

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos



Dissertação

**Quantificação de micotoxinas e resíduos de fungicidas em grãos de trigo por
LC-QToF-MS**

Suzane Rickes da Luz

Pelotas, 2016

Suzane Rickes da Luz

**Quantificação de micotoxinas e resíduos de fungicidas em grãos de trigo por
LC-QToF-MS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Comitê de orientação: Prof-Dr. Fábio Clasen Chaves
Prof-Dra. Giniani Carla Dors
Prof-Dr. Leandro José Dallagnol

Pelotas, 2016

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

L979q Luz, Suzane Rickes da

Quantificação de micotoxinas e resíduos de fungicidas em grãos de trigo por LC-QToF-MS / Suzane Rickes da Luz ; Fábio Clasen Chaves, Giniani Carla Dors, orientadores ; Leandro José Dallagnol, coorientador. — Pelotas, 2016.

95 f.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, 2016.

1. Validação de método. 2. Triticum aestivum. 3. Micotoxinas. 4. Resíduos de fungicidas. I. Chaves, Fábio Clasen, orient. II. Dors, Giniani Carla, orient. III. Dallagnol, Leandro José, coorient. IV. Título.

CDD : 633.15

Suzane Rickes da Luz

Quantificação de micotoxinas e resíduos de fungicidas em grãos de trigo por LC-QToF-MS

Dissertação aprovada, como requisito para obtenção do grau de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 09/03/2016.

Banca examinadora:

Prof. Dr. Fábio Clasen Chaves
Doutor em *Plant Biology* – Rutgers University

Prof. Dr. Edinalvo Rabaioli Camargo
Doutor em Agronomia – Texas A&M University

Prof. Dr. Leandro José Dallagnol
Doutor Agronomia – Esalq-USP

Prof. Dr. Nathan Levien Vanier
Doutor em Ciência e Tecnologia de Alimentos – UFPel

Prof. Dr. Rui Carlos Zambiasi
Doutor em Food and Nutrition Science – University of Manitoba

Nossa vida é um caminho cheio de incertezas, as quais ninguém é capaz de prever, por isso mais importante do que as coisas que tem na vida é quem temos na vida. Dedico este trabalho aos meus pais, minha avó, meu irmão, meus afilhados e aos meus padrinhos.

Agradecimentos

Aos professores e orientadores Fábio Clasen Chaves, Giniani Carla Dors, Leandro Dallagnol pela dedicação, apoio, ensinamentos.

Ao pessoal do laboratório de Cromatografia que sempre foram muito mais do que simples colegas, tenho a agradecer pela amizade, pela troca de conhecimento e experiências, pela força, pelos momentos de descontração. As meninas do LaCEM pelos conhecimentos transmitidos e pela ajudinha de sempre no HPLC/MS.

E principalmente aos meus pais Ieda e Rudinei Luz que não mediram esforços para que eu conseguisse alcançar todos os meus objetivos, por todo amor, apoio e por sempre acreditarem em mim. O amor e a admiração que tenho por eles são infinitos, pelo exemplo de honestidade, caráter, dedicação, amor e apoio que recebi em todos os momentos da minha vida. A minha avó Antônia Ilza que foi minha segunda mãe, que sempre esteve presente em toda minha trajetória.

Ao meu irmão Róger, minha cunhada Michele e meu afilhado Eduardo pelo carinho e apoio de sempre. Aos meus padrinhos Vera e Carlos Bahr, que me acolheram em sua casa como uma filha, pelo apoio, carinho, amizade e por estarem sempre torcendo pelas minhas conquistas.

Aos colegas e amigos do DCTA, principalmente os quais entraram junto comigo no mestrado, pelos momentos de estudos, pelos trabalhos em grupo, pela amizade, apoio e momentos de distração.

Não poderia esquecer dos amigos da “colônia” os quais sempre me proporcionaram momentos de alegria e descontração, pela amizade e parceria de sempre.

Gostaria de agradecer ainda ao Programa de Ciência e Tecnologia de Alimentos pela oportunidade e ao CNPq pela concessão da bolsa de estudos. À Secretaria de Desenvolvimento Econômico, Ciência e Tecnologia do Governo do Estado do Rio Grande do Sul, através do programa de apoio aos Polos Tecnológicos e à CAPES pelos apoios financeiro à pesquisa.

*“Por vezes sentimos que aquilo
que fazemos não é senão uma gota
de água no mar. Mas o mar seria
menor se lhe faltasse uma gota”*

Madre Teresa de Calcutá

Resumo

LUZ, Suzane Rickes. **Quantificação de micotoxinas e resíduos de fungicidas em grãos de trigo por LC-QToF-MS. 2016. 95f.** Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2015.

O trigo (*Triticum aestivum*) é mundialmente um dos cereais mais consumidos e está sujeito a contaminação por micotoxinas e fungicidas. As micotoxinas são metabólitos oriundos do metabolismo especializado de fungos filamentosos, sendo os principais do gênero *Fusarium*, *Penicillium* e *Aspergillus*, responsáveis pela produção de fumonisinas, zearalenona (ZEA), deoxinivalenol (DON), ocratoxinas e aflatoxinas. O objetivo deste trabalho foi validar metodologia analítica por LC-ESI-QToF-MS para determinação simultânea de micotoxinas e resíduos de fungicidas em grãos de trigo. Os tratamentos na planta de trigo foram realizados com os fungicidas Fox (trifloxistrobina e protioconazol), Opera (epoxiconazol e piraclostrobina) e Unizeb Gold (mancozebe), separadamente e em mistura. Todos os parâmetros (linearidade, limite de detecção e quantificação, exatidão, precisão, especificidade, seletividade e efeito de matriz) para a validação do método analítico de quantificação ficaram em conformidade com as regras da AOAC, ANVISA e a SANCO. Para a extração simultânea de micotoxinas (aflatoxina B₁, B₂, G₁, G₂, deoxinivalenol, fumonisina B₁, ocratoxina A e zearalenona) e fungicidas (trifloxistrobina, protioconazol, piraclostrobina, epoxiconazol e mancozebe) foi utilizado o método de Quechers. O epoxiconazol e o DON foram as moléculas que apresentaram maior concentração nas amostras analisadas. O mancozebe não foi possível ser detectado pelo LC-ESI-QToF devido suas características poliméricas e dificuldade de solubilização. Avaliando uma possível relação da aplicação de diferentes fungicidas nas plantas de trigo com a produção de micotoxinas pode-se observar que os fungicidas trifloxistrobina, protioconazol, epoxiconazol, piraclostrobina e mancozebe, aplicados separadamente e como mistura, podem ter estimulado a produção de AFB₂; os princípios ativos trifloxistrobina, protioconazol e mancozebe podem ter apresentado efeito estressor ao fungo, produzindo ZEA; enquanto o uso dos fungicidas epoxiconazol, piraclostrobina e mancozebe podem

ter promovido à produção de OTA. As moléculas de AFB₁ e DON foram encontradas em menor concentração em todos os tratamentos, quando comparados com amostras controle, exceto para o tratamento com o mancozebe no qual a concentração de DON aumento em 11%.

Palavras chaves: Validação de método; *Triticum aestivum*; micotoxinas; resíduos de fungicidas.

Abstract

LUZ, Suzane Rickes. **Quantification of mycotoxins and fungicide residues in wheat grains by LC-MS-QToF. 2016. 95f.** Dissertation (Masters in Food Science and Technology) - Graduate Program in Food Science and Technology. Agroindustrial Science and Technology Department, Federal University of Pelotas, Pelotas, 2015.

Wheat (*Triticum aestivum*) is globally one of the most consumed cereal and is subjected to contamination by mycotoxins and fungicides. Mycotoxins are metabolites derived from specialized metabolism of filamentous fungi, the main belonging to the genus *Fusarium*, *Penicillium* and *Aspergillus*, which are responsible for the production of fumonisin, zearalenone (ZEA), deoxynivalenol (DON), ochratoxin and aflatoxin. The aim of this study was to evaluate an analytical LC-ESI-QTOF-MS method for simultaneous determination of mycotoxins and fungicide residues in wheat grains. Wheat plants were treated with Fox (trifloxystrobin and prothioconazole), Opera (epoxiconazole and pyraclostrobin) and Unizeb Gold (mancozeb) fungicides, separately and in combination. All parameters (linearity, detection and quantification limits, accuracy, precision, specificity, selectivity and matrix effect) for the validation of the analytical method and quantification were in accordance with the rules of the AOAC, ANVISA and SANCO. For simultaneous extraction of mycotoxins (aflatoxins B1, B2, G1, G2, deoxynivalenol, fumonisin B1, ochratoxin A and zearalenone) and fungicides (trifloxystrobin, prothioconazole, pyraclostrobin, epoxiconazole and mancozeb) was used QuEChERS method. In general, the epoxiconazole and DON were found in higher concentrations. The mancozeb could not be detected by LC-ESI-QTOF-MS method, due to polymer characteristics that makes its solubilization hard. Evaluating a possible relation between the applied fungicides with mycotoxin content it can be observed that the fungicides trifloxystrobin, prothioconazole, epoxiconazole, pyraclostrobin and mancozeb, applied both separately and as a mixture, may have stimulated the production of AFB₂; the active ingredients trifloxystrobin, prothioconazole and mancozeb may have presented stressor effect to the fungus, stimulating the production of ZEA; while the use of epoxiconazole, pyraclostrobin and mancozeb

fungicides may be associated with OTA production. The AFB1 and DON molecules were found in lower concentrations in all treatments, as compared to the control sample, except for the treatment with mancozeb, in which the concentration of DON increased by 11%.

Keywords: Method validation; *Triticum aestivum*; mycotoxins; fungicide residues.

Lista de Figuras

Figura 1 - Estrutura do grão de trigo.	21
Figura 2 – Giberela do trigo; A: sinais do patógeno no terço inferior da espiga; B: espiga com severidade da doença de 80%, C: grãos danificados pela presença da giberela na espiga.	23
Figura 3 - Estrutura química das aflatoxinas.	26
Figura 4 - Estrutura química do deoxinivalenol.	27
Figura 5 - Estrutura química das fumonisinas.	28
Figura 6 - Estrutura química da esfingosina.	29
Figura 7 - Estrutura química da esfinganina.	29
Figura 8 - Estrutura química das ocratoxinas. A: ocratoxina A; B: ocratoxina B; C: ocratoxina C.	30
Figura 9 - Estrutura química da zearalenona.	31
Figura 10 - Estrutura química do protioconazol.	32
Figura 11 - Estrutura química da trifloxistrobina.	33
Figura 12 - Estrutura química do epoxiconazol.	33
Figura 13 - Estrutura química da piraclostrobina.	34
Figura 14 - Estrutura química do mancozebe.	34
Figura 15 - Estrutura química do PSA.	38
Figura 16 - Processo de ionização por eletronebulização.	39
Figura 17 - Esquema representativo de um ESI-QToF-MS em corte.	40
Figura 18 - Redução por quarteamento da amostra.	50
Figura 19 - Moinho de martelos, Perten (A) e moinho analítico (IKA, A11 basic).	51
Figura 20 - Partículas retidas na peneira 32 mesh.	51
Figura 21 - Cromatograma de íons de aflatoxina (A ₁ , A ₂ , B ₁ e B ₂) no modo positivo (linha amarela) e no modo negativo (linha preta).	55
Figura 22 - Cromatograma de íons deoxinivalenol no modo positivo (linha preta) e no modo negativo (linha azul).	55
Figura 23 - Cromatograma de íons de ocratoxina A no modo positivo (linha azul) e no modo negativo (linha laranja).	55
Figura 24 - Cromatograma de íons de fumonisina B ₁ no modo positivo (linha preta) e no modo negativo (linha azul).	56

Figura 25 - Cromatograma de íons de trifloxistrobina no modo positivo (linha laranja) e no modo negativo (linha preta).....	56
Figura 26 - Cromatograma de íons de epoxiconazol no modo positivo (linha preta) e no modo negativo (linha verde).	56
Figura 27 - Cromatograma de íons de piraclostrobina no modo positivo (linha azul) e no modo negativo (linha verde).	56
Figura 28 - Cromatograma de íons de zearalenona no modo positivo (linha azul) e no modo negativo (linha laranja).	57
Figura 29 - Cromatograma de íons de protioconazol modo positivo (linha marrom) e no modo negativo (linha azul).	57
Figura 30 - Separação das aflatoxinas B ₁ , B ₂ , G ₁ e G ₂	57
Figura 31 - Cromatograma das micotoxinas e fungicidas.	63
Figura 32 - Espectro de massas da fumonisina B ₁	64
Figura 33 - Espectro de massas da aflatoxina B ₁	64
Figura 34 - Espectro de massas da aflatoxina B ₂	64
Figura 35 - Espectro de massas da aflatoxina G ₁	64
Figura 36 - Espectro de massas da aflatoxina G ₂	65
Figura 37 - Espectro de massas da zearalenona.	65
Figura 38 - Espectro de massas da ocratoxina A.....	65
Figura 39 - Espectro de massas da deoxinivalenol.	65
Figura 40 - Espectro de massas da protioconazol.	65
Figura 41 - Espectro de massas da trifloxistrobina.....	65
Figura 42 - Espectro de massas da epoxiconazol.....	66
Figura 43 - Espectro de massas da piraclostrobina.	66

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Principais fungos produtores de micotoxinas e seus metabólitos	24
Tabela 2 - Limites máximos toleráveis estabelecidos para o Brasil (ANVISA) e para a União Européia (European Union Commission Regulation) para algumas micotoxinas e moléculas de fungicida	36
Tabela 3 - Gradiente da fase móvel	46
Tabela 4 - Tratamentos aplicados nas plantas de trigo, princípios ativos dos fungicidas utilizados e as doses aplicadas em cada tratamento	53
Tabela 5 - Fórmula estrutural, massa molecular protonada e tempo de retenção (TR) dos padrões.....	58
Tabela 6 - Coeficiente de determinação das micotoxinas e fungicidas em solvente e em extrato de matriz.....	59
Tabela 7 - Limite de detecção (LD) e quantificação (LQ) das micotoxinas e fungicidas em solvente (acetonitrila) e em extrato de matriz de trigo	61
Tabela 8 - Análise do percentual de recuperação das micotoxinas e fungicidas	62
Tabela 9 - Ensaio de repetitividade e precisão intermediária	63
Tabela 10 - Efeito de matriz (%) sobre os analitos.....	67
Tabela 11 - Diluição da amostra para verificação do efeito de matriz sobre os sinais dos analitos	68
Tabela 12 - Teor de aflatoxina (B ₁ , B ₂ , G ₁ e G ₂), deoxinivalenol, fumonisina B ₁ , ocratocina A e zearalenona (µg kg ⁻¹) em amostras de trigo	70
Tabela 13 - Teor de trifloxistrobina, proclonazol, epoxiconazol, piraclostrobina (µg kg ⁻¹) em amostras de trigo.....	76

Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	18
2.1 OBJETIVO GERAL.....	20
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
3.1 TRIGO.....	21
3.2 MICOTOXINAS.....	23
3.2.1 Aflatoxinas.....	25
3.2.2 Deoxinivalenol.....	26
3.2.3 Fumonisina.....	27
3.2.4 Ocratoxinas	29
3.2.5 Zearalenona	31
3.3 FUNGICIDAS	31
3.3.1 Protioconazol.....	32
3.3.2 Trifloxistrobina	32
3.3.3 Epoxiconazol.....	33
3.3.4 Piraclostrobina.....	33
3.3.5 Mancozebe.....	34
3.4 LEGISLAÇÃO.....	35
3.5 MÉTODO DE DETERMINAÇÃO DE MICOTOXINAS E AGROTÓXICOS	36
3.5.1 Extração	36
3.5.2 Identificação e quantificação	38
3.6 VALIDAÇÃO DOS PARÂMETROS ANALÍTICOS	41
3.6.1 Linearidade e curva analítica.....	41
3.6.2 Limite de detecção e quantificação	42
3.6.2.1 Parâmetros da curva analítica.....	42
3.6.2.2 Método da relação sinal-ruído.....	42
3.6.3 Exatidão	42
3.6.4 Precisão	43
3.6.5 Especificidade e seletividade	43
3.6.6 Efeito de matriz	44

4	MATERIAIS E MÉTODOS	44
4.1	Reagentes, solventes e materiais utilizados	44
4.2	Preparo das soluções analíticas.....	45
4.3	LC-ESI-QToF-MS	46
4.4	VALIDAÇÃO DOS PARÂMETROS ANALÍTICOS	47
4.4.1	Faixa de linearidade	47
4.4.2	Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ).....	48
4.4.3	Exatidão	48
4.4.4	Precisão	48
4.4.5	Especificidade e Seletividade.....	49
4.4.6	Efeito de matriz	49
4.5	MÉTODO DE EXTRAÇÃO	50
4.6	PREPARO DA AMOSTRA	50
4.7	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL PARA OBTENÇÃO DA MATRIZ	52
4.8	LIMPEZA DE VIDRARIAS E TRATAMENTO DE RESÍDUOS.....	54
4.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	54
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	54
5.1	LC-ESI-QToF-MS	54
5.2	VALIDAÇÃO DOS PARÂMETROS ANALÍTICOS	59
5.2.1	Linearidade e curva analítica.....	59
5.2.2	Limite de detecção e quantificação	60
5.2.3	Exatidão	61
5.2.4	Precisão	62
5.2.5	Especificidade e seletividade	63
5.2.6	Efeito de matriz	66
5.3	AValiação dos grãos de trigo	68
6.	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	78
	REFERÊNCIAS.....	79
	ANEXOS	91

Lista de Abreviaturas e Siglas

AFB₁ – Aflatoxina B₁

AFB₂ – Aflatoxina B₂

AFG₁ – Aflatoxina G₁

AFG₂ – Aflatoxina G₂

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

AOAC – Associação de Químicos Analíticos Oficiais, do inglês Association of Official Analytical Chemists

Aw – atividade de água

CV – Coeficiente de variação

CAS – Chemical Abstracts Service

DON – Deoxinivalenol

EBDC – etileno-bis-ditiocarbamato

EM – Efeito de matriz

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

EPI – Equipamentos de Proteção Individual

ESI – Ionização por electrospray, do inglês electrospray ionization

eV – elétron volts

EPI – Equipamentos de Proteção Individual

FAO – Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura

FB₁ – Fumonisina B₁

FC – Fator de correção

FD – Fator de Diluição

g – grama

IARC – Agência Internacional para Pesquisa sobre o Câncer, do inglês International Agency for Research on Cancer

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IDA – Ingestão Diária Aceitável

IUPAC – União Internacional de Química Pura e Aplicada, do inglês International Union of Pure and Applied Chemistry

INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia

kg – quilograma

LC – Cromatografia Líquida, do inglês liquid chromatography

LMT – Limites máximos toleráveis

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

MgSO₄ – Sulfato de magnésio

mL – mililitro

mg – miligrama

[M + H] – Molécula protonada

[M + K] – Aduto de potássio

[M + Na] – Aduto de sódio

[M+CH₃COO]⁻ – Aduto de ácido acético

MS – espectrômetro de massas, do inglês, mass spectrometry

m/z – razão massa carga

ng – nanograma

OTA – Ocratoxina

p.c. – peso corpóreo

PSA – amina primária secundária, do inglês, primary secondary amine

ppb – parte por bilhão

ppm – parte por milhão

Q- quadruplo

RASFF – Segundo o Sistema de Alerta Rápido para Alimentos e Rações, do inglês
Rapid Alert System for Food and Feed

r² – Coeficiente de determinação

ToF – Detector por tempo de voo, do inglês Time of Flight

TR – Tempo de retenção

UV – ultra violeta

Vis – luz visível

ZEA – Zearalenona

1. INTRODUÇÃO

Segundo o IBGE (2015) a população brasileira está próxima de 203 milhões de habitantes e a estimativa é que aumente continuamente até 2042, chegando a 228,4 milhões de habitantes, sendo ampliado o desafio de produzir alimentos para uma demanda crescente.

A agricultura, principal responsável pela produção de alimentos, contribui de modo significativo para a economia brasileira, representando atualmente cerca de 5% do PIB, ou seja, 28% do total das exportações, gerando em torno de 55 bilhões de dólares (FAO, 2015). A Secretaria Nacional de Segurança Alimentar e Nutricional implementou a lei Orgânica de Segurança Alimentar e Nutricional (nº 11.346, de 15 de setembro de 2006) que visa o direito básico da população à segurança alimentar, ou seja, os alimentos devem atender a padrões de qualidade, estar livres de componentes prejudiciais à saúde, como pesticidas e micotoxinas, além da produção e distribuição em quantidade suficiente.

Para assegurar a inocuidade dos alimentos é necessária a implementação de boas práticas agrícolas e de fabricação, cuidados com transporte, armazenamento e distribuição dos produtos, eliminando ou reduzindo riscos e perigos. Falhas nesse processo podem levar a condições de contaminação do alimento, principalmente o desenvolvimento de micro-organismos, como fungos que podem produzir micotoxinas (ALEXOPOULOS e MIMS, 1996), acarretando em perdas econômicas através da rejeição e descarte de alimentos, além dos gastos com tratamentos relacionados à saúde animal e humana (HUSSEIN et al., 2001).

O Sistema de Alerta Rápido para Alimentos e Rações (RASFF - Rapid Alert System for Food and Feed) que monitora a entrada de produtos na União Europeia constatou, em 2014, 383 lotes de produtos com presença de micotoxinas, dos quais 280 foram rejeitados na fronteira. Com relação a resíduos de agrotóxicos foram 435 casos de lotes de produtos contaminados, dos quais 279 foram rejeitados na fronteira por apresentarem limites superiores ao estabelecidos pela legislação (RASFF, 2015).

O trigo (*Triticum aestivum*) é uma cultura de ciclo anual, cultivada no inverno e primavera, sendo um dos cereais mais consumidos, com papel importante na alimentação por ser boa fonte de energia, nutrientes e fibras (SCHEUER et al., 2011). No Brasil, a giberela tornou-se uma das principais doenças fúngicas desta cultura, pois além de causar danos diretos na planta, os grãos podem apresentar

contaminação por micotoxinas que são tóxicas tanto para humanos quanto para animais (CREPPY, 2002). Na tentativa de controlar as doenças fúngicas na planta são utilizados fungicidas, no entanto, estes podem permanecer nos grãos e nos derivados, podendo colocar em risco a saúde dos consumidores (TIBOLA et al., 2013).

Para tanto, este trabalho teve por objetivo validar metodologia analítica por LC-ESI-QToF-MS para determinação simultânea de micotoxinas e resíduos de fungicidas em grãos de trigo. O processo de validação de um método analítico se faz necessário para a obtenção de dados confiáveis e reprodutíveis. Dados não confiáveis podem gerar informações falso-positivas, conduzindo a interpretações errôneas, tomada de decisões inadequadas e prejuízos financeiros (RIBANI et al., 2004). A validação pode ser aplicada para um equipamento, um operador ou um laboratório, sendo necessário avaliar alguns parâmetros como a linearidade, os limites de detecção e quantificação, a exatidão, a precisão, a especificidade e seletividade e o efeito de matriz.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Validar metodologia analítica por LC-ESI-QToF-MS para determinação simultânea de micotoxinas e resíduos de fungicidas em grãos de trigo.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Extrair as micotoxinas (aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂, deoxinivalenol, fumonisina B₁, ocratoxina A e zearalenona) e os fungicidas (protioconazol, trifloxistrobina, epoxiconazol, piraclostrobina e mancozebe) das amostras de trigo, utilizando o método Quechers.

Quantificar as micotoxinas (aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂, deoxinivalenol, fumonisina B₁, ocratoxina A e zearalenona) e os fungicidas (protioconazol, trifloxistrobina, epoxiconazol, piraclostrobina e mancozebe) das amostras de trigo, utilizando LC-ESI-QToF-MS.

Avaliar a relação da aplicação de diferentes fungicidas nas plantas de trigo com a produção de micotoxinas.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Trigo

O trigo é uma gramínea da família Poaceae e do gênero *Triticum*. O ciclo de produção é anual, cultivado entre as estações de inverno e primavera (SOUZA e LORENZI, 2008). Os grãos, em geral, apresentam formato ovalado com extremidades arredondadas e um sulco ao longo do grão. Apresentam cor e tamanhos variáveis, dependendo da variedade e posição dos grãos na espiga. Estruturalmente, o grão de trigo é um cariópse, ou seja, possui semente única (HOSENEY, 1991).

Os grãos de trigo são constituídos por basicamente três partes (Figura 1): o gérmen, que corresponde a parte que contém o embrião e os nutrientes (proteínas, açúcares, lipídios, vitaminas e minerais); o endosperma que é composto por grânulos de amido envoltos por uma matriz proteica; e o pericarpo que reveste a semente atuando como uma capa protetora, formada por uma série de camadas posicionadas em direção ao centro da semente (epiderme, hipoderme, células intermediárias, células cruzadas e células tubulares) (HOSENEY, 1991).

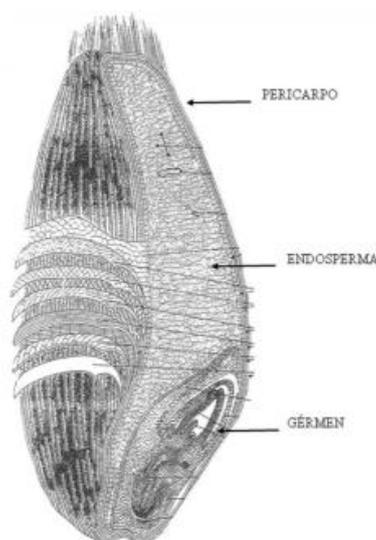


Figura 1 - Estrutura do grão de trigo.
Fonte: adaptado de Hosenev (1991).

O trigo pode ser classificado em duro, mole e *durum*, os quais se diferenciam pelas características físicas e químicas, ou seja, pela dureza das sementes e/ou pela composição de proteínas e absorção de água (GUTKOSKI et al., 2003).

Dependendo da classificação do trigo utilizado para a produção de farinha, esta é destinada para a produção de determinados produtos. A farinha elaborada com trigo duro é destinada para a panificação e para produtos fermentados por apresentar alto teor de proteínas e absorção de água e também podem ser destinadas para a produção de massas. As farinhas provenientes de trigo mole são utilizadas para a produção de biscoitos, “crackers” e bolos. A farinha de trigo *durum* é basicamente utilizada para a produção de massas (YONEMOTO et al., 2007).

O trigo contribui significativamente para a economia global, ocupando o segundo lugar no *ranking* dos cereais mais produzidos no mundo. No Brasil a produção de trigo se destaca nas regiões Sul, onde concentra cerca de 90% da produção nacional (TIBOLA et al., 2013).

Em 2015 o trigo apresentou uma queda de produção devido ao excesso de chuva na região Sul, dificultando o manejo da cultura e aumentando a incidência de doenças fúngicas (IBGE, 2015). A principal doença fúngica do trigo é a giberela causada por *Fusarium* spp. que tem por condições ideais de desenvolvimento o molhamento da espiga por no mínimo 48h e faixa de temperatura entre 20 a 25°C. A fase mais propícia para a infecção do patógeno é a floração, porém pode ocorrer também durante o espigamento e o enchimento dos grãos (FERNANDES e PICININI, 1999; LIMA, 2004; TIBOLA et al., 2013). As espigas atacadas apresentam coloração esbranquiçada e, frequentemente, é observada a presença de coloração rosada oriunda da massa de esporos dos fungos (Figura 2A e 2B). A giberela causa o aborto da flor ou a produção de grãos chochos, enrugados, de coloração clara a rosadas, com baixo peso específico (Figura 2C) (FERNANDES e PICININI, 1999; LIMA, 2004).

A contaminação do grão com espécies de *Fusarium* pode resultar em diminuição do rendimento e, principalmente, na contaminação por micotoxinas, propiciando a rejeição ou desvalorização do trigo no mercado (TIBOLA et al., 2013). As principais micotoxinas produzidas pelas espécies de *Fusarium* causadoras da giberela do trigo são a zearalenona (KRSKA et al., 2003; ZAIN, 2011), as fumonisinas (BUTKERAITIS, 2003) e o deoxinivalenol (EMAN, 2003).

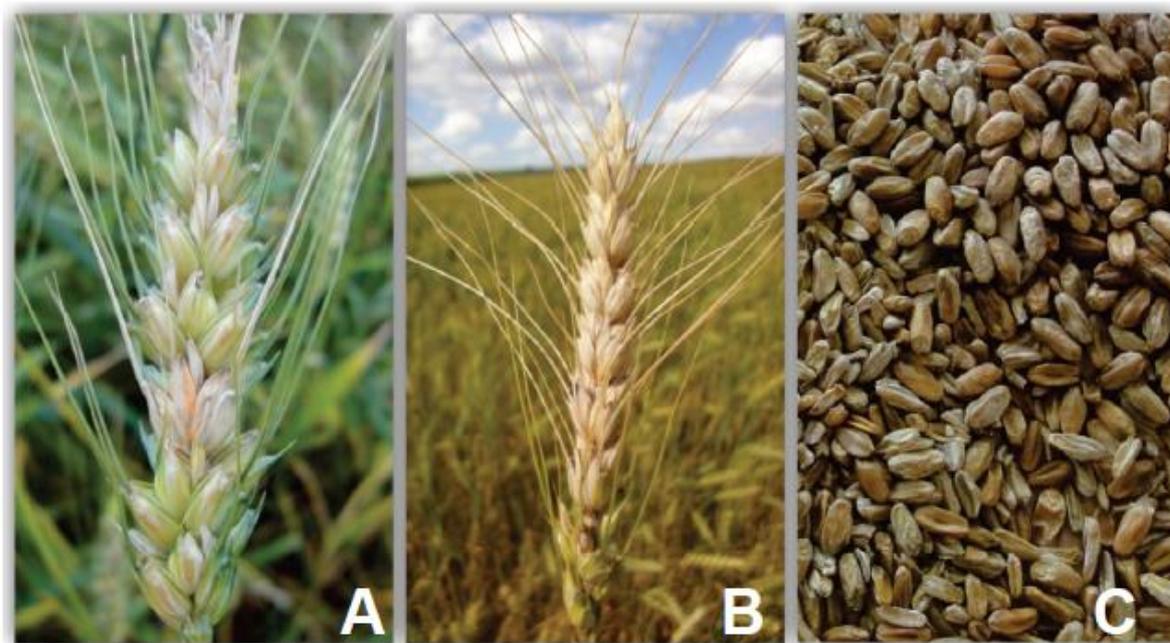


Figura 2 – Giberela do trigo; A: sinais do patógeno no terço inferior da espiga; B: espiga com severidade da doença de 80%, C: grãos danificados pela presença da giberela na espiga. Fonte: TIBOLA et al. (2013).

