANVISA, 2021.

ALASALVAR, C.; SHAHIDI, F. (ed.). **Tree nuts**: composition, phytochemicals, and health effects. Boca Raton: CRC Press, 2009.

ALASSANE-KPEMBI, I. *et al.* Mycotoxins co-contamination: Methodological aspects and biological relevance of combined toxicity studies. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 57, n. 16, p. 3489–3507, 2 nov. 2017.

ALCÁNTARA-DURÁN, J. *et al.* Use of a modified QuEChERS method for the determination of mycotoxin residues in edible nuts by nano flow liquid chromatography high resolution mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 279, p. 144–149, maio 2019.

ALIZADEH, A. *et al.* Deoxynivalenol and its modified forms: are there major differences? **Toxins**, v. 8, n. 11, p. 334, 16 nov. 2016.

ALSHANNAQ, A.; YU, J.-H. Occurrence, toxicity, and analysis of major mycotoxins in food. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 14, n. 6, p. 632, 13 jun. 2017.

AL JABIR, M. *et al.* Dietary exposure of the Qatari population to food mycotoxins and reflections on the regulation limits. **Toxicology Reports**, v. 6, p. 975–982, 2019.

ARMITAGE, P.; BERRY, G. **Statistical methods in medical research**. 3rd ed. Oxford; Boston: Blackwell Scientific Publications, 1994.

ARROYO-MANZANARES, N. *et al.* A new approach in sample treatment combined with UHPLC-MS/MS for the determination of multiclass mycotoxins in edible nuts and seeds. **Talanta**, v. 115, p. 61–67, out. 2013.

AUNE, D. Plant Foods, Antioxidant Biomarkers, and the Risk of Cardiovascular Disease, Cancer, and Mortality: A Review of the Evidence. **Advances in Nutrition**, v. 10, n. Supplement_4, p. S404–S421, 1 nov. 2019.

AUSTRALIA. Department of Health & Human Services. Nuts and Seeds. State Government of Victoria, 2019. Disponível em: <https://www.betterhealth.vic.gov.au/health/healthyliving/Nuts-and-seeds>. Acesso em: 14 ago. 2019.

BATTILANI, P. *et al.* Aflatoxin B1 Contamination In Maize In Europe Increases Due To Climate Change. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, jul. 2016.

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

BHAT, R. *et al.* Outbreak Of Trichothecene Mycotoxicosis Associated With Consumption Of Mould-Damaged Wheat Products In Kashmir Valley, India. **The Lancet**, v. 333, n. 8628, p. 35–37, jan. 1989.

BIANCHINI, A.; BULLERMAN, L. B. MYCOTOXINS | Classification. In: **Encyclopedia of Food Microbiology**. [S.l.]: Elsevier, 2014. p. 854–861.

BRAINER, M.; PEREIRA, S. C.; VIDAL, M.F. **Cajucultura**. 2020. (Caderno Setorial ETENE). Disponível em: https://www.bnb.gov.br/documents/80223/7106244/114_Caju.pdf/b0348238-45be-b060-3629-488c2e70a499. Acesso em: 08 jun. 2021.

BRÄSE, S. *et al.* Chemistry and Biology of Mycotoxins and Related Fungal Metabolites. **Chemical Reviews**, v. 109, n. 9, p. 3903–3990, 9 set. 2009.

BRASIL. Controle de Resíduos e Contaminantes em Produtos de Origem Vegetal - PNCRC/Vegetal para o ano de 2017. **Diário Oficial da União**: seção 1, Brasília, DF, n° 103, p. 5, 31 maio 2007.

BRASIL. Instrução Normativa n° 12, de 30 de Maio de 2017b. Fica definido, na forma desta Instrução Normativa, o cronograma de execução do Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes em Produtos de Origem Vegetal - PNCRC/Vegetal para o ano de 2017. **Diário Oficial da União**: seção 1, Brasília, DF, n° 103, p. 5, 30 maio 2017.

BRASIL. Instrução Normativa SDA/MAPA n° 42, de 31 de dezembro de 2008. Instituir o Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes em Produtos de Origem Vegetal - PNCRC/Vegetal. **Diário Oficial da União**: seção 1, Brasília, DF, n° 2, p. 2-3, 05 jan. 2009.

BRASIL. Lei 8.080, de 19 de setembro de 1990. Dispõe sobre as condições para a promoção, proteção e recuperação da saúde, a organização e o funcionamento dos serviços correspondentes e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 19 set. 1990a.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Manual de garantia da qualidade analítica**. Brasília: MAPA/ACS, 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Portaria Nº 2031, de 23 de setembro de 2004. Dispõe sobre a organização do Sistema Nacional de Laboratórios de Saúde Pública. **Diário Oficial da União**: seção 1, Brasília, p. 79, 24 set. 2004.

BRAUN, M. S.; WINK, M. Exposure, occurrence, and chemistry of fumonisins and their cryptic derivatives: fumonisins and their cryptic derivatives.... **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 17, n. 3, p. 769–791, maio 2018.

BRERA, C. *et al.* Mycotoxins. *In*: BARCELÓ, D. (ed.). **Comprehensive Analytical Chemistry**. [S.l.]: Elsevier, 2008. v. 51, p. 363–427. Chapter 12.

BRITO, N. M. *et al.* Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. **Pesticidas**: revista de ecotoxicologia e meio ambiente, v. 13, p. 129-146, 2003.

BROWN, M.B.; FORSYTHE, A.B. Robust tests for the equality of variances. **J. Am. Stat. Assoc.**, v. 69, p. 364-367, 1974.

BUI-KLIMKE, T. R.; WU, F. Ochratoxin A and Human Health Risk: A Review of the Evidence. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 55, n. 13, p. 1860–1869, 10 nov. 2015.

CABALLERO, B. (ed.). **Encyclopedia of food sciences and nutrition**. Amsterdam: Academic Press, 2003.

CALORI-DOMINGUES, M. A. *et al.* Ocorrência de desoxivalenol em trigo nacional e importado utilizado no Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 1, p. 181–185, mar. 2007.

CANO-SANCHO, G. *et al.* Occurrence and exposure assessment of aflatoxins in Catalonia (Spain). **Food and Chemical Toxicology**, v. 51, p. 188–193, jan. 2013.

CARBONE, I. *et al.* Gene duplication, modularity and adaptation in the evolution of the aflatoxin gene cluster. **BMC Evolutionary Biology**, v. 7, n. 1, p. 111, 2007.

CHEMICAL and physical characteristics of the principal mycotoxins. **IARC scientific publications**, n. 158, p. 31–38, 2012.

CHEMICAL contaminants and residues in food. 2nd edition. Boston, MA: Elsevier, 2017.

CHREVATIDIS, A. Mycotoxins. Occurrence and Determination. *In*: CABALLERO, B.; FINGLAS, P. M.; TRUGO, L. C. **Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition**. [S.I.]: Elsevier, 2003. p. 4089–4096.

CHUN, H. S. *et al.* Determination of aflatoxin levels in nuts and their products consumed in South Korea. **Food Chemistry**, v. 102, n. 1, p. 385–391, jan. 2007.

CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION. **Report of the thirtieth session of the Codex Committee on Methods of Analysis and Sampling**. CL 2009/12-MAS. [S. I.]: CAC, 2009.

CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION. **General standard for contaminants and toxins in food and feed**: CODEX STAN 193-1995. [S. I.]: CAC, 2015.

COMUNIDADE EUROPEIA. Commission Directive 98/53/EC of 16 July 1998 laying down the sampling methods and the methods of analysis for the official control of the levels for certain contaminants in foodstuffs. **Official Journal of the European Communities**, Brussels, 1998.

COSTA, E. A.; ROZENFELD, S. Constituição da vigilância sanitária no Brasil. *In*: ROZENFELD, S. (org.). **Fundamentos da vigilância sanitária**. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2000, p.15-40.

DALL'ASTA, C. *et al.* Difficulties in fumonisin determination: the issue of hidden fumonisins. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 395, n. 5, p. 1335–1345, nov. 2009.

DAVIS, I. M. **Nuts**: properties, consumption and nutrition. Hauppauge, N.Y: Nova Science Publishers, 2013.

DÍAZ NIETO, C. H. *et al.* Sterigmatocystin: A mycotoxin to be seriously considered. **Food and Chemical Toxicology**, v. 118, p. 460–470, ago. 2018.

