

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DOS ALIMENTOS

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS PARA MULTI-TOXINAS POR  
CROMATOGRÁFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA ACOPLADA À  
ESPECTRÔMETRO DE MASSA / MASSA**

**Dissertação apresentada ao Curso de Pós-graduação em Ciência dos Alimentos do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciência dos Alimentos.**

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. PhD Vildes M. Scussel

José Júnior Mendonça Xavier

2007

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por guiar-me pelos caminhos que me levaram até este momento, tão importante em minha vida.

Aos meus pais pelo apoio e esforço para a concretização das minhas realizações.

A Prof<sup>a</sup> Vildes M. Scussel, pelo reconhecimento, oportunidades e incentivo para que o meu crescimento seja incessante.

A minha noiva Thaís pela paciência, apoio e força nos momentos difíceis e em todo o período de realização deste trabalho.

Ao pessoal do LABMICO, que mais do que amigos são uma segunda família.

Ao Dr. Shepard da Promec, África do Sul, e à Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ) pela doação dos padrões de fumonisinas B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> e de citrinina.

Ao Dr. Spanjer (VWA-Holanda) e Dr<sup>a</sup>. Silvia Hesnik (Universidade Nacional de Buenos Aires-Argentina) pela doação dos padrões de tricotecenos.

À equipe da Applied Biosystems do Brasil por toda a orientação técnica para a operação do sistema LC-MS/MS.

## RESUMO

Métodos utilizando cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrômetro de massa/massa (LC-MS/MS) foram desenvolvidos para diferentes grupos de micotoxinas e avaliados em castanha-do-Brasil. (a) **Desenvolvimento de um Método para Determinação de Aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, e G<sub>2</sub> por LC-MS/MS em castanhas-do-Brasil.** O primeiro método foi desenvolvido utilizando ionização química à pressão atmosférica (APCI) no modo positivo  $[M+H]^+$ , para determinação simultânea das aflatoxinas (AFLs) B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, e G<sub>2</sub> em castanhas-do-Brasil. Através da monitoração de múltiplas reações foi possível analisar as transições das AFLs aumentando assim a especificidade e sensibilidade. A separação das AFLs foi realizada utilizando uma coluna C<sub>8</sub> e um gradiente de fase móvel composta por água:metanol (ambos com 25 mM de acetato de amônia) em um tempo total de corrida de 7 minutos. A extração das toxinas foi conduzida utilizando uma solução de acetonitrila:água (80:20) e não foi utilizada etapa de limpeza. Os valores de limite de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ) do método para AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub> e AFG<sub>2</sub> foram 0.04; 0.045; 0.050 e 0.060  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  e 0.08, 0.09, 0.10 e 0.12  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  respectivamente. Os coeficientes de correlação para as toxinas foram excelentes e a linearidade foi obtida em uma faixa de 0.005, 0.02 0.25 e 0.04 até 0.5, 2.0, 25 e 4.0  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  para cada toxina respectivamente. Os componentes da matriz não influenciaram a detecção e quantificação das AFLs. Os valores de recuperação ficaram entre 92 e 100 % e valor do  $\Sigma\text{AFLs}$  obtidos a partir de amostras naturalmente contaminadas esteve entre 1.2 à 11.5  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ . (b) **Desenvolvimento de Métodos para 15 Micotoxinas por LC-MS/MS Utilizando Ionização Química por Pressão Atmosférica e por Eletrospray.** Neste estudo dois métodos foram desenvolvidos para quantificação de 15 micotoxinas APCI e eletrospray (ESI) como fontes de ionização. A separação foi realizada utilizando uma coluna C<sub>18</sub> e gradientes de fase móvel compostas de metanol:água (ambos com 25 mM e acetato de amônia). As toxinas estudadas foram AFLs, citrinina (CTR), fumonisinas (FB<sub>1</sub> e FB<sub>2</sub>), ocratoxina A (OTA), tricotecenos (NEO; 15ADON; 3ADON; DAS; HT<sub>2</sub>; T<sub>2</sub>) e zearalenona (ZON). Os tempos cromatográficos para os métodos foram de 11.5 e 9.5 minutos para APCI e ESI respectivamente. APCI não foi capaz de ionizar FB<sub>1</sub>; FB<sub>2</sub>; CTR e OTA e a ESI não foi capaz de ionizar as AFLs. Os LOQs utilizando APCI foram 0.25, 2.5, 0.7, 0.01, 0.015, 0.015, 0.02, 0.2, 1.0, 0.5 e 0.05  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  para NEO; 15ADON; 3ADON; AFB<sub>1</sub>; AFB<sub>2</sub>; AFG<sub>1</sub>; AFG<sub>2</sub>; DAS; HT<sub>2</sub>, T<sub>2</sub> e ZON respectivamente. Utilizando ESI, os LOQs foram de 0.1, 1.5, 0.14, 0.04, 0.08, 0.1, 0.2, 0.08, 2.5, 0.08 e 0.05  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  para NEO; 15ADON; 3ADON; DAS; HT<sub>2</sub>; T<sub>2</sub>; FB<sub>1</sub>; FB<sub>2</sub>; CTR; OTA e ZON respectivamente. Sete micotoxinas foram ionizadas pelas duas fontes de ionização. Todavia, os LOQs foram menores utilizando ESI. Os dois métodos desenvolvidos mostraram vantagens e desvantagens quando comparados e a escolha da fonte de ionização dependerá do objetivo do estudo. Os dois estudos confirmaram o uso da espectrometria de massas como uma das melhores ferramentas para análise de micotoxinas em alimentos, especialmente devido às restrições das legislações internacionais.

## ABSTRACT

Liquid chromatography with mass/ mass spectrometry (LC-MS/MS) methods were developed for mycotoxins of different groups and evaluated in dried Brazil-nut matrices. (a) **Development of a LC-MS/MS Method for the Determination of Aflatoxins B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, and G<sub>2</sub> in Brazil Nut.** The first method was developed using atmospheric pressure chemical ionization in the positive mode  $[M+H]^+$ , for simultaneous determination of the aflatoxins (AFLs): AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub> and AFG<sub>2</sub> in Brazil nuts matrix. By means of multiple reaction monitoring it was possible to analyze the AFLs fragment ions to increase specificity and sensitivity. The separation of the toxins was carried out in a C<sub>8</sub> column with gradient mobile phase composed of water:methanol (25 mM ammonium acetate) in a total run time of 7.0 min. The toxin extraction solvent was acetonitrile:water (80:20) and no clean up was required for the Brazil nut samples. The method values of LOD and LOQ for AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub> and AFG<sub>2</sub> were 0.04; 0.045; 0.050 and 0.060  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ ; 0.08, 0.09, 0.10 and 0.12  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ , respectively. The toxins correlation coefficients were excellent and the linearity obtained was over the range of 0.005, 0.02 0.25 and 0.04 to 0.5, 2.0, 25 and 4.0  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  for each toxin, respectively. The Brazil nut matrix did not influence the AFLs detection and quantification. The method recoveries from the Brazil nuts were between 92 and 100% and  $\Sigma\text{AFL}$  levels obtained from naturally contaminated samples ranged from 1.2 to 11.5  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ . (b) **Development of Methods for 15 Mycotoxins by LC-MS/MS Using Atmospheric Pressure Chemical and Electrospray Ionizations.** In this study, two methods were developed for quantification of 15 mycotoxins in a single injection using atmospheric pressure chemical ionization (APCI) and eletrospray ionization (ESI) as ionization sources and compared. The separation was performed using a C<sub>18</sub> column and the mobile phase solvents used were methanol and water (both with 25 mM of ammonium acetate). The toxin studied were: AFLs (AFB<sub>1</sub>; AFB<sub>2</sub>; AFG<sub>1</sub>; AFG<sub>2</sub>), CTR, fumonisins (FB<sub>1</sub>; FB<sub>2</sub>), OTA, trichotecenes (NEO; 15ADON; 3ADON; DAS; HT<sub>2</sub>; T<sub>2</sub>) and ZON. The chromatography time for methods using APCI and ESI was 11.5 and 9.5 min, respectively. The mycotoxins that were able to be ionized by APCI were NEO; 15ADON; 3ADON; AFB<sub>1</sub>; AFB<sub>2</sub>; AFG<sub>1</sub>; AFG<sub>2</sub>; DAS; HT<sub>2</sub> and T<sub>2</sub> (positive mode) and ZON (negative mode). ESI ionized NEO; 15ADON; 3ADON; DAS; HT<sub>2</sub>; T<sub>2</sub>; FB<sub>1</sub>; FB<sub>2</sub>; CTR and OTA (positive mode) and ZON (negative mode). The limits of quantification (LOQ) using APCI were 0.25, 2.5, 0.7, 0.01, 0.015, 0.015, 0.02, 0.2, 1.0, 0.5 and 0.05  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  for NEO; 15ADON; 3ADON; AFB<sub>1</sub>; AFB<sub>2</sub>; AFG<sub>1</sub>; AFG<sub>2</sub>; DAS; HT<sub>2</sub> and T<sub>2</sub> and ZON respectively. Using ESI were 0.1, 1.5, 0.14, 0.04, 0.08, 0.1, 0.2, 0.08, 2.5, 0.08 and 0.05  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  for NEO; 15ADON; 3ADON; DAS; HT<sub>2</sub>; T<sub>2</sub>; FB<sub>1</sub>; FB<sub>2</sub>; CTR; OTA and ZON respectively. Seven mycotoxins were ionized by both IS. However their LOQ were lower using ESI. Aflatoxins were ionized only by APCI. The methodologies developed with the two IS showed different advantages. IS selection will depend on the study purposes. The two studies confirmed the use of MS spectrometry as one of the best tools for mycotoxin analysis in food, especially due to the very restrict international regulation.

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 2.1-</b> Métodos oficiais da AOAC e IUPAC para determinação de micotoxinas.....	41
<b>Tabela 2.2-</b> Métodos analíticos desenvolvidos para AFLs por LC-MS/MS reportados na literatura .....	61
<b>Tabela 2.3-</b> Métodos analíticos desenvolvidos para FBs por LC-MS/MS reportados na literatura.....	62
<b>Tabela 2.4-</b> Métodos analíticos desenvolvidos para OTA por LC-MS/MS reportados na literatura .....	68
<b>Tabela 2.5-</b> Métodos analíticos desenvolvidos para PTL por LC-MS/MS reportados na literatura.....	69
<b>Tabela 2.6-</b> Métodos analíticos desenvolvidos para tricotecenos por LC-MS/MS reportados na literatura .....	73
<b>Tabela 2.7-</b> Métodos analíticos desenvolvidos para ZON por LC-MS/MS reportados na literatura .....	75
<b>Tabela 2.8-</b> Métodos analíticos desenvolvidos para multitoxinas por LC-MS/MS reportados na literatura .....	78
<b>Tabela 2.9-</b> Legislações para micotoxinas em alimentos para animais e humanos.....	80
<b>Tabela 3.1</b> - Íons pai (precursores), transições e parâmetros de MS/MS otimizados para as AFLs.....	97
<b>Tabela 3.2</b> - Valores instrumentais de LOD, LOQ e $R^2$ .....	99
<b>Tabela 3.3</b> - Detecção de aflatoxinas e repetibilidade em castanha-do-Brasil artificialmente contaminadas com diferentes concentrações .....	110
<b>Tabela 4.1-</b> Concentração dos diferentes padrões e os solventes utilizados.....	123
<b>Tabela 4.2</b> Íons precursores, transições e parâmetros otimizados para as micotoxinas ionizadas por APCI .....	126
<b>Tabela 4.3-</b> Íons precursores, transições e parâmetros otimizados para as micotoxinas ionizadas por ESI.....	126
<b>Tabela 4.4-</b> Gradiente de fase móvel para os métodos por LC-MS/MS utilizando	

APCI e ESI.....	128
<b>Tabela 4.5-</b> Tempo de retenção individual para as micotoxinas utilizando APCI e ESI.....	128
<b>Table 4.6-</b> Valores de LOD, LOQ, DW e $R^2$ para todas as micotoxinas utilizando APCI e ESI como fontes de ionização.....	132

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 2.1-</b> Estruturas químicas das principais aflatoxinas encontradas em alimentos.....	20
<b>Figura 2.2-</b> Estrutura química da citrinina.....	21
<b>Figura 2.3-</b> Estrutura química das principais fumonisinas.....	23
<b>Figura 2.4-</b> Estrutura química das principais ocratoxinas.....	25
<b>Figura 2.5-</b> Estrutura química da patulina .....	26
<b>Figura 2.6-</b> Estrutura química de alguns tricotecenos do grupo A e B .....	29
<b>Figura 2.7-</b> Estrutura química da zearalenona .....	31
<b>Figura 2.8-</b> Fundamento da técnica de imunoensaio.....	33
<b>Figura 2.9-</b> Componentes do cromatógrafo líquido de alta eficiência.....	37
<b>Figura 2.10-</b> Componentes e composição básica de um espectrômetro de massa.....	46
<b>Figura 3.1-</b> Cromatograma de massa de AFB <sub>1</sub> , AFB <sub>2</sub> , AFG <sub>1</sub> e AFG <sub>2</sub> utilizando LC-MS/MS-APCI [M+H] <sup>+</sup> em uma concentração de 50 x LOQ.....	106
<b>Figura 3.2-</b> Estruturas químicas das AFLs com sua respectivas massas molares [a] AFB <sub>1</sub> (312), [b] AFB <sub>2</sub> (314), [c] AFG <sub>1</sub> (328) e [d] AFG <sub>2</sub> (330).....	108
<b>Figura 3.3-</b> Cromatograma de massa/massa de uma amostra contaminada utilizando LC-MS/MS-APCI [M+H] <sup>+</sup> com concentrações de: 0,1, 0,13, 0,15 e 0,12 µg.kg <sup>-1</sup> para AFB <sub>1</sub> , AFB <sub>2</sub> , AFG <sub>1</sub> e AFG <sub>2</sub> , respectivamente.....	111
<b>Figura 4.1-</b> Cromatograma do método de multi-toxinas utilizando APCI no modo positivo [M+H] <sup>+</sup> .....	129
<b>Figura 4.2-</b> Cromatograma do método de multi-toxinas utilizando APCI no modo negativo [M-H] <sup>-</sup> .....	129
<b>Figura 4.3-</b> Cromatograma do método de multi-toxinas utilizando APCI no modo positivo/negativo .....	130
<b>Figura 4.4-</b> Cromatograma do método de multi-toxinas utilizando ESI no modo positivo [M+H] <sup>+</sup> .....	130
<b>Figura 4.5-</b> Cromatograma do método de multi-toxinas utilizando ESI no modo negativo [M-H] <sup>-</sup> .....	131
<b>Figura 4.6-</b> Cromatograma do método de multi-toxinas utilizando ESI no modo positivo/negativo .....	131

## LISTA DE ABREVIATURAS

3-ADON	3-acetil deoxinivalenol
15-ADON	15-acetildeoxinivalenol
AFB <sub>1</sub>	Aflatoxina B <sub>1</sub>
AFB <sub>2</sub>	Aflatoxina B <sub>2</sub>
AFG <sub>1</sub>	Aflatoxina G <sub>1</sub>
AFG <sub>2</sub>	Aflatoxina G <sub>2</sub>
AFLs	Aflatoxinas
AFM <sub>1</sub>	Aflatoxina M <sub>1</sub>
AFM <sub>2</sub>	Aflatoxina M <sub>2</sub>
AOAC	Association of Official Analytical Chemists
APCI	Ionização Química à Pressão Atmosférica
ATA	Aleucia Tóxica Alimentar
CAC	Codex Alimentarius
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CCFAC	Comitê de Aditivos Alimentares do Codex
CE	Energia de Colisão
CEN	Committee of European Normalization
CID	Dissociação por Colisão Induzida
CG	Cromatografia Gasosa
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CTR	Citrinina
DAS	Diacetoxiscirpenol
DNA	ácido desoxirribonucléico
DON	Deoxinivalenol
DP	Declustering Potential
DW	Dwell time
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
ESI	Ionização por Eletrospray
FL	Detector de Fluorescência
FBs	Fumonisinias
FDA	Food and Drugs Administration
GC-ECD	Cromatografia Gasosa Acoplada a Detector de Captura de Elétrons
HT <sub>2</sub>	toxina HT <sub>2</sub>
JECFA	Comitê de Especialistas em Cotaminantes e Aditivos Alimentares
LC	Cromatografia Líquida
LC-FL	Cromatografia Líquida acoplada com Fluorescência
LC-MS	Cromatografia Líquida acoplada a Espectrometria de Massa
LC-MS/MS	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas
LEM	Leucoencefalomalácia
LOD	Limite de Detecção
LOQ	Limite de Quantificação



MS	Espectrometria de massa
MS/MS	Tandem
NEO	Neosolaniol
NIV	Nivalenol
OTA	Ocratoxina A
PTL	Patulina
RNA	ácido ribonucléico
SCF	Comitê Científico para Alimentos
SPE	Extração Fase Sólida
T <sub>2</sub>	Toxina T <sub>2</sub>
TOF	Tempo de vôo
UV	Detectores de Ultravioleta
ZON	Zearalenona
WHO-IARC	Organização Mundial de Saúde-Agência Internacional de Pesquisas do Câncer.

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	12
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	16
2.1 Micotoxinas.....	16
2.1.1 Aflatoxinas.....	18
2.1.2 Citrinina .....	21
2.1.3 Fumonisinias .....	23
2.1.4 Ocratoxina A .....	24
2.1.5 Patulina.....	26
2.1.6 Tricotecenos .....	28
2.1.7 Zearalenona.....	31
2.2 Métodos de detecção para micotoxinas .....	32
2.2.1 Triagem .....	33
2.2.2 Quantificação.....	34
2.3 Espectrometria de Massa .....	44
2.3.1 Histórico.....	44
2.3.2 Princípio de funcionamento.....	45
2.3.3 Componentes .....	46
2.4 Sistema LC-MS/MS.....	51
2.4.1. Desenvolvimento de métodos por LC-MS/MS .....	52
2.5 Métodos de Detecção Aplicados às Micotoxinas.....	56
2.5.1 Aflatoxinas.....	56
2.5.2 Fumonisinias .....	58
2.5.3 Ocratoxina A .....	60
2.5.4 Patulina.....	66
2.5.5 Tricotecenos .....	67
2.5.6 Zearalenona.....	71
2.5.7 Multitoxinas.....	73
2.6 Legislação.....	77
2.7 Referências bibliográficas .....	84
3 ARTIGO.....	99
3.1 RESUMO .....	100

3.2 INTRODUÇÃO.....	101
3.3 MATERIAL E MÉTODOS.....	104
3.3.1 MATERIAL.....	104
3.3.2 MÉTODOS .....	105
3.5 CONCLUSÃO .....	114
3.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	115
4 ARTIGO.....	118
4.1 RESUMO .....	119
4.2 INTRODUÇÃO.....	120
4.3 MATERIAL E MÉTODOS.....	123
4.3.1 MATERIAL .....	123
4.3.2 MÉTODOS.....	124
4.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	126
4.5 CONCLUSÃO .....	137
4.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	138
5 CONSIDERAÇÕES GERAIS .....	142
ANEXO A – Legislação Européia para Aflatoxinas .....	144
ANEXO B – Apresentação oral: “LC-MS/MS Methodology for Mycotoxins Using Electrospray and Atmospheric Pressure Chemical Ionization” .....	149
ANEXO D - Apresentação oral: “ Desenvolvimento de um Multimétodo por LC- MS/MS para Quantificação de Patulina, Fumonisina B <sub>1</sub> , Citrinina, Ocratoxina A e Zearalenona” .....	155
ANEXO E – Pôster: “ Survey of Aflatoxins in Processed Brazil Nuts Using Liquid Tandem Mass Spectrometry” .....	157
ANEXO F – Pôster: “ Mycotoxin Evaluation in Feed for Pets Using Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry” .....	159
ANEXO G – Pôster: “ Características externas da Castanha -do-Brasil e sua Relação com Contaminação por Aflatoxinas” .....	161
ANEXO H – Pôster: “Avaliação da Eficiência na Redução da Contaminação por Aflatoxinas no Processo de Seleção de Grãos” .....	163

## 1 INTRODUÇÃO

Micotoxinas são metabólitos secundários produzidos por fungos filamentosos. São produzidas principalmente por cinco gêneros de fungos: *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Alternaria* e *Claviceps*. A produção dos tipos e quantidades de micotoxinas varia de ano à ano e depende de fatores como a espécie de fungos, composição do alimento e condições climáticas. Estas substâncias podem estar presentes em alimentos para consumo humano e animal e sua principal via de entrada é a ingestão de alimentos tais como grãos, leite, ovos e seus produtos. A intoxicação provocada pelas micotoxinas produz diversos efeitos no organismo tais como: hepatotóxicos, nefrotóxicos, estrogênicos, neurotóxicos, hemorrágicos e imunotóxicos. A exposição às micotoxinas pode levar a mutagênese, teratogênese e carcinogênese.

Outro aspecto importante dos efeitos provocados pelas micotoxinas é o impacto negativo na economia de diversos países exportadores. Dos critérios para estimar o impacto econômico produzido pelas micotoxinas, os principais são: perda de vidas humanas e animais, perdas na produção de grãos e queda no rendimento de crescimento e reprodução de animais. Também são critérios os custos com armazenagem e tratamento dos grãos e alimentos processados, custos com restrições de legislação e gastos com pesquisas para avaliar o impacto e severidade relacionados às micotoxinas. É estimado que cerca de 25 % da produção mundial de grãos e 20 % da produção de grãos da União Européia são contaminadas com estas toxinas. As perdas econômicas provocadas pelas micotoxinas são praticamente impossíveis de serem avaliadas com precisão. Todavia, a *Food and Drugs Administration* (FDA) produziu estimativas baseadas

em modelos de computador e concluíram que cerca de 932 milhões de dólares é o custo anual gasto por perdas com grãos contaminados nos Estados Unidos.

Com o intuito de minimizar os efeitos das micotoxinas, diversos países tem instituído legislações para controle das mesmas, estabelecendo limites máximos seguros das micotoxinas em alimentos. Ao compararmos a situação desde 1995 até 2003, é possível verificar que ocorreu um aumento de 30 % no número de países com legislação e também um acréscimo no número de micotoxinas incluídas e em muitos casos uma diminuição nos limites considerados seguros. Ao mesmo tempo, diversas legislações estão sendo harmonizadas entre países que compõem blocos econômicos como União Européia e Mercosul.

Com as restrições cada vez maiores exigidas pelas legislações, aumento do número de toxinas regulamentadas e diminuição dos limites máximos permitidos, principalmente pela União Européia e países desenvolvidos, há uma necessidade cada vez maior de desenvolvimento e validação de métodos analíticos que possam suprir essas exigências. Atualmente, os métodos mais utilizados para detecção e quantificação de micotoxinas estão relacionados principalmente com os tipos de micotoxinas a serem analisadas, e preferencialmente utilizam técnicas de imunoenaios, cromatografia em camada delgada, cromatografia gasosa com detector de captura de elétron (CG-ECD) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detectores de fluorescência (FL) e de ultravioleta (UV). Métodos utilizando estas técnicas estão presentes em publicações oficiais como *Association of Official Analytical Chemists* e *Committee of European Normalization*, e aceitos por praticamente todas as legislações. Porém eles ainda possuem algumas limitações e dificuldades tais como longo tempo nas etapas de

extração e limpeza, gasto de grandes volumes de solventes tóxicos, sensibilidade, dificuldade em análise de multi-toxinas principalmente de gupos diferentes de micotoxinas e necessidade de métodos de confirmação.

Essas limitações têm levado pesquisadores a buscar novos métodos. Atualmente, a aplicação de detectores de massa/massa (MS/MS) acoplados à CLAE e CG aparecem como uma das melhores ferramentas para análise de micotoxinas. Estes detectores têm como base a análise da massa do analito, ampliando sua especificidade e conseqüentemente sua seletividade e sensibilidade. Estudos desenvolvidos com estes detectores têm demonstrado uma diminuição nos limites de detecção e quantificação quando comparados com os métodos tradicionais. Outra vantagem é a diminuição no tempo de análise, pois sua seletividade e especificidade reduzem consideravelmente as etapas de extração das micotoxinas e limpeza, bem como a segurança nos resultados, pois não necessitam de etapas de confirmação sendo considerados auto confirmatórios. Todavia, provavelmente a maior vantagem do uso destes detectores é a possibilidade de análise de multi-toxinas provenientes de diversos gêneros de fungos toxigênicos, em um único processo de extração e detecção, característica esta que faz com que este detector fique muito à frente dos demais. Existe atualmente uma tendência mundial quanto à análise simultânea de multi-toxinas, isto por que diversos estudos têm demonstrado uma ação sinérgica entre as micotoxinas. Várias micotoxinas podem estar presentes em uma mesma matriz, sendo que suas concentrações individuais estejam abaixo dos limites máximos permitidos, porém suas presenças simultâneas têm revelado danos provenientes justamente pelo sinergismo de suas ações tóxicas, Portanto, o uso de métodos de

detecção de diversas micotoxinas ao mesmo tempo torne-se indispensável para conclusões mais precisas deste efeito sinérgico, para uma maior proteção dos consumidores e atualização das legislações atuais.

Este trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de métodos para multi-toxinas por LC-MS/MS para (a) aflatoxinas (AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub>, AFG<sub>2</sub>) e aplicação em análises de castanha-do-Brasil, bem como (b) para 15 toxinas de diferente grupos químicos (citrinina, fumonisinas [FB<sub>1</sub> e FB<sub>2</sub>], ocratoxina A, patulina, diversos tricotecenos e zearalenona), frente à duas fontes de ionização: ionização química à pressão atmosférica e ionização por eletrospray comparando-as para futura aplicação em alimentos.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Micotoxinas

O termo micotoxina é proveniente do termo grego *mykes* que significa fungo e do latim *toxicum* que significa veneno. Este termo foi utilizado pela primeira vez em 1962 após uma crise veterinária incomum próxima à Londres, Inglaterra, onde cerca de 100 000 perus morreram após a ingestão de ração contendo farelo de amendoim proveniente do Brasil. A doença foi chamada de doença X dos perus. Após análise do farelo foi verificada pela primeira vez a presença de fungo produtor (*Aspergillus flavus*) da toxina denominada a partir deste de aflatoxinas (AFLs). Todavia, surgimento de casos de câncer de fígado em trutas, relacionados com a ração contendo sementes de algodão, foram documentadas em meados de 1935 e no gado em torno de 1953. A relação do Ergot e doenças animais provavelmente não foi reportado até a idade média, considerando que algumas atividades biológicas do ergot eram conhecidas pelos chineses à mais de 5 000 anos atrás. Existem várias documentações de casos de ergotismo em animais domésticos e gado nos Estados Unidos no século XIX implicando a presença de ergot como causa de problemas de produção animal. Nos anos 30 grãos provenientes dos Estados Unidos foram embargados pela Alemanha devido à presença de fatores causadores de inibição de ingestão de alimento pelos animais, provavelmente deoxinivalenol (DON) e outros tricotecenos. Casos de Leucoencefalomalácia em eqüinos relacionados pela primeira vez com a ingestão



de milho mofado foram reportados em 1891, hoje se sabe que provavelmente foram causados pela presença de fumonisinas (FBs). O consumo de milho contaminado com *Fusarium verticillioides* foi a primeira indicação de que milho mofado poderia causar a síndrome de edema pulmonar em suínos. Após a descoberta das FBs, o surgimento de casos de edema pulmonar em suínos mostraram-se sendo causados pela presença de FBs. A associação de estrogeinismo em porcos com o consumo de grãos mofados são conhecidos desde 1928. A ocratoxina A (OTA) foi isolada e identificada no final dos anos 70 e relacionada com doenças renais em cavalos e porcos (BINDER, 2007; MORGAVI e RILEY, 2007).

Em 1993, a Organização Mundial de Saúde-Agência Internacional de Pesquisas do Câncer (WHO-IARC) avaliaram o potencial carcinogênico de algumas micotoxinas e as classificaram. As AFLs foram classificadas como carcinogênicas para seres humanos (Grupo 1) enquanto que as FBs e OTA foram classificadas como possivelmente carcinogênicas (Grupo 2B). Tricotecenos e zearalenona (ZON) foram classificadas como não carcinogênicas para seres humanos (Grupo 3). Os riscos provocados pelas micotoxinas para saúde humana e animal vem sendo avaliados exaustivamente até os dias atuais (HUSSEIN e BRASEL, 2001).

Em geral, as micotoxinas são lipofílicas (com exceção da FB<sub>1</sub>) e tendem a acumular-se no tecido adiposo. O impacto das micotoxinas na saúde depende da quantidade consumida, a toxicidade do composto, peso, espécie e idade do indivíduo, presença de outras micotoxinas (efeito sinérgico) e outros fatores

relativos à dieta. As principais micotoxinas são: AFLs, FBs, OTA, ZON, citrinina (CTR), patulina (PTL) e tricotecenos (STEYN, 1995; HUSSEIN e BRASEL, 2001).

### 2.1.1 Aflatoxinas

As micotoxinas mais comuns são as AFLs devido ao fato de elas representarem uma das substâncias com maior poder carcinogênico conhecida até hoje. São os grupos de micotoxinas mais estudadas com cerca de mais de 5000 publicações. São produzidas por diferentes espécies do gênero *Aspergillus* (principalmente *A. flavus* e *A. parasiticus*). Existem cerca de mais de 20 tipos de AFLs, porém as mais importantes são as AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub>, AFG<sub>2</sub>, AFM<sub>1</sub> e AFM<sub>2</sub>. Estruturalmente são diidrofuranos ou tetrahidrofuranos ligados à um anel cumarínico (SCUSSEL, 2000; HUSSEIN e BRASEL, 2001). Ver as estruturas químicas das principais AFLs encontradas em alimentos na Figura 2.1.

As AFLs, assim como outros compostos heterocíclicos fluorescem e são distinguidas por suas propriedades fluorescentes. As AFB<sub>1</sub> e AFB<sub>2</sub> produzem uma fluorescência azul e as AFG<sub>1</sub> e AFG<sub>2</sub> fluorescem de amarelo-esverdeado sob luz ultravioleta. Existem variações entre os efeitos tóxicos entre as diferentes AFLs. A AFB<sub>1</sub> é a mais tóxica, tanto em aflatoxicoses crônicas quanto agudas, sendo que a toxicidade decresce onde a AFG<sub>1</sub> é maior que a AFB<sub>2</sub> que é maior que a AFG<sub>2</sub>. Os sintomas agudos produzidos pelas AFLs incluem diminuição do crescimento, desordem na atividade gastrointestinal, distúrbios neurológicos e morte. Na aflatoxicose crônica o fígado torna-se hiperplásico com fibrose progressiva e/ou tumor. Podem ser encontradas contaminando uma grande variedade de alimentos

como amendoim, milho, soja, arroz, feijão, centeio, sorgo, semente de algodão, castanha-do Brasil, leite, ovos, frutas secas, chás e diversos alimentos produzidos com matérias-primas contaminadas (SCUSSEL, 1998; MCKEAN et al., 2006; BINDER, 2007).

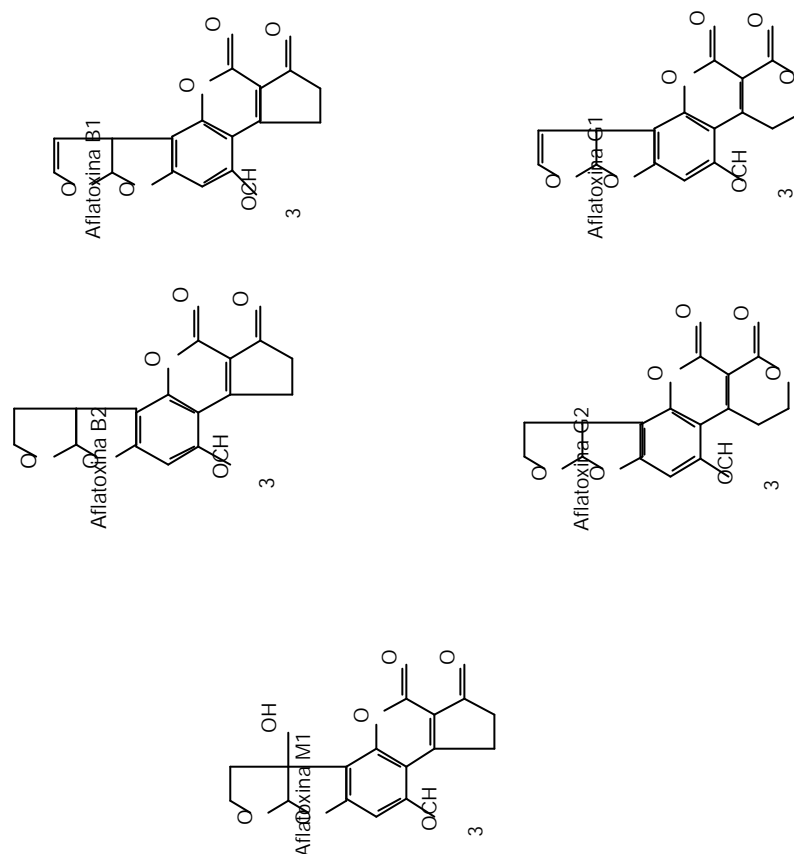
As AFLs são absorvidas no trato gastrointestinal e biotransformadas primariamente no fígado, por enzimas microssomais do sistema de funções oxidases mistas. A biotransformação da AFB<sub>1</sub>, particularmente, tem sido estudada com maior interesse, uma vez que guarda estreita relação com seus mecanismos de ação tóxica.

Existe atualmente consenso de que a AFB<sub>1</sub> é, na realidade, um pró-carcinógeno, o qual requer ativação metabólica para manifestar seus efeitos tóxicos. A forma ativada da AFB<sub>1</sub> é o composto identificado como 8,9-óxido de AFB<sub>1</sub>, ou AFB<sub>1</sub>-epóxido, originado através da epoxidação da dupla ligação do éter vinílico, presente na estrutura bi-furanóide da molécula de AFB<sub>1</sub>. Este composto é altamente eletrofílico e capaz de reagir rapidamente, através de ligações covalentes, com sítios nucleofílicos de macromoléculas, como ácido desoxirribonucléico (DNA), ácido ribonucléico (RNA) e proteínas. Estas ligações determinam a formação de adutos, os quais representam a lesão bioquímica primária produzida pelas AFLs. A ligação da AFB<sub>1</sub>-epóxido com o DNA modifica a sua estrutura e, conseqüentemente, a sua atividade biológica, originando assim os mecanismos básicos dos efeitos mutagênicos e carcinogênicos da AFB<sub>1</sub>. A formação de adutos ocorre através da ligação com guaninas da molécula de DNA, na posição N<sub>7</sub>, ao nível do códon 249, do gene supressor de tumores p53. A

ocorrência deste tipo de alteração é característica de vários carcinomas no homem, sobretudo o hepático. Estudos efetuados em fígados de ratos demonstraram que os adutos AFB<sub>1</sub>-N<sub>7</sub>-guanina podem ser retirados após a sua formação, deixando sítios apurínicos na molécula de DNA. Os sítios vagos tendem a serem preenchidos com adenina, resultando em transversão de guanina para timina, o que origina um ponto de mutação bastante significativo. Os adutos de DNA, depois de sofrerem depurinação espontânea, podem ser conjugados e excretados, sobretudo através da urina.