3.2 Micotoxinas

As micotoxinas são metabólitos fúngicos oriundos do metabolismo especializado de fungos filamentosos, não essenciais para seu desenvolvimento, crescimento e reprodução. São em geral compostos de baixo peso molecular, tóxicos tanto para animais quanto para seres humanos (BENNETT e KLICH, 2003; GEORGIANNA e PAYNE, 2009). O efeito tóxico geralmente afeta os sistemas nervoso, endócrino e imunológico, atacando também os rins e o fígado. No entanto, o efeito tóxico que as micotoxinas tem sobre cada indivíduo é variável, em função da dose e da forma de exposição (cutânea, oral ou por inalação), da idade e sexo. Como as micotoxinas comprometem o sistema imunológico, o indivíduo fica propenso a infecções bacterianas. Além disso, as micotoxinas estão relacionadas com efeitos carcinogênicos, mutagênicos e teratogênicos (PERAICA et al., 1999; BENNETT e KLICH, 2003).

As primeiras evidências de doenças causadas por micotoxinas ocorreram na idade média. Pessoas que visitavam o santuário de *St. Anthony*, na França, sentiam sensação de queimação, alucinações e algumas perturbações mentais e a grande maioria vinha a óbito. Este fenômeno foi denominado de fogo-sagrado ou fogo-de-santo-antônio. Anos mais tarde foi descoberto que os sintomas eram causados por ergotismo, doença causada por alcalóides de Ergot, produzidos pelos fungos do

gênero *Claviceps* encontrados nos cereais como trigo, centeio, cevada e arroz (SKINNER et al., 1947).

As micotoxinas começaram a ser mais estudadas a partir de 1960 quando um surto matou milhares de perus na Inglaterra. Esse surto foi denominado como “doença X”. Tempos depois foi constatado que a causa da morte dos perus foi por contaminação da ração a base de amendoim com aflatoxina; o amendoim contaminado foi produzido no Brasil e descarregado na Inglaterra em 1959 (PERAICA et al., 1999).

A ocorrência de micotoxinas predomina em regiões de clima tropical e subtropical nas quais a umidade e as altas temperaturas favorecem o desenvolvimento fúngico (SASSAHARA et al., 2003).

A produção de micotoxinas e o crescimento fungico podem não ter relação direta, pois nem sempre as condições ótimas para o crescimento fúngico são as mesmas para a produção das micotoxinas. Portanto, as micotoxinas podem ser produzidas em qualquer época do cultivo, da colheita ou do armazenamento. Estes metabólitos podem estar presentes nos alimentos mesmo que não haja mais a presença dos fungos produtores (Tabela 1) (TANIWAKI e SILVA, 2001).

Tabela 1 - Principais fungos produtores de micotoxinas e seus metabólitos

Gênero	Micotoxinas
<i>Fusarium</i>	Fumonisinias, zearalenona, tricotecenos (deoxinivalenol, nivalenol)
<i>Penicillium</i>	Ocratoxinas, patulina
<i>Aspergillus</i>	Ocratoxinas, aflatoxinas

Os fungos produtores de micotoxinas podem ainda se dividir em dois grupos; os de ocorrência durante o cultivo e os que predominam durante o armazenamento. Por exemplo, o fungo *F. graminearum*, produtor das micotoxinas deoxinivalenol e nivalenol, é um fitopatógeno de ocorrência no campo, enquanto os fungos *F. moniliforme*, que produz fumonisinias, e *A. flavus*, que produz aflatoxinas, são oportunistas e crescem em plantas debilitadas ou em fase de senescência e podem permanecer após a colheita. Os fungos *A. flavus* e *P. verrucosum* produzem ocratoxinas e podem surgir durante o cultivo e contaminar o produto após a colheita (FAO, 2015).

A doença fúngica de maior incidência em grãos de trigo, cevada e outros cereais no campo é a giberela, causada por um complexo de espécies do gênero *Fusarium*, enquanto nos grãos armazenados prevalecem as espécies de *Aspergillus* e *Penicillium*. As micotoxinas deoxinivalenol (DON) e zearalenona (ZEA) são as mais monitoradas no Sul do Brasil em amostras de trigo comercial. A Embrapa Trigo realizou um monitoramento de quatro safras de trigo (2009 a 2012) e detectou na safra de 2009 a presença de DON e ZEA superior ao limite máximo estabelecido pela legislação, 2000 ppb e 400 ppb, respectivamente (TIBOLA et al., 2013). O acúmulo dessas micotoxinas pode estar relacionado com as condições climáticas, como umidade relativa do ar, chuva, temperatura, além de variáveis agrônômicas, como o cultivo anterior da área, o nível de resistência da cultivar, entre outras (PRADINI et al., 2009).

3.2.1 Aflatoxinas

As principais espécies produtoras de aflatoxinas são *A. flavus*, responsável pela produção das aflatoxinas B₁ e B₂, e *A. parasiticus*, relacionado com a produção das aflatoxinas B (B₁ e B₂) e G (G₁ e G₂). As aflatoxinas M₁ e M₂ são oriundas da oxidação das aflatoxinas B₁ e B₂ que ocorre no organismo após a ingestão de matérias-primas contaminadas, sendo encontrada no leite, na urina e nas fezes tanto de animais quanto de humanos. As aflatoxinas são compostos heterocíclicos altamente oxigenados (derivados de furanocumarinas) (Figura 3). AFB₁ possui fórmula molecular C₁₇H₁₂O₆ e massa molecular de 312,0634g mol⁻¹, a AFB₂ possui fórmula molecular C₁₇H₁₄O₆ e massa molecular de 314,0790g mol⁻¹, AFG₁ possui fórmula molecular C₁₇H₁₂O₇ e massa molecular de 328,0583g mol⁻¹ e a AFG₂ possui fórmula molecular C₁₇H₁₄O₇ e massa molecular de 330,0740g mol⁻¹ (PERAICA et al., 1999; BENNETT e KLICH, 2003).

A produção de aflatoxinas pode ocorrer a partir da atividade de água acima de 0,82, umidade relativa do ar superior a 85% e temperaturas acima de 27°C. Esses metabólitos são estáveis a altas temperaturas, podendo manter-se estáveis até 220°C (PEREIRA et al., 2002).

As aflatoxinas podem causar doenças denominadas de aflatoxicoses, atacando principalmente o fígado e estão relacionadas com o desenvolvimento de câncer, supressão imunológica e em casos extremos a morte (ATAS et al., 2012). As

aflatoxinas são comumente encontradas em produtos agrícolas como milho, vinho, castanhas, amendoim e trigo (ALGÜL e KARA, 2014).

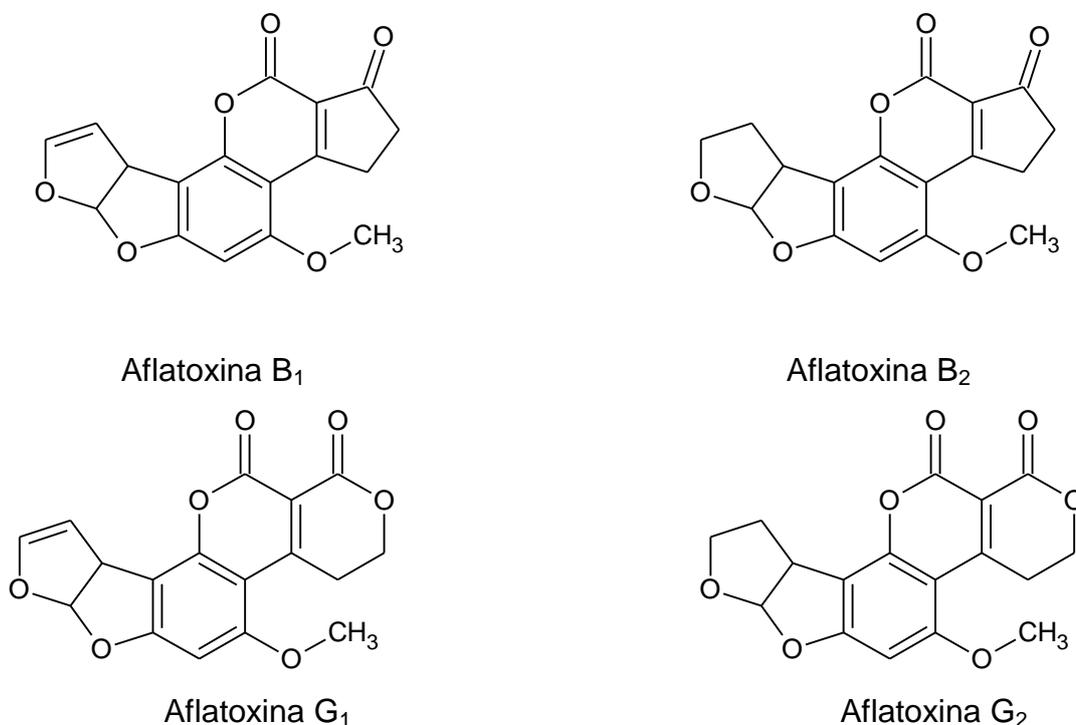


Figura 3 - Estrutura química das aflatoxinas.

As aflatoxinas são compostos termoestáveis, solúveis em solventes polares e sensíveis a soluções fortemente alcalinas como hipoclorito de sódio (OPAS, 1983). A aflatoxina B₁ (AFB₁) é a mais tóxica dentre as aflatoxinas, seguidas pelas aflatoxinas G₁, B₂ e G₂ (BENNETT e KLICH, 2003). Esse metabólito foi considerado pela International Agency for Research on Cancer (IARC), em 2003, como pertencente à classe 1 dos compostos carcinogênicos para humanos, sendo considerada uma das substâncias mais tóxicas de ocorrência natural.

3.2.2 Deoxinivalenol

O deoxinivalenol (DON; C₁₅H₂₀O₆, MM = 296,1260g mol⁻¹) também é conhecido por vomitoxina e faz parte do grupo dos tricotecenos do tipo B, os quais apresentam um esqueleto tetracíclico 12,13-epoxitricoteno (Figura 4) (FREIRE et al., 2007; HE et al., 2010). Quando ingerida essa micotoxina promove a indução de vômitos e espasmos musculares em animais e humanos (LIMA, 2004), podendo

promover a inibição da síntese proteica nos estágios iniciais de alongamento e terminação (FREIRE et al., 2007).

O DON é produzido principalmente por *Fusarium* spp., podendo ocorrer na pré-colheita e acumular-se em grãos após a colheita (EMAN, 2003; FREIRE et al., 2007). A temperatura ótima para a produção de DON é 28°C, mas a produção pode ocorrer em uma faixa de temperatura de 15° a 30°C e umidade relativa do ar entre 80 a 90% (MARQUES, 2007). O DON é solúvel em água e solventes polares, conseqüentemente são rapidamente distribuídos e processados pelo organismo após a ingestão e são excretados principalmente pela urina e em menor proporção pela bile (RAZZAZI-FAZALI, 2003).

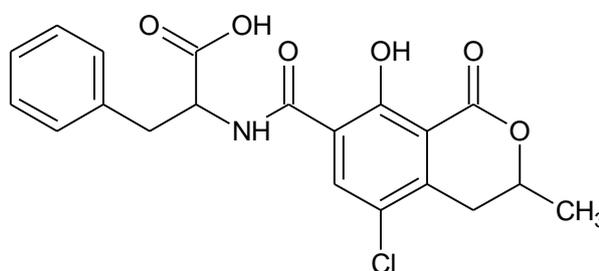


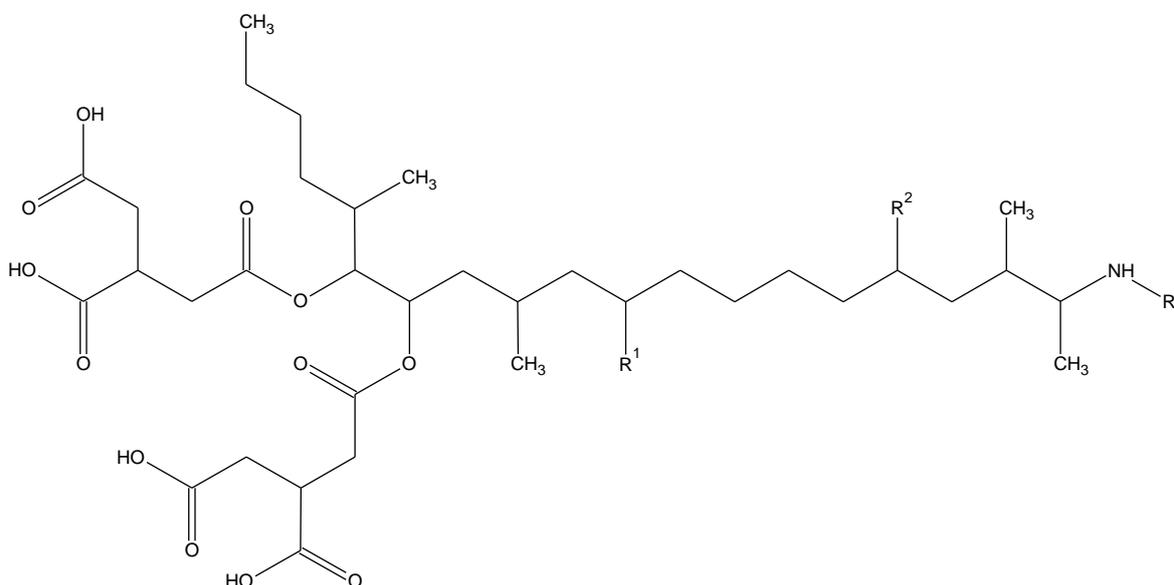
Figura 4 - Estrutura química do deoxinivalenol.

O DON é estável em altas temperaturas, até 350°C, apresentando alto risco de permanência em alimentos processados (DÖLL e DÄNICKE, 2011), como bebidas, farinhas, produtos de panificação em geral, cereais matinais e alimentos infantis (CREPPY, 2002).

3.2.3 Fumonisina

As fumonisinas (FB) são metabólitos produzidos por fungos do gênero *Fusarium*, dos quais o *F. moniliforme* é o principal produtor desse metabólito. Dentre as fumonisinas, a B1 (C₃₄H₅₉NO₁₅, MM = 721,3885g mol⁻¹) é a de maior ocorrência e toxicidade, representando aproximadamente 70% da contaminação total de fumonisinas detectadas em alimentos. As fumonisinas A₁, A₂, B₂, B₃ e B₄ são menos tóxicas e ocorrem em concentrações muito baixas (PERAICA et al., 1999; BUTKERAITIS, 2003). As FB do grupo A apresentam um grupamento amina

enquanto as do grupo B apresentam um grupamento amida (Figura 5) (KRSKA et al., 2007).



Fumonisina B₁: R¹ = OH; R² = OH; R³ = H;

Fumonisina B₂: R¹ = H; R² = OH; R³ = H;

Fumonisina B₃: R¹ = OH; R² = H; R³ = H;

Fumonisina B₄: R¹ = H; R² = H; R³ = H;

Fumonisina A₁: R¹ = OH; R² = OH; R³ = CH₂CO;

Fumonisina A₂: R¹ = H; R² = OH; R³ = CH₂CO;

Figura 5 - Estrutura química das fumonisinas.