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

DUARTE, S. C.; PENA, A.; LINO, C. M. A review on ochratoxin A occurrence and effects of processing of cereal and cereal derived food products. **Food Microbiology**, v. 27, n. 2, p. 187–198, abr. 2010.

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

EDIAGE, E. N. *et al.* A Validated Multianalyte LC-MS/MS Method for Quantification OF 25 Mycotoxins in Cassava Flour, Peanut Cake and Maize Samples. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, p. 5173-5180, 2011.

EFSA PANEL ON CONTAMINANTS IN THE FOOD CHAIN (CONTAM) *et al.* Risks for animal health related to the presence of zearalenone and its modified forms in feed. **EFSA Journal**, v. 15, n. 7, jul. 2017a.

EFSA PANEL ON CONTAMINANTS IN THE FOOD CHAIN (CONTAM) *et al.* Risks to human and animal health related to the presence of deoxynivalenol and its acetylated and modified forms in food and feed. **EFSA Journal**, v. 15, n. 9, set. 2017b.

EL KHOURY, A.; ATOUI, A. Ochratoxin A: General Overview and Actual Molecular Status. **Toxins**, v. 2, n. 4, p. 461–493, 29 mar. 2010.

FALAVIGNA, C. *et al.* Masked fumonisins in processed food: co-occurrence of hidden and bound forms and their stability under digestive conditions. **World Mycotoxin Journal**, v. 5, n. 3, p. 325–334, 1 ago. 2012.

FAO/WHO Expert Committee on Food Additives Evaluation of certain food additives and contaminants. WHO Technical Report Series, World Health Organization, Geneva, 2004.

FIGUEIREDO, A. V. A.; RECINE, E.; MONTEIRO, R. Regulação dos riscos dos alimentos: as tensões da Vigilância Sanitária no Brasil. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 22, n. 7, p. 2353–2366, jul. 2017.

FRANCISCO ROJO, S. R. V. Aflatoxins in Walnut (*Juglans regia* L.), Pecan (*Carya illinoensis* (Wangenh.) K. Koch) and Cashew (*Anacardium occidentale* L.) Nuts of Mexico. **Pharmaceutica Analytica Acta**, v. 06, n. 02, 2015.

FREIRE, F.C.O. *et al.* **Micotoxinas**: importância na alimentação e na saúde humana e animal. Fortaleza: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Embrapa Agroindústria Tropical, 2007. (Documento 110). Disponível em: http://www.cnpat.embrapa.br/cnpat/cd/jss/acervo/Dc_110.pdf. Acesso em: 14 ago. 2019.

GARCÍA-CAMPAÑA, A. M.; CUADROS-RODRÍGUEZ, L.; MUÑOZ, J.A.; BARRERO, F.A. 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.

GOSETTI, F. *et al.* Signal suppression/enhancement in high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, n. 25, p. 3929–3937, jun. 2010.

GUASCH-FERRÉ, M. *et al.* Nut Consumption and Risk of Cardiovascular Disease. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 70, n. 20, p. 2519–2532, nov. 2017.

HAN, L. *et al.* Evaluation of a recent product to remove lipids and other matrix co-extractives in the analysis of pesticide residues and environmental contaminants in foods. **Journal of Chromatography A**, v. 1449, p. 17–29, jun. 2016.

HEUSSNER, A.; BINGLE, L. Comparative Ochratoxin Toxicity: A Review of the Available Data. **Toxins**, v. 7, n. 10, p. 4253–4282, 22 out. 2015.

- IAMANAKA, B. T. *et al.* Aflatoxin evaluation in ready-to-eat brazil nuts using reversed-phase liquid chromatography and post-column derivatisation. **Food Additives & Contaminants: Part A**, v. 31, n. 5, p. 917–923, 4 maio 2014.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (ed.). **Pesquisa de orçamentos familiares, 2017-2018**. Rio de Janeiro: IBGE, 2019.
- IQBAL, S. Z. *et al.* Aflatoxin M1 in milk and dairy products, occurrence and recent challenges: A review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 46, n. 1, p. 110–119, nov. 2015.
- JARDIM, A. N. O.; CALDAS, E. D. Exposição humana a substâncias químicas potencialmente tóxicas na dieta e os riscos para saúde. **Química Nova**, v. 32, n. 7, p. 1898–1909, 2009.
- JAGER, A. V. *et al.* Assessment of aflatoxin intake in São Paulo, Brazil. **Food Control**, v. 33, n. 1, p. 87–92, set. 2013.
- JOINT FAO/WHO EXPERT COMMITTEE ON FOOD ADDITIVES; FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS; WORLD HEALTH ORGANIZATION (ed.). **Evaluation of certain contaminants in food: eighty-third report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives**. Geneva, Switzerland: World Health Organization, 2017.
- KAMALA, A. *et al.* Outbreak of an acute aflatoxicosis in Tanzania during 2016. **World Mycotoxin Journal**, v. 11, n. 3, p. 311–320, 18 set. 2018.
- KRISHNAMACHARI, K. A. V. R. *et al.* Hepatitis Due To Aflatoxicosis. **The Lancet**, v. 305, n. 7915, p. 1061–1063, maio 1975.
- KUIPER-GOODMAN, T. Food safety: mycotoxins and phycotoxins in perspective. *In*: MIRAGLIA, M. (ed.). **Mycotoxins and phycotoxins-developments in chemistry: Toxicology and food safety**. Fort Collins, Colo: Alaken Inc., 1998. p. 25-48.
- KUJBIDA, P. *et al.* Risk assessment of the occurrence of aflatoxin and fungi in peanuts and cashew nuts. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 55, p. e18135, 2019.
- KUMAR, P. *et al.* Aflatoxins: A Global Concern for Food Safety, Human Health and Their Management. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, 17 jan. 2017.
- LÓPEZ, P. *et al.* Alternaria toxins and conjugates in selected foods in the Netherlands. **Food Control**, v. 69, p. 153–159, nov. 2016.
- LOPES, R. Produção de castanhas e nozes no Brasil está aquém de seu potencial, dizem especialistas. 2017. Elaborada por Agência Indusnet Fiesp. Disponível em: <http://www.fiesp.com.br/noticias/producao-de-castanhas-e-nozes-no-brasil-esta-aquem-de-seu-potencial-dizem-especialistas/>. Acesso em: 16 out. 2017.

MAGRINE, I. C. O. *et al.* Intake of aflatoxins through the consumption of peanut products in Brazil. **Food Additives and Contaminants: Part B**, v. 4, n. 2, p. 99–105, jun. 2011.

MALDANER, L.; JARDIM, I. C. S. F. O estado da arte da cromatografia líquida de ultra eficiência. **Química Nova**, v. 32, n. 1, p. 214–222, 2009.

MALIR, F. *et al.* Ochratoxin A: 50 Years of Research. **Toxins**, v. 8, n. 7, p. 191, 4 jul. 2016.

MARAGOS, C. Zearalenone occurrence and human exposure. **World Mycotoxin Journal**, v. 3, n. 4, p. 369–383, nov. 2010.

MARÍN, S.; RAMOS, A. J. Molds and mycotoxins in nuts. *In: Food Hygiene and Toxicology in Ready-to-Eat Foods*. [S. l.]: Elsevier, 2016. p. 295–312.

MARTINS, B.R; TANCREDI, R.C.P; GEMAL, A.L. Segurança alimentar no contexto da vigilância sanitária: reflexões e práticas. Rio de Janeiro: Escola Politécnica de Saúde Joaquim Venâncio, p.1-208, 2014.

MILIĆEVIĆ, D. R.; ŠKRINJAR, M.; BALTIĆ, T. Real and Perceived Risks for Mycotoxin Contamination in Foods and Feeds: Challenges for Food Safety Control. **Toxins**, v. 2, n. 4, p. 572–592, 1 abr. 2010.

MIRÓ, M. *et al.* **Encyclopedia of analytical science**. [S.l: s.n.]. v. 1.

MOTTA, S. DA; SOARES, L. M. V. A method for the determination of two *Alternaria* toxins, alternariol and alternariol monomethyl ether, in tomato products. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 31, n. 4, out. 2000.