O processo de carcinogênese, fundamentado em trabalhos experimentais, envolve, geralmente, duas fases distintas: a iniciação e a promoção do câncer. A fase de iniciação é resultante de alterações mutagênicas nas células, ao passo que a de promoção relaciona-se com a expressão fenotípica das modificações ocorridas na primeira fase. Neste contexto, as mutações determinadas pelas AFLs representam alterações genéticas permanentes nas células afetadas, o que possibilita a iniciação do processo cancerígeno. Os adutos de RNA e de proteínas determinam lesões bioquímicas, as quais devem, provavelmente, estar envolvidas com os mecanismos de toxicidade aguda da AFB<sub>1</sub>, dado que conduzem à morte celular pela inativação de macromoléculas essenciais às células. A formação destes adutos inicia-se com a hidrólise da AFB<sub>1</sub>-epóxido para produzir 8,9-dihidro-8,9-dihidroxi-B<sub>1</sub> (ou B<sub>1</sub>-diol), o qual reage com amino-grupos primários de proteínas, originando bases de Schiff desestruturando as proteínas. Os principais adutos de proteínas são formados com albumina, durante a sua síntese nos

hepatócitos (SCUSSEL, 1998 e 2000; HUSSEIN e BRASEL, 2001; MCKEAN et al., 2006; SCUSSEL et al. 2006a; BINDER, 2007).

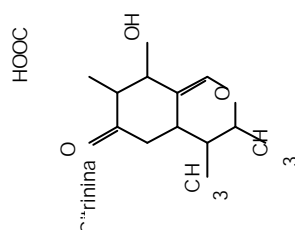


**Figura 2.1-** Estruturas químicas das principais aflatoxinas encontradas em alimentos

### 2.1.2 Citrinina

A CTR está relacionada com o “problema do arroz amarelo”, fato que ocorreu no Japão em 1951, onde arroz importado da Tailândia estava contaminado pelo fungo produtor de CTR e estudos mostraram a presença desta micotoxina. Foi isolada pela primeira vez a partir de uma cultura de *Penicillium citrinum* em 1931

(SOUZA, 1997). CTR é particularmente instável, o que faz com que se deva tomar cuidado nos processos de extração. Sua estrutura molecular pode ser vista na Figura 2.2. Seu ponto de fusão é de 172°C. É solúvel em metanol, etanol e na maioria dos outros solventes polares. Pode ser degradada em soluções ácidas, alcalinas ou por calor. Ela é capaz de formar complexos quelatos (SOUZA, 1997). Fungos da espécie *Penicillium* incluindo *P. verrucosum* têm-se mostrado produtores de CTR. Estes fungos são também capazes de produzir OTA em cereais, fazendo com que em algumas ocasiões estas toxinas apareçam juntas. Outros fungos também podem produzir a CTR, tais como: *Aspergillus terreus*, *A. carneus* e *A. niveus* (OSBORNE, 1982). Citrinina causa danos renais e hepáticos. Outros efeitos incluem vasodilatação, constrição brônquica e aumento do tônus muscular. Foram também observados efeitos teratogênicos em ratos quando administrada em altas doses. As evidências carcinogênicas não estão ainda muito bem elucidadas. Em seres humanos, a CTR parece estar implicada em doenças renais. Em circunstâncias normais, aparentemente a CTR é instável aos processamentos de cereais. Seu mecanismo de ação continua pouco elucidado. A CTR tem sido detectada em arroz, trigo, amendoim e frutas.(SOUZA, 1997).



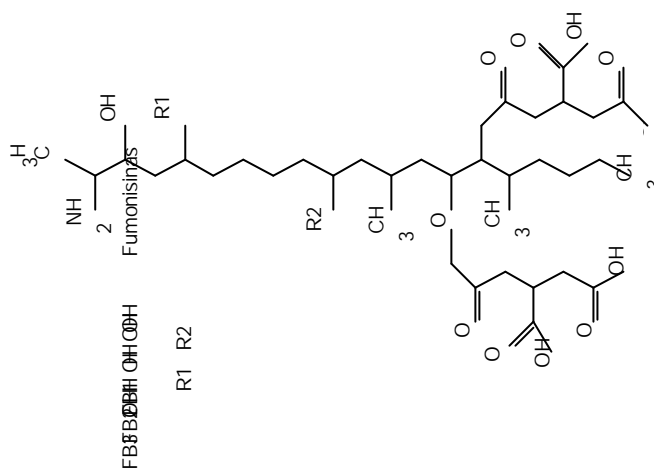
**Figura 2.2-** Estrutura química da citrinina

### 2.1.3 Fumonisin

As micotoxinas mais recentemente descritas com relevância para saúde de homens e animais são as FBs, as quais foram primeiramente reportadas na África do Sul em 1988. Estes compostos são produzidos principalmente por fungos do gênero *Fusarium* (principalmente *F. verticillioides*, *F. proliferatum* e *F. nygama*) bem como por *Alternaria* spp. Existem diversos tipos de FBs, porém as mais importantes são as FB<sub>1</sub>, FB<sub>2</sub> e FB<sub>3</sub>. Sua estrutura química básica é formada por uma cadeia hidrocarbônica longa (similar à estrutura da esfinganina e esfingosina) a qual contém grupos metil, acetil e amino (GUTLEB et al., 2002; MATTSSON, 2007; BINDER, 2007). Ver Figura 2.3.

Os principais efeitos relacionados com a presença de FBs são leucoencefalomalácia em eqüinos (LEM) doença que causa destruição do tecido cerebral e edema pulmonar em suínos. Porém existem indícios de casos de câncer de esôfago em humanos relacionados ao consumo de FBs. Os principais alimentos que podem estar contaminados com FBs são o milho bem como alimentos processados a partir desta matéria-prima, como rações e farinhas (MINERVINI et al., 2004; MCKEAN et al., 2006; MORGAVI e RILEY, 2007). O mecanismo de ação das FBs baseia-se na semelhança de sua estrutura química com a a estrutura da esfingosina e esfinganina. Esta semelhança faz com que a molécula de FB interfira na biossíntese de esfingolipídios e “turnover” de esfingosina. A inibição da biossíntese de esfingolipídios pode ter um profundo efeito sobre a célula, uma vez que estes componentes têm um importante papel

na estrutura da membrana, comunicação celular, interação intracelular e matrix celular e regulação de fatores de crescimento. O sítio específico de ação das FBs parece ser as enzimas esfinganina e esfingosina Nacetiltransferase. A inibição desta via metabólica resulta na depleção do complexo esfingolípido e aumento intracelular de esfinganina livre. O acúmulo das bases esfingóides é a causa primária da toxicidade das FBs. A inibição na produção de esfingolípídios (presente em grande quantidade no tecido cerebral) pode explicar o desenvolvimento de Leuencefalomalácia em eqüinos (HUSSEIN e BRASEL, 2001; GUTLEB et al., 2002; CONCOVÁ et al., 2003; MCKEAN et al., 2006; SCUSSEL et al., 2006b; MATTSSON, 2007).



**Figura 2.3-** Estruturas químicas das principais fumonisinas

#### 2.1.4 Ocratoxina A

A OTA é um metabólito secundário produzido tanto por espécies de *Aspergillus* e *Penicillium*. Quimicamente são definidas como uma

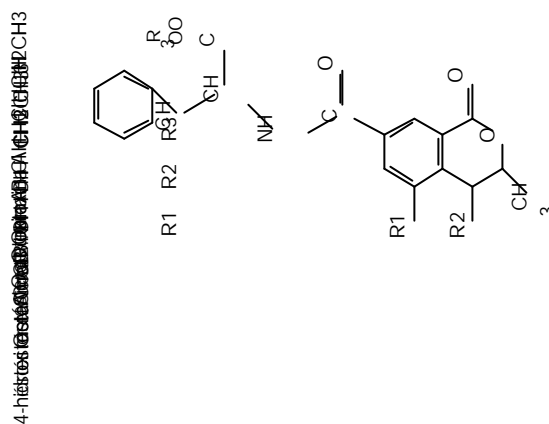


dihidroisocumarina ligada à L-fenilalanina na posição 7-carbonila (Figura 2.4). Seus efeitos tóxicos têm como principais órgãos alvo os rins. A presença destas toxinas está relacionada com casos de nefrotoxicidade, nefropatias e ainda existem suspeitas de casos de câncer relacionados com a presença de OTA. Os alimentos que podem ter contaminação por OTA são principalmente os cereais, feijão, vinho e cerveja (HUSSEIN e BRASEL, 2001; MALLY, 2007; BINDER, 2007).

Mecanismos de toxicidade da OTA têm sido experimentalmente atribuídos a lactona aberta a qual é estruturalmente análoga à sítios ativos de enzimas mitocondriais competindo com a ligação com o substrato. Estudos nos modos de ação da OTA na respiração celular indicam inibição competitiva da ATPase, succinato dehidrogenase (Oxidoredutases atuando sobre o grupo CH-CH de doadores, com NAD<sup>+</sup> ou NADP<sup>+</sup> como aceptores) e citocromo C oxidase em mitocôndrias de fígado de ratos. Outros estudos indicam os danos celulares causados pela OTA à formação de radical hidroxil e peroxidação lipídica. No baço, a OTA parece interromper a síntese protéica por inibição competitiva da fenilalanil-tRNA sintetase a qual é resultado da fenilalanina da OTA.

Estudos recentes, *in vitro*, células renais de humanos e cães tem demonstrado um efeito estimulatório da OTA em proteína quinase extracelular e caspase (caspases são um grupo de proteases baseadas em cisteína, enzimas com um resíduo de cisteína capazes de clivar outras proteínas depois de um resíduo de ácido aspártico, uma especificidade incomum entre proteases). O nome "caspase" é derivado dessa função molecular característica: *cysteine-aspartic-acid-proteases*. Caspases são essenciais na apoptose celular, um dos

principais tipos de morte celular programada durante o desenvolvimento e em outras fases da vida adulta. Algumas caspases também são necessárias no sistema imune, para a maturação das citocinas. Falhas na apoptose são uma das contribuições principais para o desenvolvimento de tumores e doenças auto-imunes; somando-se isto à apoptose indesejada que ocorre na isquemia ou mal de Alzheimer, despertou-se rapidamente interesse nas caspases como alvos terapêuticos desde que foram descobertas em meados da década de 90) resultando em apoptose. Em outros estudo *in vitro*, células uroteliais expostas a OTA demonstraram uma indução não programada de síntese de DNA com subsequente lesões (PETZINGER e WEIDENBACH, 2002; MALLY *et al.*, 2005; BINDER, 2007).

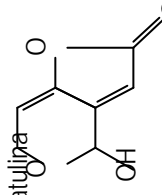


**Figura 2.4-** Estrutura química das principais ocratoxinas

### 2.1.5 Patulina

A PTL é uma lactona produzida por fungos dos gêneros *Penicillium*, *Aspergillus* e *Byssosclamyis*, os quais causam apodrecimento em frutas tais como

maçã, sidra e uva, frutas estas que são consideradas as mais prováveis de possuírem contaminação com PTL. Quimicamente é conhecida como 4-hidroxi-4H-furo [3,2] pirano-2 (6H)-1 (Figura 2.5). (HOPKINS, 1993). A PTL possui atividade antibiótica de amplo espectro e tem sido testada em seres humanos. Todavia sua efetividade nunca foi comprovada. Em testes com seres humanos para uso como antibiótico, a PTL causou irritação estomacal, náuseas e vômitos. A ingestão prolongada de sucos de maçã e sidras contaminadas com PTL produziu desenvolvimento de câncer em alguns pacientes. Outras características de seus efeitos tóxicos incluem distúrbios respiratórios e motores, espasmo, asfixia, hemorragias no pulmão e cérebro (SCUSSEL, 1998; SCHUMACHER et al, 2004). A presença de deterioração em frutas como maçãs, uvas e sidras são um indicativo de possível contaminação por PTL. Bebidas produzidas a partir de frutas contaminadas também podem apresentar esta micotoxina. Seu mecanismo de ação ainda permanece sem elucidação (HOPKINS, 1993).



**Figura 2.5-** Estrutura química da patulina

### 2.1.6 Tricotecenos

Os tricotecenos representam o maior grupo de micotoxinas produzidas por *Fusarium*. Atualmente existem cerca de 170 tricotecenos e derivados de tricotecenos isolados e caracterizados. Quimicamente são sesquiterpenos tricíclicos caracterizados pela presença de uma dupla ligação entre os carbonos 9 e 10 e um anel epóxi nos carbonos 12 e 13 e conseqüentemente são caracterizados como 12,13-epóxi-tricotecenos (Figura 2.6). Devido à características químicas distintas, estes compostos foram classificados em 4 sub classes. Os tricotecenos do grupo A possuem um grupo funcional na posição C-8 que não seja uma cetona, enquanto que os tricotecenos do grupo B possuem uma cetona na posição C-8. No grupo C, há a presença de um segundo grupo epóxi na posição C-7,8 ou C-9,10. Os tricotecenos do grupo D possuem um anel macrolítico entre os carbonos 4 e 5 com duas ligações éster. Todavia, apenas alguns tricotecenos, dos grupos A e B, têm importância toxicológica (D'MELLO et al., 1999; GUTLEB et al., 2002; BINDER, 2007).

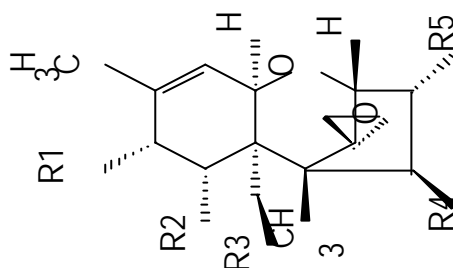
Tricotecenos do grupo A tais como toxina T<sub>2</sub> (T<sub>2</sub>); toxina HT<sub>2</sub> (HT<sub>2</sub>); neosolaniol (NEO) e diacetoxiscirpenol (DAS) estão implicadas mais com efeitos tóxicos agudos enquanto que tricotecenos do grupo B como deoxinivalenol (DON), nivalenol (NIV), 3-acetildeoxinivalenol (3-ADON) e 15- acetildeoxinivalenol (15-ADON) estão mais relacionados com efeitos tóxicos crônicos (GUTLEB et al., 2002; MORGAVI e RILEY, 2007). Os efeitos tóxicos e sintomas característicos atribuídos aos tricotecenos em humanos e animais são principalmente, vômitos, angina necrótica, diarreia, anorexia, alterações hematológicas, distúrbios

neurológicos, destruição da medula óssea e hemorragias generalizadas seguidas ou não de morte. Em 1913 ocorreram casos fatais de uma doença atribuída à ingestão de tricotecenos em regiões da antiga Rússia. Esta doença recebeu o nome de Aleucia Tóxica Alimentar (ATA) (MINERVINI et al., 2004; BONY et al., 2007).

Em relação ao mecanismo de ação dos tricotecenos, a citotoxicidade dos tricotecenos tem sido atribuída à sua potente inibição de síntese de proteínas, RNA e DNA e tem sido experimentalmente relacionado ao núcleo 12,13-epóxitricoteceno. Os sítios ativos sugeridos foram o 9-ene e os ésteres metabólicos formados pelas hidroxilas. Quando os tricotecenos ligam-se aos ribossomos e polissomos ativos, a ligação peptídica é rompida, as seqüências de iniciação e terminação são reduzidas e o ciclo ribossomal é interrompido. Outros efeitos tóxicos dos tricotecenos incluem interrupção do transporte e funções da membrana e supressão da resposta imune.

Os efeitos negativos da toxina T2 na função da membrana celular é explicado pela interrupção do transporte de aminoácidos, nucleotídeos, glicose e atividade do canal de sódio e potássio. Estudos demonstraram que o transporte mitocondrial de elétrons é também inibido pela toxina T2 como resultado da supressão da succinato desidrogenase. Peroxidação lipídica através da formação de radicais livres durante o metabolismo da toxina T2 também tem sido sugerido como um modo de ação de tricotecenos em fígados de ratos. Com relação à resposta imune, a proliferação de linfócitos humanos em culturas mostrou-se inibida pela presença da toxina T2, DON e DAS.

Em outro estudo, onde foram utilizados macrófagos peritoniais de camundongo, DON e DAS inibiram a atividade fagocítica, mitocondrial e produção de anion superóxido. Em estudos relacionados à células sanguíneas, a toxina T2 reduziu a formação de macrófagos na medula óssea de camundongos. Em outro estudo, a DON inibiu os precursores de monócitos. Ambas toxinas T2 e DAS também inibiram precursores eritroblásticos humanos (HUSSEIN e BRASEL, 2001; CONKOVÁ et al., 2003; MINERVINI, et al., 2004; BONY et al., 2007).

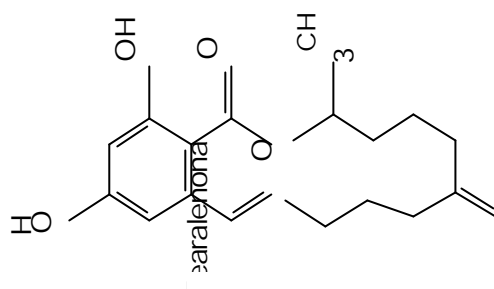


Tricotecenos	R1	R2	R3	R4	R5
<b>Tipo A</b>					
HT2	-O	H	O-acetil	OH	OH
T2	-O	H	O-acetil	O-acetil	OH
<b>Tipo B</b>					
NIV	-O	OH	OH	OH	OH
DON	-O	OH	OH	H	OH
3-ADON	-O	OH	OH	H	O-acetil
15-ADON	-O	OH	O-acetil	H	OH

**Figura 2.6-** Estrutura química de alguns tricotecenos do grupo A e B

### 2.1.7 Zearalenona

É produzida principalmente por espécies de *Fusarium*, tais como *F. culmorum*, *F. graminearum* e *F. sporotrichioides*. Quimicamente é uma lactona macrocíclica (Figura 2.7) que exibe fluorescência azul esverdeada em comprimentos de onda de luz ultravioleta (360 nm) e uma fluorescência verde muito intensa quando excitada com comprimento de onda curto de luz ultra violeta (260 nm). É considerada como um composto fitoestrogênico o qual possui grande afinidade pelos receptores estrogênicos. Seus principais efeitos tóxicos estão justamente relacionados pela sua afinidade com os receptores estrogênicos podendo provocar infertilidade, edema de vulva, prolapsos vaginal e retal e hipertrofia mamária em fêmeas e feminilização em machos. A ZON aparece em quase todos os produtos de origem agrícola como grãos (trigo e milho) e em alimentos processados como rações, cereais matinais, cerveja e pães (HUSSEIN e BRASEL, 2001; GUTLEB et al., 2002; MORGAVI e RILEY, 2007). A toxina liga-se em receptores estrogênicos, influenciando a transcrição estrogênio dependente no núcleo das células. Receptores ocupados por ZON têm demonstrado uma inibição na ligação de hormônios estrogênicos em tecidos mamários de camundongos. Estudos recentes têm demonstrado o potencial da ZON em estimular o crescimento de células tumorais de mama em humanos contendo receptores de estrogênio (D'MELLO et al., 1999; CONKOVÁ et al., 2003; VLATA et al., 2006; BINDER, 2007).



**Figura 2.7-** Estrutura química da zearalenona

## 2.2 Métodos de detecção para micotoxinas

Devido à toxicidade e grande ocorrência das micotoxinas em alimentos, somado às exigências demandadas pelas legislações em escala global, existe uma necessidade distinta por métodos altamente seletivos e precisos para identificar e quantificar as micotoxinas em uma enorme variedade de matrizes agrícolas, biológicas e alimentares. Numerosas técnicas são necessárias para abranger todas as diferenças existentes entre as micotoxinas tais como polaridade, capacidade de fluorescência, volatilidade e absorção de raios ultravioleta. Além das diferenças entre as micotoxinas, as matrizes analisadas para a presença das mesmas são extremamente variadas e complexas exigindo etapas de limpeza e extração específicas (KATZ et al., 1998; ZÖLLNER et al., 2006).

Alguns métodos de detecção de micotoxinas utilizam princípios imunológicos (imunoensaios); todavia, o emprego de princípios cromatográficos aparece na quase totalidade das situações. A cromatografia está fundamentada na migração diferencial dos componentes de uma mistura, que ocorre devido a diferentes



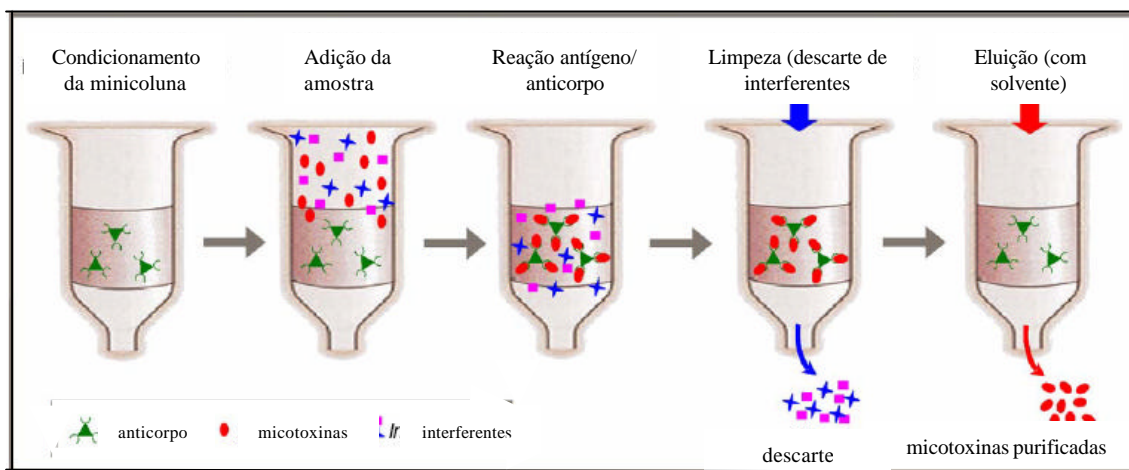
interações, entre duas fases imiscíveis, a fase móvel e a fase estacionária. A grande variedade de combinações entre fases móveis e estacionárias a torna uma técnica extremamente versátil e de grande aplicação. De acordo com o objetivo da análise, os métodos podem ser divididos basicamente em **triagem** e **quantificação** (COLLINS, 1993; KATZ et al., 1998; NOLLET, 2006)

### 2.2.1 Triagem

Um dos métodos de triagem clássicos na análise de micotoxinas é o método da minicoluna. Este método serve apenas para a detecção de AFLs e fundamenta-se na separação da micotoxina presente na amostra durante sua migração no interior de uma minicoluna após a aplicação de um pequeno volume do extrato da amostra seguida de um solvente de eluição. A toxina fica retida na região onde há o adsorvente Florisil. Uma fluorescência é observada na presença de AFLs sob luz ultra-violeta em câmara escura (ROMER, 1979). Outro tipo de método de triagem muito utilizado é o imunoensaio.

Estes métodos são ferramentas muito úteis e tem como fundamento a produção de anticorpos específicos contra determinadas micotoxinas que são imobilizados em um suporte inerte e empacotados em minicolunas. O extrato proveniente do alimento é então passado através da coluna. Enquanto que praticamente todos os compostos do extrato são lavados e eluídos da coluna, as micotoxinas ficam retidas nos anticorpos específicos. Devido ao fato de que as micotoxinas não ficam ligadas covalentemente aos anticorpos, as mesmas podem

ser retiradas com o uso de solventes orgânicos como metanol ou acetonitrila. Este eluato contém as micotoxinas em grande concentração e pureza, podendo ser detectadas por métodos cromatográficos. Na Figura 2.8 é possível observar o esquema do método de imunoafinidade (CAVALIERI et al., 2007; REN et al., 2007).



**Figura 2.8-** Fundamento da técnica de imunoensaio (KATZ et al, 1998)

## 2.2.2 Quantificação

A quantificação tem por objetivo avaliar a concentração das micotoxinas em determinada matriz. Os principais métodos para quantificação de micotoxinas são a cromatografia em camada delgada (CCD), imunoensaios, cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) acoplada a detectores de fluorescência (FL), ultravioleta (UV) e de massa (MS) e cromatografia gasosa (CG) acopladas a detectores de captura de elétrons, ionização por chama e de massa (ZÖLLNER e MAYER-HELM, 2006)

### a) Cromatografia em Camada Delgada

Também conhecida como TLC do inglês *Thin Layer Chromatography*, este método de quantificação (que em alguns casos pode ser também usado como triagem) teve um papel fundamental na descoberta das micotoxinas. Foi utilizando este método que as AFLs foram inicialmente isoladas e identificadas e continua até hoje a desempenhar um papel muito importante na quantificação de diversas micotoxinas, tais como: ZON, PTL, OTA e EST. Esta técnica de quantificação tem como a principal vantagem o baixo custo e a não necessidade de uso de equipamentos caros e sofisticados. É utilizada em grande escala principalmente em países em desenvolvimento, e apesar de existir diversos métodos oficiais empregando este tipo de cromatografia, gradualmente ela vem sendo substituída por técnicas mais precisas e práticas como CLAE (KATZ et al., 1998; NOLLET, 2006).

A cromatografia em camada delgada é uma técnica de adsorção líquido-sólido. Nesse caso, a separação se dá pela diferença de afinidade dos componentes de uma mistura pela fase estacionária. Por ser um método simples, rápido, visual e econômico, a CCD é a técnica predominantemente escolhida para o acompanhamento de reações orgânicas. O parâmetro mais importante a ser considerado em CCD é o fator de retenção ( $R_f$ ), o qual é a razão entre a distância percorrida pela substância em questão e a distância percorrida pela fase móvel. A sílica gel é a fase estacionária mais utilizada, sendo seguida pela alumina, pela terra diatomácea e pela celulose. As amostras a serem analisadas por CCD devem ser aplicadas a aproximadamente 1 cm da base inferior da placa, com a ajuda de

uma seringa. O próximo passo é colocá-la em uma cuba com a fase móvel específica no fundo e deixar que esta fase móvel suba por capilaridade até uma distância pré-determinada e visualização da placa em câmara escura no caso das micotoxinas (COLLINS, 1993; KATZ et al., 1998; NOLLET, 2006).

## **b) Cromatografia gasosa**

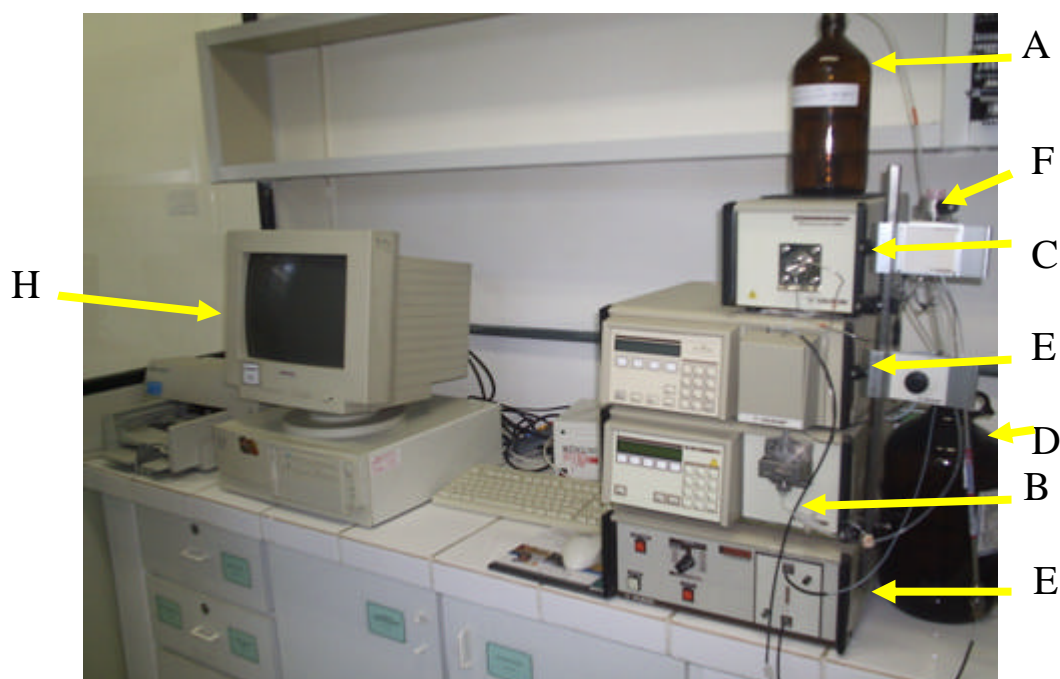
A CG utiliza fase móvel e amostra no estado gasoso. A fase estacionária, presente no interior da coluna, pode ser líquida ou sólida. Para a aplicação deste método, as micotoxinas necessitam ser termoestáveis e voláteis, ou ainda, serem convertidas em derivados voláteis, isto porque no processo de CG, as amostras são submetidas a altas temperaturas para atingirem o estado gasoso. Os detectores mais utilizados para a detecção de micotoxinas são o detector de captura de elétrons e o de ionização por chama. Neste tipo de análise, as micotoxinas não necessitam ser fluorescentes nem absorverem na região UV. As micotoxinas que foram utilizadas inicialmente e em maior escala foram os tricotecenos. Todavia, atualmente existem métodos desenvolvidos para detecção de FBs e de PTL. (JENNINGS et al., 1997). O fundamento da detecção por ionização por chama consiste na presença de uma chama no final da coluna para onde os eluentes são direcionados. Assim que os componentes orgânicos atingem a chama, são formadas espécies eletricamente carregadas. As espécies carregadas são então coletadas por um eletrodo produzindo um aumento na corrente que é proporcional à concentração de carbono na chama. A corrente resultante é amplificada por um eletrômetro. O princípio de funcionamento dos detectores de captura de elétrons está fundamentada na capacidade de algumas

moléculas em atrair e remover elétrons termolizados (JENNINGS et al., 1997; MACNAIR et al. 1997; GROB e BARRY, 2004).

### **c) Cromatografia líquida de alta eficiência**

Atualmente, o uso de CLAE é o método de escolha para laboratórios de análise de micotoxinas. Existem diversos métodos oficiais baseados nesta técnica de quantificação. Após a introdução dos detectores de fluorescência, por exemplo, houve um aumento significativo na sensibilidade do processo de quantificação. Além desta vantagem, outras podem ser citadas, como a possibilidade de automatização e uso de injetores automáticos, limpezas *online* e derivatização pré e pós coluna. Na quantificação de micotoxinas, diversos detectores podem ser utilizados, sendo que vale destacar os detectores UV utilizados para análise de PTL e ZON, detectores de FL utilizados na detecção de AFLs, ZON, FBs e OTA e os detectores de MS que podem ser aplicados para praticamente todas as micotoxinas (KATZ et al., 1998; NIESSEN, 2006; ARDREY, 2003). A quantificação por cromatografia líquida de alta eficiência é também conhecida por HPLC, do inglês *High Performance Liquid Chromathography*. Este é um tipo de cromatografia líquida que emprega pequenas colunas, recheadas de materiais especialmente preparados e uma fase móvel que é eluída sobre altas pressões. Ela tem a capacidade de realizar separações e análises quantitativas de uma grande quantidade de compostos presentes em vários tipos de amostras, em escala de tempo de poucos minutos, com alta resolução, eficiência e sensibilidade (MACRAE, 1982; KATZ et al., 1998; ARDREY, 2003). Os componentes básicos que compõem um CLAE são: fase móvel, bomba, manômetro, coluna, detectores e

sistema de interpretação de dados. A Figura 2.9 apresenta os diversos componentes do sistema CLAE que serão sucintamente discutidos seguir já que estão relacionados aos trabalhos desenvolvidos.



**Figura 2.9-** Componentes do cromatógrafo líquido de alta eficiência (**Fonte:** acervo do autor)

**A- Fase móvel:** na cromatografia líquida, tanto a fase móvel quanto a amostra tem que estar no estado líquido. A fase móvel pode ser composta por um tipo de líquido ou uma mistura. Os solventes mais utilizados na preparação da fase móvel para análise de micotoxinas são o metanol, água ultra pura, acetonitrila e tetrahydrofurano. Ela desempenha um papel fundamental na separação dos analitos, pois a mesma é bombeada sob alta pressão através do injetor de amostra arrastando-a até a coluna onde ocorre a separação e posterior migração dos compostos de interesse até o detector. Ao final do percurso a fase móvel é

armazenada em um recipiente e descartada (CIOLLA, 1998; KATZ et al., 1998; NIESSEN, 2006; ARDREY, 2003).

**B- Bombas:** o desenvolvimento do sistema de bombeamento adequado foi o fator mais importante para o desenvolvimento da CLAE. A bomba tem que proporcionar uma vazão razoável de fase móvel através da coluna para que a análise não seja lenta, e uma vazão constante, para não atrapalhar o sistema de detecção. Os sistemas de bombeamento podem ser isocráticos, onde se tem apenas uma bomba que bombeia uma fase móvel de composição constante ou gradiente, onde existem de duas à quatro bombas capazes de atuar simultaneamente possibilitando mudanças na composição da fase móvel durante uma análise (KATZ et al., 1998; NIESSEN, 2006).

**C- Manômetro:** como o sistema trabalha à alta pressão, é necessário um controle da mesma para que não ocorram danos ao equipamento, este controle é realizado pelo manômetro (NIESSEN, 2006; ARDREY, 2003).

**D- Colunas:** as colunas são consideradas como sendo o “coração” do CLAE. Elas são geralmente constituídas de um cilindro metálico de comprimento variado (5, 10, 15 e 25 cm) empacotadas com material que serve de fase estacionária, na maioria dos casos sílica. As colunas aplicadas para análise de micotoxinas são geralmente compostas com sílica tratada com polímeros de carbono e dependendo do tamanho da cadeia carbônica ligada à partícula de sílica podem ser: C<sub>4</sub>, C<sub>8</sub> e C<sub>18</sub> principalmente. É no interior da coluna que ocorre a separação dos analitos antes de os mesmos migrarem para o detector (KATZ et al., 1998).

**E- Detectores:** os detectores mais utilizados para análise de micotoxinas são os de UV, FL e MS. Nos detectores UV o funcionamento baseia-se na absorbância de luz por parte da amostra. Existem dois tipos de detectores de luz ultravioleta: o de comprimento de onda variável (espectrofotômetros), que não só é de aplicação mais variada e sensível, mas também é mais caro, e o chamado fotométrico que funciona com um ou dois comprimentos de onda fixos. Este último é sensível, econômico e mais do que suficiente para obtenção de bons resultados com todos os compostos que absorvem luz no comprimento de onda em que ele funciona. Este tipo de detector é normalmente insensível a variações de vazão e temperatura. Em ótimas condições, podem-se atingir sensibilidades de até 0,001 unidades de absorbância e, se o composto absorve intensamente na faixa de UV, é possível detectar quantidades de amostras da ordem de nanogramas ( $10^{-9}$  g) (CIOLLA, 1998; KATZ et al., 1998; ARDREY, 2003; NIESSEN, 2006).