A fumonisina B₁ é pouco avaliada em trigo, no entanto os fungos do gênero *Fusarium* são frequentemente encontrados nesta cultura, principalmente nas regiões subtropicais como o Sul do Brasil (MENDES et al., 2015). As condições para a produção da FB é de temperatura entre 20 e 25 °C, atividade de água de 0,97 e umidade relativa do ar alta (ORSI et al., 2000; LORENZZETTI et al., 2006).

As fumonisinas apresentam características fortemente polares, são solúveis em acetonitrila, metanol e água, e insolúveis em solventes orgânicos apolares. Não apresentam fluorescência e absorvem fracamente no ultravioleta, sendo necessária detecção por espectrometria de massas ou sua derivatização para detecção por fluorescência. As fumonisinas são estáveis ao calor e resistem ao processamento,

como cozimento, extrusão, moagem, branqueamento, fritura, entre outros (BUTKERAITIS, 2003).

O efeito tóxico da fumonisina no organismo está relacionado com a inibição da síntese dos esfingolipídios, no entanto isso ocorre devido à similaridade da fumonisina com a esfingosina (Figura 6) e a esfinganina (Figura 7), que são moléculas intermediárias da biossíntese dos esfingolipídios. Esse efeito inibitório da síntese tem efeito sobre as células, já que os esfingolipídios fazem parte da estrutura das membranas celulares, interferindo desta maneira na comunicação intracelular, fatores relacionados com o crescimento celular e vias de sinalização (PEREIRA et al., 2009; CHANDRASEKHAR e SREELAKSHMI, 2012).

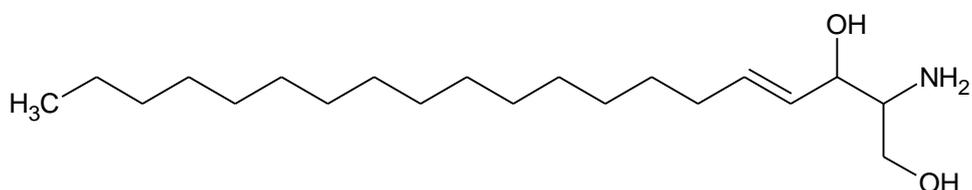


Figura 6 - Estrutura química da esfingosina.

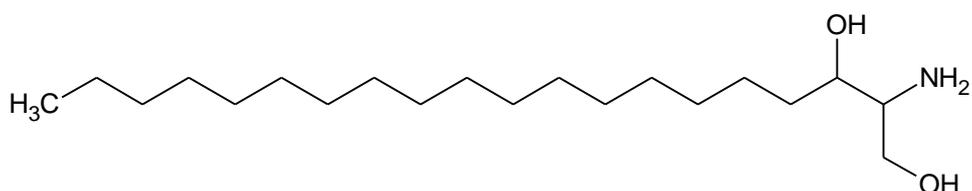


Figura 7 - Estrutura química da esfinganina.

3.2.4 Ocratoxinas

Ocratoxinas já foram encontradas em diferentes regiões geográficas em condições de temperatura variadas produzidas por espécies de *Penicillium* e *Aspergillus* (BIRCAN, 2009). O gênero *Penicillium* se desenvolve melhor em áreas de clima frio, enquanto os fungos do gênero *Aspergillus* se adaptam melhor em zonas tropicais e subtropicais de clima quente (RINGOT et al., 2006). No geral as condições favoráveis para sua produção são atividade de água entre 15 a 20°C e atividade de água de 0,95 a 0,98, no entanto esses níveis podem sofrer variações conforme o fungo envolvido na contaminação do alimento (LASRAM et al., 2010). Essa micotoxina predomina na pós-colheita e é estável, resistindo às etapas de secagem mesmo sob altas temperaturas (BIRCAN, 2009).

As ocratoxinas são classificadas em A, B e C, conforme os diferentes substituintes da estrutura base (Figura 8). A ocratoxina A (OTA; $C_{20}H_{18}O_6NCl$, $MM = 403,0823g\ mol^{-1}$) é a mais abundante e a mais tóxica entre as ocratoxinas (KNASMULLER et al., 2004), é um policetídeo derivado de uma dihidro-isocumarina unida no carbono 7 por uma ligação amídica a uma L- β -fenilalanina (RINGOT et al., 2006).

A ocratoxina A é nefrotóxica, neurocarcinogênica e genotóxica em humanos (IARC, 1993; PERAICA et al., 1999; GIROLAMO et al., 2011; ALGÜL e KARA, 2014). Devido a alta afinidade com a albumina, a OTA ainda pode ter efeito cumulativo em diversos órgãos (REITER et al., 2011). Quando o animal ingere altas concentrações dessa micotoxina pode contaminar o ser humano de forma indireta pelo consumo de carne, leite e derivados contaminados. Esse metabólito pode ainda ser encontrado em cereais, especiarias, cacau, café, vinho, cerveja, suco de uva e frutas secas (GIROLAMO et al., 2011).

A OTA é altamente solúvel em solventes orgânicos polares e em solução aquosa de carbonato de cálcio, mas pouco solúvel em água (TEIXEIRA, 2011).

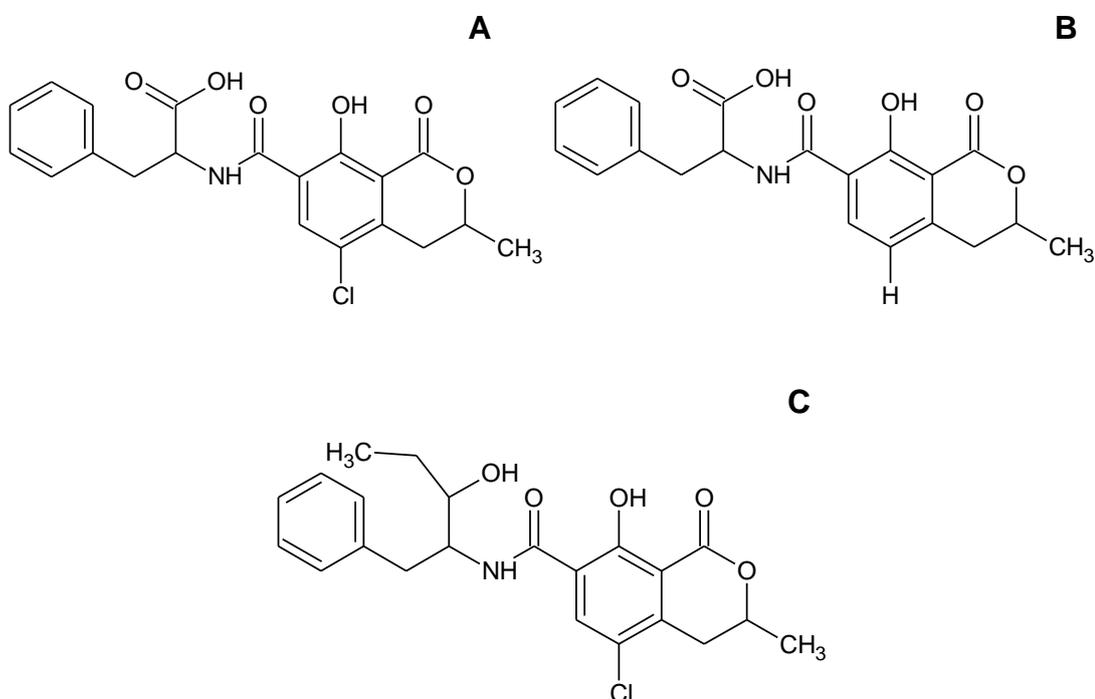


Figura 8 - Estrutura química das ocratoxinas. A: ocratoxina A; B: ocratoxina B; C: ocratoxina C.

3.2.5 Zearalenona

A zearalenona (ZEA; $C_{18}H_{22}O_5$, $MM = 318,1467g\ mol^{-1}$) é um metabólito produzido por espécies de *Fusarium* principalmente, *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. cerealis*, *F. equiseti* e *F. semitectum rookwellense* (KRSKA et al., 2003; ZAIN, 2011). A ZEA (Figura 9) é descrita quimicamente como uma lactona do ácido resorcílico (GAUMY et al., 2001). Pode ser produzida em períodos de frio prolongados e elevada umidade (ZINEDINE et al., 2007). Esse metabólito tem toxicidade aguda baixa, porém tem efeito no sistema reprodutor de animais, podendo causar infertilidade e redução na produção de leite (ZAIN, 2011).

A estrutura química da zearalenona pode sofrer metabolização no fígado de mamíferos levando a formação dos isômeros α - e β - zearalenol. O α -zearalenol apresenta um efeito tóxico muito mais acentuado que a ZEA e o β -zearalenol (MALEKINEJAD et al., 2005; ZINEDINE et al., 2007). A ZEA é estável à quebra hidrolítica que pela presença grupamento metila secundário que protege a carbonila da lactona de ataques nucleofílicos (ZINEDINE et al., 2007). A ZEA é estável a altas temperaturas, solúvel em éter dietílico, benzeno, metanol, acetato de etila, álcoois e acetonitrila e insolúvel em água (MARQUES, 2007).

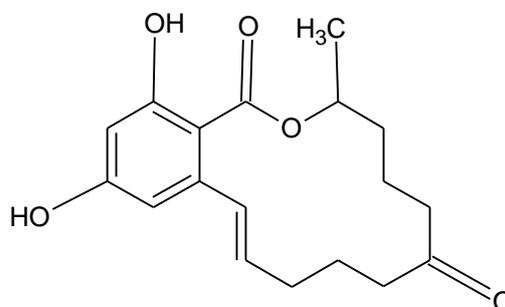


Figura 9 - Estrutura química da zearalenona.

3.3 Fungicidas

Os cultivos de cereais são constantemente atacados por pragas, doenças e plantas daninhas, gerando perdas significativas. Uma medida que vem sendo utilizada há anos é a aplicação de agrotóxicos, que por sua vez são eficazes para controlar ou reduzir esses ataques. No entanto, resíduos de agrotóxicos nos alimentos podem causar malefícios à saúde do consumidor (ZANELLA et al., 2012). A detecção e a quantificação desses agrotóxicos são fundamentais devido à recorrente utilização de agrotóxicos não permitidos para determinada cultura, ao

desrespeito ao período de carência e a aplicação de concentrações fora dos limites recomendados (BARBOSA, 2004).

Foi implantado no Brasil, desde 2001, o Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos que é coordenado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) juntamente com as Vigilâncias Sanitárias (VISA) e com os Laboratórios Centrais de Saúde Pública (LACEN) que avaliam periodicamente os níveis de resíduos de agrotóxicos nos alimentos de origem vegetal coletados nos mercados varejistas. Os alimentos são avaliados com relação aos agrotóxicos autorizados para determinada cultura e os Limites Máximos de Resíduos (LMR) permitidos (ANVISA, 2015), utilizando a razão de miligramas do agrotóxico por quilo do alimento (mg kg^{-1}).

3.3.1 Protioconazol

O fungicida protioconazol [$\text{C}_{14}\text{H}_{15}\text{Cl}_2\text{N}_3\text{OS}$, $\text{MM} = 343,0113\text{g mol}^{-1}$, $\text{Kow} (20^\circ\text{C}, \text{pH } 7) = 3,82$; Figura 10], aprovado para a aplicação em trigo, de modalidade de aplicação foliar, com intervalo de segurança de vinte dias, é classificado no grupo químico da Triazolintiona e apresenta Ingestão Diária Aceitável (IDA) de $0,001\text{mg kg}^{-1}$ de peso corpóreo (p.c.) (ÍNDICE DE MONOGRAFIAS - ANVISA, 2016; KONTIOKARI e MATTSOFF, 2011). Este grupo está relacionado com o mecanismo de inibição da biossíntese de ergosterol que é um importante componente da membrana celular dos fungos (CORRÊA, 2015).

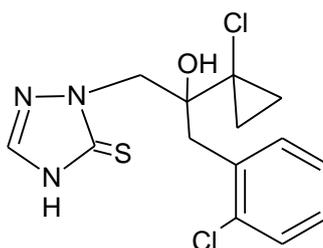


Figura 10 - Estrutura química do protioconazol.

3.3.2 Trifloxistrobina

A trifloxistrobina [$\text{C}_{20}\text{H}_{19}\text{F}_3\text{N}_2\text{O}_4$, $\text{MM} = 408,1297\text{g mol}^{-1}$, $\text{Kow} (20^\circ\text{C}, \text{pH } 7) = 4,5$; Figura 11] é outro fungicida aprovado para a aplicação em trigo, de modalidade de aplicação foliar, com intervalo de segurança de trinta dias, e pertence ao grupo químico da estrobilurina, com IDA de $0,03\text{mg kg}^{-1}$ p.c. (ÍNDICE DE MONOGRAFIAS -

ANVISA, 2016; MILHOME et al., 2009). As estrobilurinas interferem na respiração mitocondrial dos fungos pela inibição da cadeia respiratória inibindo o complexo III, interrompendo a fosforilação oxidativa e interferindo na ação da ATP-sintase. Possui ainda ação antiesporulante, dificultando a germinação dos esporos (FREITAS et al., 2011).

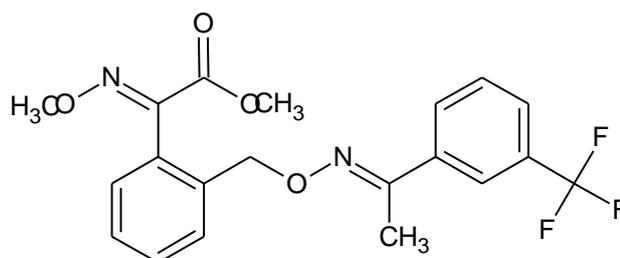


Figura 11 - Estrutura química da trifloxistrobina.

3.3.3 Epoxiconazol

O epoxiconazol [C₁₇H₁₃ClFN₃O, MM = 329,0731g mol⁻¹, Kow (25°C, pH 7) = 3,3; Figura 12], fungicida aprovado para a aplicação em trigo, de modalidade de aplicação foliar, com intervalo de segurança de trinta dias, é classificado no grupo químico dos triazóis e apresenta IDA de 0,003 mg kg⁻¹ p.c. (ÍNDICE DE MONOGRAFIAS - ANVISA, 2016; LICHHEB et al., 2015). Os triazóis agem inibindo a biossíntese de ergosterol que leva a um colapso na célula fúngica afetando seu crescimento (FREITAS et al., 2011).

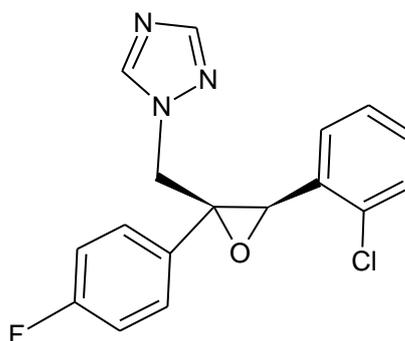


Figura 12 - Estrutura química do epoxiconazol.

3.3.4 Piraclostrobina

A piraclostrobina [C₁₉H₁₈ClN₃O₄, MM = 387,0986g mol⁻¹, Kow (20°C, pH 7) = 3,99; Figura 13], fungicida aprovado para a aplicação em trigo, de modalidade de

aplicação foliar, com intervalo de segurança de trinta dias, é classificada no grupo químico dos estrobilurina e apresenta IDA de $0,04\text{mg kg}^{-1}$ p.c. (ÍNDICE DE MONOGRAFIAS - ANVISA, 2016; MILHOME et al., 2009).