NAKHJAVAN, B.; AHMED, N. S.; KHOSRAVIFARD, M. Development of an Improved Method of Sample Extraction and Quantitation of Multi-Mycotoxin in Feed by LC-MS/MS. **Toxins**, v. 12, n. 7, p. 462, 19 jul. 2020.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. PubChem Database. **Zearalenone, CID=5281576**. 20-?. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Zearalenone>. Acesso em: 26 ago. 2019.

NAUSHAD, M.; KHAN, M. R. **Ultra performance liquid chromatography mass spectrometry: evaluation and applications in food analysis**. [S.l: s.n.].

NIELSEN, K. F. *et al.* UHPLC-MS/MS Determination of Ochratoxin A and Fumonisin in Coffee Using QuEChERS Extraction Combined with Mixed-Mode SPE Purification. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, n. 3, p. 1029–1034, 28 jan. 2015.

OMOTAYO, O. P. *et al.* Prevalence of Mycotoxins and Their Consequences on Human Health. **Toxicological Research**, v. 35, n. 1, p. 1–7, 15 jan. 2019.

OSTADRAHIMI, A. *et al.* Aflatoxin in Raw and Salt-Roasted Nuts (Pistachios, Peanuts and Walnuts) Sold in Markets of Tabriz, Iran. **Jundishapur Journal of Microbiology**, v. 7, n. 1, 1 jan. 2014.

OSTRY, V. *Alternaria* mycotoxins: an overview of chemical characterization, producers, toxicity, analysis and occurrence in foodstuffs. **World Mycotoxin Journal**, v. 1, n. 2, p. 175–188, 1 maio 2008.

PASCHOAL, J. A. R. *et al.* Validação de métodos cromatográficos para a determinação de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos. **Química Nova**, v. 31, n. 5, p. 1190–1198, 2008.

PITT, J. I. Mycotoxins: Mycotoxins – General. *In*: MOTARJEMI, Yasmine. **Encyclopedia of Food Safety**. [S.l.]: Elsevier, 2014. p. 283–288.

POZZI, C. R. *et al.* Aspectos relacionados à ocorrência e mecanismo de ação de fumonisinas. **Ciência Rural**, v. 32, n. 5, p. 901–907, out. 2002.

PROBST, C.; NJAPAU, H.; COTTY, P. J. Outbreak of an Acute Aflatoxicosis in Kenya in 2004: Identification of the Causal Agent. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 8, p. 2762–2764, 15 abr. 2007.

RAGHAVENDER, C.; REDDY, B. Human and animal disease outbreaks in India due to mycotoxins other than aflatoxins. **World Mycotoxin Journal**, v. 2, n. 1, p. 23–30, fev. 2009.

RAHMANI, A.; JINAP, S.; SOLEIMANY, F. Qualitative and Quantitative Analysis of Mycotoxins. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 8, n. 3, p. 202–251, jul. 2009.

SOUZA, R. *et al.* Nuts and Human Health Outcomes: A Systematic Review. **Nutrients**, v. 9, n. 12, p. 1311, 2 dez. 2017.

RYAN, T.A.; JOINER, B.L. **Normal probability plots and tests for normality**. Pennsylvania: The State College, Pennsylvania State University, 1976. 15 p.

REJCZAK, T.; TUZIMSKI, T. A review of recent developments and trends in the QuEChERS sample preparation approach. **Open Chemistry**, v. 13, n. 1, 18 jan. 2015.

RICHARD, J. L. Discovery of aflatoxins and significant historical features. **Toxin Reviews**, v. 27, n. 3–4, p. 171–201, jan. 2008.

ROMANI, L. Immunity to fungal infections. **Nature Reviews Immunology**, v. 4, n. 1, p. 11–24, jan. 2004.

RUIZ, M.-J. *et al.* Cytotoxic effects of mycotoxin combinations in mammalian kidney cells. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, n. 10, p. 2718–2724, out. 2011.

SAHOO, P. K. *et al.* Acute and subchronic toxicity of aflatoxin B1 to rohu, *Labeo rohita* (Hamilton). **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 39, n. 5, p. 453–458, maio 2001.

SANTOS, A. C. DOS *et al.* Occurrence and exposure assessment to aflatoxins in peanuts commercialized in the northwest of Parana, Brazil. **Ciência Rural**, v. 48, n. 6, 24 maio 2018.

SARTORI, A. V. *et al.* Determination of Aflatoxins M1, M2, B1, B2, G1, and G2 and Ochratoxin A in UHT and Powdered Milk by Modified QuEChERS Method and Ultra-High-Performance Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry. **Food Analytical Methods**, v. 8, n. 9, p. 2321–2330, out. 2015.

SARTORI, A. V.; DE MATTOS, J. S.; SOUZA, Y. P.; DOS SANTOS, R. P.; PAULINO DE MORAES, M. H.; DA NÓBREGA, A. W. Determination of aflatoxins M1, M2, B1, B2, G1 and G2 in peanut by modified QuEChERS method and ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Vigilância Sanitária em Debate: Sociedade, Ciência & Tecnologia (Health Surveillance under Debate: Society, Science & Technology)*. **Visa em Debate**, Rio de Janeiro, v. 3, n. 3, p. 115-121, 2015b.

SCHROEDER, H. W.; COLE, R. J. Natural occurrence of alternariols in discolored pecans. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 25, n. 1, p. 204–206, jan. 1977.

SHAHBANDEH, M.. **Consumption of cashew nuts (kernel basis) worldwide from 2012 to 2019**. 2021. Statista. Disponível em: <https://www.statista.com/statistics/967649/global-cashew-nut-consumption/#:~:text=In%202019%2C%20a%20total%20of,cashew%20nuts%20were%20consumed%20worldwide..> Acesso em: 08 jun. 2021.

SNEDECOR, G. W.; COCHRAN, W. G.; COCHRAN, W. G. **Statistical methods**. 8th ed., 7. print ed. Ames, Iowa: Iowa State Univ. Press, 1996.

SOBRAL, M. M. C. *et al.* Toxicological interactions between mycotoxins from ubiquitous fungi: Impact on hepatic and intestinal human epithelial cells. **Chemosphere**, v. 202, p. 538–548, jul. 2018.

SOBROVA, P. *et al.* Deoxynivalenol and its toxicity. **Interdisciplinary Toxicology**, v. 3, n. 3, 1 jan. 2010.

SOUBRA, L. *et al.* Occurrence of total aflatoxins, ochratoxin A and deoxynivalenol in foodstuffs available on the Lebanese market and their impact on dietary exposure of children and teenagers in Beirut. **Food Additives & Contaminants: Part A**, v. 26, n. 2, p. 189–200, fev. 2009.

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.

SUN, G. *et al.* Fumonisin B 1 contamination of home-grown corn in high-risk areas for esophageal and liver cancer in China. **Food Additives and Contaminants**, v. 24, n. 2, p. 181–185, fev. 2007.

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

VAN DE PERRE, E. *et al.* Impact of maximum levels in European legislation on exposure of mycotoxins in dried products: Case of aflatoxin B1 and ochratoxin A in nuts and dried fruits. **Food and Chemical Toxicology**, v. 75, p. 112–117, jan. 2015.

VERŠILOVSKIS, A.; DE SAEGER, S. Sterigmatocystin: Occurrence in foodstuffs and analytical methods - An overview. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 54, n. 1, p. 136–147, jan. 2010.

WANG, J. *et al.* Role of hMLH1 in sterigmatocystin-induced G2 phase arrest in human esophageal epithelial Het-1A cells in vitro. **Toxicology Letters**, v. 217, n. 3, p. 226–234, mar. 2013.

WANG, Y. *et al.* Multi-mycotoxin exposure and risk assessments for Chinese consumption of nuts and dried fruits. **Journal of Integrative Agriculture**, v. 17, n. 7, p. 1676–1690, jul. 2018.

WANG, Y. *et al.* Occurrence and co-occurrence of mycotoxins in nuts and dried fruits from China. **Food Control**, v. 88, p. 181–189, jun. 2018.

WAŚKIEWICZ, A.; BESZTERDA, M.; GOLIŃSKI, P. Occurrence of fumonisins in food – An interdisciplinary approach to the problem. **Food Control**, v. 26, n. 2, p. 491–499, ago. 2012.

WATSON, J. T.; SPARKMAN, O. D. **Introduction to mass spectrometry: instrumentation, applications and strategies for data interpretation**. 4th ed ed. Chichester, England ; Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, 2007.

WILD, C. P.; GONG, Y. Y. Mycotoxins and human disease: a largely ignored global health issue. **Carcinogenesis**, v. 31, n. 1, p. 71–82, 1 jan. 2010.