A detecção por fluorescência é um método dos mais sensíveis da atualidade, específico para compostos que fluorescem. Em boas condições é possível detectar quantidades da ordem de picogramas ( $10^{-12}$  g). Uma alta intensidade de fluorescência é esperada de compostos que sejam conjugados simetricamente ou que não podem produzir estruturas fortemente iônicas. A fase móvel empregada nos detectores de fluorescência deve ser cuidadosamente selecionada, pois a intensidade de emissão depende do meio em que se encontra a amostra. Isto dificulta algumas de suas aplicações, tais como análise quantitativa e eluição por gradiente, nas quais devem-se selecionar os componentes da fase móvel para não atrapalhar a fluorescência. Os detectores para fluorescência



também podem proporcionar espectros de emissão das amostras retidas momentaneamente na sua cela (KATZ et al., 1998; VISCONTI e PASCALE, 1998; NIESSEN, 2006;). A utilização de detectores de massa será discutido mais detalhadamente adiante em um capítulo específico.

**F - Injetor de amostra:** é o local onde é introduzida a amostra. Normalmente possui um reservatório com volume específico pré-determinado e podem ser manuais (o operador injeta as amostras manualmente) ou automáticos, também chamados de *autosamplers*, que possibilitam uma injeção automatizada.

**G - Sistema de interpretação de dados:** o sistema de interpretação de dados está presente no computador que controla todas as funções do CLAE através de uma interface. Todos os dados relativos à fluxo de fase móvel, pressão, tempo de corrida e sinais produzidos pelos detectores são comandados recebidos e interpretados por este sistema. Os sinais produzidos pelos detectores são analisados por este sistema que emite um cromatograma, ou seja, uma representação gráfica da concentração da substância que se está pesquisando. Esta representação gráfica é também conhecida como “pico cromatográfico” e possui uma área mensurável de acordo com a intensidade do sinal produzido (CIOLLA, 1993, KATZ et al., 1998; ARDREY, 2003). Na Tabela 2.1 são apresentados detalhes de algumas aplicações oficiais e métodos de detecção por CCD, CLAE, GC e imunoenaios para micotoxinas utilizando os fundamentos citados anteriormente.

**Tabela 2.1 - Métodos oficiais da AOAC e IUPAC para determinação de micotoxinas**

Micotoxina	Matriz	Fundamento	Faixa de aplicação (µg/kg)	Método oficial
AFB <sub>1</sub> + AFB <sub>2</sub> + AFG <sub>1</sub> + AFG <sub>2</sub>	Cacau	CCD	8 - 35	AOAC 971.23
AFB <sub>1</sub> + AFB <sub>2</sub> + AFG <sub>1</sub> + AFG <sub>2</sub>	Côco	CCD	31 - 47	AOAC 971.24
AFB <sub>1</sub> + AFB <sub>2</sub>	Semente de algodão	CCD	7 - 266	AOAC
AFB <sub>1</sub> + AFB <sub>2</sub> + AFG <sub>1</sub> + AFG <sub>2</sub>	Soja	CCD	15 - 58	AOAC 972.27
AFB <sub>1</sub>	Semente de algodão	CCD	18 - 87	AOAC 980.20
AFB <sub>1</sub>	Ovos	CCD	>1	AOAC 978.15
AFB <sub>1</sub>	Milho	CCD	5 - 50	AOAC 993.17
AFB <sub>1</sub> + AFB <sub>2</sub> + AFG <sub>1</sub> + AFG <sub>2</sub>	Castanha-do-Brasil	CLAE	5 - 30	AOAC 994.08
AFB <sub>1</sub> + AFB <sub>2</sub> + AFG <sub>1</sub> + AFG <sub>2</sub>	Milho	CLAE	2 - 30	AOAC 991.31
AFB <sub>1</sub> + AFB <sub>2</sub> + AFG <sub>1</sub> + AFG <sub>2</sub>	Manteiga de amendoim	CLAE	2 - 33	AOAC 991.31
AFB <sub>1</sub> + AFB <sub>2</sub> + AFG <sub>1</sub> + AFG <sub>2</sub>	Amendoim	CLAE	1 - 30	AOAC 991.31
AFB <sub>1</sub> + AFB <sub>2</sub> + AFG <sub>1</sub> + AFG <sub>2</sub>	Milho	ELISA	> 30	AOAC 990.30
AFB <sub>1</sub> + AFB <sub>2</sub> + AFG <sub>1</sub> + AFG <sub>2</sub>	Semente de algodão	ELISA	20	AOAC – IUPAC
AFB <sub>1</sub> + AFB <sub>2</sub> + AFG <sub>1</sub> + AFG <sub>2</sub>	Manteiga de amendoim	ELISA	90	AOAC 991.45
DON	Trigo	CCD	50 - 1000	AOAC 986.17
DON	Trigo	CG	> 350	AOAC 986.18
FB <sub>1</sub>	Milho	CLAE	50 - 2000	IUPAC
FB <sub>1</sub>	Milho	CLAE	500 - 8000	AOAC- IUPAC
FB <sub>1</sub>	Flocos de milho	CLAE	320 - 1050	AOAC
FB <sub>2</sub>	Milho	CLAE	50 - 750	AOAC-IUPAC
FB <sub>2</sub>	Milho	CLAE	90 - 560	AOAC-IUPAC
FB <sub>2</sub>	Flocos de milho	CLAE	130 - 460	AOAC-IUPAC
OTA	Cevada	CCD	25 - 100	AOAC 973.37

OTA	Café	CCD	41 - 230	AOAC 975.38
OTA	Cevada	CLAE	10 - 50	AOAC 991.44
OTA	Cerveja	CLAE	0.2 – 1.5	AOAC 2001.20
OTA	Milho	CLAE	10 - 50	AOAC 991.44
PTL	Suco de maçã	CCD	50 - 340	AOAC 974.18
PTL	Suco de maçã	CLAE	5 - 250	IUPAC
PTL	Suco de maçã	CLAE	20 - 200	AOAC 995.10
ZON	Milho	CCD	100 - 2000	AOAC 976.22
ZON	Milho	ELISA	> 800	AOAC 994.01
ZON	Milho	ELISA	> 800	AOAC 994.01
ZON	Ração	ELISA	> 800	AOAC 994.01
ZON	Ração	CLAE	50 - 4000	AOAC 985.18
ZON	Ração	CLAE	50 - 200	AOAC 985.18

---

AFB<sub>1</sub>=Aflatoxina B<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>= Aflatoxina B<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub>= Aflatoxina G<sub>1</sub>, AFG<sub>2</sub>= Aflatoxina G<sub>2</sub>, DON=Deoxinivalenol, ZON=zearalenona, OTA=ocratoxina A, FB<sub>1</sub>=Fumonisina B<sub>1</sub>, FB<sub>2</sub>= Fumonisina B<sub>2</sub>, PTL=patulina, CCD=cromatografia em camada delgada, CG=cromatografia gasosa, ELISA=Imunoensaio, CLAE=cromatografia líquida de alta eficiência, IUPAC=*international union for purê applied chemistri*, AOAC=*association of official agricultural chemistis*

(GILBERT, 2002)

## 2.3 Espectrometria de Massa

**2.3.1 Histórico:** a espectrometria de massas pode ser definida como o estudo de sistema de formação de íons, com ou sem fragmentação, os quais são caracterizados por sua relação massa/carga ( $m/z$ ) abundância relativa. Historicamente, a espectrometria de massas esteve envolvida com estudos na virada do século XIX, com Goldstein descobrindo “raios” positivos em 1886 e Wien estudando suas propriedades elétricas e magnéticas. Em torno de 1900, J. J. Thomson construiu seu espectrômetro de massas parabólico para avaliar a razão carga / massa ( $z/m$ ) para muitas espécies iônicas. Na expressão  $z/m$ ,  $z$  é o número de cargas e  $m$  é a soma total de prótons e nêutrons em um átomo, molécula ou íon. Na moderna espectrometria de massas, o parâmetro medido é a relação  $m/z$ , ao invés de  $z/m$ , a unidade  $m/z$  foi recentemente designada de thomson (Th) (HERBERT e JOHNSTONE, 2003).

Aston continuou o trabalho em Cambridge construindo instrumentos que o auxiliaram a estabelecer a presença de isótopos. Ele era então capaz de mensurar a massa atômica da maioria dos elementos com extrema precisão. Após este período de desenvolvimento, Aston acreditava que praticamente todo o potencial da espectrometria de massas havia sido explorado. A partir de 1940 esta técnica começou a ser amplamente empregada na elucidação de compostos orgânicos na indústria do petróleo. A ionização era realizada por impacto de elétrons (atualmente chamada de eletro ionização). Isto limitou a aplicação da técnica para compostos com massas abaixo de 1 000 Daltons (Da). Durante os anos 50, aparelhos começaram a ser fabricados em escala comercial, e novas aplicações foram sendo

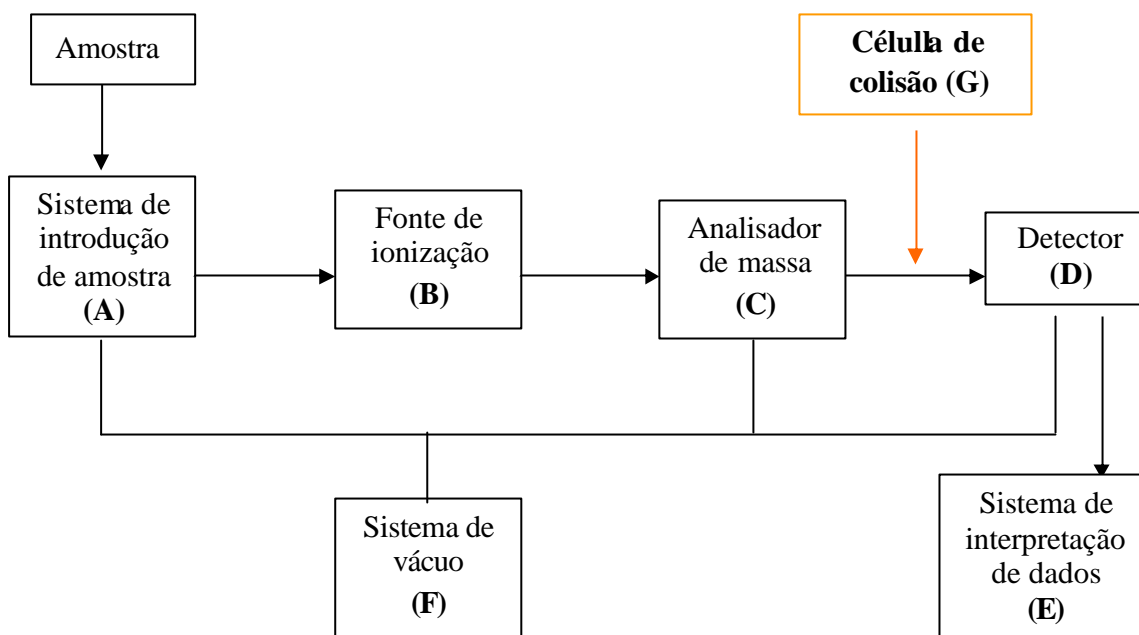
descobertas. Uma das primeiras aplicações foi a identificação de compostos de baixo peso molecular, como os compostos voláteis responsáveis pelo odor de alimentos. Dez anos depois, a poderosa combinação entre espectrometria de massa e cromatografia gasosa levou a uma explosão de aplicações, onde a técnica foi usada em estudos químicos e bioquímicos para qualificação e quantificação de compostos. Instrumentos de CG-MS produziram “montanhas” de dados, os quais eram mais bem interpretados por computadores. Em 1966, Munson e Field, descreveram o desenvolvimento de uma nova técnica de ionização, a ionização química. Após este período, inúmeros métodos de ionização foram desenvolvidos, ampliando significativamente a aplicação dos espectrômetros de massa. Novas técnicas de separação também começaram à ser desenvolvidas, como cromatografia líquida (LC) e eletroforese capilar, conectadas à espectrômetros de massa. (NIESSEN, 2006; ARDREY, 2003)

Atualmente existem diversos modelos de equipamentos, como MS em serie (MS/MS), dissociação por colisão induzida (CID), tempo de vôo (TOF), diferentes tipos de detectores e equipamentos híbridos. Com esta grande variedade, se tornou possível quantificar compostos com massa molecular de até 300 000 Da, com alta sensibilidade e seletividade (HERBERT e JOHNSTONE, 2003).

**2.3.2 Princípio de funcionamento:** a espectrometria de massa é o estudo do efeito da energia de ionização nas moléculas. Isto depende, sobretudo, de reações químicas que ocorrem na fase móvel na qual moléculas da amostra são consumidas durante a formação de espécies iônicas ou neutras. Embora a amostra seja consumida de forma destrutiva pelo espectrômetro de massas, a

técnica é muito sensível, necessitando de pequenos volumes de amostra para ser realizada. O espectrômetro de massas converte moléculas da amostra em íons na fase móvel, separa-as de acordo com sua  $m/z$ . Uma vez carregadas estas moléculas tornam-se aptas à serem manipuladas em um campo elétrico (“túnel” sob alto vácuo). Basicamente, no interior do espectrômetro de massa, a molécula ionizada pode ser levada diretamente ao detector (sistema MS), ou então ser acelerada de encontro à uma célula de colisão (a qual cria uma barreira entre a molécula ionizada e o detector), para que ocorra um choque e formação de fragmentos para posterior detecção (sistema MS/MS), ou ainda, a molécula pode ser confinada em uma espécie de “armadilha” no interior da qual é fragmentada (sistema Ion Trap) e os fragmentos direcionados até o detector. Pela forma como os sistemas MS/MS e Ion Trap atuam, ocorre um aumento na especificidade e sensibilidade da detecção, pois a fragmentação de uma molécula sempre nas mesmas condições irá formar sempre os mesmos fragmentos, tornando o método auto-confirmatório ( NIESSEN, 2006; ARDREY, 2003).

**2.3.3 Componentes:** De uma forma geral, os espectrômetros de massa possuem uma configuração básica, composta por: sistema de introdução de amostra; fonte de ionização; analisador de massa; detector; sistema de interpretação de dados e sistema de vácuo entre o sistema de introdução de amostra e o detector (figura 2.10). Esta conformação básica é presente em praticamente todos os equipamentos. No caso dos sistemas MS/MS, existe ainda uma célula de colisão entre os componentes C e D.



**Figura 2.10:** Componentes e composição básica de um espectrômetro de massa.

**A) Sistema de introdução de amostra:** é o local por onde entra a amostra antes da ionização. O fluxo de amostra, juntamente com a fase móvel, entra na câmara de ionização (onde se encontra a fonte de ionização) através de um pequeno orifício. Os solventes do fluxo são então evaporados (no caso de fluxos líquidos) e migram para um sistema de descarte, enquanto que os analitos são enviados para o processo de ionização (NIESSEN, 2006).

**B) Fontes de ionização:** a fonte de ionização encontra-se no interior de uma câmara chamada de câmara de ionização. As fontes de ionização são projetadas para ionizar analitos, que após ionizados são chamados de íons precursores, independentemente de sua massa. Usualmente, as fontes de ionização possuem um sistema de retirada e focalização dos íons. Os íons são removidos

eletrostaticamente da câmara. Atrás dos íons existe o repulsor, que possui a mesma carga dos íons formados, forçando-os a entrar no analisador de massa em alta velocidade (HERBERT e JOHNSTONE, 2003). Existem diversas formas de ionização, como ionização à laser, bombardeamento rápido de elétrons e ionização térmica. Porém, no contexto deste trabalho, serão citadas apenas duas: ionização química à pressão atmosférica (APCI) e ionização por eletrospray (ESI). *B.1 APCI:* quando o espectrômetro de massa está conectado a um CLAE, a fase móvel entra na câmara de ionização na forma líquida. Esta técnica de ionização está baseada na vaporização da fase móvel através de um fluxo suave de gás (nitrogênio, por exemplo) e aquecimento para formação de gotículas. O gás age como um carreador e auxilia na formação das gotículas. Este spray entra em uma região onde um campo elétrico é produzido por uma descarga proveniente de uma agulha com voltagens em torno de 3-5 kV. As moléculas da fase móvel são então ionizadas e servem como um gás reagente para a formação de íons com as moléculas do analito através de colisão, podendo protonar (modo positivo, representado como  $[M+H]^+$ ) ou desprotonar (modo negativo, representado como  $[M-H]^-$ ) o analito. Podem ocorrer também a formação de adutos, principalmente com amônia e acetato. Após este processo, os íons são enviados para o interior do analisador de massa eletrostaticamente (NIESSEN, 2006; ARDREY, 2003). *B.2 ESI:* este tipo de ionização pode ser dividido em três etapas: nebulização da solução contendo a amostra em gotículas carregadas eletricamente, liberação dos íons de dentro das gotículas e introdução dos íons no espectrômetro de massa. Uma voltagem de 2-3 kV é estabelecida entre a saída do capilar (onde são formadas as primeiras gotículas) e a entrada do espectrômetro de massa. As



gotículas recebem uma descarga elétrica na saída do capilar, que pode ser positiva ou negativa. A gotícula então fica circundada por cargas iguais ao do capilar, porém, o acúmulo de cargas desestabiliza a superfície da gotícula, ocorrendo a formação de gotículas ainda menores. Estas gotículas são então repelidas até uma região chamada “counter electrode”, que possui carga diferente. No caminho percorrido pela gotícula ocorre sua evaporação por ação de temperatura e da presença de gás. Ocorre então um fenômeno chamado de explosão Columbica, fazendo com que sobre apenas os analitos carregados com as cargas que estavam presentes na superfície da gotícula (ARDREY, 2003).

**C) Analisadores de massa:** a função do analisador de massa é separar os íons produzidos na fonte de ionização de acordo com suas diferentes relações  $m/z$ . O analisador sofre constantemente a ação de bombas para a manutenção de alto vácuo, fazendo com que os íons possam transitar no interior do analisador sem sofrer qualquer tipo de resistência nem colisão com moléculas de gás. Existem vários modelos de analisador de massas, tais como: analisador de massa por deflexão magnética, espectrômetro por tempo de voo, simples quadrupolo, entre outros (HERBERT e JOHNSTONE, 2003). Porém será discutido apenas o tipo triplo quadrupolo, que foi o analisador usado neste trabalho. *C.1) Triplo quadrupolo:* no interior deste tipo de analisador existem 4 hastes, dispostas de uma maneira circular, ficando todas as hastes uma em frente a outra para formar uma espécie de “caminho” para o íon. Os pares de hastes opostos estão conectados eletricamente, sendo que um par recebe carga negativa e o outro par recebe uma carga positiva. Estas cargas vão se alternando de forma muito rápida, pois o íon

também está carregado eletricamente, e esta alternância na carga elétrica faz com que o íon descreva uma trajetória espiral até o detector ou até a célula de colisão, dependendo do tipo de equipamento. É possível ajustar estes parâmetros no triplo quadrupolo de forma que apenas íons com relação  $m/z$  desejados sejam conduzidos no interior do analisador de massa (NIESSEN, 2006; ARDREY, 2003).

**D) Detectores:** após deixar o analisador de massa, os íons colidem contra um detector. O multiplicador de elétron é o tipo de detector mais utilizado. *D.1) Multiplicador de elétron:* neste tipo de detector, o feixe de íons colide contra o detector que converte o feixe de íons em feixe de elétrons. Um multiplicador de elétrons possui uma série de eletrodos dispostos de forma circular. Por exemplo, quando o íon toca um eletrodo, este produz 2 elétrons que tocam outro eletrodo produzindo 4 elétrons e assim sucessivamente, multiplicando o sinal em um efeito cascata (ARDREY et al., 2006).

**E) Sistema de interpretação de dados:** este componente do espectrômetro de massas é o que recebe os sinais produzidos no detector interpretando-os. Usualmente, quando conectado a um CLAE, a interpretação do sinal é dado na forma de um pico cromatográfico, este pico cromatográfico é então integrado pelo sistema de interpretação de dados e sua área é calculada. A área do pico é diretamente proporcional ao sinal produzido, que sua vez é proporcional a quantidade de analito presente na amostra. Este sistema de interpretação de dados normalmente é um *software* instalado em um computador e que, além de interpretar os dados, também possibilita que a maioria dos comandos sejam realizados através dele (HERBERT e JOHNSTONE, 2003).

**F) Sistema de vácuo:** o sistema de vácuo é formado por bombas que funcionam ininterruptamente para manter o interior do analisador de massas com uma pressão menor do que  $10^{-6}$  torr. Esta baixa pressão é importante para que não ocorra resistência para o trânsito do íon, mantendo-o intacto e sem alteração de rota.

**G) Célula de colisão:** em equipamentos de MS/MS, existe um componente chamado célula de colisão. Nesta célula existe algum tipo de gás (nitrogênio ou hélio, por exemplo), e está situada entre no meio do caminho percorrido pelo íon. Quando o íon alcança esta célula, eles colidem com os átomos do gás, estas colisões provocam uma fragmentação do íon, estes fragmentos são chamados de transições, que inicialmente são formados pela ruptura das ligações mais frágeis da molécula. A intensidade com que íon atinge esta célula de colisão está relacionada com a velocidade de impacto, definida por um parâmetro chamado de energia de colisão (CE). A CE é o resultado de um aumento ou diminuição do potencial elétrico que expulsa o íon da câmara de ionização (MACLAFERTY, 1983; HOFFMANN et al, 1996).

## **2.4 Sistema LC-MS/MS**

O primeiro registro de uma conexão entre cromatografia líquida e espectrometria de massa data da década de 70. Antes deste período a forma mais comum de separação de substância para posterior detecção no espectrômetro de massa era a cromatografia gasosa. Todavia, pelos princípios aplicados nesta técnica de detecção, muitos analitos não podiam ser detectados devido a sua instabilidade térmica ou incapacidade de volatilização. Já na cromatografia líquida,

os compostos não são expostos à altas temperaturas, fazendo a técnica de LC-MS/MS ganhar muita atenção nestes últimos 40 anos. Esta união entre uma excelente técnica de separação (LC) e uma de detecção (MS/MS) fez com que houvesse uma evolução também nas formas e fontes de ionização. Atualmente as fontes de ionização aplicadas no sistema LC-MS/MS, em praticamente todas as situações, são a APCI e a ESI (MACLAFERTY, 1983; HOFFMANN et al, 1996).

**2.4.1. Desenvolvimento de métodos por LC-MS/MS:** O desenvolvimento de métodos utilizando LC-MS/MS depende de uma série de parâmetros que podem influenciar a obtenção do resultado final. Como são dois equipamentos envolvidos neste tipo de análise, existem parâmetros que devem ser otimizados no espectrômetro e parâmetros que devem ser otimizados no LC. Uma boa definição destes parâmetros, de forma conjunta, garante um aumento na precisão e sensibilidade da detecção (HERBERT e JOHNSTONE, 2003; ARDREY, 2003).

**a) Parâmetros de MS/MS:** Para o desenvolvimento de metodologias analíticas por LC-MS/MS, é necessário que os parâmetros relacionados ao espectrômetro sejam definidos primeiro, sem a conexão com o LC. Para a definição e otimização destes parâmetros, processo também chamado de *tunning*, é necessário que se conheça informações relativas às características do analito, tais como massa molecular, polaridade, termoestabilidade e volatilidade. No caso de sistemas MS/MS há a produção de fragmentos (também chamados de transições) que devem ser obtidos a partir da molécula de interesse (chamada de íon precursor ou íon pai). Para a obtenção destes fragmentos da forma mais adequada, os parâmetros que devem

ser considerados e otimizados são: a fonte de ionização, que deve ser selecionada de forma adequada de acordo com o objetivo do estudo. Isto porque nem todas as moléculas são ionizadas da mesma forma por diferentes fontes de ionização, voltagem na fonte de ionização, parâmetro importante para formação dos íons, a pressão do gás na célula de colisão, parâmetro este importante no processo de fragmentação da molécula ionizada, temperatura na fonte de ionização, fator importante tanto no processo de ionização bem como evaporação do solvente para posterior descarte e o *dwell time* (DW) que é um parâmetro importante na detecção de múltiplos íons, pois o detector MS/MS não é capaz de identificar os íons simultaneamente e este parâmetro serve como o tempo em que o equipamento leva para detectar cada íon de forma separada, este tempo é extremamente baixo, na ordem de milisegundos (MACLAFERTY, 1983; HOFFMANN et al, 1996; HERBERT e JOHNSTONE, 2003). Alguns equipamentos possuem parâmetros diferenciais, por motivos comerciais e protegidos por registros de patente, que auxiliam e aumentam o processo de detecção. No caso do equipamento utilizado neste estudo, além dos parâmetros citados acima, existem ainda o *declustering potential* (DP), que é um potencial aplicado ainda na fonte de ionização e que tem por finalidade desfazer possíveis ligações (chamadas de *clusters*) entre os analitos e as moléculas da fase móvel ou ligações entre os próprios analitos. Estes *clusters* podem interferir de forma significativa na sensibilidade e seletividade da detecção, pois eles “prendem” as moléculas de analito alterando sua massa, sendo desta forma descartado no processo de seleção pelo analisador de massas. Existe também a energia de colisão (CE, do inglês *collision energy*), genericamente chamada de voltagem de aceleração, que é um parâmetro importante no processo

de fragmentação, pois esta energia acelera o íon contra a célula de colisão, ela deve ser ajustada para que a molécula sempre se fragmente da mesma forma, energias de colisão muito alta fragmentam a molécula de forma muito intensa praticamente destruindo-a e energias de colisão muito baixas acabam deixando a molécula passar intacta pela célula de colisão, não ocorrendo a fragmentação. Outro parâmetro é o potencial de saída da célula (CXP do inglês *cell exit potential*), é utilizado para remover os fragmentos formados na célula de colisão e direcioná-los até o detector, isto porque o íon transita até a célula de colisão em condições de vácuo, porém, na célula de colisão existe a quebra do vácuo pela presença do gás utilizado como barreira para a fragmentação do íon, ocorrendo uma desaceleração, que deve ser retomada para que os fragmentos atinjam o detector.

**b) Parâmetros de LC:** Os parâmetros cromatográficos devem ser definidos e otimizados após a obtenção dos parâmetros de MS/MS. Neste caso, o LC é conectado ao detector MS/MS e os parâmetros a serem otimizados são: solventes da fase móvel, normalmente são utilizados água, metanol e acetonitrila e em alguns casos na presença de algum tipo de solução que auxilie no processo de ionização e formação de adutos (como acetato de amônia, por exemplo) ou ainda soluções que proporcionem um processo chamado de derivatização, que facilita também o processo de ionização, como ácido fórmico, por exemplo. Outro parâmetro é o fluxo de fase móvel, que não pode ser muito alto, devido à capacidade da interface de ionização em evaporar este fluxo para posterior descarte, nem muito baixo, o que pode levar a uma separação muito lenta dos compostos de interesse, aumentando o tempo de análise e também propiciando

uma integração não ideal dos picos cromatográficos pelo sistema de interpretação de dados. A escolha da coluna cromatográfica também é um parâmetro importante, pois a separação dos analitos ocorre no interior da coluna e depende diretamente do tipo utilizado (MACLAFERTY, 1983; HOFFMANN et al, 1996). Com a definição destes parâmetros é possível obter dados necessários para a realização da quantificação de substância por LC-MS/MS, como LOD, LOQ e construção da curva analítica. O LOD é a menor quantidade de analito que pode ser detectada, mas não quantificada. Em análise por CLAE, o LOD é determinado por 3 vezes a relação entre o sinal (pico cromatográfico formado pelo analito) e o ruído (linha de base do cromatograma) representado por 3 S/N. O LOQ é a menor quantidade de analito que pode ser quantificada com precisão. Em análises por CLAE é definida como 6 ou 10 vezes a relação sinal ruído (6 ou 10 S/N). A curva de calibração avalia a variação da detecção com diferentes concentrações de analito através de um parâmetro chamado de coeficiente de correlação ( $R^2$ ). Para a construção da curva analítica são necessários no mínimo 5 níveis diferentes de concentração avaliados em triplicata. Quanto mais proporcionais são as detecções, em relação à concentração do analito e o sinal produzido pelo detector, mais o  $R^2$  tende à 1 pela equação da reta formada pela relação entre as diferentes concentrações e a intensidade de sinal produzido (HERBERT e JOHNSTONE, 2003).

## 2.5 Métodos de Detecção Aplicados às Micotoxinas

Como citado anteriormente, existem diversas maneiras para a detecção de micotoxinas, com suas vantagens e desvantagens. Para um melhor entendimento da aplicação destes métodos e sua relação com o objetivo desse trabalho, serão relatados métodos publicados na literatura com aspectos específicos de detecção para cada micotoxina separadamente.

### 2.5.1 Aflatoxinas

Os métodos de detecção tradicionais para AFLs, compreendem CCD, o qual é ainda o mais utilizado principalmente em países em desenvolvimento, sendo que os resultados obtidos são aceitos por praticamente todas as legislações. Outro método muito comum são os *kits* de imunoensaio, porém não oferecem muita segurança na quantificação destas micotoxinas. Um método tradicional muito eficiente para quantificação de AFLs baseia-se em LC conectada à detectores de fluorescência. Devido a natureza fluorescente destas micotoxinas, é possível alcançar limites muito baixos através desta técnica. Etapas de extração e limpeza utilizando colunas de imunoafinidade têm aumentado consideravelmente a detecção de AFLs por LC-FL (ZÖLLNER e MAYER-HELM, 2006).

LC-MS/MS tem sido utilizado em estudos envolvendo AFLs, objetivando auxiliar o entendimento dos mecanismos de ação destas toxinas *in vivo*, através da elucidação estrutural de alteração em biomarcadores coletados em urina. Porém, existe um número limitado de métodos de quantificação de AFLs em alimentos utilizando LC-MS. Neste aspecto, a espectrometria de massas é mais utilizada



como um método de confirmação para os resultados obtidos através dos métodos tradicionais. Porém, os baixos níveis detectáveis através desta técnica e a obtenção de resultados auto confirmatórios, vem estimulando pesquisadores à desenvolverem mais metodologias ( ZÖLLNER e MAYER-HELM, 2006)

No que diz respeito à extração de AFLs para posterior análise por LC-MS/MS, poucos métodos utilizam etapas de limpeza simples. Scatzki et al., 2002 utilizaram extratos de amendoim para introdução direta no LC-MS/MS e Abbas et al 2002, no mesmo ano utilizaram de milho, com posterior extração líquido/líquido e introdução no sistema. Apesar da excelente seletividade da detecção por MS/MS, diversos autores têm aplicado sistemas de imunoafinidade para etapas de limpeza (KUSSAK, et al., 1995; SCHOLL, et al., 1997; WALTON, et al., 2001) enquanto outros demonstraram eficientes métodos de limpeza aplicando colunas de C<sub>18</sub> (MARZZILI et al., 1998; BLESA et al., 2003).

As condições típicas para análise de AFLs por LC-MS/MS, têm utilizado colunas de C<sub>18</sub> na separação dos compostos no LC e metanol/água ou acetonitrila/água como solventes na fase móvel, tanto em sistemas isocráticos, bem como gradientes. Em alguns casos, ácido acético, ácido fórmico e sais de amônia são adicionados à fase móvel com o objetivo de aumentar a capacidade de separação e ionização. Normalmente as AFLs podem ser separadas nestas condições em corridas cromatográficas que variam de 10 à 25 minutos (WALTON et al., 2001; ABBAS et al., 2002; SORENSEN e ELBAEK, 2005; KOKKONEN et al., 2005). No que diz respeito às condições do MS/MS, as AFLs tem demonstrado um ótimo comportamento quando ESI é utilizado como fonte de ionização no modo

positivo (KUSSAK et al., 1995; BLESA et al., 2003; VENTURA et al., 2004;). Trabalhos reportando a utilização de APCI são escassos, e parece que a dificuldade de ionização é devido aos subgrupos das AFLs e da geometria da APCI. Apenas métodos desenvolvidos por Kokkonen et al., 2005, Sorensen et al., 2005 e Cavaliere et al., 2006, atingiram as exigências da legislação da União Européia (ZÖLLNER e MAYER-HELM, 2006). Maiores detalhes sobre a aplicação de LC-MS/MS na detecção de AFIs podem ser observados na Tabela 2.2.

### **2.5.2 Fumonisinias**

A detecção de FBs é mais focada em grãos e seus produtos. Para alcançar limites apropriados de detecção nos métodos tradicionais, são necessárias etapas de purificação do extrato e derivatização do analito após a extração de matrizes sólidas, normalmente realizada com água:acetonitrila ou água:metanol. A aplicação de colunas de extração de fase sólida (SPE) é normalmente utilizada com troca por força iônica na etapa de limpeza, mais recentemente também estão sendo utilizadas colunas de C<sub>18</sub> e colunas de imunoafinidade (WILKES e SUTHERLAND, 1998). Devido a sua alta massa molecular e polaridade, misturas de FBs são tradicionalmente separadas por LC. Como elas não tem grupos cromóforos, seu grupo amino livre é geralmente derivatizado para detecção por fluorescência alcançando limites de detecção entre 10 e 50 µg/kg. Um grande número de derivativos tem sido estudado, porém, o uso de o-phtaldeído é mais amplamente utilizado devido sua estabilidade.(SHEPHARD, 1998). Diferente do LC, o CG praticamente não é utilizado na detecção de FBs. Para análises qualitativas, técnicas de baixo custo, como CCD e de alta seletividade como imunoenaios têm

tido grande aceitação. Todavia, em casos positivos, torna-se necessária a aplicação de etapas de confirmação e quantificação (WILKES e SUTHERLAND, 1998; SHEPHARD, 1998)

Os estudos conduzidos para detectar FBs por LC-MS/MS atualmente têm utilizado ESI como fonte de ionização. O maior enfoque destes métodos é na detecção de FB<sub>1</sub>, devido à sua alta toxicidade em comparação com os demais tipos de FBs. Estes estudos têm obtido limites de detecção muito baixos. Além disso, cultura fúngicas tem sido estudadas para a descoberta de novos tipos de FBs, bem como a aplicação de LC-MS/MS objetivando o estudo de metabólitos das FBs (ZÖLLNER e MAYER-HELM, 2006).

Em relação aos procedimentos de extração, solventes como metanol, acetonitrila ou misturas destes com água são utilizados. Para a purificação e enriquecimento do extrato, amostras líquidas e extratos líquidos provenientes de matrizes sólidas são normalmente aplicadas em colunas SPE de fase reversa (DOERGE et al., 1994; HINNES et al., 1995; PLATTNER, 1999; HARTL et al., 1999), troca por força iônica (CALDAS et al., 1995; SEEFELDER et al., 2002; ROYER et al., 2004) e colunas de imunoafinidade para posterior detecção no LC-MS/MS (CHURCHWELL et al., 1997; NEWKIRK et al., 1998; PAEPENS et al., 2005). Em contra partida, dependendo da complexidade das matrizes, alguns autores não utilizaram nenhum tipo de etapa de limpeza, desenvolvendo métodos em níveis de mg/kg (VOSS et al., 2001; BARTOK et al., 2006; CIRILLO et al., 2003).