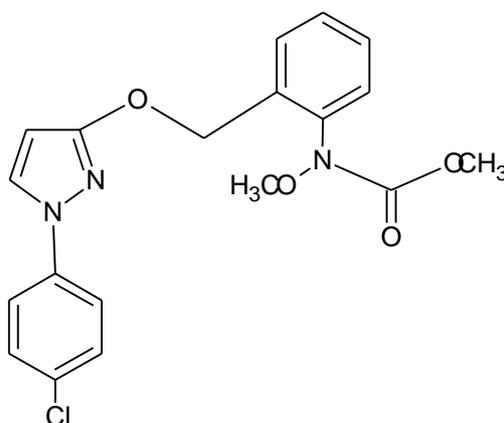


Figura 13 - Estrutura química da piraclostrobina.

3.3.5 Mancozebe

O fungicida mancozebe $[(\text{C}_4\text{H}_6\text{N}_2\text{S}_4\text{Mn})_x (\text{Zn})_y]$, Kow (20°C , $\text{pH } 7$) = 1,33, pka = 10,3; Figura 14] é aprovado para a aplicação em trigo, de modalidade de aplicação foliar, com intervalo de segurança de trinta e dois dias, classificado no grupo químico dos ditiocarbamatos e apresenta IDA de $0,03\text{mg kg}^{-1}$ p.c. (ÍNDICE DE MONOGRAFIAS - ANVISA, 2016).

O mancozebe pertencente ao subgrupo dos Etileno-bis-Ditiocarbamato (EBDC), tem estrutura química comum entre os compostos desse subgrupo ($\text{C}_4\text{H}_6\text{N}_2\text{S}_4$), diferenciando-se nas ligação com os metais. O mancozebe é um polímero complexado com sais de zinco (2 -5%) e manganês (20%).

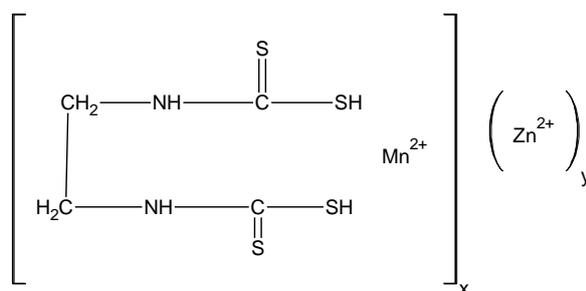


Figura 14 - Estrutura química do mancozebe.

Os EBDC tem sido amplamente utilizados em várias culturas para controlar doenças fúngicas. A degradação ou biotransformação dos EBDC pode formar o composto etilenotiouréia que pode quelar íons metálicos, como o cobre, que apresentam toxicidade para humanos (HAYAMA e TAKADA, 2008). O seu mecanismo de ação deriva da ação de inibição do íon isotiocianato, oriundo da decomposição do mancozebe, às enzimas sulfidrílicas e outros compostos sulfúricos envolvidos na respiração, impedindo a conversão da glicose em piruvato, a formação da acetilcoenzima A e a transformação do ácido succínico em ácido fumárico (ROGRIGUES, 2006; JULIATTI, 2016).

3.4 Legislação

Os limites máximos de micotoxinas estabelecidos pela legislação visam proteger os consumidores dos efeitos nocivos destes contaminantes à saúde. A ANVISA através da RDC 07/2011 estabeleceu os limites máximos toleráveis (LMT) de micotoxinas para alguns alimentos. Os LMT estabelecidos para aplicação em janeiro de 2014 e janeiro de 2016 foram prorrogados para até 1º de janeiro de 2017 (RDC nº 59, de 26 de dezembro de 2013). Os LMT para DON e ZEA que devem ser implementados até 2017 para o trigo integral estão na Tabela 2. As demais micotoxinas não são mencionadas nesta legislação especificamente para o trigo integral, porém, foram estabelecidos limites para cereais em 2011 para aflatoxinas B₁ + B₂ + G₁ + G₂ de, 5µg Kg⁻¹ e em 2014 para ocratoxina A de 20µg Kg⁻¹, incluindo, portanto, o trigo integral. A União Européia estabelece limites máximos toleráveis para cereais a partir do Regulamento nº 1881/2006.

Os limites máximos toleráveis dos fungicidas para a cultura de trigo são estabelecidos pela ANVISA (ÍNDICE DE MONOGRAFIAS - ANVISA, 2016). Os limites máximos de resíduos estabelecidos pela União Européia constam no Regulamento nº 396/2005.

Tabela 2 - Limites máximos toleráveis estabelecidos para o Brasil (ANVISA) e para a União Europeia (European Union Commission Regulation) para algumas micotoxinas e moléculas de fungicida

	Legislação	
	Brasil	União Europeia
AFB ₁	-*	2µg kg ⁻¹
AF (B ₁ + B ₂ + G ₁ + G ₂)	5µg kg ⁻¹ **	4µg kg ⁻¹
DON	1000µg kg ⁻¹	1750µg kg ⁻¹
FB ₁	-#	-#
OTA	20µg Kg ^{-1**}	5µg kg ⁻¹
ZEA	200µg kg ⁻¹	100µg kg ⁻¹
Protioconazol	10µg kg ⁻¹	100µg kg ⁻¹
Trifloxistrobina	50µg kg ⁻¹	300µg kg ⁻¹
Epoxiconazol	100µg kg ⁻¹	600µg kg ⁻¹
Piraclostrobina	500µg kg ⁻¹	200µg Kg ⁻¹
Mancozebe	1000µg Kg ⁻¹ de CS ₂	1000µg Kg ⁻¹ de CS ₂

Aflatoxinas (AFB₁, AFB₂, AFG₁ e AFG₂), deoxinivalenol (DON), fumonisina B₁ (FB₁), ocratoxina A (OTA), e zearalenona (ZEA), dissulfeto de carbono (CS₂). * Não consta na legislação, ** Legislação para cereais, # legislação somente para milho e derivados.

3.5 Método de determinação de micotoxinas e agrotóxicos

3.5.1 Extração

O método mais utilizado para a extração simultânea de micotoxinas e resíduos de agrotóxicos é o método QuEChERS. Vários autores utilizaram este método para diferentes matrizes, como trigo, pepino, vinho (ORTEGA et al., 2012), arroz, milho (ZHANG et al., 2013), papinha de maçã para bebê, farinha de trigo, páprica, pimenta preta, sementes de girassol (LACINA et al., 2012) e leite (AGUILERA-LUIZ et al., 2011).

O método de extração multiresíduos denominado QuEChERS foi desenvolvido por Anastassiades e Lehotay (2003) para a extração de agrotóxicos de frutas e hortaliças. QuEChERS (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Robust, Safe*) é a sigla em inglês que traduzida significa rápido, fácil, barato, eficaz, robusto e seguro. A partir deste método, vários outros autores foram otimizando o método para expandir o número de compostos a serem analisados e aumentar o percentual de recuperação (PRESTES et al., 2011). Uma adaptação do método foi a substituição do cloreto de sódio pelo acetato de sódio (LEHOTAY et al., 2005). Em 2007 esse

método otimizado foi adotado como oficial pela *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC) para a determinação de resíduos de pesticidas em alimentos. Anastassiades et al. (2007) desenvolveram o método “QuEChERS-citrato” no qual utilizaram citrato de sódio diidratado e hidrogenocitrato sesquihidratado para promover o efeito tamponante (pH 5,0 – 5,5). No ano seguinte a *Européen de Normalisation* (CEN) oficializou o método, tornando-o referência na União Européia (CEN, 2008).

Este método vem sendo empregado para a análise multiresíduos por sua simplicidade, diminuição da utilização de solventes, redução dos gastos e do tempo de análise, assim como dos riscos à saúde e ao ambiente. O método tem também como vantagem a extração de vários analitos de interesse, em apenas três etapas: extração com solvente, partição com sais e limpeza do extrato, que é imprescindível para remoção dos interferentes, diminuindo o efeito de matriz (PRESTES et al., 2011).

Os solventes de extração mais utilizados no método Quechers são acetonitrila, acetona e acetato de etila, o qual é mais utilizado para cromatografia gasosa (MAŠTOVSKÁ e LEHOTAY, 2004). A acetonitrila é mais indicada como solvente de extração por sua compatibilidade com a técnica de separação por cromatografia líquida, além de ser amplamente utilizada como fase móvel. Quando acidificada, a acetonitrila promove a estabilização de alguns agrotóxicos. Para promover a partição são utilizados sais como acetato de sódio, cloreto de sódio e sulfato de magnésio anidro, os quais proporcionam o *salting out*, promovendo a saturação da água e consequente separação da acetonitrila, aumentando a recuperação de analitos polares, uma vez que diminuem a solubilidade desses compostos em água, migrando para a fase orgânica (ANASTASSIADES e LEHOTAY, 2003; PRESTES et al., 2011). O sulfato de magnésio anidro é bastante utilizado por sua alta capacidade de adsorver água, comparado com os demais sais, reduzindo assim o volume de fase aquosa. Além disso, a reação de hidratação desse sal é exotérmica, promovendo um pequeno aquecimento que favorece a extração de moléculas apolares (ANASTASSIADES e LEHOTAY, 2003).

Para amostras com teor de umidade abaixo de 80% é recomendada a adição de água com a finalidade de melhorar a extração dos analitos de interesse. A água hidrata as partículas, facilitando a entrada do solvente em toda a amostra (ANASTASSIADES e LEHOTAY, 2003).

A amina primária secundária (PSA) (Figura 15) é utilizada na etapa de *clean up*, atuando como adsorvente e retendo os interferentes polares da matriz, tais como alguns pigmentos, açúcares e ácidos orgânicos. Essa remoção pode ocorrer por ligações de hidrogênio ou dipolo-dipolo estabelecidas entre a PSA e os interferentes da matriz (ANASTASSIADES e LEHOTAY, 2003). A remoção de componentes co-extraídos diminui o efeito de matriz e aumenta a vida útil principalmente da coluna do cromatógrafo líquido (PRESTES et al., 2011).

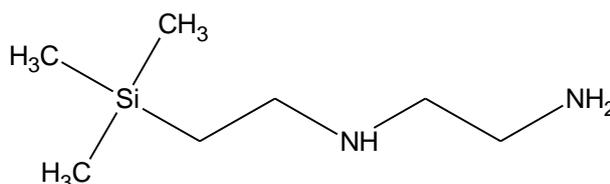


Figura 15 - Estrutura química do PSA.

3.5.2 Identificação e quantificação

A técnica analítica de determinação de micotoxinas e resíduos de agrotóxicos por cromatografia líquida com detecção por fluorescência foi utilizada durante anos, no entanto, essa técnica vem perdendo espaço para a cromatografia líquida acoplada a espectrômetro de massas, pois nenhuma etapa de derivatização é necessária e pode-se obter uma maior seletividade e sensibilidade (ZHANG et al., 2013).

Existem vários exemplos de quantificação simultânea de micotoxinas e resíduos de agrotóxicos por LC-MS. Em leite foram determinados simultaneamente 85 moléculas de micotoxinas e pesticidas (AGUILERA-LUIZ et al., 2011), em trigo, pepino e vinho foram avaliadas 90 moléculas de pesticidas, biopesticidas e micotoxinas (GONZÁLEZ et al., 2012), em farinha de trigo, papinha de maçã para bebê, pimenta preta e sementes de girassol, Lacina et al. (2012) determinaram resíduos de 288 agrotóxicos e 38 micotoxinas e Zhang et al. (2013) determinaram simultaneamente 22 inseticidas e 17 micotoxinas em cereais.

A cromatografia líquida é uma técnica analítica muito empregada para análises de alimentos, utilizada para a determinação de moléculas não-voláteis. No entanto, apesar de ser uma técnica eficiente para a separação dos compostos, necessita de uma técnica de confirmação (LANÇAS, 2009). Uma alternativa é o acoplamento da cromatografia líquida com a espectrometria de massas. A união

dessas duas técnicas tem a vantagem da alta seletividade e eficiência de separação da cromatografia líquida com a obtenção de informações estruturais, de massa molar, além do aumento da seletividade e detecção proporcionadas pela espectrometria de massas. Como a maioria dos compostos analisados na cromatografia líquida apresenta baixa volatilidade e/ou são sensíveis ao calor, deve-se escolher a técnica de ionização mais adequada (CHIARADIA et al., 2008).

Uma das fontes de ionização bastante utilizada é a ionização por eletronebulização (*electrospray*, ESI). Na ESI a amostra é dissolvida e pressurizada em um capilar onde é aplicada uma voltagem (3000 a 5000 V). O analito sai do capilar em forma de um *spray* de aerossol e há formação de íons a pressão atmosférica. As gotículas formadas são dessolvatadas, ou seja, perdem solvente continuamente, com isso as cargas dos analitos na gotícula começam a se repelir e a tensão superficial da gotícula é incapaz de se opor à essas forças de repulsão, ocorrendo então a “explosão” das gotículas em diversas gotículas menores. Esse fenômeno é denominado explosão Coulômbica. Esse fenômeno continua ocorrendo até que apenas um íon do analito permaneça. Os íons formados adentram o espectrômetro de massas atraídos por efeitos eletrostáticos e pelo vácuo (Figura 16) (LANÇAS, 2009).

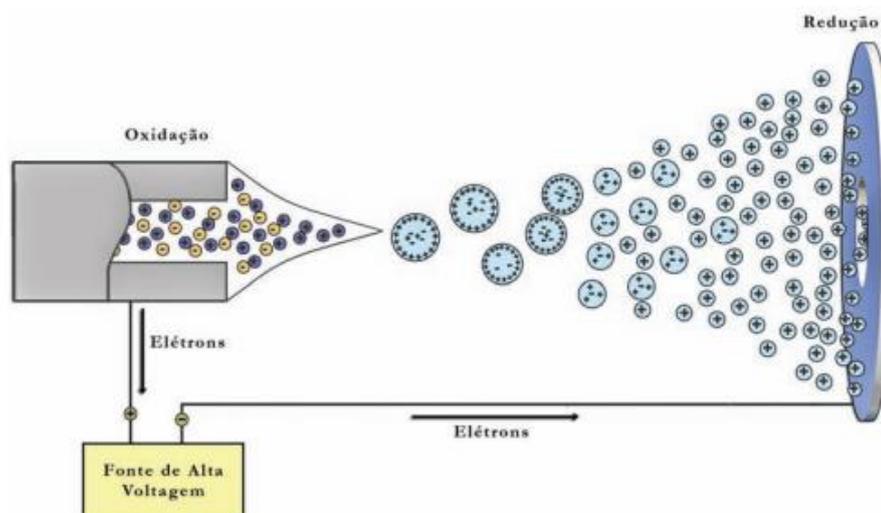


Figura 16 - Processo de ionização por eletronebulização.
Fonte: LANÇAS, 2009.

Os íons após adentrarem o espectrômetro de massas passam por um filtro de massas, denominado quadrupolo. O quadrupolo é composto por quatro barras metálicas dispostas em duplas, um par de barras é mantido com um potencial elétrico positivo e o outro par de barras é mantido com um potencial negativo. O

potencial vai alternando entre as barras e com isso os íons passam em forma helicoidal entre as barras. Os íons que estão abaixo ou acima da razão massa/carga estipulada pelo analista colidem nas barras e são desprotonados e eliminados através da bomba de vácuo. O par de barras positivo atua como um filtro de massas mais elevadas, enquanto que o par negativo atua como um filtro de massas mais leves (CHIARADIA et al., 2008; LANÇAS, 2009).