XU, W. *et al.* Natural Occurrence of Alternaria Toxins in the 2015 Wheat from Anhui Province, China. **Toxins**, v. 8, n. 11, p. 308, 26 out. 2016.

YAN, P. *et al.* Natural Occurrence of Deoxynivalenol and Its Acetylated Derivatives in Chinese Maize and Wheat Collected in 2017. **Toxins**, v. 12, n. 3, p. 200, 22 mar. 2020.

ZHANG, G.-L. *et al.* Zearalenone: A Mycotoxin With Different Toxic Effect in Domestic and Laboratory Animals' Granulosa Cells. **Frontiers in Genetics**, v. 9, 18 dez. 2018.

APÊNDICE A

Tabela 17- Resultados das intensidades percentuais relativas obtidas no estudo de otimização do Ion Energy 1 e 2 (continua)

Micotoxina	<i>Ion Energy (IE) 1 / Ion Energy 2</i>					
	0,1/ 0,1	0,1/ 1	0,1/ 2	0,1/3	1/ 0,1	1/ 1
FB1 (+)	24 (4,0)	38,9 (8,7)	44,7 (0,9)	61,8 (2,6)	22,4 (3,0)	37,1 (0,0)
HFB1 (+)	23,3 (1,4)	41,4 (0,1)	64,4 (1,1)	79,0 (6,9)	19,4 (2,4)	36,4 (0,3)
FB2 (+)	18,8 (4,8)	44,1 (2,3)	55,2 (11,6)	68,6 (2,4)	21,7 (5,1)	37,3 (2,2)
HFB2 (+)	22,3 (0,8)	45,7 (1,2)	67,5 (2,5)	81,6 (3,6)	20,4 (1,7)	37,7 (0,3)
DON (+)	26,5 (1,0)	48,6 (2,1)	66,4 (4,7)	74,5 (1,9)	35,8 (1,1)	62,6 (5,9)
DON-3-G (-)	28,2 (2,8)	45,6 (2,6)	65,0 (9,2)	76,3 (3,3)	40,8 (0,1)	66,3 (6,8)
3-ADON (+)	32,8 (0,8)	56,3 (0,0)	74,6 (0,2)	75,9 (0,1)	43,2 (1,9)	74,4 (0,4)
15-ADON (+NH ₄)	21,3 (4,9)	40,6 (1,3)	63,9 (1,1)	62,0 (2,6)	34,2 (1,6)	64,1 (1,3)
AFM1 (+)	47,0 (0,2)	64,5 (2,8)	75,1 (1,9)	77,6 (0,8)	60,8 (0,3)	83,8 (1,2)
AFG2 (+)	47,2 (1,8)	63,9 (1,4)	75,0 (0,9)	79,1 (1,9)	59,7 (0,8)	84,4 (2,2)
AFG1 (+)	43,7 (0,7)	60,4 (0,2)	73,3 (2,3)	77,0 (0,8)	56,2 (1,5)	81,2 (2,5)
AFB2 (+)	41,1 (0,7)	58,5 (0,1)	71,4 (0,3)	76,7 (0,2)	53,9 (1,4)	78,8 (2,5)
AFB1 (+)	36,1 (1,1)	54,6 (0,1)	66,9 (0,5)	71,3 (0,4)	48,9 (2,0)	73,8 (2,3)
OTA (+)	47,9 (2,3)	67,1 (4,2)	78,9 (0,6)	78,3 (1,4)	59,5 (1,2)	82,7 (0,2)
ZEA (-)	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	8,2 (0,1)	39,2 (0,1)
STG (+)	58,7 (1,5)	71,0 (2,3)	76,3 (1,2)	73,8 (2,4)	64,2 (2,5)	81,7 (0,1)
AOH (+)	32,0 (2,0)	48,7 (5,0)	69,6 (6,6)	70,2 (2,2)	51,0 (6,8)	75,5 (0,8)
AME (+)	55,9 (5,5)	76,8 (1,2)	75,9 (0,1)	81,0 (1,3)	64,5 (0,4)	91,2 (7,4)
DON (-)	0,0 (0,0)	0,1 (0,1)	0,1 (0,1)	0,3 (0,3)	4,8 (0,1)	32,6 (4,0)
DON-3-G (+)	21,1 (1,8)	41,2 (5,2)	45,2 (2,6)	54,7 (1,2)	27,9 (4,1)	46,5 (0,3)
3-ADON (-)	0,0 (0,0)	0,1 (0,0)	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	3,1 (0,0)	38,1 (5,0)
15-ADON (+)	30,4 (0,1)	47,3 (4,2)	50,9 (0,3)	52,2 (1,7)	39,6 (0,2)	58,8 (1,4)
ZEA (+)	16,6 (0,8)	25,1 (0,1)	29,9 (1,7)	34,6 (2,5)	23,4 (1,3)	39,3 (3,2)

Nota: Desvio padrão percentual entre parêntesis (DP). Estudo realizado nos modos (+): ESI modo positivo e (-): ESI modo negativo (exceto em 3 kV).

Fonte: O autor, 2021.

APÊNDICE A

Tabela 17 - Resultados das intensidades percentuais relativas obtidas no estudo de otimização do Ion Energy 1 e 2 (continuação)

Micotoxina	<i>Ion Energy (IE) 1 / Ion Energy 2</i>					
	1/ 2	1/ 3	2/ 0,1	2/ 1	2/ 2	2/ 3
FB1 (+)	56,0 (9,8)	68,2 (8,0)	35,9 (5,9)	62,4 (0,2)	76,0 (2,6)	98,3 (2,3)
HFB1 (+)	56,1 (0,9)	73,6 (6,8)	29,6 (0,6)	53,9 (0,4)	79,7 (5,9)	100 (2,0)
FB2 (+)	50,3 (0,6)	66,6 (7,0)	31,4 (4,0)	69,6 (2,9)	80,6 (0,7)	100 (3,9)
HFB2 (+)	57,2 (0,6)	69,6 (6,0)	30,7 (0,4)	58,1 (1,9)	81,3 (2,8)	100 (1,1)
DON (+)	87,7 (4,2)	88,5 (3,5)	45,5 (0,2)	68,2 (3,4)	89,0 (4,9)	100 (2,7)
DON-3-G (-)	82,5 (9,9)	88,6 (2,3)	49,9 (3,9)	73,6 (0,6)	96,2 (7,9)	100 (9,6)
3-ADON (+)	93,4 (2,1)	93,9 (0,0)	45,3 (0,1)	72,3 (0,1)	86,1 (7,6)	92,5 (2,3)
15-ADON (+NH ₄)	87,7 (2,7)	100,0 (2,0)	38,1 (6,8)	63,8 (5,4)	93,7 (0,4)	93,1 (3,3)
AFM1 (+)	95,4 (0,1)	98,4 (2,9)	62,8 (1,3)	86,3 (0,2)	98,8 (1,2)	97,7 (1,7)
AFG2 (+)	97,1 (1,5)	100,0 (2,8)	63,1 (0,3)	84,8 (0,3)	97,9 (1,1)	99,7 (0,8)
AFG1 (+)	96,0 (1,3)	99,4 (5,0)	59,5 (2,3)	83,7 (0,7)	96,2 (1,0)	97,9 (0,6)
AFB2 (+)	93,0 (2,0)	96,9 (4,0)	58,5 (2,3)	84,8 (0,0)	97,5 (0,8)	99,4 (0,2)
AFB1 (+)	90,1 (0,2)	94,1 (3,2)	54,5 (1,6)	81,8 (1,7)	94,9 (1,3)	96,3 (1,7)
OTA (+)	99,6 (2,6)	100,0 (4,4)	59,6 (0,0)	85,4 (1,0)	97,6 (0,1)	98,3 (1,2)
ZEA (-)	61,6 (2,7)	69,4 (1,8)	11,3 (0,6)	56,8 (0,6)	86,2 (1,8)	100,0 (1,0)
STG (+)	90,3 (0,5)	91,1 (1,4)	65,7 (1,2)	87,6 (0,8)	94,2 (0,0)	93,2 (0,1)
AOH (+)	84,2 (8,1)	93,4 (3,8)	51,7 (4,5)	64,0 (4,0)	77,2 (1,7)	70,5 (4,7)
AME (+)	100,0 (3,6)	95,6 (5,2)	60,4 (4,6)	85,9 (0,8)	89,9 (1,3)	89,1 (0,7)
DON (-)	59,7 (0,4)	68,2 (4,3)	5,1 (0,2)	38,6 (1,6)	65,3 (1,2)	81,2 (3,4)
DON-3-G (+)	61,8 (1,5)	67,1 (5,3)	29,2 (4,2)	56,2 (0,2)	66,5 (3,3)	69,0 (6,4)
3-ADON (-)	73,9 (5,2)	78,8 (1,5)	5,5 (4,6)	38,5 (0,2)	84,8 (1,7)	100,0 (12,7)
15-ADON (+)	67,2 (2,7)	63,6 (3,3)	38,5 (1,5)	59,0 (0,8)	67,2 (4,7)	65,4 (2,6)
ZEA (+)	52,6 (2,8)	48,4 (7,0)	29,8 (4,0)	43,8 (4,2)	53,6 (5,4)	51,1 (6,7)

Nota: Desvio padrão percentual entre parêntesis (DP). Estudo realizado nos modos (+): ESI modo positivo e (-): ESI modo negativo (exceto em 3 kV).