Para análises por LC-MS/MS geralmente são utilizadas colunas de C<sub>18</sub> e solventes como metanol:água ou acetonitrila:água em sistemas isocráticos ou gradientes. Normalmente as FBs não eluem de forma adequada com fases móveis neutras ou com pH básico, por isso, são utilizados ácidos fórmico (CHURCHWELL et al., 1997; NEWKIRK et al., 1998; ROYER et al., 2004; BARTOK et al., 2006) e acético (CHEN et al., 1992; PLATNER, 1999; ABBAS et al., 2002; SORENSEN e ELBAEK, 2005) adicionados à fase móvel para melhorar a retenção do analito, forma do pico cromatográfico e separação na coluna. Nas condições típicas, análises de FBs por LC-MS/MS levam entre 6 e 30 min (ZÖLLNER e MAYERHELM, 2006). Com apenas uma exceção encontrada (ROYER et al., 2004), a fonte de ionização utilizada para análise de FBs tem sido ESI. As moléculas protonadas [M+H]<sup>+</sup> e desprotonadas [M-H]<sup>-</sup> são abundantemente formadas e fragmentadas em modos negativos e positivos (DOERGE et al. 1994; PLATNER, 1999; CALDAS et al., 1995). Ver detalhes de métodos por LC-MS/MS para FBs na Tabela 2.3.

### 2.5.3 Ocratoxina A

Devido a grande toxicidade e restrições das legislações em relação à OTA, métodos sensíveis e precisos são exigidos em níveis abaixo de  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  em uma grande variedade de alimentos e bebidas. Devido a grande capacidade fluorescente destas toxinas, métodos utilizando CLAE com detectores de FL têm sido como primeira escolha na análise de OTA, assim como CCD (principalmente em países fora da Europa e EUA). As desvantagens são os níveis de sensibilidade e a ocorrência de interferência pelos componentes da matriz (BETINA, 1993). Métodos empregando CG são praticamente inexistentes na análise de OTA.

Análises por ELISA têm demonstrado grande importância, porém, apenas para fins qualitativos, necessitando de outros métodos para confirmação e quantificação (BETINA, 1993; VALENTE, 1998). De forma geral, independente da forma de detecção, há necessidade de etapas de extração e limpeza muito cuidadosas, com a utilização de colunas de imunoafinidade. Baixas taxas de recuperação continuam sendo um problema, isto porque a OTA se liga de forma muito forte com proteínas e DNA (VALENTE, 1998).

**Tabela 2.2-** Métodos analíticos desenvolvidos para AFLs por LC-MS/MS reportados na literatura

Analito	Matriz	Preparo da amostra	Coluna	Fase móvel	FI	LOD/LOQ µg/kg	Autor
AFLs	Pó de osso e urina	Extração: ACN e Limpeza: IAC	C <sub>18</sub>	Isocrática: H <sub>2</sub> O:ACN:MeOH 60:20:20	ESI	0.05 / NR (cada AFL)	Kussak, et al 1995
AFLs	Amendoim /pasta de amendoim/fig o/pimenta	Extração: metanol Limpeza: coluna de celulose e sílica gel	C <sub>18</sub>	Isocrática: H <sub>2</sub> O:ACN:MeOH 60:28:12	APCI	0.1 / NR (cada AFL)	Jorgensen, et al 1998
AFLs	Amendoim	Dispersão de fase sólida da matriz + C <sub>18</sub>	C <sub>18</sub>	Isocrática: MeOH:H <sub>2</sub> O-55:45	ESI	0.07/0.2 (AFB <sub>1</sub> ); 0.2/0.6 (AFB <sub>2</sub> ); 0.07/0.2 (AFG <sub>1</sub> ) e 0.2/0.6 (AFG <sub>2</sub> )	Blesa et al, 2003
AFLs	Ervas medicinais	Extração: MeOH:H <sub>2</sub> O-80:20. Limpeza: SPE	C <sub>18</sub>	Isocrática: MeOH:H <sub>2</sub> O-70:30	ESI	0.01 / 0.25 (cada AFL)	Ventura et al, 2005
AFLs e AFM <sub>1</sub>	Queijo	Extração: 0.1% HCOOH em ACN:Hexano-55:45	C <sub>18</sub>	Gradiente: 0.1% AcOH em H <sub>2</sub> O:ACN	ESI	0.8/5.0 (cada AFL) e 0.3/0.6 (AFM <sub>1</sub> )	Kokkonen, et al, 2005
AFB <sub>1</sub>	Cigarro (filtro)	Extração: isopropanol Limpeza: IAC	C <sub>18</sub>	Isocrática: NH <sub>4</sub> 10mM:ACN-67:33/H <sub>2</sub> O	ESI	0.01/0.15 (AFB <sub>1</sub> )	Edinboro et al, 2005

AFLs: aflatoxinas [AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub> e AFG<sub>2</sub>] AFB<sub>1</sub>=Aflatoxina B<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>= Aflatoxina B<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub>= Aflatoxina G<sub>1</sub>, AFG<sub>2</sub>= Aflatoxina G<sub>2</sub>, AFM<sub>1</sub>= Aflatoxina M<sub>1</sub>, ACN=acetonitrila, MeOH=metanol, H<sub>2</sub>O=água, SPE=cartucho de extração em fase sólida, FI=fonte de ionização. LOD=limite de detecção, LOQ=limite de quantificação, ESI=ionização eletrospray, APCI=ionização à pressão atmosférica, NR=não reportado (ZÖLLNER e MAYER-HELM,2006)

**Tabela 2.3-** Métodos analíticos desenvolvidos para FBs por LC-MS/MS reportados na literatura

Analito	Matriz	Preparo da amostra	Coluna	Fase móvel	FI	LOD/LOQ µg/kg	Autor
FB <sub>1</sub>	Milho	Extração com ACN:H <sub>2</sub> O-50:50. Limpeza: SPE C <sub>18</sub>	C <sub>18</sub>	Isocrática: 1% AcOH:ACN-95:5	ESI	156/NR	Hines, et al, 1995
FB <sub>1</sub> , FB <sub>2</sub> e FB <sub>3</sub>	Ração para roedores	Extração: ACN:H <sub>2</sub> O-50:50. Limpeza SPE e IAC	C <sub>18</sub>	Isocrática: 1% de HCOOH:ACN-55:45/H <sub>2</sub> O	ESI	0.3/1.1 (FB <sub>1</sub> , FB <sub>2</sub> e FB <sub>3</sub> )	Churchwell, et al, 1997
FB <sub>1</sub> , FB <sub>2</sub> e FB <sub>3</sub>	Ração para roedores	Extração: ACN:H <sub>2</sub> O-50:50. Limpeza SPE e IAC	C <sub>18</sub>	Isocrática: 1% de HCOOH:ACN-55:45	ESI	NR/0.25 (FB <sub>1</sub> , FB <sub>2</sub> e FB <sub>3</sub> )	Newkirk, et al, 1998
FB <sub>1</sub>	Produtos de milho	Extração: ACN:MeOH:H <sub>2</sub> O-25:25:50. Limpeza: SPE C <sub>18</sub>	C <sub>18</sub>	Gradiente: H <sub>2</sub> O:MeOH com 0.05% TFA	ESI	5/NR	Hartl, et al, 1999
FB <sub>1</sub>	Produtos de milho	Extração: MeOH: 0.1M HCl	C <sub>18</sub>	Gradiente: H <sub>2</sub> O:MeOH com 0.05% TFA	ESI	NR/ 20	Hartl, et al, 1999
FB <sub>1</sub>	Milho e produtos	Extração com ACN:H <sub>2</sub> O-50:50, pH 4.5 com HCl 6N	C <sub>18</sub>	Gradiente: H <sub>2</sub> O:MeOH com 0.1% AcOH:MeOH	ESI	2/NR	Voss, et al, 2001
FB <sub>1</sub>	Milho e produtos	Extração: ACN:MeOH:H <sub>2</sub> O-25:25:50. Limpeza: SPE C <sub>18</sub>	C <sub>18</sub>	Gradiente: H <sub>2</sub> O:ACN com 0.05% de TFA	ESI	10/NR*	Seefelder et al, 2001
FB <sub>1</sub>	Aspargo e alho	Extração: MeOH:0.1M HCl Limpeza: SPE-troca iônica	C <sub>18</sub>	Gradiente: H <sub>2</sub> O:MeOH com 0.05% de TFA	ESI	NR*/NR*	Seefelder et al, 2002
FB <sub>1</sub> e FB <sub>2</sub>	Milho e produtos	Extração com MeOH	C <sub>18</sub>	Gradiente: 1% HCOOH:5mM NH <sub>4</sub> OAc em MeOH	ESI	NR*/5	Cirillo, et al, 2003
FB <sub>1</sub>	Milho	Extração: ACN: H <sub>2</sub> O-75:25. Limpeza: SPE-troca iônica	C <sub>18</sub>	Gradiente: H <sub>2</sub> O:ACN c/ 5mM NH <sub>4</sub> OAc e HCOOH, pH 4.0	ESI	20/50	Royer et al, 2004
FB <sub>1</sub> , FB <sub>2</sub> , FB <sub>3</sub> e FB <sub>4</sub>	Milho e produtos	Extração: ACN:50mM HCOOH-75:25. Limpeza:	C <sub>18</sub>	Gradiente: H <sub>2</sub> O:MeOH com 25mM de HCOOH	ESI	2/NR* (FB <sub>1</sub> ), 1/NR* (FB <sub>2</sub> )	Faberi et al, 2005

---

SPE C <sub>18</sub>							
FB <sub>1</sub> e FB <sub>2</sub>	Leite	Extração: ACN:hexano- 61:39. Limpeza: SPE-troca iônica	C <sub>18</sub>	Gradiente: H <sub>2</sub> O:MeOH com 0.02% de AcOH	ESI	0.04/0.09 (FB <sub>1</sub> ) 0.02/0.04 (FB <sub>2</sub> )	Sorensen et al, 2005

---

FB<sub>1</sub>=Fumonisina B<sub>1</sub>, FB<sub>2</sub>= Fumonisina B<sub>2</sub>, FB<sub>3</sub>= Fumonisina B<sub>3</sub>, ACN=acetonitrila, MeOH=metanol, H<sub>2</sub>O=água, SPE=cartucho de extração em fase sólida, FI=fonte de ionização. LOD=limite de detecção, LOQ=limite de quantificação, ESI=ionização eletrospray, APCI=ionização à pressão atmosférica, NR=não reportado  
(ZÖLLNER e MAYER-HELM,2006)



Nas etapas de extração, em amostras sólidas, são utilizados água (HANCOCK, 2002), acetato de etila (LOSITO et al., 2004), clorofórmio (SAEGER et al., 2004; MALLY et al., 2005; TIMPERIO et al., 2006) e metanol:água (XIAO et al., 1996; PARK et al., 2005), acetonitrila:água (BISELLI et al., 2004 e 2005), hexano:acetonitrila (SORENSEN e ELBAEK, 2005) e misturas de diclorometano e etanol (JORGENSEN et al., 1999). Extratos líquidos, bem como amostras líquidas, são regularmente submetidas à processos de limpeza e enriquecimento do extrato com a aplicação de cartuchos SPE C<sub>18</sub> (ZÖLLNER et al., 2000; REINSCH et al., 2007), troca por força iônica (SAEGER et al., 2004). Muito freqüentemente observa-se também a aplicação de colunas de imunoafinidade (SCOTT et al., 1998; LAU et al., 2000; LEITNER et al., 2002; LINDENMEIER et al., 2004; PARK et al., 2005; TIMPERIO et al., 2006).

Nas condições de separação em LC usualmente têm sido aplicadas colunas de C<sub>18</sub> e C<sub>8</sub>, com metanol:água, acetonitrila:água e metanol:acetonitrila:água em sistemas isocráticos e gradientes. Os tempos de análise por LC-MS/MS demandam um tempo normalmente inferior à 10 minutos (JORGENSEN et al., 1999; DEGELLMAN et al., 1999; ZÖLLNER et al., 2000; VENTURA et al., 2003; SHEPHARD et al., 2003; SAEGER et al., 2004). Apesar da alta seletividade de MS/MS, separações cromatográficas, freqüentemente em combinação com procedimentos apropriados de extração, são necessárias para remover interferentes da matriz, com o objetivo de aumentar a sensibilidade e reprodutibilidade de dados quantitativos (ZÖLLNER et al., 2003). Em relação aos parâmetros de MS/MS, geralmente e independentemente da geometria da interface

de ionização, OTA oferece um extenso comportamento de fragmentação em APCI, resultando em uma sensibilidade menor quando comparada com ESI, conseqüentemente ESI tem sido quase que exclusivamente utilizada para quantificação de OTA (BECKER et al., 1998; LAU et al., 2000). Mais informações sobre métodos por LC-MS/MS para detecção de OTA na Tabela 2.4.

#### **2.5.4 Patulina**

Devido a toxicidade aguda da PTL, teratogenicidade e possível carcinogenicidade, a Organização Mundial de Saúde recomenda seu limite em alimentos na ordem de 50 µg/kg. Conseqüentemente, muitos países adotaram limites entre 20-50 µg/kg (EGMOND, 1997).

A técnica mais utilizada para PTL é LC conectada à UV, isto devido à alta capacidade de absorção UV. LC-MS/MS tem sido predominantemente aplicada para análise de PTL em sucos de maçã (RYCHLIK e SCHIEBERLE, 1999; YAMAZAKI et al., 2004), e em menor escala em outras frutas e milho (RYCHLIK e SCHIEBERLE, 1999). Tradicionalmente, o processo de preparação da amostra consiste em extração líquido/líquido com acetato de etila e limpeza em cartuchos SPE. Na análise por MS/MS, temperaturas aplicadas na fonte APCI parece ter grande influência na detecção, sendo que altas temperaturas parecem produzir picos melhores (SEWRAM et al., 2000). Devida à sua natureza ácida, a PTL é melhor ionizada no modo negativo, tanto em APCI quanto ESI (RYCHLIK e SCHIEBERLE, 1999; TAKINO et al., 2003). Mais informações sobre métodos para PTL por LC-MS/MS ver Tabela 2.5.

### 2.5.5 Tricotecenos

Detecções confiáveis de tricotecenos são exigidas em valores abaixo de 100-500  $\mu\text{g}/\text{kg}$  em amostras naturalmente contaminadas, enquanto que valores menores (10-50  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) são necessários para pesquisas, com o objetivo de estabelecer riscos relacionados com este grupo de micotoxinas (LANGSETH e RUNDBERGET, 1998). As técnicas predominantemente utilizadas para a detecção destas toxinas baseiam-se em GC/MS ou GC/ECD, após diferentes formas de extração e derivatização. A maior vantagem destes métodos é sua alta eficiência de separação em misturas e obtenção de resultados relativamente seguros para tricotecenos dos grupos A e B (KRUSKA et al., 2001). Métodos de ELISA, utilizadas para análises qualitativas têm demonstrado resultados pouco precisos e superestimados dos níveis de tricotecenos em amostras biológicas ( JOSEPH et al., 2001). Métodos baseados em LC são utilizados com uma frequência muito menor, devido a dificuldade relativa na separação dos tricotecenos e a baixa sensibilidade dos detectores de UV.

A separação no CLAE é de extrema importância antes da detecção por MS/MS, isto porque, análises destas toxinas geralmente lidam com mais de um tipo de tricoteceno em amostras complexas. Em praticamente todos os casos são utilizadas colunas  $\text{C}_{18}$  com acetonitrila:metanol:água (HUOPALATHI et al., 1997; RAZAZZI et al., 1999 e 2003; LAGANA et al., 2003), metanol:água (BERGER et al., 1999; PLATNER et al., 2003; DALL'ASTA et al., 2004; KRSKA et al., 2004; BISELI et al., 2004 e 2005;) e acetonitrila:água (PALLARONI et al., 2002; ROYER et al., 2004; CAVALIERI et al., 2005; KLÖTZEL et al., 2005) como fase móvel, tanto em

sistemas isocráticos como gradientes. Neste contexto, metanol tem demonstrado um aumento na sensibilidade do MS/MS, principalmente para tricotecenos do grupo B, quando comparado com acetonitrila (BISELLI et al., 2004 e 2005; BERTHILLER et al., 2005). Ácido acético e acetato de amônia são predominantemente aplicados como aditivos para aumentar a separação cromatográfica ou para produzir adutos para melhorar a sensibilidade no MS/MS (HUOPALATHI et al., 1997; TUOMI et al., 1998; BERGER et al., 1999; RAZAZI et al., 2002; ROYER et al., 2004; SORENSEN e ELBAEK, 2005; BERTHILLER et al., 2005; KLÖTZEL et al., 2005). Dependendo dos tricotecenos, colunas e matrizes, os tempos de corrida cromatográfica variam entre 6-30 minutos. Em relação aos parâmetros de MS/MS, tanto APCI quanto ESI, nos modos negativo e positivo demonstram excelente capacidade de ionização dos tricotecenos, todavia as diferenças encontradas nos processos de ionização parecem ter relação com o tipo de tricoteceno, geometria e detalhes técnicos dos equipamentos de MS/MS (HUOPALATHI et al., 1997; RAZAZZI et al., 1998 e 2003; BERGER et al., 1999; LAGANA et al., 2003; PLATNER et al., 2003; KRŠKA et al., 2004; DALL'ASTA et al., 2004; BISELI et al., 2004 e 2005;). APCI parece ser um pouco menos eficiente quando comparado com ESI, com isso, ESI tem sido aplicado na maioria das vezes na quantificação dos tricotecenos (BISELLI et al., 2004 e 2005; KLÖTZEL et al., 2005). Informações mais detalhadas de métodos para quantificação de tricotecenos por MS/MS estão presentes na Tabela 2.6.

**Tabela 2.4-** Métodos analíticos desenvolvidos para OTA por LC-MS/MS reportados na literatura

Analito	Matriz	Preparo da amostra	Coluna	Fase móvel	FI	LOD/LOQ µg/kg	Autor
OTA	Cerveja e café	Extração: Mg Cl <sub>2</sub> 0.4 M e tolueno/H <sub>2</sub> O. Limpeza: SPE-Si	C <sub>18</sub>	Gradiente: 0.05% TFA em H <sub>2</sub> O:MeOH	ESI	0.06/2.5(cerveja) 0.09/4.0 (café)	Becker, et al, 1998
OTA	Cerveja	Extração: líquido/líquido Limpeza SPE-sílica	C <sub>18</sub>	Gradiente: 0.05% TFA em H <sub>2</sub> O:MeOH	ESI	0.06/2.5	Degelmann, et al 1999
OTA	Café	Extração: MeOH: NaHCO <sub>3</sub> - 50:50/H <sub>2</sub> O. Limpeza: IAC	C <sub>18</sub>	Isocrática: H <sub>2</sub> O:MeOH:ACN-1:1:1 com 0.17 & de HCOOH	ESI	0.5/1.0	Lau, et al, 2000
OTA	Vinho	SPE G <sub>8</sub>	C <sub>18</sub>	Isocrática: 2.5% AcOH:MeOH- 31.5:68.5/H <sub>2</sub> O	ESI	0.025/0.5	Zöllner, et al 2000
OTA	Vinho	SPE com imunoafinidade ou C <sub>18</sub>	C <sub>18</sub>	Isocrática: solução aquosa 2.5% AcOH:MeOH-31.5:68.	ESI	0.15/1.0	Leitner et al, 2002
OTA	Café	Extração: NaHCO <sub>3</sub> , IAC	C <sub>18</sub>	Isocrática: 0.1% HCOOH em H <sub>2</sub> O/ACN-60:40	ESI	0.1/NR	Ventura et al, 2003
OTA	Vinho	IAC	C <sub>18</sub>	Isocrática: H <sub>2</sub> O/ACN-26:74 com HCOOH 0,1%	ESI	0.01/NR	Shephard, et al, 2003
OTA	Café, pimenta, vinho e cerveja	Extração: MgCl <sub>2</sub> 0.4M/H <sub>2</sub> O e tolueno c/ IAC	C <sub>18</sub>	Gradiente: TFA 0.05% em H <sub>2</sub> O:MeOH	ESI	0.5/1.4	Lindenmaeir, et al, 2004
OTA	Vinho	Injeção direta	C <sub>18</sub>	Isocrática: AcOH:NH <sub>3</sub> em H <sub>2</sub> O:ACN- 85:15	ESI	0.05/NR	Dall'Asta, et al, 2004
OTA	Cereais	Extração: MeOH:HCOOH- 99:1.Limpeza SPE G <sub>8</sub>	C <sub>18</sub>	Isocrática: 0.1M HCOOH:MeOH- 30:70	ESI	0.3/0.95	Blesa et al, 2004
OTA	Uvas	Extração: CHCl <sub>3</sub>	C <sub>18</sub>	Gradiente: H <sub>2</sub> O:ACN ambos com 0.05% HCOOH	ESI	0.01/0.02	Timperio et al, 2006
OTA	Vinho	Extração: SPE-troca iônica	C <sub>18</sub>	Isocrática: H <sub>2</sub> O/MeOH/AcOH- 25.5:69:1.5	ESI	0.35/1.13	Reinsch, et al, 2005

OTA=ocratoxina A, ACN=acetoneitrila, MeOH=metanol, H<sub>2</sub>O=água, SPE=cartucho de extração em fase sólida, FI=fonte de ionização. LOD=limite de detecção, LOQ=limite de quantificação, ESI=ionização eletrospray, APCI=ionização à pressão atmosférica, NR=não reportado (ZÖLLNER e MAYER-HELM,2006)

**Tabela 2.5-** Métodos analíticos desenvolvidos para PTL por LC-MS/MS reportados na literatura

Analito	Matriz	Preparo da amostra	Coluna	Fase móvel	FI	LOD/LOQ µg/kg	Autor
PTL	Suco de maçã, produtos de frutas, pão de trigo	Extração: acetato de etila. Limpeza: Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> 1.5%	C <sub>18</sub>	Gradiente: H <sub>2</sub> O:ACN	ESI	20/NR	Rychlik et al, 1999
PTL	Suco de maçã	Extração: acetato de etila, Limpeza: Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> 1.5%	C <sub>18</sub>	Isocrática: H <sub>2</sub> O:ACN-90:10	APCI	4/10	Sewram et al, 2000
PTL	Suco de maçã	Extração: acetato de etila, Limpeza: Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> 1.5%	C <sub>18</sub>	Isocrática: NH <sub>4</sub> OAc 10mM:MeOH-98:2	APCI	0.20/NR	Takino et al, 2003
PTL	Suco de maçã	Extração: acetato de etila, Limpeza: Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> 1.5%	C <sub>18</sub>	Gradiente: H <sub>2</sub> O:ACN	ESI	2.5/5.0	Yamazaki et al, 2004

PTL=patulina, ACN=acetonitrila, MeOH=metanol, H<sub>2</sub>O=água, SPE=cartucho de extração em fase sólida, FI=fonte de ionização. LOD=limite de detecção, LOQ=limite de quantificação, ESI=ionização eletrospray, APCI=ionização à pressão atmosférica, NR=não reportado

### 2.5.6 Zearalenona

Devido aos efeitos estrogênicos da ZON e a presença de legislações exigem métodos de determinação capazes de quantificar níveis entre 10 e 100 µg/kg em alimentos. LC com detector de fluorescência é atualmente o método de escolha para detecção da ZON, oferecendo sensibilidade, seletividade e eficiente separação após etapas adequadas de extração e limpeza (KRUSKA et al., 2001; FAZEKAS e TAR, 2001). A utilização de GC não é comum na análise de ZON. Países fora da Europa e dos EUA ainda utilizam técnicas de CCD, devido ao baixo custo e facilidade de manuseio. ELISA oferece resultados semelhantes aos obtidos por LC-FD, apesar de ser necessária a confirmação por outros, métodos devido à interferência da matrix nas colunas de imunoafinidade, evitando resultados falso-positivos (KRUSKA et al., 2001).

Usualmente, a extração em cereais e grãos utiliza acetonitrila:água (ROSENBERG et al., 1998; ZÖLLNER et al., 1999; SCHNEWEISS et al., 2002; BISELLI et al., 2004 e 2005; ROYER et al., 2005; CAVALIERI et al., 2005;), tecidos animais com metanol (JODLBAUER et al., 2000; ZÖLLNER, et al., 2002; KLEINOVA et al., 2002) e culturas fúngicas com metanol e solução aquosa de cloreto de sódio (LLORENS et al., 2006). Uma série de procedimentos de limpeza tem utilizado SPE de Florisil (SCHNEWEISS, et al., 2002), imunoafinidade (ZÖLLNER et al., 1999; LAUNAY et al., 2004).

Os procedimentos de separação em LC são muito importantes na detecção de ZON devido à presença de diversos metabólitos secundários que possuem

estruturas e processo de fragmentação semelhantes. Este problema pode ser minimizado com procedimentos de extração e limpeza adequados (ZÖLLNER et al., 2000; ROYER et al., 2004). As colunas normalmente utilizadas são de C<sub>18</sub> e C<sub>8</sub> com metanol:água, acetonitrila:água e metanol:acetonitrila:água como solventes da fase móvel que pode ser ainda no modo isocrático ou gradiente, e com adição ou não de acetato de amônia (JODLBAUER et al., 2000; ZÖLLNER et al., 2000; FANG et al., 2002; KLEINOVA et al., 2002; ROYER et al., 2004) e ácidos, como ácido fórmico (SCHNEWEISS et al., 2002; ROYER et al., 2004), ácido acético (HORIE e NAKAZAWA, 2000; PALLARONI et al., 2002, 2003 e 2004;) e TFA (ácido trifloroacético) (JOSS, et al., 1999) para melhorar a separação cromatográfica e eficiência da ionização. Normalmente o tempo de corrida fica na faixa de 5 à 27 minutos (JOSS et al., 1999; ZÖLLNER et al., 2000; JODLBAUER et al., 2000; HORIE e NAKAZAWA, 2000; FANG et al., 2002; KLEINOVA et al., 2002; SCHNEWEISS et al., 2002; ROYER et al., 2004; PALLARONI et al., 2002, 2003 e 2004).

Análises de ZON podem ser realizadas tanto com APCI como ESI nos modos negativos e positivos. Todavia, ionização no modo negativo têm obtido resultados com maior sensibilidade e seletividade, tendo sido mais aplicada para processos de quantificação de ZON por LC-MS/MS (ROSEMBERG et al., 1998; ZÖLLNER et al., 1999). Mais detalhes dos métodos de detecção de ZON por LC-MS/MS podem ser verificados na Tabela 2.7.



### 2.5.7 Multitoxinas

Já está bem estabelecido que *Fusarium*, *Penicillium* e *Aspergillus* produzem numerosas micotoxinas freqüentemente pertencentes à diferentes grupos. Por este motivo, métodos capazes de detectar várias toxinas em uma única etapa de preparo de amostra e detecção são muito desejáveis. Neste sentido, o sistema LC-MS/MS parece ser a melhor ferramenta (ZÖLLNER e MAYER-HELM, 2006). O número destes tipos de métodos ainda é limitado devido a complexidade das matrizes como alimentos e amostras biológicas, bem como as diferenças químicas e físicas das diversas micotoxinas. Pesquisas recentes têm focado desenvolvimento de métodos para toxinas produzidas por *Fusarium*, como tricotecenos e ZON (BISELI et al., 2004; ROYER et al., 2004; BERTHILLER et al., 2005), algumas vezes incluindo FBs (BISELI et al., 2004; SORENSEN e ELBAEK, 2005) e AFLs (BISELI et al., 2004; SORENSEN e ELBAEK, 2005).

**Tabela 2.6-** Métodos analíticos desenvolvidos para tricotecenos por LC-MS/MS reportados na literatura

Analito	Matriz	Preparo da amostra	Coluna	Fase móvel	FI	LOD/LOQ µg/kg	Autor
DON, DAS e T2	Ração e milho moído	Extração:hexano:MeOHe limpeza: SPE C <sub>18</sub>	C <sub>18</sub>	Isocrática: 3mM NH <sub>4</sub> OAc: MeOH:ACN -50:45:5	ESI	250/NR	Huopalathi et al, 1997
DON e NIV	Trigo	Extração: ACN:H <sub>2</sub> O- 84:16. Limpeza: SPE C <sub>18</sub>	C <sub>18</sub>	Isocrática::ACN:MeOH- 82:9:9	APCI	NR/40(DON) NR/50(NIV)	Razzazi et al, 1999
DON, NIV, DAS, 3-ADON, 15-ADON, HT2, T2 e NEO	Trigo, arroz e colônias fúngicas	Extração: ACN:H <sub>2</sub> O- 84:16. Limpeza: SPE C <sub>18</sub>	C <sub>18</sub>	Gradiente: H <sub>2</sub> O:MeOH ambos com NH <sub>4</sub> OAc 50mM	APCI	1-10/10-100	Berger et al, 1999
DON	Trigo	Extração: ACN:H <sub>2</sub> O- 84:16 sem limpeza	C <sub>18</sub>	Gradiente: H <sub>2</sub> O:MeOH+0.3%AcOH	ESI	2000/NR	Platner, 1999
HT2, T2, DAS e NEO	Trigo, milho e ração	Extração: ACN:H <sub>2</sub> O- 84:16. Limpeza: SPE C <sub>18</sub>	C <sub>18</sub>	Gradiente: H <sub>2</sub> O:ACN ambos com NH <sub>4</sub> OAc 1mM	APCI	NR/50-85	Razzazi et al, 2002
DON e NIV	Trigo, milho	Extração: ACN:H <sub>2</sub> O- 84:16, filtração e dil. H <sub>2</sub> O	C <sub>18</sub>	Gradiente: H <sub>2</sub> O:MeOH+0.3%AcOH	APCI	50/NR	Platner et al, 2003
DON, NIV e 3-ADON	Milho	Extração: ACN:H <sub>2</sub> O- 75:25 Limpeza: SPE C <sub>18</sub>	C <sub>18</sub>	Gradiente: H <sub>2</sub> O:MeOH:ACN	ESI	NR/1.5-10	Lagana et al, 2003
DON, NIV e 3-ADON e 15-DON	Milho	Extração: ACN:H <sub>2</sub> O- 84:16	C <sub>18</sub>	Gradiente: H <sub>2</sub> O:MeOH:ACN	APCI	NR/25-150	Razzazi et al, 2005
DON, NIV, 3-ADON, 15-DON HT2, T2, NEO e DAS	Cereais	Extração: ACN:H <sub>2</sub> O- 80:20. Limpeza: SPE C <sub>18</sub>	C <sub>18</sub>	Isocrática: H <sub>2</sub> O:MeOH- 65:35 com NaCl 0.1mM	ESI	20-50/100	Dall'Asta et al, 2004
DON	Trigo e ovos	Trigo: extração c/	C <sub>18</sub>	Gradiente: H <sub>2</sub> O:MeOH	ESI	1.5/NR (trigo) 0.01/0.025(ovos)	Sypecka et al, 2004

ACN:H <sub>2</sub> O-84:16							
DON	Trigo	Ovos: ACN e IAC Extração: ACN:H <sub>2</sub> O- 75:25	C <sub>18</sub>	Gradiente: H <sub>2</sub> O+NH <sub>4</sub> OAc 5m e HCOOH, pH 4.0:ACN	APCI	10/50	Royer et al 2004
DON, NIV e 3- ADON, 15-DON	Milho	Extração: ACN:H <sub>2</sub> O- 75:25. Limpeza: SPE C <sub>18</sub>	C <sub>18</sub>	Gradiente: H <sub>2</sub> O:ACN	ESI	2-12/5-20	Cavalieri et al, 2005
DON, 3-ADON, 15- DON	Trigo e milho	Extração com ACN:H <sub>2</sub> O- 84:16. Limpeza: SPE C <sub>18</sub>	C <sub>18</sub>	Isocrática: H <sub>2</sub> O:MeOH- 85:15	APCI	20/NR	Berthiller et al, 2005
DON, NIV 3-ADON, 15-DON, HT2, T2, NEO e DAS	Cereal e pão	Extração com ACN:H <sub>2</sub> O- 84:16. Limpeza: SPE C <sub>18</sub>	C <sub>18</sub>	Gradiente: H <sub>2</sub> O c/ NH <sub>3</sub> 0.00184mM e NH <sub>4</sub> OAc 0.13mM/ACN	ESI	0.18-5.0/16	Klötzel et al, 2005

DON=Deoxinivalenol, NIV=nivalenol, 3-ADON=3 acetildeoxinivalenol, 15-ADON=15 acetildeoxinivalenol, HT2=HT2-toxina, T2=toxina T2, NEO=neosolaniol, DAS= diacetoxiscirpenol ACN=acetonitrila, MeOH=metanol, H<sub>2</sub>O=água, SPE=cartucho de extração em fase sólida, FI=fonte de ionização. LOD=limite de detecção, LOQ=limite de quantificação, ESI=ionização eletrospray, APCI=ionização à pressão atmosférica, NR=não reportado

(ZÖLLNER e MAYER-HELM,2006)

**Tabela 2.7-** Métodos analíticos desenvolvidos para ZON por LC-MS/MS reportados na literatura

Analito	Matriz	Preparo da amostra	Coluna	Fase móvel	FI	LOD/LOQ µg/kg	Autor
ZON	Milho	Extração: ACN:H <sub>2</sub> O-75:25. Limpeza: IAC	C <sub>18</sub>	Isocrática: ACN:H <sub>2</sub> O-40:60	APCI	0.12/0.17	Rosemberg et al, 1998
ZON	Milho, aveia e trigo	Extração: ACN:H <sub>2</sub> O-75:25 +KCl. Limpeza: IAC, C <sub>18</sub>	C <sub>18</sub>	Isocrática: H <sub>2</sub> O:MeOH-25:75 c/ NH <sub>4</sub> OAc 15mM	APCI	0.5/1.0	Zöllner et al, 1999
ZON e metabólitos	Cerveja	SPE com C <sub>18</sub>	C <sub>8</sub>	Isocrática: H <sub>2</sub> O:MeOH-35:65 c/ NH <sub>4</sub> OAc 15mM	APCI	0.03/0.06	Zöllner et al, 2000
ZON	Trigo	MeOH:ACN -50:50	C <sub>8</sub>	Isocrática: H <sub>2</sub> O:MeOH-c/ AcOH0.2%-45:55	APCI	NR*/30	Pallaroni, et al, 2002
ZON e metabólitos	Trigo	Extração: ACN:H <sub>2</sub> O-21:79 Limpeza: SPE de Florisil	C <sub>18</sub>	Gradiente: H <sub>2</sub> O + 1% HCOOH:ACN	ESI	NR*/10	Schneweiss, et al, 2002
ZON	Trigo	Extração com ACN:H <sub>2</sub> O- 50:50	C <sub>8</sub>	Isocrática: H <sub>2</sub> O:MeOH-c/ 0.2% AcOH-45:55	ESI	5/15	Pallaroni, et al, 2003
ZON	Milho	Extração com ACN:H <sub>2</sub> O- 75:25. Limpeza: SPE C <sub>18</sub>	C <sub>18</sub>	Gradiente: H <sub>2</sub> O+1%ACN c/ NH <sub>4</sub> OAc 5mM e HCOOH. pH 4.0	APCI	3/10	Royer et al, 2004

ZON=zearalenona, ACN=acetonitrila, MeOH=metanol, H<sub>2</sub>O=água, SPE=cartucho de extração em fase sólida, FI=fonte de ionização. LOD=limite de detecção, LOQ=limite de quantificação, ESI=ionização eletrospray, APCI=ionização à pressão atmosférica, NR=não reportado (ZÖLLNER e MAYER-HELM,2006)

A maior parte dos multimétodos têm sido aplicados à culturas fúngicas e grãos e menos freqüentemente em queijos, leites e outros alimentos. Comumente, amostras relativamente simples como culturas fúngicas e soluções aquosas são injetadas diretamente no LC-MS/MS ou utilizam-se etapas de limpeza antes da injeção no sistema de detecção (SMEDSGAARD e FRISVALD, 1996; SEWRAM et al., 1999; MONTI et al., 2000; POCSFALVI et al., 2000; RUNDBERGET e WILKINS, 2002; NIELSEN et al., 2003; KOKKONEN et al., 2005). Para matrizes mais complexas, diversas formas de extração capazes de obter várias micotoxinas em uma única etapa têm sido propostas. Outra dificuldade neste tipo de método é o fato de que toxinas ionizam de formas diferentes (APCI e ESI em modos positivo e negativo), todavia, equipamentos atuais possuem a capacidade de alterar sua polaridade de forma muito rápida durante a mesma corrida, facilitando este tipo de análise. Os solventes e colunas utilizadas para este tipo de método, bem como a fonte de ionização, são muito variáveis (ZÖLLNER e MAYER-HELM, 2006). Ver detalhes de multimétodos na Tabela 2.8.