A fonte de ESI é considerada uma ionização suave, e desta forma, não costuma ocorrer fragmentação do analito na fonte. Esta é uma característica interessante quando se busca determinar a massa exata de um composto e avaliar a presença de diferentes compostos no espectro. Porém, quando se deseja conseguir mais informações estruturais sobre a molécula e aumentar a seletividade, deve-se buscar a fragmentação do composto. A fragmentação ocorre dentro de um dispositivo chamado “Câmara de Colisão”, por meio da colisão do íon selecionado com um gás inerte, geralmente nitrogênio (IGLESIAS, 2016).

Os íons formados são analisados pelo analisador de tempo de voo (Time-of-Flight - TOF) que são acelerados através de um “tubo de voo” (Figura 17). A identificação consiste na medida de intervalo de tempo gasto pelos íons para percorrer do ponto de entrada do tubo até a chegada no detector. Os íons são caracterizados pela relação massa/carga (m/z). O tempo necessário para um íon atravessar o tubo será inversamente proporcional à raiz quadrada da razão m/z . (CHIARADIA et al., 2008; LANÇAS, 2009).

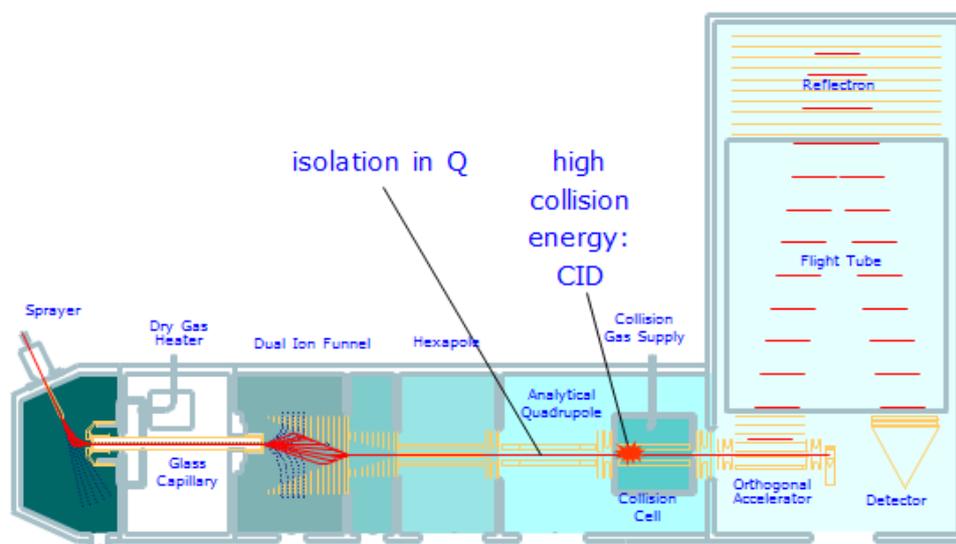


Figura 17 - Esquema representativo de um ESI-QToF-MS em corte.
Fonte: BRUKER, 2015.

3.6 Validação dos parâmetros analíticos

A validação é um processo de confirmação ou demonstração do desempenho de um método de análise que se faz necessária para a obtenção de informações confiáveis e interpretáveis sobre a amostra.

3.6.1 Linearidade e curva analítica

A linearidade é um procedimento analítico que compreende a obtenção de resultados diretamente proporcionais à concentração do analito em questão, dentro de um determinado intervalo de concentração (AOAC, 2002). Usualmente, a linearidade é calculada a partir de curvas analíticas, pela relação matemática entre a concentração do analito (eixo x) (variável independente) e o sinal medido pelo equipamento, que pode ser pela área ou altura do pico (eixo y) (variável dependente) do analito a ser quantificado (RIBANI et al., 2004). Essa relação produz uma equação que pode ser de regressão linear (Equação 1).

$$y = ax + b \tag{1}$$

Onde:

y = resposta medida (absorbância, altura ou área do pico);

x = concentração;

a = interseção com o eixo y, quando $x = 0$ (coeficiente angular);

b = inclinação da curva analítica (coeficiente linear).

O coeficiente de determinação (r^2) pode ser calculado para estimar a qualidade da curva analítica, que quanto mais próximo de 1 menor é a variação dos dados obtidos. Valores superiores a 0,99 são recomendados pelas diretrizes da AOAC (2002) e da ANVISA (2003), enquanto o INMETRO recomenda valores superiores a 0,90.

A curva analítica pode ser construída em solvente e/ou em extrato de matriz. A curva analítica construída em solvente é utilizada quando a matriz não exerce nenhum efeito sobre o sinal do equipamento. A comparação do comportamento das linhas de regressão da curva analítica em solvente com a curva analítica em extrato de matriz demonstra a seletividade do método quando estão em paralelo. A exatidão e a precisão também são levadas em consideração no intervalo de concentração da curva analítica (RIBANI et al., 2004).

3.6.2 Limite de detecção e quantificação

O limite de detecção (LD) é a menor concentração que pode ser detectada pelo equipamento. O que não necessariamente significa que esse valor possa ser quantificado de forma exata. O limite de quantificação (LQ) é a menor concentração ou quantidade de um analito que pode ser avaliado com confiabilidade aceitável através das condições experimentais previamente estabelecidas (AOAC, 2002; RIBANI et al., 2004; ICH-GUIDELINE, 2005; RIBEIRO et al., 2008).

3.6.2.1 Parâmetros da curva analítica

O LD e LQ podem ser calculados a partir da equação da reta, levando em consideração o coeficiente linear e o coeficiente angular da curva analítica (ICH-GUIDELINE, 2005).

3.6.2.2 Método da relação sinal-ruído

A determinação do sinal-ruído para estimar LD e LQ é feita através da comparação dos sinais da amostra sem a presença do analito e com a amostra contendo baixas concentrações conhecidas do analito, detectadas com confiabilidade. A estimativa do limite de detecção aceitável é de 3:1 ou 2:1 (RIBANI et al., 2004; ICH-GUIDELINE, 2005; RIBEIRO et al., 2008).

3.6.3 Exatidão

A exatidão é a determinação que avalia a proximidade entre os dados de um material de referência, aceito como valor verdadeiro, e o valor resultante do ensaio obtido através do método em estudo (ANVISA, 2003; RIBANI et al., 2004). A exatidão deve abranger a faixa linear do método e apresentar no mínimo nove determinações, sendo três concentrações referentes à concentração alta, intermediária e baixa da curva analítica. Os ensaios devem ser em triplicata (ANVISA, 2003).

A exatidão pode ser avaliada utilizando o método proposto a partir de uma substância de referência (padrões certificados) ou comparação dos resultados com outras metodologias, ou ainda por recuperação (RIBANI et al., 2004; RIBEIRO et al., 2008)

3.6.4 Precisão

A precisão é expressa como o grau de concordância ou proximidade dos resultados (grau de dispersão) a partir de uma série de medidas obtidas por múltiplas análises de uma mesma amostra. A precisão pode ser obtida a partir de três categorias - repetitividade, precisão intermediária e reprodutibilidade - e é expressa através da variância, desvio padrão ou coeficiente de variação (ANVISA, 2003; INMETRO, 2003; ICH-GUIDELINE, 2005).

Para a análise de repetitividade deve-se manter o mesmo procedimento de medição, o mesmo avaliador, o mesmo laboratório e equipamento com as mesmas condições instrumentais. A avaliação da repetitividade deve contemplar um mínimo de nove determinações, sendo três concentrações estipuladas dentro da faixa linear de cada curva analítica (nível baixo, intermediário e alto, todas em triplicata) (ANVISA, 2003).

A precisão intermediária também é definida como precisão inter-corrída, permanecendo as mesmas condições cromatográficas, variando apenas o analista, o equipamento ou a avaliação em dias diferentes. Esta análise objetiva verificar se o método está gerando os mesmos resultados (INMETRO, 2003). A ANVISA sugere no mínimo dois dias distintos com diferentes analistas.

A reprodutibilidade também pode ser denominada de inter-laboratorial e é determinada a partir da concordância dos resultados obtidos em laboratórios distintos (ANVISA, 2003; INMETRO, 2003).

3.6.5 Especificidade e seletividade

A especificidade é interpretada como a capacidade de um método para a determinação de um analito de forma exata, na presença de interferentes provenientes da matriz em questão (ANVISA, 2003). A seletividade é a capacidade dos métodos de extração, de purificação e, principalmente, do sistema de separação e detecção, em selecionar o analito de interesse dentre outros compostos (SANCO, 2013).

3.6.6 Efeito de matriz

Componentes da matriz podem interferir na determinação dos analitos (IUPAC, 1989). A amplitude desse efeito pode estar vinculada com a concentração do extrato (INMETRO, 2008). Os co-extrativos da matriz podem gerar algum tipo de efeito sobre a ionização dos analitos de interesse. Essa interferência pode ser uma supressão ou um aumento no sinal do íon, podendo ser classificada em: baixa quando menor que 20% ou maior que -20%; média quando estiver entre -50 e -20% ou 20 e 50%; e alta, quando superior a 50% ou inferior a -50%, ou seja, a matriz exerce um forte efeito sobre a ionização dos íons (FERRER et al., 2011). Valores positivos do efeito de matriz revelam que houve um acréscimo na intensidade dos sinais dos íons e valores negativos representam uma supressão dos íons. Quando a resposta for zero significa que não houve interferência da matriz sobre os íons de interesse (STAHNKE et al., 2012).

O efeito de matriz pode ser mensurado quantitativamente através da comparação entre a curva elaborada em solvente com a curva elaborada com extrato da amostra (STAHNKE et al., 2012).

Uma estratégia para eliminar ou minimizar o efeito de matriz é diluir o extrato, uma vez que é fácil de aplicar e eficaz sobre a diminuição da supressão dos sinais, pois há a diluição dos co-extrativos, porém ocorre simultaneamente a diluição dos analitos de interesse, podendo ultrapassar o limite de quantificação (FERRER et al., 2011).

4 MATERIAIS e MÉTODOS

4.1 Reagentes, solventes e materiais utilizados

Acetonitrila grau HPLC, acetato de sódio p.a., sulfato de magnésio anidro p.a., ácido acético glacial 96%, marca Vetec (Brasil);

Água ultrapura obtida a partir do equipamento de purificação da marca MegaPurity;

PSA (amina primaria-secundária), ácido fórmico >96%, 2mL de padrão de aflatoxinas em acetonitrila (mix de AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂) 20µg mL⁻¹, 1mg de padrão de fumonisina B₁ CAS: 116355-83-0, 1mg de padrão de deoxinivalenol CAS: 51481-10-8, 5mg de padrão de ocratoxina A CAS: 303-47-9, 5mg de padrão de zearalenona CAS: 17924-92-4, 250mg de padrão de mancozebe CAS: 8018-01-7,

100mg de padrão de trifloxistrobina CAS: 141517-21-7, 100mg de padrão de protioconazol CAS: 178928-70-6, 100mg de padrão de epoxiconazol CAS: 133855-98-8, 100mg de padrão de piraclostrobina CAS: 175013-18-0; todos da marca Sigma-Aldrich (Brasil).

4.2 Preparo das soluções analíticas

Para o preparo das soluções analíticas de micotoxinas, primeiramente foi removida a proteção de alumínio do frasco contendo o padrão sólido, sem remover as tampas originais, para evitar a dispersão das partículas no ar. Com o auxílio de uma seringa de vidro com agulha descartável o septo foi furado e injetou-se o diluente indicado para cada micotoxina. O frasco foi sonicado durante 1min e o conteúdo foi transferido para um balão volumétrico, lavando-se cinco vezes o frasco.

As soluções estoque dos padrões de ocratoxina A e de zearalenona foram preparadas na concentração de 100mg L^{-1} . Cada padrão foi ressuspense em 50mL de uma mistura de benzeno:acetonitrila (98:2) e divididos em 10 frascos âmbar contendo 5mL da solução estoque. As soluções estoque dos padrões de fumonisina B₁ e deoxinivalenol foram preparadas na concentração de 200mg L^{-1} . O padrão de fumonisina B₁ foi ressuspense com 5mL de acetonitrila:água (1:1) e o padrão de deoxinivalenol com 5mL de benzeno:acetonitrila (98:2). Após, cada solução foi dividida em três frascos âmbar, contendo 2,5mL; 1,5mL e 1,0mL. As aflatoxinas foram adquiridas em solução de $20\mu\text{g mL}^{-1}$, sendo diluída para $10\mu\text{g mL}^{-1}$.

Em todas as soluções padrão os solventes dos frascos foram removidos utilizando fluxo de nitrogênio gasoso e armazenados em freezer (-18°C) para posterior ressuspensão.

A confirmação da concentração das soluções de micotoxinas foi realizada através da determinação da absorbância por espectrofotômetro (Anexo B) (IAL, 2008).

As soluções estoque dos padrões de mancozebe, trifloxistrobina, protioconazol, piraclostrobina e epoxiconazol foram preparadas na concentração de 100mg L^{-1} . Cinco mg de cada padrão foram ressuspensos em 50mL de acetonitrila grau HPLC e após cada solução foi dividida em 10 frascos âmbar contendo 5mL da solução estoque. Os solventes foram removidos dos frascos, utilizando nitrogênio gasoso e armazenados a -18°C para posterior ressuspensão.

4.3 LC-ESI-QToF-MS

Para a análise de micotoxinas e fungicidas, cada padrão foi injetado separadamente na concentração de 10ng mL^{-1} . Para a definição do modo de ionização, todos os padrões foram analisados no modo positivo e no modo negativo, injetando-se $10\mu\text{L}$ de cada. As micotoxinas e os fungicidas foram identificados e quantificados utilizando cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometro de massas (LC-ESI-QToF-MS). Foi utilizado um LC da marca Shimadzu, equipado com desgaseificador *on line*, bomba binária, detector por arranjo de diodos (DAD), amostrador automático e coluna de fase reversa (C18) Shim-pack XR – ODS (75mm x 2,0mm; $2,2\mu\text{m}$). O sistema de eluição utilizado baseou-se em gradiente linear utilizando como fase móvel as soluções A (0,1% de ácido fórmico em água) e B (0,1% de ácido fórmico em acetonitrila) conforme a Tabela 3 (Ortega et al., 2012).

Tabela 3 - Gradiente da fase móvel

Tempo	Concentração da fase móvel
0 – 2min	90% de A
7min	50 % de A
22min	0 % de A
22 – 25min	0 % de A
27min	90 % de A
27 – 30min	90 % de A

As análises ocorreram sob fluxo constante de $0,2\text{mL min}^{-1}$ na temperatura da coluna de 40°C .

Foi utilizado um espectrômetro de massas da marca Bruker, equipado com fonte de ionização por *electrospray*, filtro de massas por quadrupolo e analisador por tempo de voo em sequência. Os compostos ionizados foram analisados no modo positivo com os seguintes parâmetros de operação: voltagem do capilar 4500V ; pressão do nebulizador 40psi ; gás de secagem 9L min^{-1} ; temperatura do gás 200°C ; as massas (m/z) selecionadas para análise foram de 50 a $1000m/z$, conforme proposto por Ortega et al. (2012).