Fonte: O autor, 2021.

APÊNDICE A

Tabela 17 - Resultados das intensidades percentuais relativas obtidas no estudo de otimização do Ion Energy 1 e 2 (conclusão)

Micotoxina	<i>Ion Energy (IE) 1 / Ion Energy 2</i>			
	3/ 0,1	3/ 1	3/ 2	3/ 3
FB1 (+)	29,0 (2,6)	59,6 (8,0)	77,6 (0,2)	100 (9,4)
HFB1 (+)	28,0 (0,7)	48,9 (4,5)	75,4 (2,6)	92,3 (3,3)
FB2 (+)	34,9 (0,4)	54,1 (1,7)	89,3 (4,3)	89,7 (10,5)
HFB2 (+)	28,6 (1,0)	51,6 (0,5)	76,1 (0,7)	89,6 (5,3)
DON (+)	45,8 (2,3)	77,4 (4,7)	93,1 (6,0)	94,7 (0,7)
DON-3-G (-)	46,1 (4,1)	71,2 (2,8)	97,2 (2,8)	93,0 (19,3)
3-ADON (+)	53,1 (2,8)	83,8 (1,9)	100,0 (3,3)	99,9 (3,6)
15-ADON (+NH ₄)	45,6 (1,3)	75,1 (10,5)	93,2 (7,0)	97,3 (7,2)
AFM1 (+)	65,2 (0,5)	86,8 (2,9)	99,7 (1,9)	100,0 (2,3)
AFG2 (+)	61,6 (0,4)	84,5 (3,9)	98,1 (1,9)	98,7 (0,9)
AFG1 (+)	61,3 (0,1)	85,1 (1,4)	100,0 (0,8)	99,1 (0,6)
AFB2 (+)	60,6 (0,1)	85,3 (0,6)	98,6 (0,3)	100,0 (5,6)
AFB1 (+)	58,0 (0,7)	82,7 (2,2)	100,0 (0,3)	98,7 (2,6)
OTA (+)	59,1 (1,3)	82,6 (0,3)	93,0 (1,1)	91,9 (1,9)
ZEA (-)	11,3 (0,5)	54,7 (0,4)	86,1 (0,2)	98,5 (0,0)
STG (+)	68,5 (1,6)	86,8 (1,8)	98,3 (1,0)	100,0 (0,0)
AOH (+)	54,4 (1,0)	71,0 (1,7)	79,3 (9,1)	100,0 (15,4)
AME (+)	71,0 (0,9)	98,2 (5,8)	99,3 (4,3)	93,4 (0,0)
DON (-)	5,9 (0,1)	39,3 (1,6)	64,4 (4,0)	100,0 (1,8)
DON-3-G (+)	34,1 (5,5)	50,1 (8,5)	68,1 (2,0)	100,0 (7,9)
3-ADON (-)	3,1 (2,1)	37,2 (0,7)	69,5 (1,7)	88,3 (2,2)
15-ADON (+)	41,7 (1,9)	59,0 (2,6)	65,7 (2,5)	100,0 (0,4)
ZEA (+)	35,8 (2,4)	52,6 (1,5)	64,0 (11,3)	100,0 (0,6)

Nota: Desvio padrão percentual entre parêntesis (DP). Estudo realizado nos modos (+): ESI modo positivo e (-): ESI modo negativo (exceto em 3 kV).

Fonte: O autor, 2021.

APÊNDICE B

Tabela 18 - Resultados das intensidades percentuais relativas obtidas no estudo de otimização da Energia do Capilar

Micotoxina	Energia do Capilar (kV)					
	0,5	1	1,5	2	2,5	3
FB1 (+)	65,2 (0,9)	95,0 (6,6)	100,0 (0,2)	84,3 (9,3)	71,1 (5,6)	76,4 (2,1)
HFB1 (+)	81,9 (1,9)	100,0(2,1)	87,5 (2,2)	76,4 (0,3)	67,7 (0,5)	68,1 (2,8)
FB2 (+)	56,8 (0,6)	97,3 (1,8)	100,0 (7,4)	93,6 (2,9)	81,8 (7,5)	85,1 (1,0)
HFB2 (+)	81,7 (1,8)	100,0(2,3)	88,9 (1,4)	77,7 (0,6)	65,8 (0,4)	67,2 (1,9)
DON (+)	79,3 (7,1)	100,0(5,0)	97,4 (1,1)	93,7 (0,7)	99,5 (1,3)	95,7 (0,9)
DON-3-G (-)	60,3 (1,2)	94,7 (0,8)	100,0 (4,9)	94,7 (1,7)	95,7 (2,7)	96,2 (4,2)
3-ADON (+)	70,3 (5,8)	91,9 (0,0)	96,9 (3,7)	97,0 (0,1)	100,0 (0,8)	99,0 (4,1)
15-ADON (+NH ₄)	90,2 (5,6)	100,0(1,1)	92,7 (0,1)	90,3 (2,6)	83,8 (7,6)	83,6 (11,3)
AFM1 (+)	94,6 (3,6)	100,0(1,4)	85,5 (0,1)	75,3 (1,6)	70,7 (2,7)	63,9 (1,1)
AFG2 (+)	100,0 (1,5)	86,3 (1,4)	63,4 (1,7)	53,4 (0,1)	45,5 (0,9)	41,0 (1,4)
AFG1 (+)	100,0 (3,4)	89,3 (1,2)	67,4 (0,3)	56,3 (0,4)	47,4 (1,2)	42,9 (1,7)
AFB2 (+)	100,0 (4,5)	89,9 (0,2)	68,3 (0,2)	56,4 (0,2)	48,4 (0,5)	43,0 (0,6)
AFB1 (+)	100,0 (4,2)	92,3 (0,6)	70,5 (1,3)	58,5 (0,6)	49,7 (1,0)	43,9 (1,1)
OTA (+)	67,1 (0,0)	100,0(1,0)	99,3 (0,3)	96,9 (5,2)	92,3 (1,4)	86,2 (0,5)
ZEA (-)	99,5 (2,7)	100,0(0,8)	83,9 (1,1)	73,3 (0,7)	63,8 (0,5)	n.d
STG (+)	85,3 (3,5)	100,0(4,1)	88,3 (3,4)	78,0 (3,1)	70,6 (0,5)	68,3 (1,5)
AOH (+)	38,3 (5,0)	68,4 (6,5)	80,0 (5,8)	86,4 (6,2)	100,0 (1,2)	94,7 (3,6)
AME (+)	59,3 (4,7)	94,9 (1,9)	86,2 (2,1)	95,1 (1,2)	100,0 (2,5)	92,8 (8,9)
DON (-)	78,1 (5,5)	100,0(0,7)	99,4 (1,1)	93,0 (0,4)	91,3 (5,8)	88,8 (1,8)
DON-3-G (+)	65,7 (3,8)	90,3 (0,1)	88,4 (1,9)	92,5 (1,3)	100,0 (3,7)	94,6 (0,1)
3-ADON (-)	78,4 (4,4)	100,0(0,4)	85,7 (11,7)	64,3 (1,8)	68,9 (1,2)	67,1 (6,3)
15-ADON (+)	88,3 (1,4)	100,0(2,2)	92,2 (2,5)	90,3 (0,9)	82,6 (2,5)	80,2 (1,6)
ZEA (+)	62,2 (2,1)	81,6 (0,7)	88,9 (4,7)	93,6 (0,4)	96,6 (3,7)	100 (0,4)

Nota: Desvio padrão percentual entre parêntesis (DP). Estudo realizado nos modos (+): ESI modo positivo e (-): ESI modo negativo (exceto em 3 kV). N.d = não determinado.