## **2.6 Legislação**

Devido aos riscos relacionados com a presença de micotoxinas em alimentos, tanto para humanos quanto para animais, bem como seus impactos econômicos, diversos países estabeleceram legislações para minimizar seus efeitos. Nos anos 80 e 90, diversos estudos foram publicados em relação aos riscos e necessidade de legislação para micotoxinas. Desde 1995 até 2003 houve um aumento de 30 % no número de países que possuem legislação para

micotoxinas, sendo que atualmente, cerca de 100 países, representando em torno de 90 % da população mundial, tem este tipo de legislação. As legislações são adotadas de forma específica para cada país, devido à características particulares, como hábitos alimentares, clima, viabilidade para realização de análises, entre outros. Mesmo com suas legislações específicas, muitas delas estão sendo harmonizadas entre países que compõe blocos econômicos como União Européia e Mercosul (BERG, 2003; BINDER, 2007).

Legislações internacionais são estabelecidas pelo *Codex Alimentarius* (CAC). O sistema de legislação desenvolvido pelo CAC envolvendo contaminantes, incluindo micotoxinas em alimentos e rações, é muito rico em detalhes. O Comitê de Aditivos Alimentares do *Codex* (CCFAC) é o órgão responsável por avaliar as informações relativas aos riscos existentes pela presença de contaminantes em geral, e micotoxinas em particular, em alimentos e rações. As informações sobre estes riscos são fornecidas ao CAC pelo Comitê de Especialistas em Contaminantes e Aditivos Alimentares (JECFA). É função do JECFA prover informações, com embasamento científico, sobre toxicidade de contaminantes e níveis seguros para consumo humano (HUSSEIN e BRASEL, 2001; BERG, 2003). Na União Européia as propostas para estabelecimento de legislações relativas à micotoxinas são de responsabilidade da Comissão Européia, que formula estas propostas baseada em dados fornecidos pelo Comitê Científico para Alimentos (SCF) (BERG, 2003).

Existem diferenças entre as legislações dos diversos países. Na Tabela 2.9 são apresentadas algumas legislações de países ou blocos econômicos importantes (União Européia e Mercosul) relativos a micotoxinas.

**Tabela 2.8-** Métodos analíticos desenvolvidos para multitoxinas por LC-MS/MS reportados na literatura

Analito	Matriz	Preparo da amostra	Coluna	Fase móvel	FI	LOD/LOQ µg/kg	Autor
OTA e 17 outras micotoxinas de <i>Penicillium</i>	Cultura fúngica	Extração: CHCl <sub>3</sub> :MeOH:acetato de etila:HCOOH-33:16:50:1	C <sub>18</sub>	Isocrática: H <sub>2</sub> O:MeOH-10:90	ESI	NR*/NR*	Smedsgaard et al, 1996
DON e ZON	Padrões	Diluição: MeOH	C <sub>18</sub>	Gradiente: H <sub>2</sub> O:ACN	APCI	NR*/NR*	Pallaroni et al, 2002
AFB <sub>1</sub> , AFB <sub>2</sub> , FB <sub>1</sub> , FB <sub>2</sub> , FB <sub>3</sub> , e FB <sub>4</sub>	Milho	Extração: MeOH: H <sub>2</sub> O-3:1	C <sub>18</sub>	Gradiente: H <sub>2</sub> O:MeOH c/ AcOH 1%	APCI (AFLs) e ESI (FBs)	NR*/NR*	Abbas et al, 2002
DON, ZON e FB <sub>1</sub>	Milho	Extração: ACN: H <sub>2</sub> O-75:25. Limpeza : SPE-troca iônica	C <sub>18</sub>	Gradiente: H <sub>2</sub> O +NH <sub>4</sub> OAc 5mM e HCOOH, pH 4.0:ACN	APCI	10/50 (ZON), 3/10(ZON), 20/50(FB <sub>1</sub> )	Royer et al, 2004
DON,NIV, 3-ADON, 15-ADON, HT2, T2, ZON, AFB <sub>1</sub> e OTA	Alimentos a base de cereais	Extração: ACN/ H <sub>2</sub> O-85:15 Limpeza: SPE-troca iônica	C <sub>18</sub>	Gradiente: H <sub>2</sub> O:MeOH	ESI	0.2-10	Biselli et al, 2004
AFB <sub>1</sub> , AFB <sub>2</sub> , AFG <sub>1</sub> , AFG <sub>2</sub> AFM <sub>1</sub> , OTA	Queijo	Extração: HCOOH 0.1% em ACN:hexano-55:45	C <sub>18</sub>	Gradiente: H <sub>2</sub> O:ACN ambos com AcOH 0.1%	ESI	0.3-0.8/0.5-5 (AFLs), 0.3/0.6 (OTA)	Kokkonen et al, 2005
DON,NIV, 3-ADON, 15-ADON, HT2, T2, ZON e DAS	Milho	Extração: ACN/ H <sub>2</sub> O-84:16. Limpeza: SPE-troca iônica	C <sub>18</sub>	Gradiente: H <sub>2</sub> O:MeOH ambos com NH <sub>4</sub> OAc 5mM	APCI	0.3-3.8/0.8-18.3 (tricotecenos) 0.9/3.2 (ZON)	Berthiller et al, 2005
AFM <sub>1</sub> , DON, OTA, 3-ADON, 15-ADON, HT2, T2, DAS,	Leite	Extração: ACN:hexano-61:39. Limpeza: SPE-troca iônica	C <sub>18</sub>	Gradiente: H <sub>2</sub> O: MeOH ambos com AcOH 0.02%	ESI	0.03-0.1/0.05-0.15, (tricotecenos)	Sorensen et al, 2005

FB <sub>1</sub> ,FB <sub>2</sub> , ZON, T2- triof						0.01/0.02 (OTA)	
						0.02/0.08 (ZON)	
						0.01/0.02 (AFM <sub>1</sub> )	
						0.02-0.04/0.04-	
						0.05 (FB <sub>1</sub> e FB <sub>2</sub> )	
DON, NIV, 3-ADON, 15-ADON, ZON	Milho	Extração: ACN/ H <sub>2</sub> O-75:25. Llimpeza: SPE-troca iônica	C <sub>18</sub>	Gradiente: H <sub>2</sub> O: ACN	ESI	2-12/5-20 (tricotecenos), 3/10 (ZON)	Cavalieri et al, 2005

AFB<sub>1</sub>=Aflatoxina B<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>= Aflatoxina B<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub>= Aflatoxina G<sub>1</sub>, AFG<sub>2</sub>= Aflatoxina G<sub>2</sub>, AFM<sub>1</sub>= Aflatoxina M<sub>1</sub>, DON=Deoxinivalenol, NIV=nivalenol, 3-ADON=3 acetildeoxinivalenol, 15-ADON=15 acetildeoxinivalenol, HT2=HT2 toxina, T2=toxina T2, NEO= neosolaniol, DAS= diacetoxiscirpenol, ZON=zearalenona, OTA=ocratoxina A, FB<sub>1</sub>=Fumonisina B<sub>1</sub>, FB<sub>2</sub>= Fumonisina B<sub>2</sub>, FB<sub>3</sub>= Fumonisina B<sub>3</sub>, ACN=acetone nitrila, MeOH=metanol, H<sub>2</sub>O=água, SPE=cartucho de extração em fase sólida, FI=fonte de ionização. LOD=limite de detecção, LOQ=limite de quantificação, ESI=ionização eletrospray, APCI=ionização à pressão atmosférica, NR=não reportado



**Tabela 2.9-** Legislações para micotoxinas em alimentos para animais e humanos

País	Alimento	Micotoxina	LMP <sup>1</sup> (µg/kg ou µg/l)
AUSTRÁLIA	Amendoim e nozes	AFB <sub>1</sub> + AFB <sub>2</sub> + AFG <sub>1</sub> + AFG <sub>2</sub>	15
CANADA	Castanhas e seus produtos	AFB <sub>1</sub> + AFB <sub>2</sub> + AFG <sub>1</sub> + AFG <sub>2</sub>	15
	Trigo	DON	2000
	Trigo e seus produtos para alimentação infantil	DON	600
	Todas as rações animais	AFB <sub>1</sub> + AFB <sub>2</sub> + AFG <sub>1</sub> + AFG <sub>2</sub>	20
	Ração para suínos	OTA	2000
	Ração para suínos	T2	1000
	Ração para gado	DON	5000
	Ração para gado	HT2	100
	Ração para gado e suínos	DON	1000
	Ração para suínos	ZON	3000
ESTADOS UNIDOS	Ração para suínos	DAS	2000
	Todos os alimentos exceto leite	AFB <sub>1</sub> + AFB <sub>2</sub> + AFG <sub>1</sub> + AFG <sub>2</sub>	20
	Maçã, suco de maçã concentrado e produtos com maçã	PTL	50
	Produtos para consumo humano contendo trigo	DON	1000
	Produtos de milho	FB <sub>1</sub> + FB <sub>2</sub> + FB <sub>3</sub>	2000
	Milho para pipoca	FB <sub>1</sub> + FB <sub>2</sub> + FB <sub>3</sub>	3000
	Leite	AFM <sub>1</sub>	0.5
	Produtos a base de milho e amendoim para alimentação de gado	AFB <sub>1</sub> + AFB <sub>2</sub> + AFG <sub>1</sub> + AFG <sub>2</sub>	300
	Semente de algodão para ração	AFB <sub>1</sub> + AFB <sub>2</sub> + AFG <sub>1</sub> + AFG <sub>2</sub>	300
Produtos a base de milho e amendoim para alimentação de	AFB <sub>1</sub> + AFB <sub>2</sub> + AFG <sub>1</sub> + AFG <sub>2</sub>	200	

	suínos		
	Produtos a base de milho e amendoim para alimentação aniamis em crescimento	AFB <sub>1</sub> + AFB <sub>2</sub> + AFG <sub>1</sub> + AFG <sub>2</sub>	20
	Grãos e seus produtos para ruminantes e frangos	DON	10000
	Grãos e seus produtos para suínos	DON	5000
	Milho e seus produtos para alimentação de cavalos e coelhos	FB <sub>1</sub> + FB <sub>2</sub> + FB <sub>3</sub>	5000
	Milho e seus produtos para alimentação suínos e peixes	FB <sub>1</sub> + FB <sub>2</sub> + FB <sub>3</sub>	20000
JAPAO	Todos os alimentos	AFB <sub>1</sub>	10
	Suco de maçã	PTL	50
	Trigo e seus produtos	DON	1100
	Componentes de ração para gado, suínos e frango	AFB <sub>1</sub>	20
	Componentes de ração	ZON	1000
	Componentes de ração	DON	1000
ÍNDIA	Todos os alimentos	AFB <sub>1</sub> + AFB <sub>2</sub> + AFG <sub>1</sub> + AFG <sub>2</sub>	30
	Amendoim moído para ração (para exportação)	AFB <sub>1</sub>	120
MERCOSUL	Amendoim, milho e seus produtos	AFB <sub>1</sub> + AFB <sub>2</sub> + AFG <sub>1</sub> + AFG <sub>2</sub>	20
	Leite fluído	AFM <sub>1</sub>	0.5
	Leite em pó	AFM <sub>1</sub>	5
MOÇAMBIQUE	Amendoim	AFB <sub>1</sub> + AFB <sub>2</sub> + AFG <sub>1</sub> + AFG <sub>2</sub>	10
UNIAO EUROPEIA	Nozes trituradas, nozes e frutas secas e seus produtos para alimentação humana direta ou como ingrediente	AFB <sub>1</sub> AFB <sub>1</sub> + AFB <sub>2</sub> + AFG <sub>1</sub> + AFG <sub>2</sub>	2 4
	Nozes trituradas submetidas à seleção, ou outro tratamento físico, antes do consumo humano ou como ingrediente em alimentos	AFB <sub>1</sub> AFB <sub>1</sub> + AFB <sub>2</sub> + AFG <sub>1</sub> + AFG <sub>2</sub>	8 15
	Nozes e frutas secas submetidas à seleção, ou outro tratamento físico, antes do consumo humano ou como ingrediente	AFB <sub>1</sub> AFB <sub>1</sub> + AFB <sub>2</sub> + AFG <sub>1</sub> + AFG <sub>2</sub>	5 10

Cereais e seus derivados para consumo humano direto ou como ingrediente a serem submetidos à tratamento físico	AFB <sub>1</sub> AFB <sub>1</sub> + AFB <sub>2</sub> + AFG <sub>1</sub> + AFG <sub>2</sub>	2 4
Milho para consumo direto para humanos ou como ingrediente ou a serem submetidos à seleção ou outro tratamento físico	AFB <sub>1</sub> AFB <sub>1</sub> + AFB <sub>2</sub> + AFG <sub>1</sub> + AFG <sub>2</sub>	5 10
Pimenta (moída e intacta)	AFB <sub>1</sub> AFB <sub>1</sub> + AFB <sub>2</sub> + AFG <sub>1</sub> + AFG <sub>2</sub>	5 10
Cereais e arroz	OTA	5
Todos os produtos derivados de cereais para consumo humano	OTA	3
Frutas secas	OTA	10
Sucos de frutas e néctar, em particular suco de maçã	PTL	50
Suco concentrado de fruta após reconstituição	PTL	50
Cidra e bebidas fermentadas derivadas de maçã ou c/ seu suco	PTL	50
Produtos de maçã sólidos, incluindo maçã em conserva e purê	PTL	25
Maçã e seus produtos em todas as formas como alimento infantil	PTL	10
Cereais e seu produtos	DON	500
Trigo e produtos contendo trigo	DON	750
Leite e produtos derivados de leite	AFM <sub>1</sub>	0.05
Todas as rações animais	AFB <sub>1</sub>	20
Rações para consumo diário de animais	AFB <sub>1</sub>	5

AFB<sub>1</sub>=Aflatoxina B<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>= Aflatoxina B<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub>= Aflatoxina G<sub>1</sub>, AFG<sub>2</sub>= Aflatoxina G<sub>2</sub>, AFM<sub>1</sub>= Aflatoxina M<sub>1</sub>, DON=Deoxinivalenol, HT2=HT2-toxina, T2=toxina T2,DAS= diacetoxiscirpenol, ZON=zearalenona, OTA=ocratoxina A, FB<sub>1</sub>=Fumonisina B<sub>1</sub>, FB<sub>2</sub>= Fumonisina B<sub>2</sub>, FB<sub>3</sub>= Fumonisina B<sub>3</sub>, LMP=limite máximo permitido. *Mercosul*: bloco formado por Brasil, Argentina, Paraguai e Uruguai . *União Européia* : bloco formado por: Áustria, Bélgica, Dinamarca, Finlândia, França, Alemanha, Grécia, Irlanda, Itália, Luxemburgo, Holanda, Portugal, Espanha, Suécia e Reino Unido. (FAO, 2007)

## 2.7 Referências bibliográficas

ABBAS, H.; WILLIAMS, W. P.; WINDHAM, PRINGLE, G. L.; H. C.; XIE, W.; SHIER W. T. Aflatoxin and fumonisin contamination of commercial corn (*Zea mays*) hybrids in Mississippi. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 50, n. 18, p. 5246-5254, 2002.,

ARDREY, R. E. **Liquid chromatography-mass spectrometry: an introduction**, 1. ed. West Sussex: John Wiley & Sons Inc, 2003.

BARTOK, T.; SZECSI, A.; SZEKERES, A.; MESTERHAZY, A.; BARTOK, M. Detection of new fumonisin mycotoxins and fumonisin-like compounds by reversed-phase high-performance liquid chromatography/electrospray ionization ion trap mass spectrometry. **Rapid Commun. Mass Spectrom.**, v. 20, n. 16, p. 2447-2462, 2006.

BECKER, M.; DEGELMAN, P.; HERDERICH, M.; SCHREIER, P.; HUMPF, H. Column liquid chromatography–electrospray ionisation–tandem mass spectrometry for the analysis of ochratoxin. **Journal of Chromatography A**, v. 818, n. 2, p. 260-264, 1998.

BERG, T. How to establish international limits for mycotoxins in food and feed? **Food Control**, v. 14, p. 219-224, 2003.

BERGER, U.; OEHME, M.; KUHN, F. Quantitative determination and structure elucidation of type A- and B-trichothecenes by HPLC/ion trap multiple mass spectrometry. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 47, n. 10, p. 4240-4245, 1999.

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

BETINA, V. **Chromatography of mycotoxins**, 1. ed. Amsterdam: Academic Press, 1993.

BINDER, E.M. Managing the risk of mycotoxins in modern feed production. **Animal Feed Science and Technology**, v. 133, p. 149-166, 2007

BISELLI, S.; HARTIG, L.; WEGENER, H.; HUMMERT, C. Analysis of *Fusarium* toxins using LC-MS/MS. **Spectroscopy**, v. 20, p. 20-28, 2005.

BISELLI, S.; HARTIG, L.; WEGNER, H.; HUMMERT, C. Development of a multiresidue method for analyses of major type B trichothecenes. **LC-GC Europe**, v. 17, p. 25-35, 2004.

BLESA, J.; BERRADA, H.; SORIANO, J. M.; MOLTO, J. C.; MANES, J. Rapid determination of ochratoxin A in cereals and cereal products by liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1046, n. 2, p. 127-131, 2004.

BLESA, J.; SORIANO, J. M.; MOLTO, J. C.; MARIN, R.; MANES, J. Determination of aflatoxins in peanuts by matrix solid-phase dispersion and liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1011, n. 1, p. 49-54, 2003.

BONY, S.; LOISEAU, L. O.; CARCELEN, M.; DEVAUX, A. Genotoxic potential associated with low levels of the *Fusarium* mycotoxins nivalenol and fusarenon X in a human intestinal cell line. **Toxicology in Vitro**, v. 21, p. 457-465, 2007.

CALDAS, E. D.; JONES, A. D.; WINTER, B.; WARD, D. G. Electrospray ionization mass spectrometry of sphinganine analog mycotoxins. **Analytical Chemistry**, v. 67, P. 196-207, 1995.

CAVALIERE, C.; FOGLIA, P.; GUARINO, C.; MOTTO, M.; NAZZARI, M.; SAMPERI, R.; LAGANA, A.; BERARDO, N. Mycotoxins produced by *Fusarium* genus in maize: determination by screening and confirmatory methods based on liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 105, p. 700-710, 2007.

CAVALIERE, C.; FOGLIA, P.; PASTORINNI, E.; SAMPERI, R.; LAGANA, A. Liquid chromatography/tandem mass spectrometry confirmatory method for determining aflatoxin M1 in cow milk. Comparison between electrospray and atmospheric pressure photoionization sources. **Journal of Chromatography A**, v. 1101, p. 69-78, 2006.

CAVALIERE, C.; D'ASCENZO, G.; FOGLIA, P.; PASTORINI, P.; SAMPERI, R.; LAGANA, A. Determination of type B trichothecenes and macrocyclic lactone mycotoxins in field contaminated maize. **Food Chemistry**, v. 92, n. 3, p. 559-568, 2005.

CHEN, J.; MIROCHA, C. J.; XIE, W.; HOGGE, L.; OLSON, D. Production of the mycotoxin fumonisin B<sub>1</sub> by *Alternaria alternata* f. sp. *Lycopersici*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, n. 12, p. 3928-3931, 1992.

CHURCHWELL, M. I.; COOPER, W. M.; HOWARD, P. C.; DOERGE, D. R.; Determination of fumonisins in rodent feed using HPLC with electrospray mass spectrometric detection. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 48, p. 2573-2578, 1997.

CIOLLA, R., **Fundamentos da Cromatografia a Líquido de Alto Desempenho**, ed. Edgard Blücher Ltda., São Paulo, 1998

CIRILLO, T.; RITIENI, A.; VISIONE, M.; COCCHIERI, R. A. Evaluation of conventional and organic italian foodstuffs for deoxynivalenol and fumonisins B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub>. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 51, p.8128-8131, 2003.

COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L. e BONATO, P.S. **Introdução a métodos cromatográficos**, 5<sup>a</sup> ed. Campinas: Editora da Unicamp, 1993.

CONKOVÁ, E.; LACIANOVÁ, A.; KOVÁČ, G; SEIDEL H. Fusarial toxins and their role in animal diseases. **The Veterinary Journal**, v. 165, p. 214-220, 2003.

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

DALL'ASTA, C.; GALAVERNA, G.; DOSSENA, A.; MARCHELLI, R. Reversed-phase liquid chromatographic method for the determination of ochratoxin A in wine. **Journal of Chromatography A**, v. 1024, n. 2, p. 275-279, 2004.

DALL'ASTA, C.; SFORZA, S.; GALAVERNA, G.; DOSSENA, S.; MARCHELLI, R. Simultaneous detection of type A and type B trichothecenes in cereals by liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometry using NaCl as cationization agent. **Journal of Chromatography A**, v.1054, n. 2, p. 389-395, 2004.

DEGELMANN, P.; BECKER, M.; HERDERICH, M.; HUMPF, H. -U. Determination of ochratoxin a in beer by high-performance liquid chromatography. **Chromatographia**, v. 49, n. 9-10, p. 543-546, 1999.

DOERGE, D. R.; HOWARD, P. C.; BAJIC, S.; PREECE, S.; GAMES, D. E. Determination of fumonisins using on-line liquid chromatography coupled to electrospray mass spectrometry. **Rapid Commun. Mass Spectrom.**, v. 8, n. 8, p. 603-606, 1994.

EDINBORO, L.E.; KAMES, H.T. Determination of aflatoxin B<sub>1</sub> in sidestream cigarette smoke by immunoaffinity column extraction coupled with liquid chromatography/mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1083, n. 1, p. 127-132, 2005.

EGMOND, H. V. Food and agricultural organisation of the United Nations. **Food and Nutrition**, v. 64, p. 35-45, 1997.

FABERI, A.; FOGLIA, P.; PASTORINI, E.; SAMPERI, R.; LAGANA, A. Determination of type B fumonisin mycotoxins in maize and maize products by

liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Rapid Commun. Mass Spectrom.**, v. 19, p. 275-282, 2005.

FANG, X.; CHEN, J.; GUO, D.; WANG, G. Detection and identification of zearalenol in chicken or rabbit liver by LC-MS/MS. **Journal of AOAC International**, v.85, n. 4, p. 841-853, 2002.

FAO, Worldwide Regulations for Mycotoxins in Food and Feed. Disponível em <http://www.fao.org/docrep/007/y5499e/y5499e00.htm>. Acesso em: 03 jul. 2007.

FAZEKAS, B.; TAR, A. Immunoaffinity column coupled with liquid chromatography for determination of zearalenone content in cereals and feedstuffs; reusability of immunoaffinity columns. **Journal of AOAC International**, v. 84, p.1453-1459, 2001.

GILBERT, J. Validation of analytical methods for determining mycotoxins in foodstuffs. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 21, n. 6, p. 468-486, 2002.

GORYACHEVA, I. Y.; SAEGER, S.; DELMULLE, B.; LOBEAU, M.; EREMIN, S. A.; VETRÓ, I. B.; PETHEGEN, C. V. Simultaneous non-instrumental detection of aflatoxin B1 and ochratoxin A using a clean-up tandem immunoassay column. **Analitica Chimica Acta**, v. 590, p. 118-124, 2007.

GROB, R. L.; BARRY, E. F. **Modern practice of gas chromatography**, 4. ed. Hoboken: John Wiley & Sons Inc, 2004.

GUTLEB, A. C.; MORRISON, E.; MURK, A.J. Cytotoxicity assays for mycotoxins produced by *Fusarium* strains: a review. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 11, p. 309-320, 2002.

HANCOCK, J. R.; D'AGOSTINO, P. A. Mass spectrometric identification of toxins of biological origin. **Analitica Chimica Acta**, 457, n. 1, p. 71-82, 2002.

HARTL, M.; HUMPF, H. -U. Simultaneous determination of fumonisin B<sub>1</sub> and hydrolyzed fumonisin B<sub>1</sub> in corn products by liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 47, n. 12, p. 5078-5083, 1999.

HARTL, M.; HERDERICH, HUMPF, M. H. -U. Rapid determination of fumonisin FB1 in corn products by high-performance liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. **European Food Research and Technology**, v. 209, n. 5, p. 348-351, 1999.

HERBERT, C. G.; JOHNSTONE, R. A. W. **Mass Spectrometry Basics**. Boca Raton: CRC Press, 2003.

HINES, H. B.; BRUEGGEMANN E. E.; HOLCOMB, M.; HOLDER, C. L. Fumonisin B1 analysis with capillary electrophoresis-electrospray ionization mass spectrometry. **Rapid Commun. Mass Spectrom.**, v. 9, n. 6, p. 519-524, 1995.

HOFFMANN, E.; CHARETT, J. STROOBANT, V. M. **Mass spectrometry: principles and applications**. Welley, Chichester, UK 1983.

HOPKINS, J. The toxicological hazards of patulin - Information Section. **Food Chemical Toxicological**, v. 31, p. 455-459, 1993.

HORIE, M.; NAKAZAWA, H. Determination of trenbolone and zeranol in bovine muscle and liver by liquid chromatography–electrospray mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 882, n. 2, p. 53-62, 2000.

HUOPALATHI, R. P.; EBEL, J.; HENION, J. D. Determination of zeranol, taleranol, zearalenone,  $\alpha$ - and  $\beta$ -zearalenol in urine and tissue by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Liquid Chromatography Related Technology**, v. 50, n. 11-12, p. 681-687, 1997.

HUSSEIN, S. H.; BRASEL, J. M.; Toxicity, metabolism and impact of mycotoxins on humans and animals. **Toxicology**, v. 167, p. 101-137, 2001.

YAMAZAKI, H.; ITO, R.; INOUE, K.; YOSHIMURA, Y.; KAWAGUCHI, M.; NAKAZAWA, H. Development of liquid chromatography-electrospray mass spectrometry for the determination of patulin in apple juice: investigation of its contamination levels in Japan. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 51, n. 25, p. 7464-7468, 2004.

JENNINGS, W.; MITTLEFEHLDT, E.; STREMPLE, P. **Analytical gas chromatography**, 2. ed. Folsom: Academic Press, 1997.

JODLBAUER, J.; ZÖLLNER, P.; LINDNER, W. Determination of zeranol, taleranol, zearalenone,  $\alpha$ - and  $\beta$ -zearalenol in urine and tissue by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Chromatographia**, v. 51, n. 11-12, p. 681-687, 2000.

JOOS, P. E.; VAN RYCKEGHEM, M. Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry of Some Anabolic Steroids. **Analytical Chemistry**, v. 71, n. 20, p. 4701-4710, 1999.

JORGENSEN, K.; VAHL, M. Analysis of ochratoxin A in pig kidney and rye flour using liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC/MS/MS). **Food Additives & Contaminants**, v. 16, n. 11, p. 451-456, 1999.

JOSEPHS, R.; SCHUHMACHER, R.; KRŠKA, R. International interlaboratory study for the determination of the Fusarium mycotoxins zearalenone and deoxynivalenol



in agricultural commodities. **Food Additives and Contaminants**, v.18, n.5, p. 417-430, 2001.

JOUANY, J. P. Methods for preventing, decontaminating and minimizing the toxicity of mycotoxins in feeds. **Animal Feed Science and Technology**, 2007, doi: 10.1016/j.anifeedsci.2007.06.009.

KATZ, e.; EKSTEEN, R.; SCHOENMAKERS, P.; MILLER, N. **Chromatography Handbook of HPLC**, 1. ed. Washington: Academic Press, 1998.

KEITH NEWKIRK, D.; BENSON, R. W.; HOWARD, P. C.; CHURCHWELL, M. I.; DOERGE, D. R.; ROBERTS, D. W. On-line immunoaffinity capture, coupled with HPLC and electrospray ionization mass spectrometry, for automated determination of fumonisins. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 46, p. 1677-1688, 1998.

KLEINOVA, M.; ZÖLLNER, P.; KAHLBACHER, H.; HOCHSTEINER, W.; LINDNER, W. Metabolic profiles of the mycotoxin zearalenone and of the growth promoter zeranol in urine, liver, and muscle of heifers. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 50, n. 17, p. 4769-4776, 2002.

KLÖTZEL, M.; GUTSCHE, B.; LAUBER, U.; HUMPF, U. H. Determination of 12 type A and B trichothecenes in cereals by liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 53, n. 25, p. 8904-8910, 2005.

KOKKONEN, M.; JESTOI, M.; RIZZO, A. Determination of selected mycotoxins in mould cheeses with liquid chromatography coupled to tandem with mass spectrometry. **Food Additives & Contaminants**, v. 22, n. 5, p. 449-456, 2005.

KRSKA, R.; BAUMGARTNER, S.; JOSEPHS, R.. State-of-the-art in the analysis of type A and B trichothecene mycotoxins in cereals. **Fresenius Journal of Analytical Chemistry**, v. 371, p. 285-299 2001.

KRSKA, R.; FREUDENSCHUSS, M.; HAMETNER, C.; SZENTE, E.; ZÖLLNER, P. Purity assessment of commercial crystalline deoxynivalenol standards. **Journal of AOAC International**, v. 87, n. 4, p. 909-919, 2004.

KRSKA, R.; JOSEPHS, R. State-of-the-art in the analysis of estrogenic mycotoxins in cereals. **Fresenius Journal of Analytical Chemistry**, v. 369, p. 469-476, 2001.

KUSSAK, A.; NILSSON, C. A.; LANGRIDGE, J. Determination of aflatoxins in bone dust and urine by liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Rapid Commun. Mass Spectrom.**, v. 9, p.1234-1242, 1995.

LAGANA, A.; CURINI, R.; DÁSCENZO, G.; LEVA, I.; FABERI, A.; PASTORINI, E. A. rapid multiresidual determination of type A and type B trichothecens. **Rapid Communication in Mass Spectrometry**, v. 17, p. 1037-1043, 2003.

LANGSETH, W.; RUNDBERGET, T.; Instrumental methods for determination of nonmacrocytic trichothecenes in cereals, foodstuffs and cultures. **Journal of Chromatography A**, v. 815, n. 1, p. 103-121, 1998.

LAU, B. P. -Y; SCOTT, P. M.; LEWIS, D. A.; KANHERE, S. R. Quantitative determination of ochratoxin A by liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry. **Journal of Mass spectrometry**, v. 35, n. 1, p. 23-32, 2000.

LAUNAY, F. M.; YOUNG, P. B.; STERK, S. S.; BLOKLAND, M. H.; KENNEDY, D. G. Confirmatory assay for zearalenol, taleranol and the *Fusarium* spp. Toxins in bovine urine using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Food Additive Contaminants**, v. 21, n. 11, p. 52-62, 2004

LEITNER, A.; ZÖLLNER, P.; PAOLILLO, A.; STROKA, J.; BOURAOUI, A. P.; JABOREK, S.; ANKLAM, E.; LINDNER, W. Comparison of methods for the determination of ochratoxin A in wine. **Analitica Chimica Acta**, v. 453, n. 1, p. 33-41, 2002.

LINDENMEIER, M.; SCHIEBERLE, P.; RYCHILIK, M. Quantification of ochratoxin A in foods by a stable isotope dilution assay using high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1023, n. 2, p. 57-66, 2004.

LLORENS, A.; HINOJO, M. J.; MATEO, R.; GONZALES, M. T.; ALGARRA, F. M.; LOGRIECO, A.; JIMINEZ, M. Characterization of *Fusarium* spp. isolates by PCR-RFLP analysis of the intergenic spacer region of the rRNA gene (rDNA). **International Journal of Food Microbiology**, v. 106, n. 3, p.297-306, 2006.

LOSITO, I.; MONACI, L.; PALMISANO, F.; TANTILLO, G. Determination of ochratoxin A in meat products by high-performance liquid chromatography coupled to electrospray ionisation sequential mass spectrometry. **Rapid Commun. Mass Spectrom.**, v. 18, p. 1965-1971, 2004.

MACLAFERTY, F.W. **Tandem mass spectrometry**, Welley, New York, USA, 1983.

MACRAE, R.; **HPLC in Food Analysis**, Academic Press Inc., London, 1982, 341p.

MALLY, A. Ochratoxin A as a potential etiologic factor in endemic nephropathy: Lessons from toxicity study in rats. 2007, doi:10.1016/j.fet.2007.05.021.

MALLY, A.; KEIM-HEUSLER, H.; AMBERG, A.; KURZ, MICHAEL.; ZEPNIK, H.; MANTLE, P.; VÖLKELE, W.; HARD, G. C.; DEKANT, W. Biotransformation and nephrotoxicity of ochratoxin B in rats. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 206, n. 1, p. 43-53, 2005.

MARZILLI, L. A.; WANG, D.; KOBERTZ, W. R.; ESSIGMANN, J. M.; VOUIROS, P. Mass spectral identification and positional mapping of aflatoxin B<sub>1</sub>-guanine adducts in oligonucleotides. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v. 9, n. 7, p. 676-682, 1998.

MATTSSON, J. L. Mixtures on real world: The importance of plant self-defense toxicants, mycotoxins and the human diet. **Toxicology and Applied Pharmacology**, 2007, doi:10.1016/j.taap.2006.12.024.

McEVOY, J. D. G. Contamination of animal feedingstuffs as a cause of residues in food: a review of regulatory aspects, incidence and control. **Analitica Chimica Acta**, v. 473, p. 3-26, 2002

McKEAN, C.; TANG, L.; TANG, M.; BILLAN, M.; WANG, Z.; THEODORAKIS, C.W.; KENDALL, J.; WANG, -S. Comparative acute and combinative toxicity of aflatoxin B<sub>1</sub> and fumonisin B<sub>1</sub> in animals and human cells. **Food and Chemical Toxicology**, v. 44, p. 868-876, 2006.

McNAIR, H. M.; MILLER, J. M. **Basic gas chromatography**, 1. ed. New York: Marcel Dekker, Inc, 1997.

MINERVINI, F.; FORNELLI, F.; FLYNN, K. M. Toxicity and apoptosis induced by the mycotoxins, nivalenol, deoxinivalenol and fumonisin B<sub>1</sub> in a human erytroleukemia cell line. **Toxicology in Vitro**, v. 18, p. 21-28, 2004.

MONTI, S. M.; FOGLIANE, V.; LOGRIECO, A.; FERRACANE, R.; RITIENI, A. Simultaneous Determination of beauvericin, enniatins, and fusaproliferin by high performance liquid chromatography. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 48, p. 3317-3320, 2000.