Para a calibração interna do equipamento foi utilizado formiato de sódio (10mM). Para a identificação dos compostos foi utilizado o *software* DataAnalysis a partir da relação massa carga (m/z), levando em consideração a adição de um próton na molécula $[M + H]^+$ e a possível presença de adutos. A tolerância de variação da massa exata foi de 5ppm e a variação do tempo de retenção foi de 0,5 min em relação ao tempo dos padrões. Os analitos pesquisados foram identificados a partir de bibliotecas *online* (KEGG, ChEBI e ChemSpider) e confirmados pela massa exata comparada com os padrões. O processamento das curvas de calibração e dos dados de quantificação foi realizado utilizando o *software* Quany Analysis.

4.4 Validação dos parâmetros analíticos

A metodologia de detecção e quantificação foi validada para os padrões de micotoxinas (deoxivalenol, zearalenona, fumonisina B₁, ocratoxina A, aflatoxina B₁, B₂, G₁ e G₂) e de fungicidas (trifloxistrobina, protioconazol, epoxiconazol, piraclostrobina) utilizando os parâmetros de faixa de linearidade, limite de quantificação e detecção, exatidão, precisão e especificidade (AOAC 2002; ICH - GUIDELINE, 2005). Os resultados obtidos foram avaliados segundo normas estabelecidas pela AOAC (2002).

4.4.1 Faixa de linearidade

As curvas analíticas foram construídas para cada substância de referência a partir de diluição seriada na proporção 1:1 em acetonitrila. Foram utilizados 11 pontos compreendidos na faixa de concentração de 5 a 5000ng mL⁻¹ para deoxivalenol, aflatoxina (B₁, B₂, G₁, G₂), ocratoxina A, zearalenona, trifloxistrobina, protioconazol, piraclostrobina e epoxiconazol; para fumonisina B₁ a faixa foi de 156 a 5000ng mL⁻¹. Também foram construídas curvas analíticas no extrato da matriz (trigo) obtido conforme o item 4.5, seguindo o mesmo procedimento. Cada ponto foi injetado em triplicata. Para o cálculo do teor de micotoxinas e fungicidas foi utilizada a curva analítica elaborada em extrato de amostra.

4.4.2 Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)

A partir da linearidade das curvas analíticas dos fungicidas e das micotoxinas em matriz e em solvente, procedeu-se a estimativa do LD e do LQ, que foram determinados com base no coeficiente angular e no desvio padrão (σ) do coeficiente linear da curva analítica (Equação 1 e 2) (ANVISA, 2003).

$$LD = 3 \times (\sigma \times \text{coeficiente linear}) / \text{coeficiente angular} \quad (1)$$

$$LQ = 10 \times (\sigma \times \text{coeficiente linear}) / \text{coeficiente angular} \quad (2)$$

Onde:

σ = desvio padrão

4.4.3 Exatidão

A exatidão foi determinada a partir de ensaios de recuperação que consistiram na adição dos padrões ao extrato de matriz de trigo, obtido conforme o item 4.5, em triplicata.

Os extratos foram fortificados com aflatoxinas (B_1 , B_2 , G_1 , G_2), ocratoxina A, deoxivalenol, zearalenona, trifloxistrobina, protioconazol, epoxiconazol, piraclostrobina em três concentrações: baixa ($19,5\text{ng mL}^{-1}$), intermediária (312ng mL^{-1}) e alta (5000ng mL^{-1}); para a fumonisina B_1 os pontos foram 156ng mL^{-1} , 625ng mL^{-1} e 5000ng mL^{-1} . Tendo como referência a faixa de concentração da curva analítica.

Para a obtenção do percentual de recuperação foi utilizada a Equação 3.

$$\% \text{ Recuperação} = [(\text{Área}_{\text{am} + \text{pad}} - \text{Área}_{\text{am}}) / \text{Área}_{\text{pad}}] \times 100 \quad (3)$$

Onde:

$\text{Área}_{\text{am} + \text{pad}}$ = área do pico da amostra fortificada com o padrão

Área_{am} = área da amostra não fortificada

Área_{pad} = área do pico do padrão

4.4.4 Precisão

A precisão foi determinada pela repetitividade, injetando um *mix* com todos os padrões de micotoxinas e fungicidas em três concentrações: baixa ($19,5\text{ng mL}^{-1}$),

intermediária (312ng mL^{-1}) e alta (5000ng mL^{-1}); exceto para a fumonisina B₁ que os pontos foram 156ng mL^{-1} , 625ng mL^{-1} e 5000ng mL^{-1} . Todos os pontos foram injetados no mesmo dia e em triplicata.

A precisão intermediária foi determinada conforme a repetitividade, no entanto as injeções foram realizadas em triplicata, em três dias consecutivos. Os resultados foram avaliados através do coeficiente de variação (CV) conforme a Equação 4.

$$CV = (\sigma/\text{CMD}) \times 100 \quad (4)$$

Onde:

σ = Desvio padrão

CMD = Concentração Média Determinada

4.4.5 Especificidade e Seletividade

A seletividade foi avaliada comparando os cromatogramas obtidos no sistema LC-ESI-QToF-MS a partir da injeção dos extratos fortificados e não-fortificados. Avaliou-se a ocorrência de co-eluição de interferentes advindos da matriz com os analitos de interesse.

4.4.6 Efeito de matriz

Para determinação do efeito de matriz foram realizadas análises com o extrato da matriz (obtido conforme descrito no item 4.5) e com o extrato diluído 2 e 5 vezes. O extrato utilizado para este ensaio foi previamente analisado e verificou-se a ausência dos analitos de interesse (micotoxinas e fungicidas).

Para a verificação do efeito de matriz o extrato foi fortificado, em triplicata, em três concentrações levando sempre em consideração a faixa linear da curva analítica dos padrões: baixa ($19,5\text{ng mL}^{-1}$), intermediária (312ng mL^{-1}) e alta (5000ng mL^{-1}); exceto para a fumonisina B₁ que os pontos foram 156ng mL^{-1} , 625ng mL^{-1} e 5000ng mL^{-1} . A percentagem do efeito de matriz (EM) foi calculada a partir da Equação (5).

$$ME = \{[\text{Área do pico (analito com extrato)}/\text{Área do pico (analito em solvente)}] - 1\} \quad (5)$$

4.5 Método de extração

O método de extração foi baseado no método proposto por González et al. (2012) e a parte de *clean up* conforme proposto por Anastassiades e Lehotay (2003).

Em tubos tipo Falcon de 50mL foram pesados 5g de amostra, em triplicata, adicionados 5mL de água, homogeneizados e mantidos durante 1h em repouso. Posteriormente, foram adicionados 10mL de acetonitrila contendo ácido acético (1% v/v) e os tubos foram agitados durante 1min em vortex. Em seguida, 4g de sulfato de magnésio anidro ($MgSO_4$) e 1,5g de acetato de sódio foram adicionados, seguido de agitação durante 1min em vortex e centrifugação a 5000rpm ($4136 \times g$) durante 5min. Para a etapa de *clean up*, uma alíquota de 5mL do sobrenadante foi transferida para um tubo de centrífuga de 15mL contendo 300mg de $MgSO_4$ e 100mg de PSA. O extrato foi agitado em vortex durante 20s e centrifugado novamente a 5000rpm durante 5min. As amostras foram transferidas para vials e injetadas, em triplicata, em LC-ESI-QToF-MS.

4.6 Preparo da amostra

A homogeneização das amostras para a avaliação dos contaminantes foi realizada através de agitação, com posterior acondicionamento em recipiente retangular, para realização do quarteamento (Figura 18), obtendo-se entre 100 e 120g que foram moídos em moinho de martelos (Perten, modelo Laboratory Mill 3100) (Figura 19).



Figura 18 - Redução por quarteamento da amostra.



Figura 19 - Moinho de martelos, Perten (A) e moinho analítico (IKA, A11 basic).

Para a padronização da granulometria foi utilizada uma peneira vibratória (Figura 20), sendo coletada a amostra passante de 32 mesh (abertura de 0,500mm). A amostra retida foi triturada novamente utilizando um moinho analítico (IKA, A11 basic) até o material não ficar mais retido na peneira de 32 mesh. Para isto foi adicionado nitrogênio líquido (quatro vezes) durante a trituração que durava cerca de 15s após cada adição.



Figura 20 - Partículas retidas na peneira 32 mesh.

Após, pesou-se 50g de cada amostra, oriunda do mesmo tratamento dentro da área 1 (Anexo A), misturou-se e homogeneizou-se, originando uma nova amostra (*mix*) de aproximadamente 200g. As novas amostras foram quarteadas, separando-se quantidade suficiente para a realização da extração dos contaminantes, em triplicata. O restante da amostra foi identificada e armazenada sob congelamento, caso fosse necessária alguma repetição.

4.7 Delineamento experimental para obtenção da matriz

A matriz utilizada neste estudo, o trigo, foi proveniente de um experimento realizado com o objetivo de avaliar o controle de doenças fúngicas na planta, principalmente a giberela, após sucessivas aplicações, de forma isolada ou em mistura, de diferentes princípios ativos de fungicidas. O experimento foi realizado com a distribuição casualizada dos tratamentos, conforme apresentado no Quadro 1 (Anexo A), no município de Piratini-RS em 2014. Cada repetição foi composta por parcelas 2 x 5m. Os tratos culturais foram seguidos conforme indicado no boletim técnico da Embrapa – Informações técnicas para trigo e triticale – Safra 2013 (RIDIE et al., 2013).

As plantas de trigo da cultivar TBIO Alvorada (*Triticum aestivum*) foram submetidas à aplicação de 3 diferentes fungicidas: Fox, Opera e Unizeb Gold, os quais foram aplicados separadamente e em mistura, com a dose máxima recomendada para a cultura e com a metade da dose recomendada (Tabela 4). O fungicida Fox tem como princípio ativo a trifloxistrobina [concentração de 150,0g L⁻¹ (15,0% m/v)] e o protioconazol [175,0g L⁻¹ (17,5% m/v)]; os princípios ativos do Opera são o epoxiconazol [50g L⁻¹ (5,0% m/v)] e a piraclostrobina [133g L⁻¹ (13,3% m/v)]; o princípio ativo do Unizeb Gold é o mancozebe que está na concentração de 750g kg⁻¹ (75% m/m), os demais ingredientes são inertes. A utilização dos princípios ativos citados foram somente os fins relacionados aos testes propostos, não tem o objetivo e apoiar ou condenar o emprego dos mesmos. As aplicações dos fungicidas foram realizadas nos estádios fenológicos de emborrachamento, florescimento e enchimento de grão, em parcelas distintas, respeitando a aplicação dos fungicidas em sua respectiva parcela. Totalizando três aplicações em cada tratamento.

Tabela 4 - Tratamentos aplicados nas plantas de trigo, princípios ativos dos fungicidas utilizados e as doses aplicadas em cada tratamento

Tratamento	Princípio ativo	Doses aplicadas
T1 – Controle	-	-
T2 – Fox	Trifloxistrobina (15% m/v) Protioconazol (5% m/v)	0,4L ha ⁻¹
T3 – Opera	Epoxiconazol (5% m/v) Piraclostrobina (13,3% m/v)	1L ha ⁻¹
T4 – Unizeb Gold	Mancozebe (75% m/m)	2kg ha ⁻¹
T5 – 100% de Fox e 100% de Unizeb Gold	Trifloxistrobina (15% m/v) Protioconazol (5% m/v) Mancozebe (75% m/m)	0,4L ha ⁻¹ + 2kg ha ⁻¹
T6 – 50% de Fox e 50% de Unizeb Gold	Trifloxistrobina (15% m/v) Protioconazol (5% m/v) Mancozebe (75% m/m)	0,2L ha ⁻¹ + 1kg ha ⁻¹
T7 – 100% de Opera e 100% de Unizeb Gold	Epoxiconazol (5% m/v) Piraclostrobina (13,3% m/v) Mancozebe (75% m/m)	1L ha ⁻¹ + 2kg ha ⁻¹
T8 – 50% de Opera e 50% de Unizeb Gold	Epoxiconazol (5% m/v) Piraclostrobina (13,3% m/v) Mancozebe (75% m/m)	0,5L ha ⁻¹ + 1kg ha ⁻¹

A colheita do trigo, 30 dias após a última pulverização do fungicida, foi de forma manual e a trilha foi realizada com uma trilhadeira mecânica (EDA, modelo TR. PARCELA). Os grãos foram coletados separadamente, secos em estufa a 40°C até atingirem a umidade de 13% e armazenados em geladeira a 5°C, separadamente em sacos de papel, até a realização das análises.

4.8 Limpeza de vidrarias e tratamento de resíduos

Segundo o Instituto Adolfo Lutz (2008) é necessário fazer uma etapa de descontaminação imergindo os materiais em hipoclorito de sódio 5% durante, no mínimo, 30min. Esse procedimento foi realizado para todos os materiais que foram utilizados no preparo dos padrões de micotoxinas e na extração das amostras. Posteriormente, as vidrarias foram enxaguadas com acetona e lavadas normalmente. Todos solventes orgânicos utilizados para a descontaminação ou para a extração das amostras foram colocados em frascos adequados e identificados para posterior tratamento.

4.9 Análise estatística

As análises de micotoxinas e fungicidas foram realizadas em triplicata. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado. Os resultados foram avaliados por análise de variância (ANOVA) e quando houve significância a comparação dos tratamentos foi realizada pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 LC-ESI-QToF-MS

Com relação aos modos de ionização as aflatoxinas (Figura 21), o deoxinivalenol, (Figura 22), a ocratoxina A (Figura 23) e a fumonisina B₁ (Figura 24) apresentaram ionização mais eficiente no modo positivo, ou seja, a intensidade dos picos foi maior. Os fungicidas trifloxistrobina (Figura 25), epoxiconazol (Figura 26) e piraclostrobina (Figura 27) só foram detectados no modo positivo. É possível verificar, nos cromatogramas referente a cada molécula, a ausência do pico no modo negativo, ou seja, havia picos no provável tempo de retenção de cada molécula analisada, porém não foram detectados, tampouco foi verificada a presença de adutos.

A zearalenona (Figura 28) e o protioconazol (Figura 29) foram as únicas moléculas que apresentaram uma melhor ionização no modo negativo, porem foram identificadas no modo positivo. Assim, como a maioria dos compostos ionizou melhor no modo positivo optou-se por utilizar este modo. A aflatoxina B₂ e a G₁

eluíram em tempos de retenção muito próximos (Figura 30), mesmo assim foi possível a identificação de todas aflatoxinas.

Ortega et al. (2012) analisaram alguns desses compostos (protioconazol, piraclostrobina, trifloxistrobina, ocratoxina A, zearalenona, fumonisina B₁, aflatoxina B₁, B₂, G₁ e G₂) e também optaram pela ionização em modo positivo.

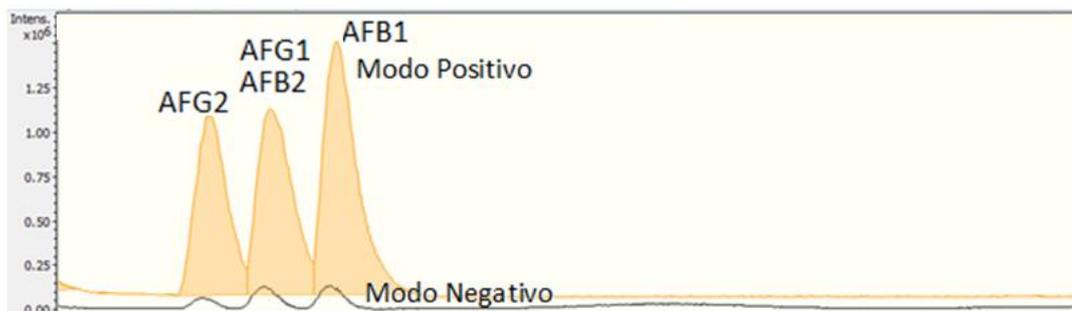


Figura 21 - Cromatograma de íons de aflatoxina (A₁, A₂, B₁ e B₂) no modo positivo (linha amarela) e no modo negativo (linha preta).