Fonte: O autor, 2021.

APÊNDICE C

Tabela 19 - Resultados das intensidades percentuais relativas obtidas no estudo de otimização da energia do Cone

Micotoxina	Energia do Cone (Volts)				
	10	20	30	40	50
FB1 (+)	100,0 (7,4)	93,6 (1,9)	97,8 (12,6)	97,2 (0,1)	97,8 (9,3)
HFB1 (+)	97,8 (4,2)	94,0 (4,9)	95,9 (9,8)	100,0 (0,4)	97,6 (3,4)
FB2 (+)	87,4 (4,8)	93,4 (5,3)	96,6 (14,0)	100,0 (1,0)	99,9 (3,4)
HFB2 (+)	96,2 (0,8)	97,6 (3,5)	97,3 (6,6)	100,0 (0,4)	98,7 (2,7)
DON (+)	96,7 (1,2)	95,3 (2,7)	100,0 (6,0)	83,8 (3,0)	44,0 (1,1)
DON-3-G (-)	98,6 (5,5)	100,0 (6,6)	95,6 (0,0)	97,1 (3,2)	95,1 (8,7)
3-ADON (+)	98,4 (4,5)	100,0 (1,9)	98,7 (2,3)	85,2 (1,0)	43,4 (0,1)
15-ADON (+NH ₄)	99,7 (0,7)	100,0 (7,9)	78,7 (4,8)	32,0 (2,4)	5,4 (1,2)
AFM1 (+)	100,0 (0,3)	96,0 (0,6)	96,7 (1,2)	97,0 (2,4)	99,1 (3,0)
AFG2 (+)	99,9 (1,3)	99,1 (3,0)	100,0 (5,0)	98,5 (0,9)	99,1 (1,0)
AFG1 (+)	97,2 (2,5)	97,0 (2,5)	97,5 (0,5)	98,7 (1,8)	100,0 (2,5)
AFB2 (+)	98,3 (3,3)	100,0 (0,8)	99,3 (1,7)	97,9 (5,0)	97,2 (4,6)
AFB1 (+)	100,0 (2,1)	96,6 (0,1)	96,5 (2,6)	96,0 (4,6)	97,5 (1,4)
OTA (+)	100,0 (1,8)	96,8 (0,6)	96,7 (3,7)	97,9 (4,2)	92,4 (0,2)
ZEA (-)	100,0 (1,9)	97,0 (0,6)	96,8 (2,5)	95,4 (2,7)	98,1 (2,1)
STG (+)	97,2 (2,9)	100,0 (3,0)	95,5 (4,6)	93,6 (6,1)	91,1 (0,3)
AOH (+)	91,6 (7,0)	100,0 (8,3)	95,1 9 (0,4)	87,7 (3,9)	82,9 (0,2)
AME (+)	100,0 (4,0)	93,8 (0,9)	91,1 (5,2)	96,4 (0,9)	96,2 (2,0)
DON (-)	95,7 (3,0)	100,0 (0,3)	92,9 (2,3)	87,1 (0,2)	40,5 (0,5)
DON-3-G (+)	100,0 (2,7)	87,6 (5,3)	99,0 (0,7)	89,7 (3,7)	65,0 (4,9)
3-ADON (-)	94,0 (8,1)	100,0 (8,5)	93,7 (8,1)	75,3 (2,3)	25,9 (5,8)
15-ADON (+)	100,0 (1,0)	96,7 (8,2)	96,4 (0,9)	75,0 (1,7)	34,1 (0,2)
ZEA (+)	100,0 (8,0)	98,8 (6,3)	90,7 (2,8)	83,8 (4,4)	61,4 (0,5)

Nota: Desvio padrão percentual entre parêntesis. Estudo realizado nos modos (+): ESI modo positivo e (-): ESI modo negativo.

Fonte: O autor, 2021.

APÊNDICE D

Tabela 20 - Resultados das intensidades percentuais relativas obtidas no estudo de otimização da temperatura do gás de dessolvatação

Micotoxina	Temperatura do Gás de Dessolvatação (°C)		
	300	400	500
FB1 (+)	80,7 (7,2)	98,8 (0,1)	100,0 (2,8)
HFB1 (+)	40,0 (1,1)	62,4 (2,1)	100,0 (4,9)
FB2 (+)	80,8 (0,6)	100,0 (0,2)	95,8 (1,2)
HFB2 (+)	69,8 (2,3)	88,2 (2,8)	100,0 (3,2)
DON (+)	54,1 (1,2)	73,4 (1,2)	100,0 (3,4)
DON-3-G (-)	15,4 (0,1)	100,0 (2,9)	48,8 (0,6)
3-ADON (+)	73,1 (1,5)	75,8 (0,3)	100,0 (1,5)
15-ADON (+NH ₄)	77,1 (3,4)	100,0 (4,9)	66,9 (4,2)
AFM1 (+)	56,0 (0,7)	74,6 (0,7)	100,0 (1,9)
AFG2 (+)	55,4 (0,6)	71,5 (0,5)	100,0 (0,4)
AFG1 (+)	59,3 (0,7)	73,8 (0,8)	100,0 (0,4)
AFB2 (+)	60,9 (0,3)	76,6 (2,0)	100,0 (2,0)
AFB1 (+)	65,4 (1,0)	80,1 (0,3)	100,0 (1,2)
OTA (+)	52,6 (0,9)	76,3 (1,4)	100,0 (2,8)
ZEA (-)	62,1 (4,7)	80,7 (8,7)	100,0 (2,8)
STG (+)	54,0 (3,4)	78,3 (3,3)	100,0 (0,7)
AOH (+)	19,9 (2,4)	46,9 (0,7)	100,0 (0,2)
AME (+)	32,8 (1,8)	66,0 (8,0)	100,0 (0,0)
DON (-)	63,7 (0,2)	90,1 (2,5)	100,0 (0,6)
DON-3-G (+)	62,4 (1,8)	98,5 (1,0)	100,0 (3,5)
3-ADON (-)	73,2 (1,6)	100,0 (6,4)	96,4 (2,3)
15-ADON (+)	70,4 (0,5)	94,6 (2,2)	100,0 (0,1)
ZEA (+)	50,3 (2,3)	63,7 (1,8)	100,0 (2,6)

Nota: Desvio padrão percentual entre parêntesis. Estudo realizado nos modos (+): ESI modo positivo e (-): ESI modo negativo.

Fonte: O autor, 2021.

APÊNDICE E

Tabela 21 - Resultados das intensidades percentuais relativas obtidas no estudo de otimização fluxo do gás de dessolvatação

Micotoxina	Fluxo do Gás de Dessolvatação (L/Hr)		
	500	750	1000
FB1 (+)	76,5 (0,5)	100,0 (7,2)	86,6 (4,3)
HFB1 (+)	76,7 (1,4)	100,0 (1,4)	96,9 (6,9)
FB2 (+)	95,0 (3,1)	100,0 (2,4)	99,2 (0,1)
HFB2 (+)	78,2 (2,0)	97,7 (1,3)	100,0 (4,4)
DON (+)	43,1 (3,8)	86,1 (2,1)	100,0 (1,9)
DON-3-G (-)	94,8 (0,6)	100,0 (0,2)	94,2 (0,4)
3-ADON (+)	60,9 (2,2)	93,9 (1,8)	100,0 (1,0)
15-ADON (+NH4)	100,0 (13,9)	98,0 (3,5)	75,4 (5,7)
AFM1 (+)	90,3 (0,3)	97,5 (2,2)	100,0 (0,1)
AFG2 (+)	96,7 (1,5)	100,0 (4,7)	99,7 (4,4)
AFG1 (+)	94,2 (0,8)	100,0 (3,3)	99,0 (1,6)
AFB2 (+)	99,9 (0,5)	100,0 (4,3)	97,9 (1,4)
AFB1 (+)	97,2 (1,2)	100,0 (2,3)	95,8 (2,4)
OTA (+)	90,3 (0,5)	99,3 (3,2)	100,0 (0,3)
ZEA (-)	96,7 (2,4)	100,0 (1,4)	95,3 (2,7)
STG (+)	90,9 (2,0)	100,0 (0,8)	94,7 (3,7)
AOH (+)	31,6 (1,5)	83,4 (4,9)	100,0 (0,7)
AME (+)	57,2 (3,5)	100,0 (0,8)	97,7 (0,8)
DON (-)	99,3 (3,5)	100,0 (0,6)	97,6 (7,3)
DON-3-G (+)	75,0 (5,6)	92,8 (1,9)	100,0 (1,1)
3-ADON (-)	100,0 (4,6)	83,7 (7,7)	70,2 (1,2)
15-ADON (+)	73,1 (3,3)	100,0 (2,0)	99,3 (3,7)
ZEA (+)	57,9 (1,32)	90,1 (5,8)	100,0 (0,4)

Nota: Desvio padrão percentual entre parêntesis. Estudo realizado nos modos (+): ESI modo positivo e (-): ESI modo negativo.