MORGAVI, D. P.; RILEY, R. T. An historical overview of field disease outbreaks know or suspected to be caused by consumption of feeds contaminated with *Fusarium* toxins. **Animal Feed Science and Technology**, 2007, doi:10.1016/j.anifeedsci.2007.06.002.

NEWKIRK, K. D.; BENSON, R. W.; HOWARD, P. C.; CHURCHWELL, M. I.; DOERGE, D. R.; ROBERTS, D. W. On-line immunoaffinity capture, coupled with HPLC and electrospray ionization mass spectrometry, for automated determination of fumonisins. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 46, p. 1677-1688, 1998.

NIESSEN, W. M. A. **Liquid Chromatography-Mass Spectrometry**, 3. ed. Leiden: Taylor e Francis, 2006.

NIELSEN, K.F.; SMEDSGAARD, J. Fungal metabolite screening: database of 474 mycotoxins and fungal metabolites for dereplication by standardised liquid chromatography-UV-mass spectrometry methodology. **Journal of Chromatography A**, v. 1002, p. 111-133, 2003.

NOLLET, L. M. L. **Food Analysis by HPLC**, 2. ed. New York: Marcel Dekker, Inc, 2000.

OSBORNE, B. G. Mycotoxins and the cereals industry-a review. **Journal of Food Technology**, v. 17, p. 1-9, 1982.

PAEPENS, C.; SAEGER, S.; PUCKE, C. V.; DUMOULIN, F.; CALENBERGH, S.; PETEGHEM, C. Development of a liquid chromatography/tandem mass spectrometry method for detection of fumonisin B1 in cornflakes. **Rapid Commun. Mass Spectrom.**, v. 19, p. 2021-2029, 2005.

PALLARONI, L.; BJÖRKLUND, E.; HOLST, C. V. Optimization of atmospheric pressure chemical ionization interface parameters for the simultaneous determination of deoxynivalenol and zearalenone using HPLC/MS. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 25, n. 6, p. 913-926, 2002.

PALLARONI, L.; HOLST, C. Determination of zearalenone from wheat and corn by pressurized liquid extraction and liquid chromatography–electrospray mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 993, n. 2, p. 39-45, 2003.

PALLARONI, L.; HOLST, C. Development of an extraction method for the determination of zearalenone in corn using less organic solvents. **Journal of Chromatography A**, v. 1055, p.247-249, 2004.

PALLARONI, L.; HOLST, C.; ESKILLSON, C. S.; BJÖRKLUND, E. Determination of zearalenone from wheat and corn by pressurized liquid extraction and high-performance liquid chromatography mass spectrometry. **Analytical Bioanal. Chemistry**, v. 374, p. 161-166, 2002

PARK, J. W.; CHUNG, S. -H.; KIM, Y. -B. Ochratoxin A in Korean food commodities: occurrence and safety evaluation. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 53, n. 11, p. 4637-4642, 2005.

PETZINGER, E.; WEIDENBACH, A. Mycotoxins in the food chain: the role of ochratoxins. **Livestock Production Science**, v. 76, p. 245-250, 2002

PLATTNER, R.D. HPLC/MS analysis of Fusarium mycotoxins, fumonisins and deoxynivalenol. **Natural Toxins**, v. 7, n. 6, p. 365-370, 1999.

PLATTNER, R. D.; MARAGOS, C. M.; Determination of deoxinivalenol and nivalenol in corn and wheat by liquid chromatography with electrospray mass spectrometry. **Journal of AOAC International**, v. 86, p. 61-65, 2003.

POCSFALVI, G.; RITIENI, A.; RANDAZZO, G.; DOBO, A.; MALOMI, A. Interaction of *Fusarium* mycotoxins, fusaproliferin and fumonisin B<sub>1</sub>, with DNA studied by electrospray ionization mass spectrometry. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 48, n. 12, p. 5795-5801, 2000.

RAZZAZI-FAZELI, E.; BÖHM, J.; JARUKAMJOM, K. Simultaneous determination of major B-trichotecenes and the de-epoxy-metabolite of deoxinivalenol in pig urine and maize using high-performance liquid chromatography-mass-spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 796, n. 1, p. 21-33, 2003.

RAZZAZI-FAZELI, E.; BÖHM, J.; LUF, W. Determination of nivalenol and deoxynivalenol in wheat using liquid chromatography-mass spectrometry with negative ion atmospheric pressure chemical ionisation. **Journal of Chromatography A**, v. 854, n. 1, p. 45-55, 1999.

REINSCH, M.; TÖPFER, A.; LEHMANN, A.; NEHLS, I. Determination of ochratoxin A in wine by liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Analytical Bioanalytical Chemistry**, v. 381, p. 1592-1595, 2005

REINSCH, M.; TÖPFER, A.; LEHMANN, A.; NEHLS, I.; PANNE, U. Determination of ochratoxin A in beer by LC-MS/MS ion trap detection. **Food Chemistry**, v. 100, n. 1, p. 312-317, 2007.

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

ROMER, T. R. Screening method for aflatoxins in mixed feed and other agricultural commodities with subsequent confirmation and qualitative measurement of aflatoxin in positive samples. **Journal of Association Official Analytical Chemistry**, p. 58-500, 1979.

ROSEMBERG, E.; KRUSKA, R.; WISSIAK, R.; KMETOV, V.; JOSEPHS, R.; RAZZAZI, E.; GRASSERBAUER, M. High-performance liquid chromatography-atmospheric-pressure chemical ionization mass spectrometry as a new tool for the determination of the mycotoxin zearalenone in food and feed. **Journal of Chromatography A**, v. 819, n.2, p. 277-288, 1998.

ROYER, D.; HUMPF, H. -U.; GUY, P. A. Quantitative analysis of *Fusarium* mycotoxins in maize using accelerated solvent extraction before liquid

chromatography/atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry. **Food Additives & Contaminants**, v. 21, n. 7, p. 678-692, 2004.

RUNDEBERGET, T.; WILKINS, A. L. Determination of *Penicillium* mycotoxins in foods and feeds using liquid chromatography–mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 964, p. 189-197, 2002

RYCHLIK, M.; SCHIEBERLE, P. Quantification of the mycotoxin patulin by a stable isotope dilution assay. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 47, n. 9, p. 3749-3755, 1999.

SAEGER, S.; DUMOULIN, F.; VAN PETEGHEM, C. Quantitative determination of ochratoxin A in kidneys by liquid chromatography/mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v.18, p. 2661-2668, 2004.

SCHATZKI, T. F.; HADDON, W. F. Rapid, non-destructive selection of peanuts for high aflatoxin content by soaking and tandem mass Spectrometry. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 50, n. 10, p. 3062-3069, 2002.

SCHNEWEIS, I.; MEYER, K.; ENGELHARDT, G.; BAUERO, J. Occurrence of zearalenone-4--D-glucopyranoside in wheat. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 50, n. 6, p. 1736-1738, 2002.

SCHOLL, P. F.; MUSSER, S. M.; GROOPMAN, J. D. Synthesis and Characterization of Aflatoxin B<sub>1</sub> Mercapturic Acids and Their Identification in Rat Urine. **Chemical Research in Toxicology**, v. 10, n. 10, p. 1144-1151, 1997.

SCHUMACHER, D. M.; METZLER, M.; LEHMANN, L. Mutagenicity of the mycotoxin, patulin in cultured chinese hamster V79 cell, and its modulation by intracellular glutathione. **Archives Toxicology**, nov, v.5, 2004.

SCOTT, P. M.; KANHERE, S. R., LAU, B. P.; HAIARD, S.; RYAN, J. J.; GOODMAN, T. K. Determination of ochratoxin a in beer by high-performance liquid chromatography **Food Additive & Contaminants**, v. 15, p. 555-562, 1998.

SCUSSEL, V. M. **Atualidades em Micotoxinas e Armazenagem de Grãos**, 1. ed. Florianópolis: Insular, 2000.

SCUSSEL, V. M. **Micotoxinas em Alimentos**, 1. ed. Florianópolis: Insular, 1998.

SCUSSEL, V. M. HASS, P. GONG, Y. Y., TURNER, C. P., WILD, C. P. Study of aflatoxin exposure in Brazilian population using an aflatoxin-albumin biomarker. In: **Mycotoxin and Phycotoxins – Advances in Determination, Toxicology and Exposure Management**, 1. ed. Wageningen: Wageningen Acad. Publishers, 2006a.

SCUSSEL, V.M. COUCH, L. H AND HOWARD, P. C. The presence of DNA damaging putative mycotoxin in mayse from Santa Catarina, Brazil.: an area of high esophageal cancer. In: **Mycotoxin and Phycotoxins – Advances in Determination, Toxicology and Exposure Management**, Wageningen: Wageningen Acad. Publishers, 2006b.

SEEFELDER, W.; HARTL, M.; HUMPF, H. -U. Determination of *N*-(Carboxymethyl)fumonisin B<sub>1</sub> in corn products by liquid chromatography/electrospray ionization-mass spectrometry. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 48, n. 10, p. 2146-2151, 2001.

SEEFELDER, W.; GOSSMANN, M.; HUMPF, H. -U. Analysis of fumonisin B<sub>1</sub> in *Fusarium proliferatum*-infected asparagus spears and garlic bulbs from germany by liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 50, n. 5, p. 2778-2781, 2002.

SEWRAN, V.; NAIR, J. J.; NIEUWOUDT; LEGGOTT, N. L.; SHEPHARD, G. S. Determination of patulin in apple juice by high-performance liquid chromatography–atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 897, p. 365-374, 2000.

SEWRAN, V.; NIEUWOUDT, T. W.; MARASAS W. F. O.; SHEPHARD, G. S.; RITIENI, A. Determination of the *Fusarium* mycotoxins, fusaproliferin and beauvericin by high-performance liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 858, p. 175-185, 1999.

SHEPHARD, G. S. Chromatographic determination of the fumonisin mycotoxins. **Journal of Chromatography A**, v. 815, n. 1, p. 31-39, 1998.

SHEPHARD, G. S.; FABIANI, A.; STOCKENSTRÖM, S.; MSHICILELI, N.; SEWRAM, V. Quantitation of ochratoxin A in South African wines. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 51, n. 4, p. 1102-1106, 2003.

SMEDSGAARD, J.; FRISVALD, J. C. Using direct electrospray mass spectrometry in taxonomy and secondary metabolite profiling of crude fungal extracts. **Journal of Microbiological Methods**, v. 5, n. 1, p. 5-17, 1996.

SORENSEN, L. K.; ELBAEK, T. H. Determination of mycotoxins in bovine milk by liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 820, n. 2, p. 183-196, 2005.

SOUZA, M. M. S.; FREIRE, R. B.; SOUZA, C.C. Supressão da resposta inflamatória por exposição a citrulina: proposta de mecanismo deação. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 19, p. 28-30, 1997.

SPEIJERS, G. J. A.; SPEIJERS, M. H. M. Combined toxic effects of mycotoxins. **Toxicology Letters**, v. 153, p. 91-98, 2004

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

SYPECKA, Z.; KELLY, M.; BRERETON, P. Deoxynivalenol and zearalenone residues in eggs of laying hens fed with a naturally contaminated diet: effects on egg production and estimation of transmission rates from feed to eggs. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 52, n. 17, p. 5463-5471, 2004.

TAKINO, M.; SHIGEKI, S.; NAKAHARA. Liquid chromatography/mass spectrometry for determination of patulin. **Rapid Communication in Mass Spectrometry**, v. 17, p. 1965-1972, 2003.

TAMMER, B; LEHMANN, I.; NIEBER, K.; ALTENBURGER, R. Combined effects of mycotoxins mixtures on human T cell function. **Journal of Chromatography A**, v. 170, p. 124-133, 2007.

TIMPERIO, A. M.; MAGRO, P.; CHILOSI, G.; ZOLLA, L. Assay of ochratoxin A in grape by high-pressure liquid chromatography coupled on line with an ESI-mass spectrometry. **Journal of chromatography B**, v. 832, n. 1, p. 127-133, 2006.

TUOMI, T.; SAARINEN, L.; REIJULA, K. Mycotoxins in crude building materials from water-damaged buildings. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 65, p. 1899-1904, 1998.

VALENTA, H. Chromatographic methods for the determination of ochratoxin A in animal and human tissues and fluids. **Journal of Chromatography A**, v. 815, n. 1, p. 75-92, 1998.

VENTURA, M.; GOMEZ, A.; ANAYA, I.; DIAZ, J.; BROTO, F.; AGUT, M.; COMELLAS, L. Determination of aflatoxins B1, G1, B2 and G2 in medicinal herbs by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1048, n. 1, p. 25-29, 2004.

VENTURA, M.; VALLEJOS, C.; ANAYA, I. A.; MONTSERRAT, F. B. -P.; COMELLAS L. Analysis of ochratoxin A in coffee by solid-phase cleanup and narrow-bore liquid chromatography-fluorescence detector-mass spectrometry. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 51, n. 26, p. 7564-7567, 2003.

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



VLATA, Z.; PORICHIS, F.; TZANAKAKIS, G.; TSATSAKIS, A.; KRAMBOVITIS, E. A study of zearalenone cytotoxicity on human peripheral blood mononuclear cells. **Toxicology Letters**, v. 165, p. 274-281, 2006.

VOSS, K. A.; POLING, S. M.; MEREDITH, F. I.; BACON, C. W. D.; SAUNDERS, S. Fate of fumonisins during the production of fried tortilla chips. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 48, n. 6, p. 3120-3126, 2001.

WALTON, M.; EGNER, P.; SCHOLL, P.F.; WALKER, J.; KENSLER, T. W.; GROOPMAN, J. D. Liquid chromatography electrospray-mass spectrometry of urinary aflatoxin biomarkers: characterization and application to dosimetry and chemoprevention in rats. **Chemical Research in Toxicology**, v. 14, n. 7, p. 919-926, 2001.

WILKES, J.; SUTHERLAND, G. J. B. Sample preparation and high-resolution separation of mycotoxins possessing carboxyl groups. **Journal of Chromatography B**, v. 717, n. 1-2, p. 135-156, 1998.

XIAO, H.; MARQUARDT, R. R.; ABRAMSON, D.; FROHLICH, A. A. Metabolites of ochratoxins in rat urine and in a culture of *Aspergillus ochraceus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n. 2, p. 648-655, 1996.

ZÖLLNER, P.; JODLBAUER, J.; KLEINOVA, M.; KAHLBACHER, H.; KUHN, T.; HOCHSTEINER, W.; LINDNER, W. Concentration levels of zearalenone and its metabolites in urine, muscle tissue, and liver samples of pigs fed with mycotoxin-contaminated oats. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 50, n. 9, p. 2494-2501, 2002.

ZÖLLNER, P.; BERNER, D.; JODLBAUER, J.; LINDNER, W. Determination of zearalenone and its metabolites @a- and @b-zearalenol in beer samples by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 738, n. 2, p. 233-241, 2000.

ZÖLLNER, P.; JODLBAUER, J.; LINDNER, W. Determination of zearalenone in grains by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry after solid-phase extraction with RP-18 columns or immunoaffinity columns. **Journal of Chromatography A**, v. 858, n. 2, p. 167-174, 1999.

ZÖLLNER, P.; LEITNER, A.; KLEINOVA, M.; JODLBAUER, J.; BERNER, D.; MAYER, B. X. Quantitative determination of ochratoxin A in kidneys by liquid chromatography tandem mass spectrometry. **LC-EC Eur**, v. 16, p. 163-172, 2003.

ZÖLLNER, P.; LEITNER, A.; LUBDA, D.; CABRERA, K.; LINDNER, W. Application of a chromolith speedROD RP-18e HPLC column: Determination of ochratoxin A in different wines by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Chromatographia**, v. 52, n. 11-12, p. 818-820, 2000.

ZÖLLNER, P.; MAYER-HELM, B. Trace mycotoxins analysis in complex biological and food matrices by liquid chromatography-atmosphere pressure ionization mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1136, p. 123-169, 2006.

### **3 ARTIGO**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

#### **DESENVOLVIMENTO DE UM MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE AFLATOXINAS EM CASTANHA-DO-BRASIL POR LC-MS/MS**

José Júnior Mendonça Xavier e Vildes Maria Scussel

### 3.1 RESUMO

Um método utilizando LC-MS/MS, com ionização química à pressão atmosférica, em modo positivo  $[M+H]^+$ , foi desenvolvido para determinação simultânea das aflatoxinas (AFLs): AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub> e AFG<sub>2</sub> em castanhas-do-Brasil. Através da monitoração de reações múltiplas, foi possível analisar os fragmentos das AFLs, aumentando a especificidade e sensibilidade. A separação das toxinas foi realizada utilizando uma coluna C<sub>8</sub> com um gradiente de fase móvel composto por água e metanol (ambos com 25mM de acetato de amônia), com um tempo total da corrida cromatográfica de 5.0 minutos. Os solventes de extração foram acetonitrila:água (80:20) e não foi realizada etapa de limpeza. Os valores de LOD e LOQ, com a presença da matriz, foram 0.04; 0.045; 0.050 e 0.060  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ ; 0.08, 0.09, 0.10 e 0.12  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  respectivamente para AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub> e AFG<sub>2</sub>. As taxas de recuperação ficaram entre 92 e 100 %. Os níveis do somatório das AFLs, obtidos de amostras naturalmente contaminadas, foram de 1.2 to 11.5  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ .

**PALAVRAS CHAVE:** Aflatoxinas, metodologia, castanha-do-Brasil, espectrometria de massa/massa, LC-MS/MS, cromatografia.

### 3.2 INTRODUÇÃO

Um dos maiores problemas relacionados com a segurança alimentar é a presença de fungos capazes de produzir metabólitos secundários tóxicos – as micotoxinas. O grupo mais importante de micotoxinas, considerando-se a toxicidade e as legislações mundiais, são as aflatoxinas (AFLs). Estas toxinas podem causar diversos danos à saúde de humanos e animais. Além disto, a presença de AFLs em alimentos pode levar à sérias perdas econômicas em países exportadores de produtos agrícolas, pois lotes de alimentos contaminados são sistematicamente rejeitados por países importadores de alimentos (ZÖLLNER et al., 2006).

Devido ao risco da presença de micotoxinas em alimentos, diversos países têm estabelecido legislações, principalmente para AFLs. Nos últimos anos, uma atualização das legislações internas vem sendo realizada, especialmente pela União Européia (UE), a qual reduziu os níveis máximos permitidos para AFLs (2 e 4  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  para AFB<sub>1</sub> e somatório das AFLs respectivamente) (EC, 2003). A UE também vem aumentando o número de micotoxinas em sua legislação em diferentes tipos de alimentos (UE, 2007). Isto cria a necessidade de metodologias sensíveis e específicas para detectar e quantificar níveis baixos de micotoxinas em alimentos.

Atualmente, os métodos utilizados para análise de AFLs estão principalmente fundamentados em cromatografia em camada delgada (CCD), cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detector de fluorescência e imunoensaios (KUSSAK, et al, 2005; AOAC, 2005). Todavia eles possuem algumas limitações tais como: demora na análise devido as longas etapas de extração e limpeza, uso de grandes volumes de solventes tóxicos e necessidade de etapas de confirmação. O uso de métodos utilizando espectrometria de massa/massa (MS/MS) acoplado à um cromatógrafo líquido (LC) é certamente uma das melhores técnicas para detecção e quantificação de micotoxinas. Com o sistema LC-MS/MS, é possível analisar diferentes grupos de toxinas nos mais variados alimentos com etapas de extração simples, alguns casos não há necessidade de limpeza do extrato, reduzindo a quantidade de solvente utilizada, o tempo de análise, bem como a obtenção de resultados auto-confirmatórios (CAVALIERI, et al., 2005; SORENSEN, et al., 2005; BERTHILLER et al., 2005; BISELLI et al., 2005; ZÖLLNER, et al, 2006; SPANJER et al., 2006; CAVALIERI, et al., 2007).

A maioria dos métodos desenvolvidos utilizando LC-MS/MS até agora são para tricotecenos (RAZZAZI-FAZELI et al., 1999; RAZZAZI-FAZELI et al., 2002; CAVALIERI, et al., 2005; SORENSEN, et al., 2005; BERTHILLER et al., 2005;), patulina (SEWRAN et al., 2000), zearalenona (BENNEKOM et al., 2002), fumonisinas (LUKACS et al., 1999; SPANJER et al., 2006) e para toxinas de *Alternaria* (SCOTT, 2001; SCOTT et al., 2006). Existem alguns métodos para análise de AFLs (AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub>, AFG<sub>2</sub>) porém, na maioria dos casos, a fonte

de ionização utilizada é a eletrospray (ESI) (JANSSEN et al., 2000; VENTURA et al., 2004; SPANJER et al., 2006; CAVALIERI, et al., 2007). Um artigo publicado em 2002 (ABBAS et al., 2002) apresenta a aplicação de APCI como fonte de ionização para análise de AFLs, todavia o tempo total da corrida cromatográfica foi de 30 minutos e uso de coluna de C<sub>18</sub>.

A castanha-do-Brasil é um produto economicamente importante para os países da América do Sul que possuem parte da floresta Amazônica em seu território. Recentemente, o mercado de exportação da castanha-do-Brasil para a UE sofreu uma drástica redução devido à presença de AFLs em concentrações superiores às exigidas pela legislação europeia (EC, 2003).

Considerando que os níveis exigidos pela UE têm restringido a exportação de castanha-do-Brasil, há a necessidade de métodos com alta sensibilidade, especificidade, auto confirmatórios e rápidos para contemplar esta legislação. Portanto, o presente estudo apresenta o desenvolvimento de um método por LC-MS/MS capaz de detectar e quantificar simultaneamente as AFLs (AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub>, AFG<sub>2</sub>) em níveis muito abaixo daqueles existentes para castanha-do-Brasil.

### 3.3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.3.1 MATERIAL

**a. Reagentes:** metanol, acetonitrila, benzeno (grau HPLC), Carlo Erba - Rodano, Itália. Água ultrapura (sistema MilliQ, Millipore – Billerica, USA). Acetato de amônia (PA), Vetc - Rio de Janeiro, Brasil.

**b. Padrões de Aflatoxinas:** AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub> e AFG<sub>2</sub>, Sigma (Saint Louis, USA).

**c. Amostras:** 40 amostras de castanha-do-Brasil com casca tipo exportação totalizando 30 kg, fornecidas pela beneficiadora CIEX, Manaus, Amazonas, Brasil.

**d. Equipamentos:** cromatógrafo líquido, modelo 1100, Agilent (Santa Clara, USA) com bomba quaternária, degaseificador, injetor automático ajustado para um volume de 20 µl. Colunas de fase reversa estudadas: três C<sub>18</sub> [(4.5 mm), 150 (5 µm) marca Hichrom (Theale, UK) e 250 mm (5 and 10 µm)] marca Phenomenex (Torrance, USA) e uma C<sub>8</sub> [4.6 x 150 mm (5 µm)] marca Agilent (Santa Clara, USA). Espectrômetro de massa/massa, API 4000 triplo-quadrupolo, Applied Biosystems<sup>®</sup> MDS SCIEX (Foster City, USA) , equipado com fontes de ionização APCI e ESI nos modos positivos e negativos e bomba de infusão marca Harvard Apparatus (Holliston, USA). Espectrofotômetro, U2010 Hitachi (Tóquio, Japão) . Moinho, Romer (Union, USA). Quebrador de nozes industrial da CIEX (Manaus, Brasil).



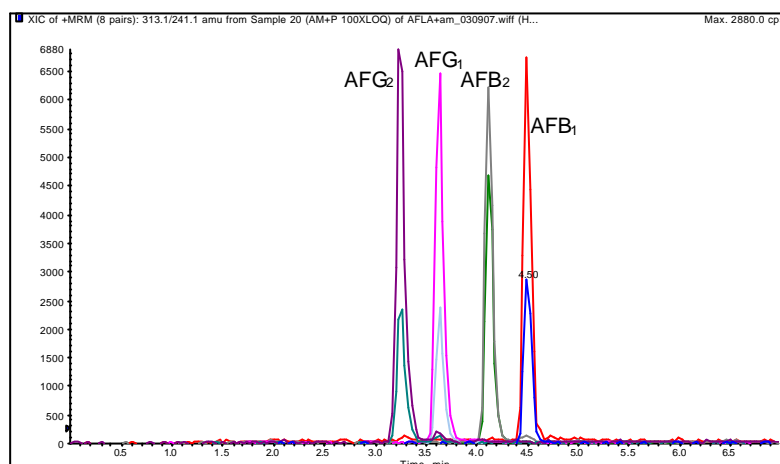
### 3.3.2 MÉTODOS

**a. Preparo das soluções padrão de AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub> e AFG<sub>2</sub>:** as soluções de toxinas (estoque, intermediária e de trabalho) foram preparadas utilizando benzeno, acetonitrila e/ou água de acordo com a etapa de desenvolvimento do método e posteriormente calibradas conforme AOAC, 2005. As soluções estoque foram preparadas com benzeno:acetonitrila (99:1), e as concentrações foram de 8.48, 10.36, 9.21 e 9.83 µg.ml<sup>-1</sup> para AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub> e AFG<sub>2</sub> respectivamente. As soluções intermediárias foram preparadas com acetonitrila em concentração de 1 µg.ml<sup>-1</sup> para todas as AFLs e as soluções de trabalho com água em concentração de 0.1 µg.ml<sup>-1</sup>. (a.1) *soluções para “tunning” do MS/MS:* soluções padrão individuais foram preparadas em concentração de 0.01 µg.ml<sup>-1</sup> em acetonitrila com 25 mM de acetato de amônia. (a.2) *soluções para o sistema LC-MS/MS:* as soluções padrão contendo as quatro AFLs (solução mix) foram preparadas em concentração de 0.001 µg.ml<sup>-1</sup> em água a partir da soluções de trabalho.

**b. Otimização dos parâmetros de MS/MS para AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub> e AFG<sub>2</sub>:** os padrões (soluções preparadas em 3.3.2.a.1) foram injetados individualmente direto no espectrômetro de massas com APCI como fonte de ionização operando no modo positivo [M+H]<sup>+</sup>, utilizando uma bomba de infusão, e os seguintes parâmetros foram otimizados: *collision energy* (CE), *declustering potential* (DP) e *cell exit potential* (CXP). Com a otimização destes parâmetros, os íons precursores (íons pai) e as transições foram obtidas para cada AFL.

**c. Ajuste dos parâmetros de LC para as AFLs no LC-MS/MS e Dwell Time**

**(DW):** o LC foi conectado ao detector e as soluções mix de AFLs, previamente preparadas, foram injetadas (20 $\mu$ l). A separação das toxinas foi avaliada em cada uma das colunas (C<sub>8</sub> e C<sub>18</sub>) utilizando metanol:água (ambas com 25 mM de acetato de amônia) como fase móvel (FM). O gradiente de FM foi desenvolvido com o objetivo de obter a melhor separação das quatro AFLs no menor tempo possível. A taxa de fluxo da FM foi de 1 ml/min, com um gradiente composto de água (A) e metanol (B) em uma proporção de 45 % (A) e 55 % (B) na etapa zero (pré corrida) por 3.5 minutos. Na etapa 1 (3.0 min) a proporção de metanol foi aumentada para 70 % e este gradiente foi então mantido até o final da corrida cromatográfica (7.0 min). Este gradiente apresentou uma excelente separação para as quatro toxinas. As toxinas foram separadas com sucesso utilizando a coluna C<sub>8</sub> e a primeira toxina a eluir da coluna foi a AFG<sub>2</sub>. Os tempos de retenção (RT) obtidos foram de 3.23, 3.64, 4.06 e 4.45 min para AFG<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub> e AFB<sub>1</sub>, respectivamente. O cromatograma de massa mostrando as transições mais sensíveis e específicas para cada toxina é apresentado na Figura 3.1. Apesar das colunas C<sub>18</sub> estudadas apresentarem boa resolução para separação das AFLs, neste estudo a coluna C<sub>8</sub> apresentou uma performance melhor, com picos cromatográficos bem definidos. O DW (parâmetro que define o tempo que o espectrômetro de MS/MS leva para detectar cada uma das transições individualmente) foi definido injetando-se soluções mix das toxinas em baixas concentrações (próximas ao limite de detecção (LOD)), com o objetivo de obter melhores picos cromatográfico. Este parâmetro é expresso em milisegundos (Tabela 3.1).



**Figura 3.1** - Cromatograma de massa de AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub> e AFG<sub>2</sub> utilizando LC-MS/MS – APCI [M+H]<sup>+</sup> em uma concentração de 50 x LOQ

**Tabela 3.1**- Íons pai (precursores), transições e parâmetros de MS/MS otimizados para as AFLs<sup>a</sup>

Toxina	MM <sup>b</sup>	Ion (m/z)		DP <sup>c</sup> (V)	CE <sup>d</sup> (V)	CXP <sup>e</sup> (V)	DW <sup>f</sup> (milisec)
		Pai	Transição				
AFB <sub>1</sub>	312	313.1	241.10*	91.00	53.00	42.00	250
			285.10**	91.00	33.00	24.00	250
AFB <sub>2</sub>	314	315.0	259.09*	101.00	41.00	22.00	250
			287.20*	101.00	37.00	26.00	250
AFG <sub>1</sub>	328	329.1	200.05**	96.00	27.00	34.00	250
			243.05*	96.00	37.00	40.00	250
AFG <sub>2</sub>	330	331.2	245.07*	86.00	43.00	42.00	250
			313.20**	86.00	35.00	20.00	250

<sup>a</sup> aflatoxinas <sup>b</sup> massa molar \*transição de quantificação <sup>c</sup> transição de confirmação

<sup>c</sup> declustering potential <sup>d</sup> collision energy <sup>e</sup> cell exit potential <sup>f</sup> dwell time

**d. Limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ), coeficiente de correlação ( $R^2$ ), efeito matriz e recuperação:** soluções mix com as AFLs em baixas concentrações foram injetadas no sistema LC-MS/MS e o LOD definido por 3 vezes a relação sinal/ruído (3S/R) e o LOQ por 6 vezes a relação sinal/ruído (6S/R). (d.1) *curvas de calibração e  $R^2$* : nesta etapa soluções mix das AFLs (calibradas) em cinco diferentes concentrações foram utilizadas. Os níveis de

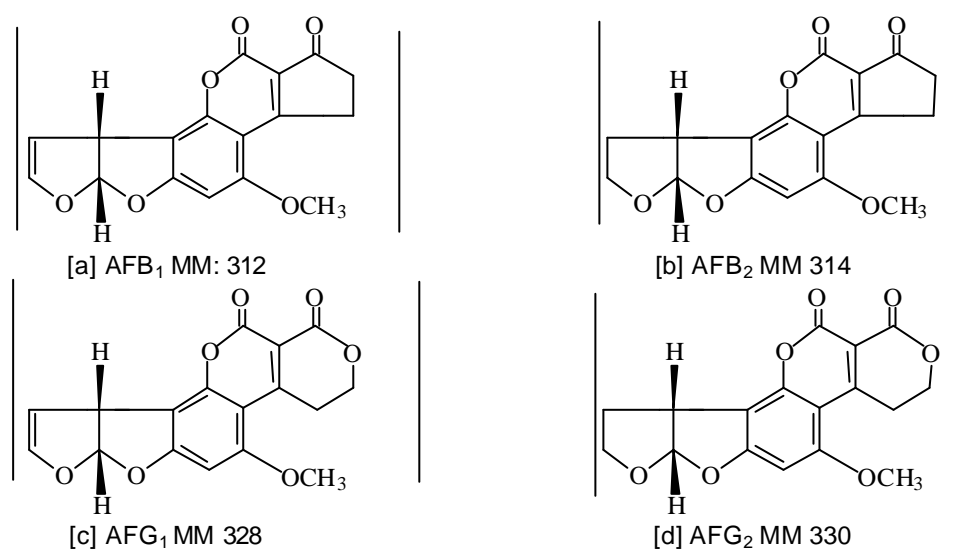
concentração utilizados para cada uma das AFLs foram calculados à partir de seus valores de LOQ obtidos anteriormente, sendo de: 1xLOQ, 5xLOQ, 10xLOQ, 20xLOQ and 100xLOQ. Após a injeção das soluções (triplicata), os  $R^2$  foram definidos à partir das curvas de calibração. Os  $R^2$  da matriz foram obtidos analisando-se castanhas-do-Brasil artificialmente contaminadas em concentrações de 1, 5, 10, 20 e 100 vezes o LOQ para cada AFL em triplicata. (d.2) *Preparo da amostra*: As amostras foram preparadas descascando-se as castanhas com um descascador industrial, posteriormente foram trituradas em um moinho. Importante enfatizar que após serem descascadas, mesmo as castanhas deterioradas foram incluídas no processo de extração. (d.3) *Extração*: porções homogêneas de 25 g foram separadas para extração adicionando-se 100 ml de acetonitrila:água (80:20 v/v) à amostra, misturadas por 2 horas e filtradas. O filtrado foi então diluído quatro vezes em água e um volume de 20µl injetado no LC-MS/MS. (d.4) *Efeito matriz*: para checar se os componentes da matriz poderiam interferir na detecção das AFLs, extratos foram artificialmente contaminados em 5 diferentes concentrações, baseadas nos valores de LOQ instrumentais e injetadas no LC-MS/MS em triplicata. (d.5) *Recuperação*: Amostras de castanha-do-Brasil foram trituradas e contaminadas com padrões das 4 AFLs em cinco concentrações de 1 à 10 µg.kg<sup>-1</sup> em triplicata e analisadas.

**e. Aplicação do método em castanha-do-Brasil naturalmente contaminadas:**

40 amostras foram analisadas utilizando o método desenvolvido. As quantificações foram realizadas pelo programa *Analyst* (instalado no sistema de interpretação de dados do sistema LC-MS/MS) baseadas nas curvas de calibração.

### 3.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

**a. Parâmetros de MS/MS para AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub> e AFG<sub>2</sub>:** a APCI foi a fonte de ionização utilizada para as AFLs em modo positivo, produzindo íons moleculares protonados. No sistema LC-MS/MS utilizado neste estudo, quando equipado com ESI como fonte de ionização, foi observado uma incapacidade de ionização das moléculas de AFLs. A fragmentação por colisão induzida demonstrou perdas mais significativas de moléculas de água, monóxido de carbono e dióxido de carbono seguidas de clivagem do esqueleto policíclico (Figura 3.2). Para o monitoramento de reações múltiplas (MRM), os fragmentos produtores de sinais mais intensos (utilizados para quantificação), bem como aqueles utilizados apenas como fragmentos de confirmação são apresentados na Tabela 3.1, assim como os outros parâmetros otimizados.



**Figura 3.2** – Estruturas químicas das AFLs com suas respectivas massas molares [a] AFB<sub>1</sub> (312), [b] AFB<sub>2</sub> (314), [c] AFG<sub>1</sub> (328) e [d] AFG<sub>2</sub> (330)

**b. LOD, LOQ,  $R^2$ , efeito matriz e recuperação:** Os valores de LOD, LOQ e  $R^2$  foram definidos para todas as transições, todavia, para quantificação, foram utilizados apenas as transições que produziram um sinal mais intenso bem como apresentaram melhores valores de  $R^2$  (Tabela 3.2). As outras transições foram utilizadas para confirmação da presença da toxina. O método apresentou linearidade instrumental em concentrações de 0.005, 0.02, 0.25 e 0.04 até 0.5, 2.0, 25 e 4.0  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  para AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub> e AFG<sub>2</sub> respectivamente, com valores de  $R^2$  próximos à 1.