Fonte: O autor, 2021.

APÊNDICE F

Tabela 22 - Resultado de %REC (%RSD) obtidos dos diferentes procedimentos de extração (continua)

Micotoxina	Procedimento de Extração							
	1	2	3	4	5	6	7	8
FB1	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	12,78 (1,6)	7,56 (1,9)	15,79 (37,6)	4,4 (17,2)	53,9 (8,3)	21,9 (13,3)
HFB1	67,2 (1,1)	41,4 (1,5)	47,3 (1,3)	38,1 (1,8)	69,7 (1,8)	38,9 (24,3)	69,8 (1,9)	46,1 (10,2)
FB2	0,9 (10,1)	0,0 (0,0)	26,2 (2,5)	12,7 (2,6)	26,2 (43,2)	5,9 (8,2)	67,5 (5,1)	28,4 (11,2)
HFB2	61,6 (4,8)	44,5 (2,8)	62,0 (2,6)	46,6 (0,8)	65,2 (6,3)	34,4 (28,5)	75,9 (0,7)	44,1 (18,1)
DON	93,1 (0,7)	80,5 (1,6)	84,1 (1,0)	74,9 (3,7)	92,6 (8,6)	78,0 (5,0)	87,3 (0,8)	81,5 (1,9)
Don-3G	33,8 (4,9)	20,6 (2,9)	24,6 (3,5)	19,5 (5,1)	39,3 (23,1)	20,2 (4,3)	39,9 (5,7)	28,3 (6,3)
3ADon	91,4 (3,4)	86,8 (2,4)	85,7 (2,7)	83,7 (1,5)	99,1 (9,6)	85,9 (5,4)	96,8 (3,3)	83,0 (6,7)
15ADon	88,5 (5,3)	96,7 (5,9)	84,0 (10,7)	89,8 (7,6)	106,9 (4,4)	109,3 (7,1)	91,9 (12,0)	95,6 (6,7)
AFM1	97,1 (2,8)	91,2 (1,4)	88,6 (1,3)	79,5 (1,3)	98,4 (9,7)	94,6 (3,2)	102,4 (3,3)	92,4 (4,1)
AFG2	107,5 (4,4)	99,4 (2,6)	95,5 (1,9)	83,8 (1,9)	96,2 (9,4)	102,7 (4,8)	103,0 (3,1)	91,1 (3,7)
AFG1	119,7 (1,9)	108,5 (0,4)	109,8 (2,5)	94,5 (0,6)	109,9 (10,9)	130,9 (3,4)	125,3 (2,0)	102,6 (3,9)
AFB2	96,3 (1,9)	83,5 (0,6)	89,2 (1,5)	80,4 (3,0)	93,4 (9,5)	89,7 (5,1)	97,4 (2,7)	81,1 (4,3)
AFB1	110,1 (2,5)	103,7 (1,4)	100,9 (0,8)	88,7 (0,7)	104,7 (10,9)	113,7 (3,4)	111,5 (2,3)	94,7 (6,1)
OTA	56,2 (4,2)	46,6 (2,4)	84,5 (3,8)	79,9 (3,1)	92,3 (10,4)	80,9 (9,4)	97,7 (2,1)	81,9 (3,3)
ZEA	92,5 (0,8)	86,7 (2,0)	93,0 (1,7)	81,7 (1,0)	92,8 (5,8)	95,0 (12,9)	97,5 (1,1)	92,2 (1,5)
STG	102,7 (0,2)	96,4 (1,2)	93,1 (1,4)	79,7 (0,7)	88,4 (8,8)	112,7 (9,7)	96,7 (0,5)	93,6 (5,6)
AOH	95,4 (2,8)	89,8 (4,9)	75,3 (7,0)	80,4 (1,7)	87,1 (10,1)	107,3 (14,7)	58,1 (2,2)	73,3 (2,3)
AME	81,1 (2,2)	77,9 (5,3)	77,7 (2,1)	70,1 (3,4)	82,1 (7,2)	72,9 (10,5)	79,5 (3,2)	79,3 (0,7)

Fonte: O autor, 2021.

APENDICE F

Tabela 22 - Resultado de %REC (%RSD) obtidos dos diferentes procedimentos de extração (conclusão)

Micotoxina	Procedimento de Extração							
	9	10	11	12	13	14	15	16
FB1	68,0 (11,6)	45,0 (4,4)	48,2 (11,1)	23,8 (13,1)	69,1 (8,9)	72,06 (6,3)	52,1 (25,2)	39,9 (26,9)
HFB1	51,6 (15,9)	47,4 (2,9)	41,3 (41,3)	38,5 (23,2)	55,9 (18,5)	63,6 (9,7)	37,7 (34,1)	37,9 (19,1)
FB2	74,1 (4,0)	51,5 (5,9)	62,0 (3,7)	30,7 (7,7)	71,1 (3,8)	71,2 (4,1)	61,5 (14,9)	48,6 (18,7)
HFB2	73,0 (7,1)	60,0 (0,2)	57,6 (23,6)	57,8 (13,4)	70,3 (13,9)	79,0 (11,1)	53,7 (26,0)	56,1 (12,8)
DON	72,6 (11,9)	73,2 (0,9)	69,2 (16,9)	76,1 (9,6)	71,5 (10,2)	80,6 (5,5)	62,2 (7,1)	55,9 (11,7)
Don-3G	21,8 (12,26)	17,5 (8,2)	26,1 (11,6)	20,3 (14,6)	32,4 (10,2)	29,5 (15,3)	24,2 (22,1)	16,5 (23,6)
3ADon	83,3 (7,94)	84,7 (2,0)	80,2 (6,8)	81,7 (7,8)	81,6 (7,2)	91,0 (6,1)	64,5 (3,0)	70,6 (11,2)
15ADon	88,8 (6,65)	89,9 (5,4)	108,0 (22,6)	91,3 (8,2)	92,5 (9,9)	80,8 (17,3)	78,2 (2,5)	79,0 (8,1)
AFM1	92,4 (2,48)	87,0 (1,3)	87,5 (8,7)	92,0 (3,8)	93,6 (8,3)	92,7 (3,0)	71,3 (2,4)	75,0 (3,8)
AFG2	94,2 (4,25)	92,8 (0,8)	93,3 (8,3)	99,9 (6,4)	108,2 (4,9)	101,2 (4,0)	82,3 (0,4)	85,5 (3,8)
AFG1	74,3 (23,90)	94,8 (2,8)	53,9 (72,5)	82,8 (12,6)	94,5 (28,4)	90,1 (14,9)	12,1 (45,4)	30,3 (58,7)
AFB2	95,7 (3,90)	89,8 (1,1)	89,5 (6,9)	81,5 (11,0)	90,1 (8,8)	93,9 (2,3)	76,7 (1,4)	83,6 (2,1)
AFB1	76,3 (24,85)	90,1 (1,3)	49,8 (80,0)	72,0 (20,4)	72,8 (31,1)	85,8 (19,3)	12,3 (45,2)	31,2 (59,7)
OTA	85,7 (1,78)	91,9 (3,2)	97,1 (5,1)	83,8 (2,9)	84,5 (4,3)	87,4 (1,9)	81,8 (0,7)	81,1 (1,9)
ZEA	90,3 (8,58)	86,5 (4,1)	95,5 (1,2)	88,4 (3,1)	84,4 (9,6)	102,0 (2,6)	85,9 (2,4)	81,3 (7,0)
STG	75,0 (14,78)	81,7 (1,1)	49,3 (67,9)	72,3 (23,3)	66,0 (30,4)	86,0 (20,5)	18,0 (39,8)	34,2 (43,6)
AOH	80,3 (6,02)	76,6 (6,3)	70,6 (2,5)	86,7 (11,0)	82,8 (1,9)	85,0 (3,4)	68,6 (1,1)	65,4 (11,4)
AME	68,0 (13,79)	72,2 (2,7)	87,7 (15,1)	73,6 (2,4)	56,1 (8,7)	78,3 (6,1)	66,8 (8,5)	61,2 (4,8)

Fonte: O autor, 2021.

APÊNDICE G

Tabela 23 - Resultado do experimento de efeito matriz

	Procedimentos de extração															
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
FB1	-0,6	5,3	6,6	8,8	10,4	6,2	43,4	10,5	17,1	23,6	19,9	8,5	18,8	15,6	28,2	25,6
HFB1	19,9	32,6	39,6	39,1	40,3	31,6	56,5	27,8	31,0	35,3	31,7	25,8	35,5	26,0	44,3	45,4
FB2	-6,0	6,5	4,7	1,1	-4,9	5,3	21,7	3,0	8,2	6,7	5,0	7,7	11,0	1,3	11,2	8,6
HFB2	-9,5	15,8	10,1	11,8	36,0	28,9	49,4	30,7	31,5	38,7	47,1	31,7	44,9	33,7	49,4	40,6
DON	-4,7	-5,1	-5,4	-8,8	-11,2	-4,6	-11,8	-3,0	-5,5	-15,3	-18,9	-13,6	-19,9	-26,1	-18,0	-15,6
Don-3G	-1,7	-4,7	-3,6	-2,0	3,1	-1,1	5,5	-2,4	7,4	1,0	4,9	4,2	6,7	-8,6	3,0	5,1
3ADon	8,5	0,0	13,1	1,2	-2,3	6,6	3,1	19,6	14,2	-3,6	3,4	8,2	-2,9	-3,3	10,5	-5,2
15ADon	8,9	-0,3	25,7	-11,3	-14,9	7,6	25,8	-1,8	-0,8	-13,7	-33,8	-13,0	-24,0	5,6	-7,0	-27,1
AFM1	24,7	-4,5	2,5	-0,1	1,2	-3,8	-5,9	18,5	-6,8	-8,6	-4,3	-7,0	-18,9	-20,3	-5,6	-10,6
AFG2	5,3	-20,4	-15,3	-14,9	-16,5	-20,5	-21,8	19,9	-25,7	-27,0	-26,0	-22,6	-42,1	-40,9	-30,4	-29,6
AFG1	-27,6	-45,0	-46,6	-43,8	-50,1	-55,3	-57,5	-21,9	-47,8	-51,9	-60,5	-52,4	-70,9	-66,0	-59,5	-55,8
AFB2	-49,2	-22,1	-22,6	-24,7	-33,1	-24,2	-32,6	10,2	-41,0	-38,2	-39,2	-25,5	-46,6	-48,3	-41,9	-42,8
AFB1	-54,8	-33,1	-30,0	-24,8	-30,7	-37,0	-38,9	-9,9	-35,0	-41,5	-46,9	-32,8	-45,8	-49,1	-38,8	-39,1
OTA	-59,0	-23,7	-27,9	-24,5	-23,4	-19,3	-25,6	-15,3	-30,1	-34,0	-32,5	-33,6	-45,0	-35,8	-38,7	-39,7
ZEA	-63,0	-41,5	-40,1	-38,6	-38,3	-45,5	-36,7	-16,0	-35,1	-37,2	-37,4	-34,2	-38,0	-43,2	-34,9	-40,0
STG	-58,2	-26,2	-24,9	-19,9	-24,1	-47,3	-27,3	-18,9	-27,7	-31,4	-40,6	-30,9	-31,1	-36,7	-25,6	-27,1
AOH	-61,4	27,6	31,4	3,1	36,3	49,2	79,1	-5,9	35,7	12,5	44,0	23,8	8,9	-2,4	23,5	57,6
AME	-51,1	-21,9	-20,9	-18,5	-33,5	-29,4	-23,0	-7,6	-6,0	-33,8	-29,1	-22,6	-6,7	-32,6	-9,5	-14,1

Fonte: O autor, 2021.

APÊNDICE H

Tabela 24 - Limites de detecção para as matrizes avaliadas (ng/g)

Micotoxinas	Castanha de Caju	Baru	Pistache	Amendoim	Macadamia	Avela	Castanha do Brasil	Amendoa	Pinhao
AOH	0,18	0,40	0,19	0,12	0,17	0,26	0,08	0,12	0,07
AME	n.d	0,56	0,27	0,14	0,24	0,22	0,19	0,06	0,01
DON	n.d	0,59	0,26	0,09	0,21	0,51	0,11	0,07	0,16
AFB1	0,0083	0,02	0,03	0,03	0,01	0,02	0,02	0,01	0,01
AFB2	0,0081	0,04	0,01	0,02	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
STG	0,0012	0,00	0,00	0,04	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
AFG1	0,0060	0,02	0,01	0,01	0,00	0,01	0,00	0,00	0,01
AFM1	0,0070	0,03	0,02	0,02	0,00	0,02	0,01	0,00	0,00
AFG2	0,015	0,06	0,07	0,08	0,02	0,01	0,01	0,01	0,01
3ADON	0,04	0,15	0,16	0,16	0,11	0,14	0,10	0,03	0,05
15ADON	0,04	n.d	0,66	0,79	0,18	0,24	0,21	0,10	0,09
OTA	0,0144	0,02	0,04	0,02	0,03	0,02	0,01	0,01	0,02
ZEA	0,02	0,12	0,02	0,03	0,01	0,02	0,01	0,01	0,02
HFB2	0,02	0,13	0,06	0,16	0,14	0,44	0,02	0,03	0,03
HFB1	0,03	0,05	0,05	0,10	0,05	0,04	0,05	0,02	0,08
FB2	0,01	0,02	0,02	0,07	0,03	0,02	0,02	0,01	0,03
FB1	0,03	0,10	0,07	0,03	0,03	0,10	0,04	0,06	0,04

n.d = Não determinado

Fonte: O autor, 2021.

APÊNDICE I

Tabela 25- Limites de quantificação para as matrizes avaliadas (ng/g)

Micotoxinas	Caju	Baru	Pistache	Amendoim	Macadamia	Avela	C.Brasil	Amendoa	Pinhao
AOH	0,59	1,34	0,62	0,41	0,58	0,87	0,25	0,39	0,24
AME	n.d	1,87	0,89	0,48	0,80	0,75	0,64	0,20	0,03
DON	n.d	1,98	0,88	0,30	0,69	1,71	0,36	0,22	0,54
AFB1	0,0276	0,07	0,09	0,10	0,04	0,06	0,05	0,04	0,03
AFB2	0,027	0,13	0,04	0,06	0,05	0,02	0,02	0,03	0,02
STG	0,0040	0,01	0,01	0,12	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
AFG1	0,020	0,08	0,03	0,05	0,01	0,03	0,01	0,01	0,02
AFM1	0,023	0,09	0,06	0,06	0,02	0,06	0,02	0,01	0,02
AFG2	0,051	0,20	0,24	0,26	0,06	0,04	0,03	0,04	0,03
3ADON	0,14	0,51	0,54	0,54	0,36	0,47	0,33	0,09	0,18
15ADON	0,14	n.d	2,18	2,62	0,61	0,80	0,70	0,35	0,30
OTA	0,048	0,054	0,14	0,052	0,084	0,061	0,032	0,040	0,053
ZEA	0,083	0,39	0,08	0,10	0,04	0,08	0,03	0,04	0,07
HFB2	0,07	0,43	0,21	0,55	0,46	1,46	0,07	0,12	0,11
HFB1	0,10	0,16	0,15	0,33	0,17	0,14	0,16	0,05	0,28
FB2	0,03	0,06	0,05	0,23	0,08	0,07	0,07	0,05	0,11
FB1	0,10	0,33	0,23	0,12	0,10	0,32	0,15	0,21	0,12

n.d = Não determinado.

Fonte: O autor, 2021.