Os valores de LOD e LOQ obtidos utilizando castanhas-do-Brasil foram excelentes, bem como os valores de recuperação, que ficaram entre 92 e 100 % (concentração das contaminações de 1 à 10  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ ). Os valores de LOD e LOQ para AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub> e AFG<sub>2</sub> foram de 0.04; 0.045; 0.050 e 0.060  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ ; 0.08, 0.09, 0.10 e 0.12  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  respectivamente, com valores de desvio padrão relativo menores que 5 %, os quais são apresentados na Tabela 3.3. Utilizando a matriz, a linearidade obtida para as AFLs esteve entre as concentrações de 0.08, 0.09, 0.10 e 0.12 até 8.0, 9.0, 10 e 12  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  e os valores de  $R^2$  foram de 0.9981, 0.9998, 0.9993 e 0.9997 para AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub> e AFG<sub>2</sub>, respectivamente. Os valores de LOD e LOQ do método (Tabela 3.2) foram muito abaixo de 1  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ , nível o qual atende as exigências da legislação da UE (2  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  para AFB<sub>1</sub> e 4  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  para o somatório das quatro AFLs ). Em relação ao efeito matriz, foi observado uma pequena interferência no sinal produzido pelas AFLs, o que pode ser verificado pelo ligeiro aumento nos valores de LOD e LOQ com a presença da matriz. A figura 3.3 mostra um cromatograma de massa/massa de uma amostra

contaminada com valores próximos ao LOQ e pode ser observado a interferência dos componentes da matriz.

**c. Resultado da aplicação do método nas amostras de castanha-do-Brasil**

**naturalmente contaminadas:** AFLs foram detectadas em 7 amostras, sendo que as concentrações, do somatório das quatro toxinas, variaram de 1.2 à 11.5  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  e apenas 4 amostras apresentaram valores de contaminação superiores às exigidas pela UE para o somatório das AFLs (4  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ ). Nenhuma amostra apresentou níveis de contaminação maiores do que outras legislações como do Mercosul (20  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ ), Canadá (15  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ ) e dos Estados Unidos (20  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ ) (EGMOND et al., 2004).

**Tabela 3.2 - Valores instrumentais de LOD<sup>a</sup>, LOQ<sup>b</sup> e R<sup>2</sup><sup>c</sup>**

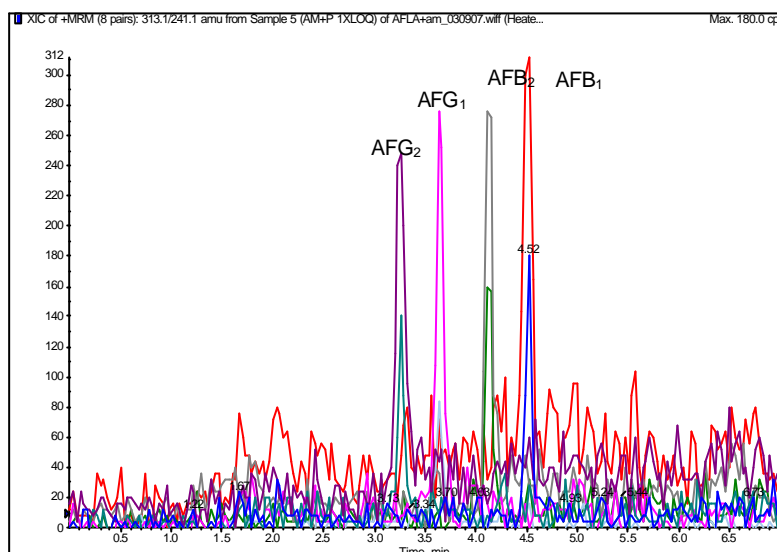
Toxina	LOD ( $\mu\text{g.kg}^{-1}$ )	LOQ ( $\mu\text{g.kg}^{-1}$ )	R <sup>2</sup>
AFB <sub>1</sub>	0.0025	0.005	0.9995
AFB <sub>2</sub>	0.01	0.02	0.9996
AFG <sub>1</sub>	0.0125	0.025	0.9995
AFG <sub>2</sub>	0.02	0.04	0.9994

<sup>a</sup> limite de detecção <sup>b</sup> limite de quantificação <sup>c</sup> coeficiente de correlação

**Tabela 3.3 - Detecção de aflatoxinas e repetibilidade em castanha-do-Brasil artificialmente contaminadas com diferentes concentrações**

TOXINA	Detecção de Aflatoxinas ( $\mu\text{g.kg}^{-1}$ )									
	100 x LOQ <sup>a</sup>		20 x LOQ		10 x LOQ		5 x LOQ		1 x LOQ <sup>a</sup>	
	Média ( $\mu\text{g.kg}^{-1}$ )	DPR <sup>b</sup> (%)	Média ( $\mu\text{g.kg}^{-1}$ )	DPR (%)	Média ( $\mu\text{g.kg}^{-1}$ )	DPR (%)	Média ( $\mu\text{g.kg}^{-1}$ )	DPR (%)	Média ( $\mu\text{g.kg}^{-1}$ )	DPR (%)
AFB <sub>1</sub>	7.99	0.75	1.69	4.73	0.79	5.10	0.41	1.46	0.075	4.00
AFB <sub>2</sub>	8.98	1.78	1.89	1.05	0.90	3.33	0.46	4.34	0.082	2.43
AFG <sub>1</sub>	9.97	0.30	2.19	5.47	1.00	5.00	0.48	1.04	0.094	3.20
AFG <sub>2</sub>	11.94	1.84	2.64	7.90	1.18	4.23	0.60	1.46	0.099	5.05

<sup>a</sup> Limite de quantificação, <sup>b</sup> Desvio padrão relativo n = 5



**Figure 3.3** – Cromatograma de massa/massa de uma amostra contaminada utilizando LC-MS/MS-APCI  $[M+H]^+$  com concentrações de: 0.1, 0.13, 0.15 e 0.12  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  para AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub> e AFG<sub>2</sub>, respectivamente

**d. Discussão Geral:** Alguns métodos para detecção de AFLs utilizando LC-MS/MS foram desenvolvidos (BLESA et al., 2003; VENTURA et al., 2004; SPANJER et al., 2006; CAVALIERI et al., 2007), sendo que os mesmos tem em comum a fonte de ionização. Estes métodos utilizaram ESI, coluna C<sub>18</sub> e alguns possuíam etapas de limpeza do extrato. Spanjer et al (2006) não utilizou nenhuma etapa de limpeza. Por outro lado, Cavalieri et al. (2007) analisaram AFLs em óleo de oliva, todavia, o método era relativamente demorado na etapa de detecção por LC-MS/MS, onde o tempo de corrida cromatográfica era de 16 minutos. Foi encontrado apenas um artigo onde o método utilizou APCI como fonte de ionização (ABBAS et al., 2002), porém com um tempo de corrida cromatográfica um tanto longo (30 minutos), neste estudo a coluna cromatográfico foi uma C<sub>18</sub>. Ao



contrário dos métodos citados, o método desenvolvido neste trabalho utilizou APCI como fonte de ionização, coluna C<sub>8</sub> e o tempo total para separação das 4 AFLs foi de apenas cinco minutos, sendo que os tempos de retenção individuais foram de 3.23, 3.64, 4.06 e 4.45 minutos para AFG<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub> e AFB<sub>1</sub> respectivamente. A utilização de um cromatógrafo líquido de ultra eficiência (UPLC) puder ser utilizado no método, o tempo total da corrida cromatográfica poderá ser extremamente reduzido, conforme o método apresentado por Ventura et al. (2006), o qual foi capaz de separar as 4 AFLs em 3.1 minutos.

Comparando as metodologias atuais utilizando LC com detector de fluorescência e CCD (AOAC, 2005), as vantagens do método desenvolvido neste estudo são a velocidade e segurança dos resultados, bem como a capacidade de detecção de níveis muito baixos das toxinas. A grande desvantagem do presente método é o alto custo para aquisição e manutenção do equipamento. Todavia, o mesmo acaba sendo financeiramente vantajoso à longo prazo devido à qualidade e segurança dos resultados obtidos, bem como redução nos custos de mão de obra e volume de solventes utilizados. O método desenvolvido neste estudo pode também ser uma ferramenta muito útil na detecção de baixos níveis de AFLs, podendo auxiliar em pesquisas, na aquisição de dados epidemiológicos para avaliar intoxicações crônicas de baixas concentrações e sua relação com efeitos tóxicos das AFLs como câncer.

Considerando as matrizes passíveis de serem avaliadas, neste caso, o método é válido apenas para análise de AFLs em castanha-do-Brasil. Este

produto por si só já justifica o uso do método desenvolvido, isto porque grande quantidade destas castanhas são exportadas anualmente, auxiliando a economia de países da América do Sul que possuem a floresta Amazônica em seus territórios.

### **3.5 CONCLUSÃO**

O método desenvolvido para análise de AFLs em castanha-do-Brasil por LC-MS/MS mostrou alta sensibilidade (baixos valores de LOD e LOQ), rápido (tempo total de cromatografia de 5.0 minutos) e especificidade (duas transições para cada AFL). A aplicação do método em castanha-do-Brasil foi excelente e capaz de contemplar a legislação da UE. A etapa de extração foi também rápida, segura (pequenos volumes de solvente) e relativamente simples (sem necessidade de etapa de limpeza do extrato). Uma melhoria proposta para o método seria a inclusão de outras micotoxinas capazes de contaminar a castanha-do-Brasil e que são exigidas pelas legislações internacionais, bem como o desenvolvimento de métodos similares para análise em outras matrizes alimentares de expressivo valor econômico para a exportação brasileira.

### 3.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, H.; WILLIAMS, W. P.; WINDHAM, G. L.; PRINGLE, H. C.; XIE, W.; SHIER, W. Aflatoxin and Fumonisin Contamination of Commercial Corn (*Zea mays*) Hybrids in Mississippi. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 5246-5254, 2002.

AOAC - Association of Official Analytical Chemists, 2005. **Official Methods of Analysis of AOAC International 18th**, Horwitz, W. and Latimer, G. W. Jr. eds. Gaithersburg, Maryland, USA.

BENNEKOM E. O.; BROUWER, L.; LAURANT, E .H. M.; HOOIJERINK, H.; NIELEN, M. W. F. Confirmatory analysis method for zearanol, its metabolites and related mycotoxins in urine by liquid chromatography-negative ion electrospray tandem mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 473, p. 151-160, 2002.

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

BISELLI, S.; HARTIG, L.; WEGENER, H.; HUMMERT, C. Analysis of *Fusarium* toxins using LC-MS/MS. **Spectroscopy**, v. 20, p. 20-28, 2005.

BLESA, J.; SORIANO, J. M.; MOLTÓ, J. C.; MARÍN, R.; MAÑES, J. Rapid determination of ochratoxin A in cereals and cereal products by liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1046, p. 127-131, 2003.

CAVALIERE, C.; D'ASCENZO, G.; FOGLIA, P.; PASTORINI, P.; E.; SAMPERI R.; LAGANÀ, A. Determination of type B trichothecenes and macrocyclic lactone mycotoxins in field contaminated maize. **Food Chemistry**, v. 92, n. 3, p. 559-568, 2005.

CAVALIERE, C.; FOGLIA, P.; GUARINO, C.; MOTTO, M.; NAZZARI, M.; SAMPERI, R.; LAGANA, A.; BERARDO, N. Mycotoxins produced by *Fusarium* genus in maize: determination by screening and confirmatory methods base don liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 105, p. 700-710, 2007.

EC - Commission of the European Communities (Health and Consumer Protection Directorate-General), 2003. Final report of a mission carried out in Brazil from 27<sup>th</sup> January to 7<sup>th</sup> February 2003 to assess the facilities and measures in place for the control of aflatoxin levels in Brazil nuts intended for export into the European Union, DG (SANCO) /9027/2003 – MR – final. 20 pp.

EGMOND, H. P.; JONKER, M. A., 2004. Current regulations governing mycotoxin limits in food. In: **Mycotoxins in Food – Detection and control**. Ed. N. Magan and M. Olsen. Acad. Publishers, 49 – 68.

EU - European Union, Scientific Committee Of Food, Brussels <http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scf/opinions>. Visitado em Setembro, 2007.

KUSSAK, A.; NILSSON, C. A.; LANGRIDGE, J. Determination of aflatoxins in bone dust and urine by liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Rapid Commun. Mass Spectrom.**, v. 9, p.1234-1242, 1995.

LUKACS, Z.; SCHAPER, S.; HERDERICH, M.; SCHREIER, P.; HUMPF, H. Identification and determination of fumonisin FB<sub>1</sub> and FB<sub>2</sub> in corn and corn products by high-performance liquid chromatography-electrospray-ionization tandem mass spectrometry (HPLC-ESI-MS-MS). **Chromatographia**, v. 43, p. 124-128, 1996.

MARKLINDER, M.; LINBLAD, A.; GIDLUND.; OLSEN, M. Consumers' ability to discriminate aflatoxin-contaminated Brazil nuts. **Food Additives and Contaminants**, v. 22, p. 56-64, 2005.

RAZZAZI-FAZELI, E.; BÖHM, J.; LUF, W. Determination of nivalenol and deoxynivalenol in wheat using liquid chromatography–mass spectrometry with negative ion atmospheric pressure chemical ionisation. **Journal of Chromatography A**, v. 854, n. 1, p. 45-55, 1999.

RAZZAZI-FAZELI, E.; BÖHM, J.; JARUKAMJOM, K. Simultaneous determination of major B-trichotecenes and the de-epoxy-metabolite of deoxinivalenol in pig urine and maize using high-performance liquid chromatography-mass-spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 796, n. 1, p. 21-33, 2003.

SCOTT, P. M. Analysis of Agricultural Commodities and Foods for *Alternaria* Mycotoxins. **Journal of AOAC International**, v.84, p. 1809-1817, 2001.

SCOTT, P.M.; LAWRENCE, G. A.; LAU, B. P. Analysis of wines, grape juices and cranberry juices for *Alternaria* toxins. Mycotoxin Research **Mycotoxin Research**, v. 22, p. 142-147, 2006.

SEWRAN, V.; NAIR, J. J.; NIEUWOUDT; LEGGOTT, N. L.; SHEPHARD, G. S. Determination of patulin in apple juice by high-performance liquid chromatography–atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 897, p. 365-374, 2000.

SORENSEN, L. K.; ELBAEK, T. H. Determination of mycotoxins in bovine milk by liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 820, n. 2, p. 183-196, 2005.

SPANJER, M.C.; SCHOLTEN J. M. e RENSEN P. M., 2006. Multi-mycotoxin analysis by LC-MS/MS in a single sample extract. In: **Mycotoxins and Phycotoxins - Advances in determination, toxicology and exposure management**. Ed. Njapau; Trujillo; van Egmond. and Park, Wageningen Acad. Publishers, 117-124.

VENTURA, M.; GÓMEZ, A.; ANAYA, I.; DIAZ, J.; BROTO, F.; AGUT, M.; COMELLAS, L. Determination of aflatoxins B<sub>1</sub>, G<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> and G<sub>2</sub> in medicinal herbs by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1048, p. 25-29, 2004.

ZÖLLNER, P.; MAYER-HELM, B. Trace mycotoxins analysis in complex biological and food matrices by liquid chromatography-atmosphere pressure ionization mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1136, p. 123-169, 2006.

**4 ARTIGO**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

**AVALIAÇÃO DE QUINZE MICOTOXINAS POR LC-MS/MS UTILIZANDO  
IONIZAÇÃO QUÍMICA À PRESSÃO ATMOSFÉRICA E IONIZAÇÃO POR  
ELETROSPRAY**

José Júnior Mendonça Xavier e Vildes Maria Scussel

#### 4.1 RESUMO

Dois métodos foram desenvolvidos para a quantificação de quinze micotoxinas, em uma única injeção de amostra, por cromatografia líquida de alta eficiência (LC) acoplada a um espectrômetro de massa/massa (MS/MS) equipado com duas fontes de ionização (FI): ionização química à pressão atmosférica (APCI) e ionização por eletrospray (ESI). As toxinas analisadas foram: aflatoxinas (AFB<sub>1</sub>; AFB<sub>2</sub>; AFG<sub>1</sub> e AFG<sub>2</sub>), citrinina (CTR), fumonisinas (FB<sub>1</sub> e FB<sub>2</sub>), ocratoxina A (OTA), tricotecenos (NEO; 15ADON; 3ADON; DAS; HT<sub>2</sub> e T<sub>2</sub>) e zearalenona (ZON). As toxinas foram separadas em uma coluna C<sub>18</sub> de fase reversa, com 15 cm de comprimento e partículas de 5 µm, com metanol e água (ambos com 25 mM de acetato de amônia) como fase móvel. O tempo total de corrida cromatográfica foi de 11.5 e 9.5 min, utilizando APCI e ESI respectivamente. As micotoxinas que foram ionizadas por APCI foram: NEO; 15ADON; 3ADON; AFB<sub>1</sub>; AFB<sub>2</sub>; AFG<sub>1</sub>; AFG<sub>2</sub>; DAS; HT<sub>2</sub> e T<sub>2</sub> (modo positivo) e ZON (modo negativo). ESI foi capaz de ionizar: NEO; 15ADON; 3ADON; DAS; HT<sub>2</sub>; T<sub>2</sub>; FB<sub>1</sub>; FB<sub>2</sub>; CTR e OTA (modo positivo) e ZON (modo negativo). Os limites de quantificação (LOQ) obtidos com APCI foram: 0.25, 2.5, 0.7, 0.01, 0.015, 0.015, 0.02, 0.2, 1.0, 0.5 e 0.05 µg.kg<sup>-1</sup> para NEO; 15ADON; 3ADON; AFB<sub>1</sub>; AFB<sub>2</sub>; AFG<sub>1</sub>; AFG<sub>2</sub>; DAS; HT<sub>2</sub>, T<sub>2</sub> e ZON, respectivamente. Utilizando ESI os LOQs foram de: 0.1, 1.5, 0.14, 0.04, 0.08, 0.1, 0.2, 0.08, 2.5, 0.08 e 0.05 µg.kg<sup>-1</sup> para NEO; 15ADON; 3ADON; DAS; HT<sub>2</sub>; T<sub>2</sub>; FB<sub>1</sub>; FB<sub>2</sub>; CTR; OTA e ZON, respectivamente. Sete micotoxinas foram ionizadas por ambas FIs, todavia seus LOQs foram menores quando ESI foi utilizado, exceto para ZON. AFLs foram ionizadas apenas por APCI. As metodologias desenvolvidas com as duas FIs mostraram diferentes vantagens, e a escolha da FI

dependerá do objetivo de sua aplicação. A APCI demonstrou menor sensibilidade quando comparada com ESI, porém, quando comparada com métodos tradicionais para detecção de micotoxinas, apresenta uma melhor performance, devido à sua sensibilidade e um tempo curto de análise.

**Palavras chave:** LC-MS/MS, micotoxinas, multi-toxinas, métodos, APCI, ESI.

## 4.2 INTRODUÇÃO

Diferentes tipos de alimentos podem ser contaminados por diferentes grupos de fungos, os quais, em determinadas condições, são capazes de produzir metabólitos secundários tóxicos – as micotoxinas. Estas toxinas podem causar severos danos à saúde de humanos e animais. Além disto, a presença destas substâncias pode levar à grandes perdas econômicas, principalmente para países exportadores de alimentos. Estima-se que cerca de 25 % dos grãos de todo o mundo estão contaminados por micotoxinas (HUSSEIN et al., 2001; GUTLEB et al, 2002; ZÖLLNER et al., 2006; BINDER, 2007).

Para minimizar os impactos negativos provocados pelas micotoxinas, diversos países têm estabelecido legislações. Atualmente cerca de 100 países, principalmente após a incorporação de países do Leste Europeu à União Europeia (UE), possuem legislação para micotoxinas. Atualização das legislações têm aumentado o número de micotoxinas de interesse, bem como uma redução nos



níveis máximos permitidos (NMP) (BERG, 2002; BINDER, 2007). Pelos motivos citados anteriormente, há uma necessidade por metodologias mais rápidas, eficientes e eficazes, capazes de detectar e quantificar baixos níveis de micotoxinas em alimentos.

Existem vários métodos oficiais capazes de realizar esta detecção e que, na maioria dos casos, utiliza técnicas de cromatografia em camada delgada (CCD), cromatografia líquida de alta eficiência (LC) com detectores de fluorescência (FL) e ultravioleta (UV) e cromatografia gasosa (CG) com detectores de ionização por chama e captura de elétrons (KUSSAC et al, 1995; AOAC, 2005). Estes métodos são confiáveis e aplicados na maioria dos processos analíticos, todavia, eles possuem certas limitações e dificuldades como incapacidade de detecção de multi-toxinas de diferentes grupos em uma única etapa analítica e a necessidade de etapas de confirmação dos resultados (REN et al, 2007; BINDER, 2007).

A utilização de métodos desenvolvidos com a aplicação de espectrometria MS/MS têm demonstrado como sendo uma das melhores técnicas para detecção e quantificação de micotoxinas de diferentes grupos nos mais variados alimentos (ZÖLLNER, et. al., 2006). A maioria destes métodos têm sido desenvolvidos para grupos específicos de micotoxinas tais como tricotecenos, patulina (PTL), aflatoxinas (AFLs) e fumonisinas (FB) (SMEDSGAARD et al.,1996; PALLARONI et al., 2002; ROYER et al., 2004; KOKKONEN et al., 2005; SORENSEN et al., 2005). Alguns métodos por LC-MS/MS objetivam também a redução das etapas de limpeza do extrato, diminuindo, desta forma, o tempo de análise e o uso de

grandes volumes de solventes (SPANJER et al., 2006). A grande vantagem da aplicação desta técnica é, sem sombra de dúvida, a obtenção de resultados auto-confirmatórios e a alta sensibilidade. A capacidade de detecção de multi-toxinas figura também como uma grande vantagem, isto devido à uma tendência global da avaliação de efeitos sinérgicos de mais de uma toxina, mesmo em níveis individuais aceitáveis, no mesmo alimento (MCKEAN et al, 2006; GORYACHEVA et al, 2007; CAVALIERI et al., 2007; MATTSSON, 2007; REN et al., 2007).

Desenvolvimento de métodos para multi-toxinas utilizando APCI e ESI como fontes de ionização, proporcionando uma comparação do desempenho entre as duas, são limitados. Por este motivo, o objetivo do presente estudo foi o desenvolvimento de métodos para detecção e quantificação de 15 micotoxinas de diferentes grupos, em um único processo analítico, utilizando APCI e ESI como FI, para futuramente serem aplicados em diferentes matrizes alimentares.

## 4.3 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.3.1 MATERIAL

**a. Reagentes:** metanol, acetonitrila, benzeno (grau HPLC) marca Carlo Erba.

Água ultrapura (sistema MilliQ, Millipore) e acetato de amônia (PA) marca Vetec.

**b. Padrões de micotoxinas:** aflatoxinas (AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub> e AFG<sub>2</sub>), fumonisinas (FB<sub>1</sub> e FB<sub>2</sub>), citrinina (CTR); ocratoxina A (OTA); zearalenona (ZON), Sigma®.

tricotecenos: toxina T<sub>2</sub> (T<sub>2</sub>); toxina HT<sub>2</sub> (HT<sub>2</sub>); neosolaniol (NEO), diacetoxiscirpenol (DAS), 3-acetil deoxinivalenol (3-ADON) e 15-acetildeoxinivalenol (15-ADON).

**c. Equipamentos:** cromatógrafo líquido, modelo 1100, Agilent (Santa Clara, USA) com bomba quaternária, desgaseificador, injetor automático ajustado para um volume de 20 µl. Coluna de fase reversa C<sub>18</sub> 15 cm e tamanho de partícula de 5µm marca Hichrom (Theale, UK). Espectrômetro de massa/massa, API 4000 triplo-quadrupolo, Applied Biosystems® MDS SCIEX (Foster City, USA) , equipado com fontes de ionização APCI e ESI nos modos positivos e negativos e bomba de infusão marca Harvard Apparatus (Holliston, USA). Espectrofotômetro, U2010 Hitachi (Tóquio, Japão) . Moinho, Romer (Union, USA).

### 4.3.2 MÉTODOS

**a. Preparo das soluções padrão de micotoxinas:** as soluções de toxinas (estoque, intermediária e de trabalho) foram preparadas utilizando benzeno, acetonitrila e/ou água, de acordo com a etapa do desenvolvimento do método e posteriormente calibradas, de acordo com a AOAC, 2005. As concentrações das soluções, bem como os solventes utilizados são apresentados na tabela 4.1.

**Tabela 4.1 – Concentração dos diferentes padrões e os solventes utilizados**

Toxina	Solvente	Soluções para MS/MS <sup>a</sup> e LC-MS/MS <sup>b</sup> (µg/ml)		
		Estoque	Intermediária	Trabalho
AFB <sub>1</sub>	Benz <sup>c</sup> /ACN <sup>d</sup> /H <sub>2</sub> O	8.48	1.0	0.1
AFB <sub>2</sub>	“	10.36	1.0	0.1
AFG <sub>1</sub>	“	9.21	1.0	0.1
AFG <sub>2</sub>	“	9.83	1.0	0.1
FB <sub>1</sub>	“	100.0	1.0	0.1
FB <sub>2</sub>	“	100.0	1.0	0.1
CTR	“	9.5	1.0	0.1
OTA A	“	29.6	1.0	0.1
ZON	“	7.99	1.0	0.1
NEO	“	49.79	1.0	0.1
DAS	“	40.16	1.0	0.1
3-ADON	“	39.38	1.0	0.1
15-ADON	“	44.39	1.0	0.1
T <sub>2</sub>	“	39.0	1.0	0.1
HT <sub>2</sub>	“	10.0	1.0	0.1

<sup>a</sup> espectrômetro de massa/massa <sup>b</sup> cromatógrafo líquido acoplado à detector de massa/massa  
<sup>c</sup>benzeno <sup>d</sup> acetonitrila

**b. Otimização dos parâmetros de MS/MS para as micotoxinas:** os padrões foram injetados individualmente direto no espectrômetro de massas utilizando uma bomba de infusão, inicialmente com APCI e posteriormente com ESI como fonte de ionização, operando nos modos positivo [M+H]<sup>+</sup> e negativo [M-H]<sup>-</sup>. Os

seguintes parâmetros foram otimizados: *collision energy* (CE), *declustering potential* (DP) e *cell exit potential* (CXP). Com a otimização destes parâmetros, os íons precursores (íons pai) e as transições foram obtidas para cada micotoxina.

**c. Ajuste dos parâmetros de LC para as micotoxinas no LC-MS/MS:** o LC foi conectado ao detector e duas soluções mix de micotoxinas foram preparadas: uma contendo as toxinas capazes de ser ionizadas por APCI e outra com as toxinas capazes de ser ionizadas por ESI. Inicialmente o detector foi equipado com a fonte APCI e a solução mix foi injetada (20 µl) posteriormente o mesmo procedimento foi repetido com a ESI. A separação das toxinas foi realizada em uma coluna C<sub>18</sub> utilizando metanol:água (ambas com 25 mM de acetato de amônia) como fase móvel (FM). O gradiente de FM foi desenvolvido com o objetivo de obter a melhor separação das toxinas no menor tempo possível.

**d. Determinação do LOD, LOQ, coeficiente de correlação ( $R^2$ ), e dwell time (DW) para os dois métodos:**

**d.1. LOD e LOQ:** soluções mix dos padrões com baixas concentrações foram injetadas no LC-MS/MS em triplicata. O LOD foi definido por três vezes a relação sinal/ruído (3S/R) e o LOQ por seis vezes esta mesma relação (6S/R).

**d.2. Coeficiente de correlação:** nesta etapa as soluções mix de padrão de micotoxinas foram preparadas, em cinco diferentes concentrações baseadas nos valores de LOQ (1, 5, 10, 20, 50 e 100 x LOQ). Após a injeção em triplicata das soluções a curva de calibração foi construída. O programa do sistema de

interpretação de dados, baseado nas curvas de calibração, calculou os valores de  $R^2$ .

**d.3. DW:** este parâmetro define o melhor tempo de leitura das transições individualmente, isto para a obtenção dos melhores picos cromatográficos e melhor integração dos mesmos pelo sistema. As soluções padrão foram injetadas em concentrações de uma vez o LOQ (1 x LOQ). Este parâmetro é expresso em milisegundos.

#### 4.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

**a. Otimização dos parâmetros de MS/MS para as micotoxinas:** a otimização dos parâmetros para cada uma das micotoxinas mostrou que, das 15 micotoxinas avaliadas, as duas fontes foram capazes de ionizar 11 micotoxinas cada. A APCI não ionizou FB<sub>1</sub>, FB<sub>2</sub>, OTA e CTR e a ESI não ionizou as quatro AFLs. Foi observado que nos dois métodos, apenas a ZON apresentou uma ionização mais eficiente no modo negativo, enquanto todas as outras toxinas foram melhor ionizadas no modo positivo. Os íons precursores (íons pai) as transições (fragmentos) e os parâmetros otimizados (DP, CE e CXP) obtidos para as duas fontes de ionização são apresentados na Tabela 4.2 e 4.3 para APCI e ESI respectivamente. Foram selecionadas duas transições para cada toxina.

**Tabela 4.2** – Íons precursoros, transições e parâmetros otimizados para as micotoxinas ionizadas por APCI

	Micotoxina	Íon (m/z)		DP <sup>a</sup>	CE <sup>b</sup>	CXP <sup>c</sup>
		Presursor	Transição			
1	AFB <sub>1</sub>	313.1	241.10*	91.00	53.00	42.00
			285.10**	91.00	33.00	24.00
2	AFB <sub>2</sub>	315.0	259.09**	101.00	41.00	22.00
			287.20*	101.00	37.00	26.00
3	AFG <sub>1</sub>	329.1	200.05**	96.00	27.00	34.00
			243.05*	96.00	37.00	40.00
4	AFG <sub>2</sub>	331.2	245.07**	86.00	43.00	42.00
			313.20*	86.00	35.00	20.00
5	NEO	400.2	215.30*	46.00	25.00	25.00
			305.30**	46.00	19.00	20.00
6	3-ADON	339.1	175.00**	76.00	33.00	32.00
			231.20*	76.00	19.00	38.00
7	15-ADON	339.1	261.20*	76.00	17.00	18.00
			321.30**	76.00	13.00	30.00
8	DAS	384.2	247.20**	61.00	21.00	22.00
			307.30*	61.00	17.00	30.00
9	HT <sub>2</sub>	442.2	215.10*	61.00	19.00	40.00
			263.20**	61.00	19.00	20.00
10	T <sub>2</sub>	484.3	215.20*	61.00	21.00	14.00
			305.30**	61.00	19.00	30.00
11	ZON	317.0	131.10*	-61.00	-40.00	-7.00
			175.00**	-61.00	-34.00	-11.00

<sup>a</sup> Declustering potential, <sup>b</sup> Collision energy e <sup>c</sup> Cell exit potential \*Íon de quantificação \*\*Íon de confirmação

**Tabela 4.3** - Íons precursoros, transições e parâmetros otimizados para as micotoxinas ionizadas por ESI

	Micotoxina	Íon (m/z)		DP <sup>a</sup>	CE <sup>b</sup>	CXP <sup>c</sup>
		Presursor	Transição			
1	FB <sub>1</sub>	722.4	334.40*	111.00	55.00	55.00
			704.40**	111.00	41.00	18.00
2	FB <sub>2</sub>	706.3	318.50**	111.00	55.00	28.00
			336.50*	111.00	51.00	24.00
3	OTA	404.1	239.10*	61.00	33.00	18.00
			358.00**	61.00	21.00	32.00
4	CTR	251.0	233.30*	41.00	23.00	16.00
			191.00**	41.00	35.00	32.00
5	NEO	400.2	215.20**	51.00	25.00	14.00
			305.30*	51.00	19.00	22.00
6	3-ADON	339.1	203.20**	76.00	21.00	12.00
			231.20*	76.00	17.00	16.00
7	15-ADON	339.1	261.30*	81.00	17.00	16.00
			321.30**	81.00	13.00	20.00
8	DAS	384.2	247.20**	56.00	19.00	16.00
			307.30*	56.00	17.00	20.00

9	HT <sub>2</sub>	442.2	215.20*	51.00	19.00	16.00
			269.30**	51.00	37.00	30.00
10	T <sub>2</sub>	484.2	215.20**	56.00	25.00	16.00
			305.30*	56.00	19.00	22.00
11	ZON	317.0	131.10**	-61.00	-40.00	-7.00
			175.00*	-61.00	-32.00	-11.00

<sup>a</sup> Declustering potential, <sup>b</sup> Collision energy e <sup>c</sup> Cell exit potential \*Ion de quantificação \*\*Ion de confirmação

**b. Ajuste dos parâmetros de LC para as micotoxinas no LC-MS/MS:** as micotoxinas foram satisfatoriamente separadas em uma coluna C<sub>18</sub> de fase reversa. Os solventes utilizados para composição da fase móvel foram água (A) e metanol (B), ambos com 25 mM de acetato de amônia. Dois gradientes foram então desenvolvidos, sendo um para o método utilizando ACPI e outro para o método utilizando ESI (Tabela 4.4) O gradiente obtido para o método por ESI mostrou-se mais simples (apenas três etapas) e rápido (tempo total de corrida cromatográfica de 9.5 minutos). Já o gradiente para o método utilizando APCI precisou de 6 etapas com um tempo total de 11.7 minutos. Os tempos de retenção individuais para cada micotoxina são apresentados na Tabela 4.5. Nas figuras 4.1, 4.2 e 4.3 são apresentados os cromatogramas utilizando APCI nos modos positivo, negativo e positivo/negativo respectivamente. Nas figuras 4.4, 4.5 e 4.6 são apresentados os cromatogramas utilizando ESI nos modos positivo, negativo e positivo/negativo respectivamente



**Tabela 4.4** – Gradiente de fase móvel para os métodos por LC-MS/MS utilizando APCI e ESI

Etapa	Tempo (min)	Fluxo (ml/min)	A <sup>c</sup> (%)	B <sup>d</sup> (%)
<b>APCI</b>				
0	3.50	1	45	55
1	6.00	1	40	60
2	7.00	1	10	90
3	10.00	1	10	90
4	10.01	1	0	100
5	11.70	1	0	100
<b>ESI</b>				
0	3.50	1	45	55
1	8.00	1	0	100
2	9.50	1	0	100

<sup>a</sup> Ionização química à pressão atmosférica <sup>b</sup> Ionização por eletrospray <sup>c</sup> Água <sup>d</sup> Metanol

**Tabela 4.5** – Tempo de retenção individual para as micotoxinas utilizando APC<sup>a</sup> e ES<sup>b</sup>

Micotoxina		RT <sup>c</sup> (min)
<b>APCI</b>		
1	NEO	2.37
2	3-ADON	3.35
3	15-ADON	3.32
4	AFG <sub>2</sub>	3.73
5	AFG <sub>1</sub>	4.33
6	AFB <sub>2</sub>	5.20
7	DAS	5.95
8	AFB <sub>1</sub>	6.10
9	HT <sub>2</sub>	9.53
10	T <sub>2</sub>	10.10
11	ZON	11.00
Tempo total		11.70
<b>ESI</b>		
1	NEO	2.37
2	3-ADON	3.26
3	15-ADON	3.20
4	DAS	4.75
5	FB <sub>1</sub>	4.96
6	CTR	5.06
7	OTA	6.05
8	HT <sub>2</sub>	6.46
9	T <sub>2</sub>	7.39
10	FB <sub>2</sub>	7.65
11	ZON	8.60
Tempo total		9.50

<sup>a</sup> Ionização química à pressão atmosférica <sup>b</sup> Ionização por eletrospray <sup>c</sup> Tempo de retenção

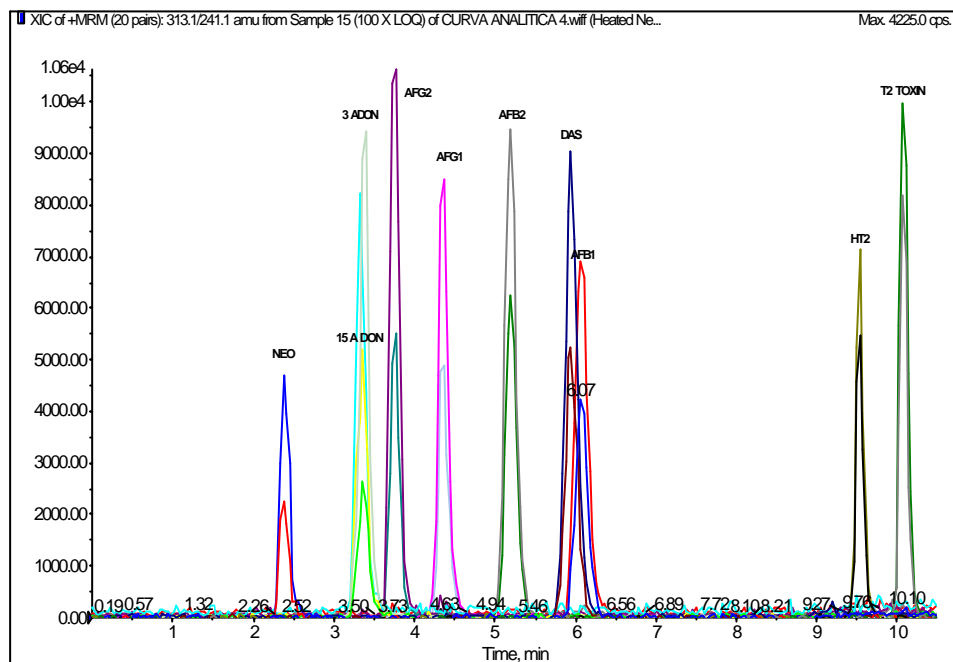


Figura 4.1 - Cromatograma do método de multi-toxinas utilizando APCI no modo positivo  $[M+H]^+$ .

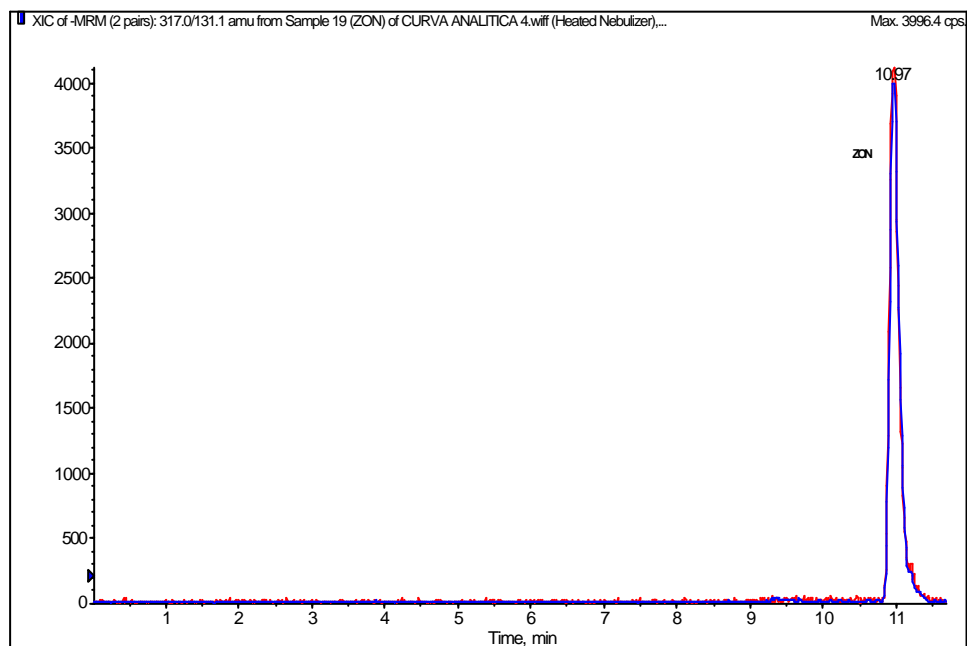


Figura 4.2 - Cromatograma do método de multi-toxinas utilizando APCI no modo negativo  $[M-H]^-$ .

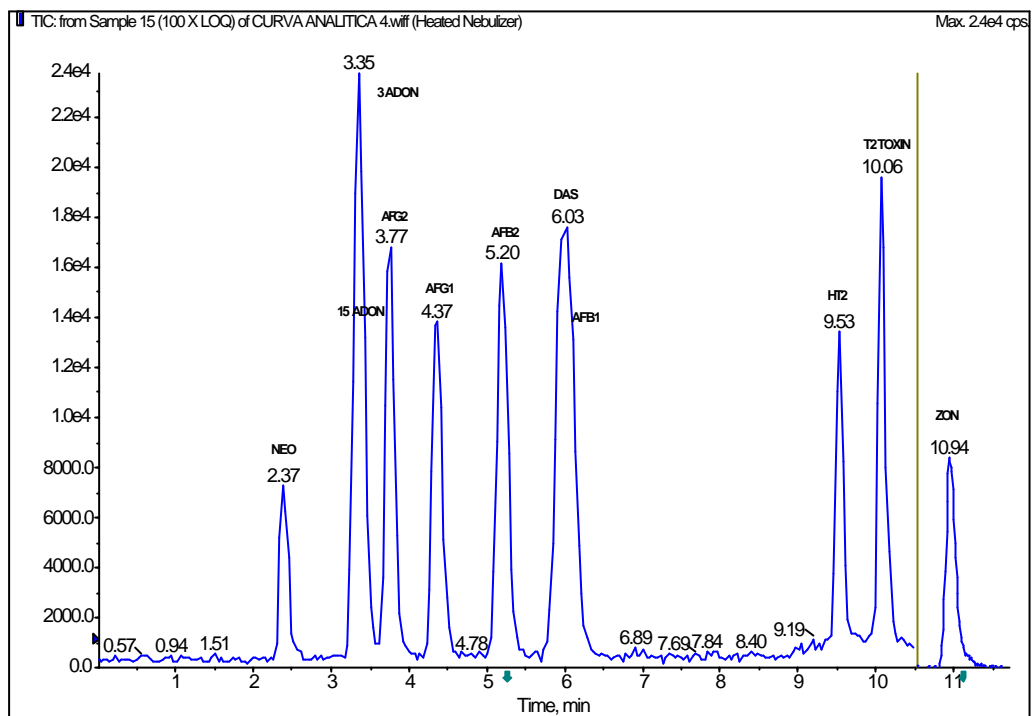


Figura 4.3 - Cromatograma do método de multi-toxinas utilizando APCI no modo positivo/negativo

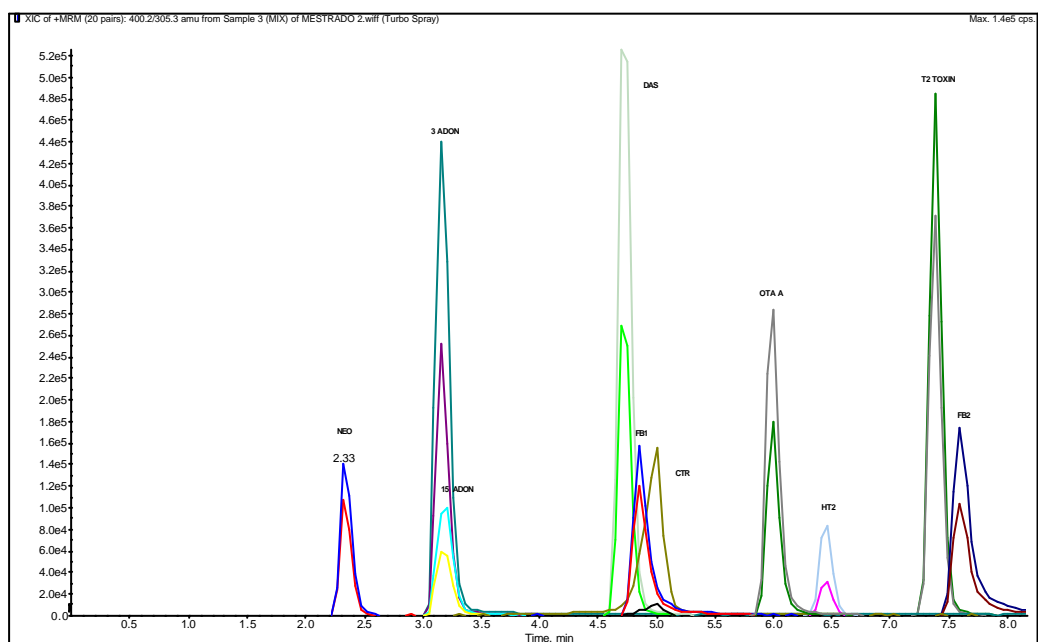


Figure 4.4 - Cromatograma do método de multi-toxinas utilizando ESI no modo positivo  $[M+H]^+$ .

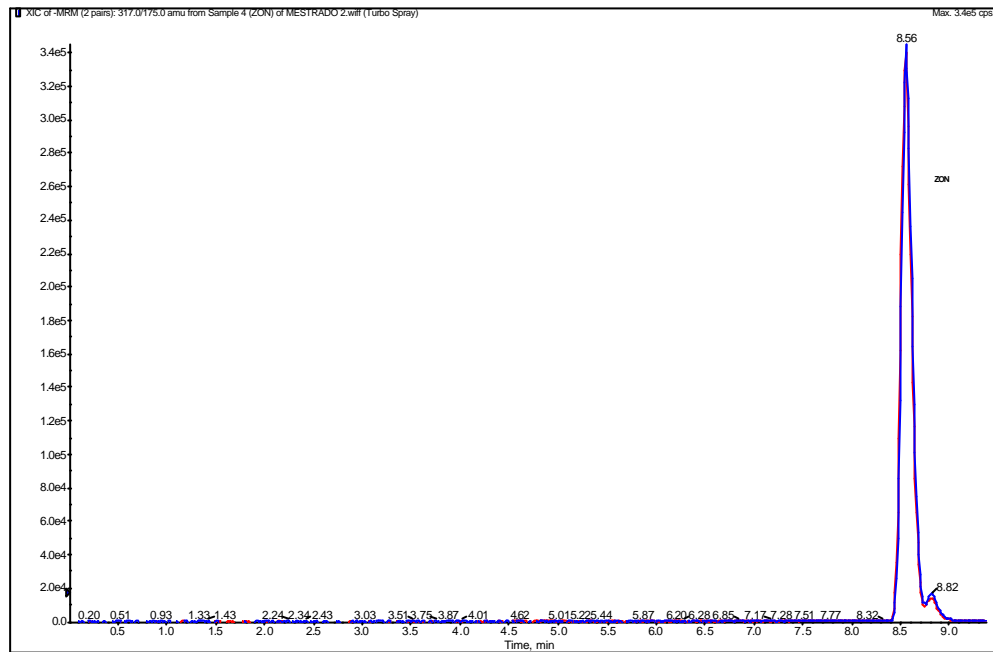


Figura 4.5 - Cromatograma do método de multi-toxinas utilizando ESI no modo negativo [M-H]<sup>-</sup>.

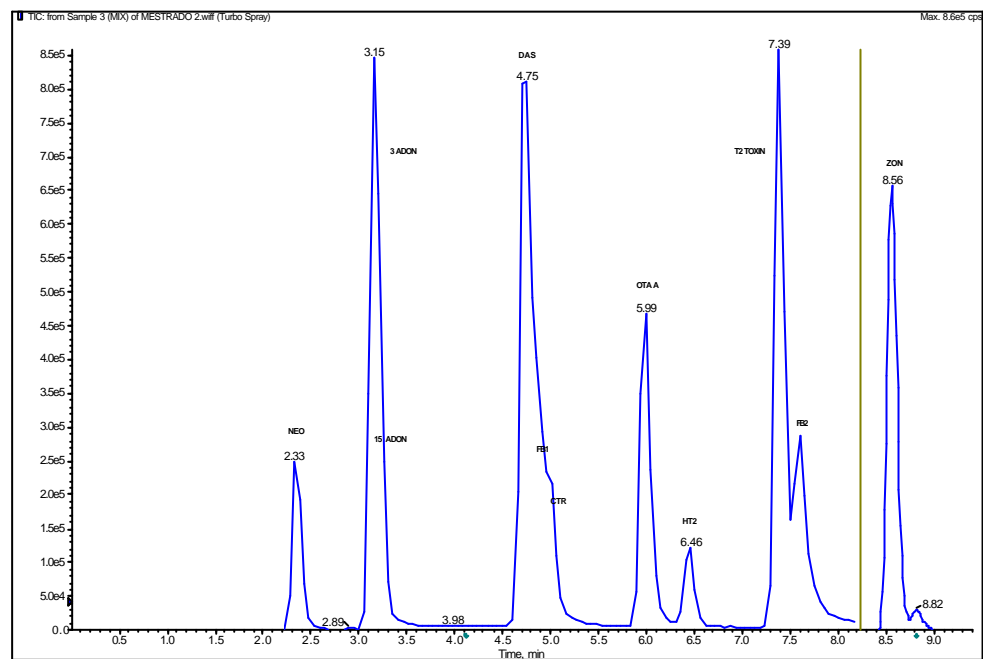


Figura 4.6 - Cromatograma do método de multi-toxinas utilizando ESI no modo positivo/negativo

**c. Determinação do LOD, LOQ, coeficiente de correlação ( $R^2$ ), e dwell time (DW) para os dois métodos:** Os valores de LOD, LOQ, DW e  $R^2$  são apresentados na tabela 4.6 para os métodos utilizando APCI e ESI. Apesar destes valores terem sido definidos para todas as transições, para quantificação foram utilizadas apenas aquelas que demonstraram maior sensibilidade e melhores valores  $R^2$ . As outras transições foram utilizadas apenas como confirmação positiva da presença da micotoxina. As transições selecionadas para quantificação foram: 215.30; 231.20; 261.20; 313.2; 243.0; 287.2; 307.30; 241.1; 215.10; 215.20 e 131.10 para NEO; 3-ADON; 15-ADON; AFG<sub>2</sub>; AFG<sub>1</sub>; AFB<sub>2</sub>; DAS; AFB<sub>1</sub>; HT<sub>2</sub>; T<sub>2</sub> e ZON respectivamente para o método utilizando APCI e 305.30; 231.20; 261.30; 307.30; 334.40; 233.30; 239.10; 215.20; 305.30; 336.50; 175.00 para NEO; 3-ADON; 15-ADON; DAS; FB<sub>1</sub>, CTR; OTA A; HT<sub>2</sub>; T<sub>2</sub>; FB<sub>2</sub> e ZON respectivamente para o método utilizando ESI. Os valores do  $R^2$  foram excelentes, variando em uma faixa de 0.9990 e 0.9999.

**Tabela 4.6** – Valores de LOD<sup>a</sup>, LOQ<sup>b</sup>, DW<sup>c</sup> e  $R^{2d}$  para todas as micotoxinas utilizando APCI e ESI como fontes de ionização

	Mycotoxin	LOD ( $\mu\text{g.kg}^{-1}$ )	LOQ ( $\mu\text{g.kg}^{-1}$ )	DW (milisec)	$R^2$
APCI					
1	NEO	0.125	0.25	120	0.9990
2	3-ADON	0.350	0.70	90	0.9991
3	15-ADON	1.25	2.50	90	0.9995
4	AFG <sub>2</sub>	0.01	0.02	90	0.9994
5	AFG <sub>1</sub>	0.0075	0.015	120	0.9995
6	AFB <sub>2</sub>	0.0075	0.015	150	0.9996
7	DAS	0.10	0.20	150	0.9999
8	AFB <sub>1</sub>	0.005	0.01	120	0.9995
9	HT <sub>2</sub>	0.50	1.00	120	0.9994
10	T <sub>2</sub>	0.25	0.50	90	0.9992
11	ZON	0.025	0.05	350	0.9999

ESI					
1	NEO	0.05	0.10	150	0.9995
2	3-ADON	0.07	0.14	150	0.9997
3	15-ADON	0.75	1.50	150	0.9995
4	DAS	0.02	0.04	150	0.9999
5	FB <sub>1</sub>	0.10	0.20	150	0.9993
6	CTR	1.25	2.50	150	0.9996
7	OTA	0.04	0.08	150	0.9999
8	HT <sub>2</sub>	0.04	0.08	150	0.9997
9	T <sub>2</sub>	0.05	0.10	150	0.9998
10	FB <sub>2</sub>	0.04	0.08	150	0.9996
11	ZON	0.025	0.05	350	0.9997

<sup>a</sup> Limite de detecção, <sup>b</sup> Limite de quantificação, <sup>c</sup> Dwell time, <sup>d</sup> Coeficiente de correlação  
<sup>e</sup> Ionização química à pressão atmosférica <sup>f</sup> Ionização por eletrospray

**d. Comparação entre os métodos desenvolvidos por APCI e ESI neste estudo e alguns apresentados na literatura:** recentemente, metodologias utilizando LC-MS/MS para diferentes tipos de matrizes têm sido publicados (BERTHILLER, et al, 2005; CAVALIERI et al., 2007). Estas metodologias diferem, principalmente, nos equipamentos utilizados, fontes de ionização, colunas para separação e etapas de preparo das amostras. Quando os sistemas LC-MS/MS começaram à ser aplicados para análise de micotoxinas, apenas grupos específicos de micotoxinas eram pesquisados.

**AFLs:** as metodologias para análise de AFLs possuem alguns parâmetros comuns, tais como: uso de ESI como fonte de ionização, colunas C<sub>18</sub> para separação e em alguns caso a aplicação ou não de etapas de limpeza do extrato (BLESA et al.,2003; VENTURA et al., 2004; SPANJER et al., 2006; CAVALIERI et al., 2007). Spanjer et al., (2006) não aplicou nenhuma etapa de limpeza e avaliou diversas micotoxinas em seu método. Por outro lado, Cavalieri et al., (2007) analisou o grupo das AFLs em óleo de oliva, todavia, o tempo de corrida

cromatográfica ficou relativamente alto para a separação das quatro AFLs, levando cerca de 16 minutos. No método desenvolvido no presente estudo, as AFLs foram capazes de ser separadas em 6.12 minutos.

**Tricotecenos:** os multi-métodos reportados na literatura para os tricotecenos diferem principalmente na fonte de ionização e fase móvel utilizadas. Com ESI, Houpalathi et al, (1997) e Dall'asta et al., (2004) desenvolveram métodos para detecção simulânea de DON, DAS e T2 entre outros tricotecenos com fase móvel isocrática composta por metanol:acetonitrila (90:10). Por outro lado, diversos autores separaram DON e outras micotoxinas utilizando gradiente de fase móvel composta por água e metanol (MERK et al., 2003; ROYER et al., 2004; YOUNG et al., 2006). Razzazi et al., (1999) utilizou uma mistura de solventes água, acetonitrila e metanol (82:9:9) para separação de DON e NIV em modo isocrático. No presente estudo, o grupo dos tricotecenos também foi capaz de ser separado utilizando a mesma composição de fase móvel (água e metanol), com a vantagem de serem ionizadas pelas duas fontes de ionização, além da possibilidade de detecção de toxinas de outros grupos no mesmo processo analítico. Importante enfatizar que o tempo total para separação dos tricotecenos no estudo desenvolvido foi de 10.1 e 7.39 minutos utilizando APCI e ESI respectivamente.

**OTA:** em se tratando de separação e ionização da OTA, a ionização por ESI é mais reportada na literatura (ZÖLLNER et al., 2006) do que APCI (XIAO et

al., 1996; OMINSKI et al., 1996). No presente estudo, a OTA também foi ionizada apenas por ESI.

**ZON:** é normalmente ionizada por ambas fontes de ionização (SCHNEWEIS et al., 2002; PALLARONIRI, 2003;) e APCI (ROSEMBERG et al., 1998; ZÖLNER et al., 1999; PALLARONI et al., 2002) apresentando excelentes resultados. No trabalho desenvolvido, a ZON foi também ionizada pelas duas fontes de ionização e detectada em nível de  $0.05 \mu\text{g}.\text{kg}^{-1}$  em ambos os casos.

**FBs e CTR:** praticamente não existem métodos utilizando APCI para FBs, apenas Royer et al., (2004) desenvolveram um método utilizando esta fonte. Métodos utilizando LC-MS/MS para detecção de CTR são quase que inexistentes. Ambas toxinas foram ionizadas apenas por ESI no presente estudo.

**Multi-toxinas:** considerando análises de multi-toxinas de diferentes grupos, métodos publicados na literatura são escassos. No trabalho desenvolvido, onde foram desenvolvidos dois multi-métodos diferentes para micotoxinas utilizando APCI e ESI, foi possível observar algumas semelhanças e diferenças em relação aqueles apresentados na literatura. Não foi possível ionizar as AFLs por ESI, diferentemente dos métodos desenvolvidos por Blesa et al., (2003), Ventura et al., (2004), Spanjer et al., (2006) e Cavalieri et al., (2007). Quando APCI foi utilizado, não foi possível ionizar FB<sub>1</sub> e FB<sub>2</sub>, o que parece ser muito comum para praticamente todos os métodos, o mesmo para OTA. Para os tricotecenos, o uso de ambas as fontes de ionização têm sido recomendado, todavia, neste estudo, a



ESI produziu melhor ionização, aumentando a sensibilidade do método em comparação com APCI. Os valores de LOD e LOQ obtidos para ambos os métodos foram excelentes, porém apresentando algumas variações entre os tricotecenos individualmente, como também é reportado na literatura, mostrando a alta sensibilidade e especificidade deste tipo de detector (tanto com ESI ou APCI), e sua importância no campo de pesquisa de micotoxinas.

#### **4.5 CONCLUSÃO**

Das quinze toxinas estudadas para detecção e quantificação por LC-MS/MS, utilizando APCI e ESI como fontes de ionização, foi possível desenvolver dois métodos capazes de quantificar onze micotoxinas cada. Eles apresentaram alta sensibilidade, especificidade e um curto tempo de análise. Foi observado que o método utilizando ESI apresentou algumas vantagens em relação à APCI, tais como: alta sensibilidade (baixos valores de LOD e LOQ para todas as micotoxinas), com exceção da ZON, que apresentou os mesmos valores de LOD e LOQ para ambos os métodos. Outra vantagem do uso de ESI foi o baixo tempo de análise e o gradiente de fase móvel mais simples e econômico. Com a utilização de APCI, o método desenvolvido foi capaz de detectar as AFLs, certamente o mais importante grupo de micotoxinas. Para os dois métodos os valores de  $R^2$  foram excelentes para todas as micotoxinas.

A escolha da fonte de ionização, bem como do método, à ser utilizado, dependerá das micotoxinas que serão pesquisadas e o objetivo da análise. Um estudo será realizado para adicionar outras micotoxinas nos métodos, incluindo DON (que não estava disponível na época da realização da pesquisa) bem como a validação dos mesmos em matrizes alimentares de importância para o consumo interno e exportação brasileira.

#### 4.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AOAC - Association of Official Analytical Chemists, 2005. **Official Methods of Analysis of AOAC International 18th**, Horwitz, W. and Latimer, G. W. Jr. eds. Gaithersburg, Maryland, USA.

BERG, T. How to establish international limits for mycotoxins in food and feed? **Food Control**, v. 14, p. 219-224, 2003.

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

BINDER, E.M. Managing the risk of mycotoxins in modern feed production. **Animal Feed Science and Technology**, v. 133, p. 149-166, 2007

BLESA, J.; SORIANO, J. M.; MOLTÓ, J. C.; MARÍN, R.; MAÑES, J. Rapid determination of ochratoxin A in cereals and cereal products by liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1046, p. 127-131, 2003.

CAVALIERE, C.; FOGLIA, P.; GUARINO, C.; MOTTO, M.; NAZZARI, M.; SAMPERI, R.; LAGANA, A.; BERARDO, N. Mycotoxins produced by *Fusarium* genus in maize: determination by screening and confirmatory methods based on liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 105, p. 700-710, 2007.

DALL'ASTA, C.; SFORZA, S.; GALAVERNA, G.; DOSSENA, S.; MARCHELLI, R. Simultaneous detection of type A and type B trichothecenes in cereals by liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometry using NaCl as

cationization agent. **Journal of Chromatography A**, v.1054, n. 2, p. 389-395, 2004.

GORYACHEVA, I. Y.; SAEGER, S.; DELMULLE, B.; LOBEAU, M.; EREMIN, S. A.; VETRÓ, I. B.; PETHEGEN, C. V. Simultaneous non-instrumental detection of aflatoxin B<sub>1</sub> and ochratoxin A using a clean-up tandem immunoassay column. **Analitca Chimica Acta**, v. 590, p. 118-124, 2007.

GUTLEB, A. C.; MORRISON, E.; MURK, A.J. Cytotoxicity assays for mycotoxins produced by *Fusarium* strains: a review. **Enviromental Toxicology and Pharmacology**, v. 11, p. 309-320, 2002.

HUOPALATHI, R. P.; EBEL, J.; HENION, J. D. Determination of zearanol, taleranol, zearalenone,  $\alpha$ - and  $\beta$ -zearalenol in urine and tissue by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Liquid Chromatography Related Technology**, v 50, n. 11-12, p. 681-687, 1997.

HUSSEIN, S. H.; BRASEL, J. M; Toxicity, metabolism and impact of mycotoxins on humans and animals. **Toxicology**, v. 167, p. 101-137, 2001.

KOKKONEN, M.; JESTOI, M.; RIZZO, A. Determination of selected mycotoxins in mould cheeses with liquid chromatography coupled to tandem with mass spectrometry. **Food Additives & Contaminants**, v. 22, n. 5, p. 449-456, 2005.

MATTSSON, J. L. Mixtures on real world: The importance of plant self-defense toxicants, mycotoxins and the human diet. **Toxicology and Applied Pharmacology**, 2007, doi:10.1016/j.taap.2006.12.024.

McKEAN, C.; TANG, L.; TANG, M.; BILLAN, M.; WANG, Z.; THEODORAKIS, C.W.; KENDALL, J.; WANG, -S. Comparative acute and combinative toxicity of aflatoxin B<sub>1</sub> and fumonisin B<sub>1</sub> in animals and human cells. **Food and Chemical Toxicology**, v. 44, p. 868-876, 2006.

MEKY, F. A.; TURNER, P. C.; ASHCROFT, A. E.; MILLER, J. D.; QIAO, Y. -L.; ROTH, M. J.; WILD, C. P. **Food Chemistry Toxicology**, v. 41, p. 265, 2003.

OMINSKI, K. H.; FROHLICH, A. A.; MARQUART R. R.; CROW G. H.; ABRANSOM D. **Food Additive Contaminants**, v. 13, p. 185, 1996.

PALLARONI, L.; HOLST, C. Determination of zearalenone from wheat and corn by pressurized liquid extraction and liquid chromatography–electrospray mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 993, n. 2, p. 39-45, 2003.

PALLARONI, L.; HOLST, C. Development of an extraction method for the determination of zearalenone in corn using less organic solvents. **Journal of Chromatography A**, v. 1055, p.247-249, 2004.

PALLARONI, L.; HOLST, C.; ESKILLSON, C. S.; BJÖRKLUND, E. Determination of zearalenone from wheat and corn by pressurized liquid extraction and high-performance liquid chromatography mass spectrometry. **Analytical Bioanal. Chemistry**, v. 374, p. 161-166, 2002

RAZZAZI-FAZELI, E.; BÖHM, J.; LUF, W. Determination of nivalenol and deoxynivalenol in wheat using liquid chromatography–mass spectrometry with negative ion atmospheric pressure chemical ionisation. **Journal of Chromatography A**, v. 854, n. 1, p. 45-55, 1999.

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

ROSEMBERG, E.; KRUSKA, R.; WISSIAK, R.; KMETOV, V.; JOSEPHS, R.; RAZZAZI, E.; GRASSERBAUER, M. High-performance liquid chromatography–atmospheric-pressure chemical ionization mass spectrometry as a new tool for the determination of the mycotoxin zearalenone in food and feed. **Journal of Chromatography A**, v. 819, n.2, p. 277-288, 1998.

ROYER, D.; HUMPF, H. -U.; GUY, P. A. Quantitative analysis of *Fusarium* mycotoxins in maize using accelerated solvent extraction before liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry. **Food Additives & Contaminants**, v. 21, n. 7, p. 678-692, 2004.

SCHNEWEIS, I.; MEYER, K.; ENGELHARDT, G.; BAUERO, J. Occurrence of zearalenone-4--D-glucopyranoside in wheat. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 50, n. 6, p. 1736-1738, 2002.

SMEDSGAARD, J.; FRISVALD, J. C. Using direct electrospray mass spectrometry in taxonomy and secondary metabolite profiling of crude fungal extracts. **Journal of Microbiological Methods**, v. 5, n. 1, p. 5-17, 1996.

SORENSEN, L. K.; ELBAEK, T. H. Determination of mycotoxins in bovine milk by liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 820, n. 2, p. 183-196, 2005.

SPANJER, M.C.; SCHOLTEN J. M. e RENSEN P. M., 2006. Multi-mycotoxin analysis by LC-MS/MS in a single sample extract. In: **Mycotoxins and Phycotoxins - Advances in determination, toxicology and exposure management**. Ed. Njapau; Trujillo; van Egmond. and Park, Wageningen Acad. Publishers, 117-124.

VENTURA, M.; GÓMEZ, A.; ANAYA, I.; DIAZ, J.; BROTO, F.; AGUT, M.; COMELLAS, L. Determination of aflatoxins B<sub>1</sub>, G<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> and G<sub>2</sub> in medicinal herbs by

liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1048, p. 25-29, 2004.

XIAO, H.; MARQUARDT, R. R.; ABRAMSON, D.; FROHLICH, A. A. Metabolites of ochratoxins in rat urine and in a culture of *Aspergillus ochraceus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n. 2, p. 648-655, 1996.

YOUNG, J. C.; ZHU, H.; ZHOU, T. **Food Chemistry Technology**, v. 44, p. 417, 2006.

ZÖLLNER, P.; JODBAUER, J.; LINDNER, W. Determination of zearalenone in grains by high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry after solid-phase extraction with RP-18 columns or immunoaffinity columns. **Journal of Chromatography A**, v. 858, n. 2, p. 167-174, 1999

ZÖLLNER, P.; MAYER-HELM, B. Trace mycotoxins analysis in complex biological and food matrices by liquid chromatography-atmosphere pressure ionization mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1136, p. 123-169, 2006

## 5 CONSIDERAÇÕES GERAIS

Considerando que as micotoxinas são produzidas em condições específicas e que podem estar presentes em diversos alimentos capazes de causar danos à saúde humana e animal, e que, são portanto responsáveis por grandes perdas econômicas, tem levado à um aumento no número de países com legislação, bem como de tipos de micotoxinas

Para a identificação e quantificação das micotoxinas em alimentos são utilizados métodos analíticos fundamentados principalmente em técnicas de CCD, CLAE com FLD e UVD e em menor escala imunoenaios e CG com ECD. Estes métodos podem ser encontrados em muitas publicações oficiais especializadas em metodologias analíticas e aplicados amplamente em laboratórios de todo o mundo. Todavia, estes métodos possuem uma série de limitações como longo tempo nas etapas de extração e limpeza de amostra, uso de grande volume de solventes, muitas vezes tóxicos, dificuldade em análise de multitoxinas em uma única análise e necessidade de etapas de confirmação.

A aplicação de LC-MS/MS para análise de micotoxinas tem demonstrado inúmeras vantagens, quando comparada aos métodos tradicionais, tais como a alta sensibilidade e seletividade, etapas de extração e limpeza mais simples, menor gasto de solventes, possibilidade de análise de multitoxinas de diversos grupos em uma única etapa de análise e produção de resultados autoconfirmatórios.

No presente trabalho foram realizados dois estudos da aplicação da espectrometria de massas para análise de micotoxinas. No primeiro, com o desenvolvimento de método para AFLs ( $B_1$ ,  $B_2$ ,  $G_1$  e  $G_2$ ) foram estabelecidos parâmetros capazes de avaliar os níveis das toxinas em amostras de castanha-do-Brasil em níveis abaixo da legislação europeia, a mais restrita dentre as legislações atuais e que tem levado à redução do comércio de exportação de nosso país para aquele bloco econômico. O método demonstrou alta sensibilidade, com limites de detecção e quantificação abaixo de 2 e 4  $\mu\text{g.kg}$ , sendo rápido e autoconfirmatório. No segundo trabalho, os dois métodos desenvolvidos abrangendo um número maior de micotoxinas serão capazes de satisfazer exigências mais amplas do comércio internacional bem como na aplicação à pesquisas de ponta relacionadas à efeitos sinérgicos entre micotoxinas. Os dois métodos apresentaram características específicas para o grupo selecionado de micotoxinas, sendo portanto recomendados para utilização, dependendo do tipo de alimentos onde essas toxinas poderão estar presentes bem como os gêneros de fungos. Os métodos demonstraram, assim como o método obtido para AFLS, alta sensibilidade, com limites de detecção e quantificação à nível de partes por trilhão, sendo rápido e autoconfirmatório. Como futuros trabalhos serão incluídas outras toxinas, bem como aplicação em outros tipos de matrizes alimentares de importância no comércio internacional .

Os dois estudos confirmaram o uso da espectrometria de massas como uma das melhores ferramentas, senão a melhor, para a análise de micotoxinas em alimentos.

## **ANEXO A – Legislação Europeia para Aflatoxinas**











**ANEXO B – Apresentação oral: “LC-MS/MS Methodology for Mycotoxins  
Using Electrospray and Atmospheric Pressure Chemical Ionization”**









**ANEXO C - Apresentação oral: “Metodologias Analíticas para Micotoxinas Conectadas à Informática (Speed Results)”**



**ANEXO D - Apresentação oral: “ Desenvolvimento de um Multimétodo por LC-MS/MS para Quantificação de Patulina, Fumonisina B<sub>1</sub>, Citrinina, Ocratoxina A e Zearalenona”**



**ANEXO E – Pôster: “ Survey of Aflatoxins in Processed Brazil Nuts Using  
Liquid Tandem Mass Spectrometry”**



**ANEXO F – Pôster: “Mycotoxin Evaluation in Feed for Pets Using Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry”**





**ANEXO G – Pôster: “ Características externas da Castanha-do-Brasil e sua  
Relação com Contaminação por Aflatoxinas”**



**ANEXO H – Pôster: “Avaliação da Eficiência na Redução da Contaminação por Aflatoxinas no Processo de Seleção de Grãos”**