Figura 22 - Cromatograma de íons deoxivalenol no modo positivo (linha preta) e no modo negativo (linha azul).

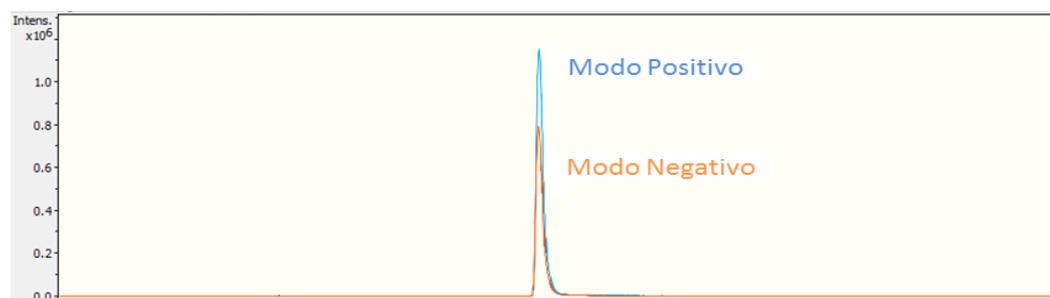


Figura 23 - Cromatograma de íons de ocratoxina A no modo positivo (linha azul) e no modo negativo (linha laranja).

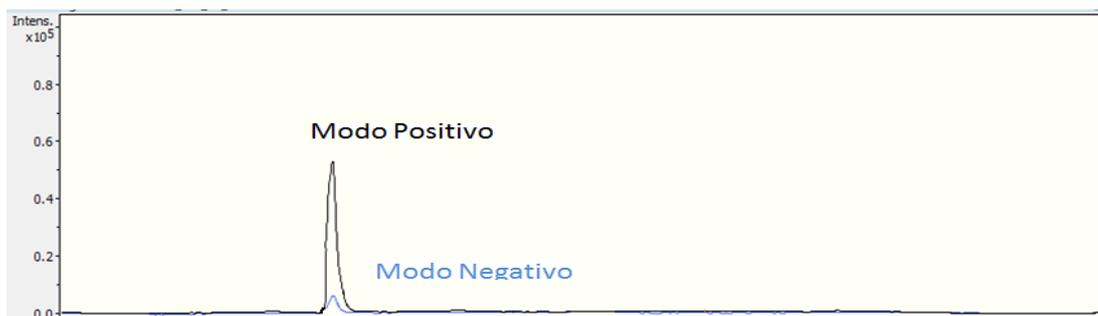


Figura 24 - Cromatograma de íons de fumonisina B₁ no modo positivo (linha preta) e no modo negativo (linha azul).



Figura 25 - Cromatograma de íons de trifloxistrobina no modo positivo (linha laranja) e no modo negativo (linha preta).

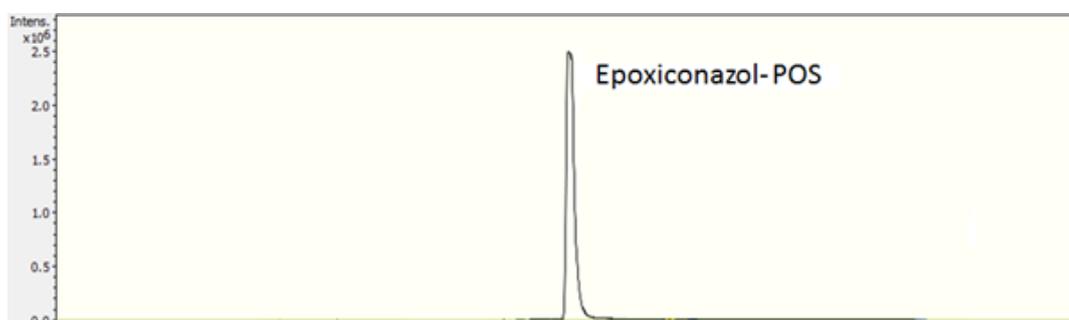


Figura 26 - Cromatograma de íons de epoxiconazol no modo positivo (linha preta) e no modo negativo (linha verde).

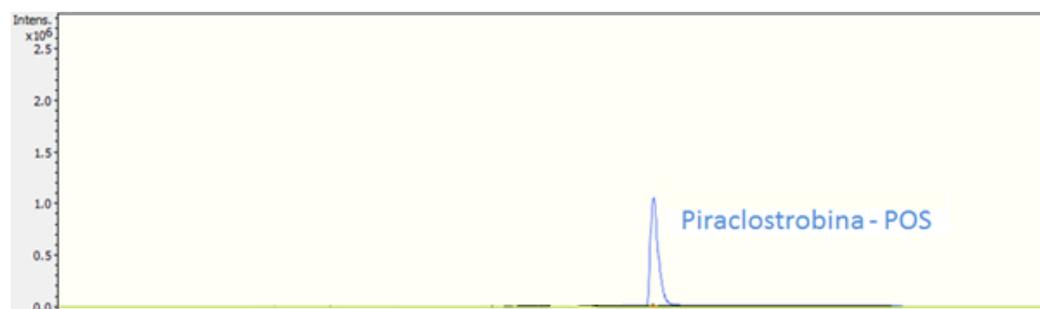


Figura 27 - Cromatograma de íons de piraclostrobina no modo positivo (linha azul) e no modo negativo (linha verde).

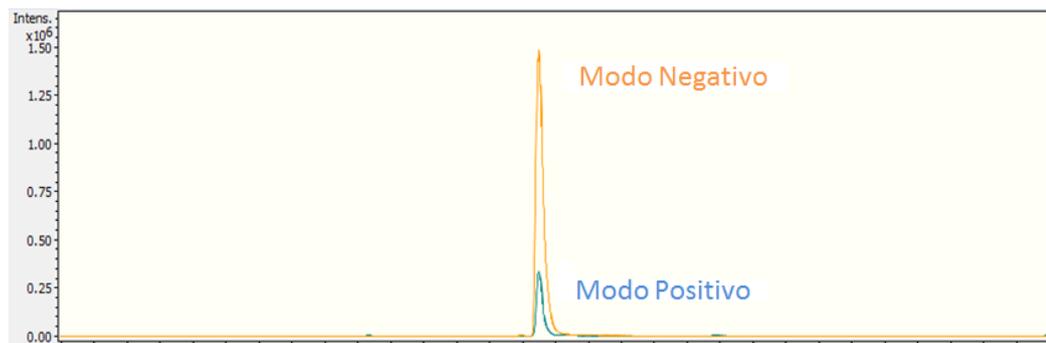


Figura 28 - Cromatograma de íons de zearalenona no modo positivo (linha azul) e no modo negativo (linha laranja).

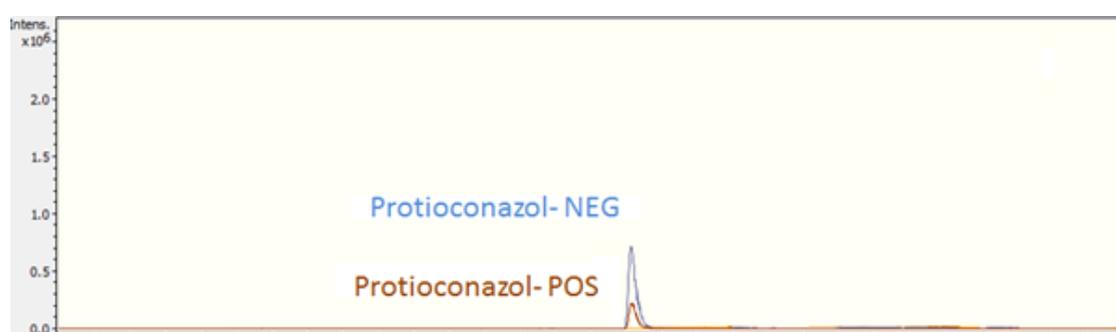


Figura 29 - Cromatograma de íons de protioconazol modo positivo (linha marrom) e no modo negativo (linha azul).

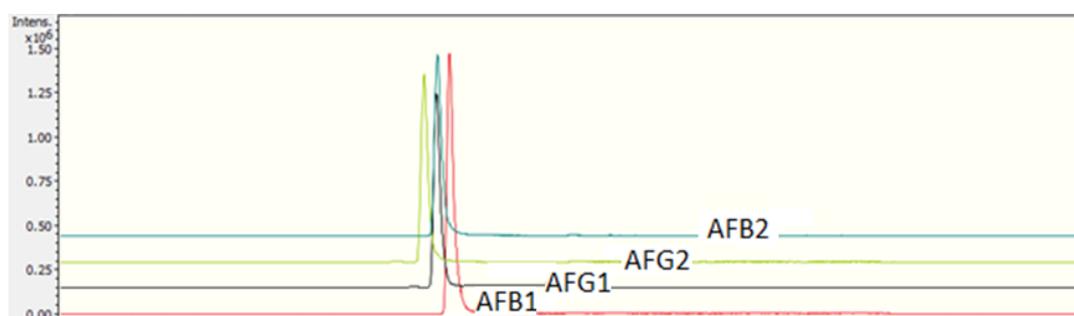


Figura 30 - Separação das aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂.

Os compostos apresentam melhor ionização em modo positivo do que em modo negativo quando possuem grupamentos que protonam com facilidade, como é o caso das moléculas que apresentam grupamentos básicos como aminas, amidas e ésteres. Moléculas com grupamentos ácidos, como por exemplo, ácidos carboxílicos, compostos fenólicos, entre outros, são mais facilmente desprotonados, ou seja, terão uma melhor resposta de ionização quando analisados em modo negativo (CROTTI et al., 2006).

O fungicida mancozebe foi injetado no sistema LC-ESI-QToF-MS e diretamente no espectrômetro de massas (ESI-QToF-MS), nos dois modos de

ionização (positivo e negativo), porém não foi detectado nenhum íon que confirmasse sua presença. Kinney et al. (2004) também não foram capazes de detectar mancozebe por LC-ESI-MS devido às suas características poliméricas e dificuldade de solubilização. Outros métodos são utilizados para estimar o mancozebe e o mais comum utiliza a decomposição de mancozebe em dissulfeto de carbono (CS₂) por digestão em meio ácido na presença de cloreto de estanho e quantificação por espectrofotometria (PERZ et al., 2000; HAYAMA e TAKADA, 2008; SINGH et al., 2009).

Desta forma, optou-se por não determiná-lo, pois seria necessário testar a metodologia de decomposição do mancozebe e isto implicaria em verificar o efeito da reação de decomposição sobre os demais analitos investigados neste trabalho, além de adquirir reagentes caros e correr o risco de não ter padrão das micotoxinas em quantidade suficiente.

A Tabela 5 apresenta os compostos avaliados neste trabalho com as respectivas fórmulas moleculares, massas e tempo de retenção (TR) nas condições descritas no item 4.3.

Tabela 5 - Fórmula estrutural, massa molecular protonada e tempo de retenção (TR) dos padrões

Padrão	Fórmula	Massa [M + H]	TR
AFB ₁	C ₁₇ H ₁₂ O ₆	313.0707	9,45
AFB ₂	C ₁₇ H ₁₄ O ₆	315.0863	9,12
AFG ₁	C ₁₇ H ₁₂ O ₇	329.0656	9,08
AFG ₂	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	331.0812	8,74
DON	C ₁₅ H ₂₀ O ₆	297.1332	1,64
OTA	C ₂₀ H ₁₈ O ₆ NCl	404.0895	11,69
ZEA	C ₁₈ H ₂₂ O ₅	319.1540	11,74
FB ₁	C ₃₄ H ₅₉ NO ₁₅	722.3957	8,53
Epoxiconazol	C ₁₇ H ₁₃ ClFN ₃ O	330.0804	12,26
Piraclostrobina	C ₁₉ H ₁₈ ClN ₃ O ₄	388.1059	14,90
Protioconazol	C ₁₄ H ₁₅ Cl ₂ N ₃ OS	344.0386	13,18
Trifloxistrobina	C ₂₀ H ₁₉ F ₃ N ₂ O ₄	409.1370	15,98

Aflatoxina (AFB₁, AFB₂, AFG₁ e AFG₂), deoxinivalenol (DON), ocratoxina A (OTA), zearalenona (ZEA) e fumonisina B₁ (FB₁).

5.2 Validação dos parâmetros analíticos

5.2.1 Linearidade e curva analítica

A linearidade ou faixa linear foi calculada a partir da equação da reta, conhecida como curva analítica. A Tabela 6 apresenta os valores dos coeficientes de determinação (r^2) para as equações das curvas analíticas em solvente (acetonitrila) e no extrato de trigo.

Tabela 6 - Coeficiente de determinação das micotoxinas e fungicidas em solvente e em extrato de matriz

Analitos	Equação	Solvente	Coeficiente de determinação (r^2)	
			Equação	Matriz
AFB ₁	$y = 877.97x + 59290$	0,9998	$y = 246.03x - 38699$	0,9932
AFB ₂	$y = 764.33x + 240282$	0,9983	$y = 240.73x + 1782.8$	0,9985
AFG ₁	$y = 664.66x + 78092$	0,9996	$y = 200.6x - 29447$	0,9975
AFG ₂	$y = 655.72x + 27295$	0,9996	$y = 129.92x - 12576$	0,9979
DON	$y = 53.222x + 15526$	0,9990	$y = 53.222x + 15526$	0,9771
OTA	$y = 477.77x - 66789$	0,9996	$y = 156.47x + 1006.8$	0,9994
ZEA	$y = 144.25x + 22296$	0,9984	$y = 30.933x - 1174.4$	0,9958
FB ₁	$y = 181.38x - 85027$	0,9982	$y = 181.38x -$	0,9941

			85027	
Epoxiconazol	$y = 6981.4x + 52767$	0,9997	$y = 418.1x + 87114$	0,9994
Piraclostrobina	$y = 1022.1x + 240894$	0,9977	$y = 154.15x + 7181.6$	0,9955
Protioconazol	$y = 163.86x - 65763$	0,9975	$y = 14.032x + 1678.3$	0,9978
Trifloxistrobina	$y = 2073.9x + 297896$	0,9978	$y = 249.13x + 61931$	0,9923

Aflatoxina (AFB₁, AFB₂, AFG₁ e AFG₂), deoxinivalenol (DON), ocratoxina A (OTA), zearalenona (ZEA) e fumonisina B₁ (FB₁).

Todas as curvas analíticas apresentaram valores superiores a 0,99 para o coeficiente de determinação (r^2) atendendo a recomendação da ANVISA (2003), exceto o deoxinivalenol elaborado em extrato de matriz que apresentou um coeficiente de correlação de 0,9771, porém ainda dentro do limite recomendado pelo INMETRO (2003), que é acima de 0,90. Quanto mais próximo de 1 for o r^2 , maior o ajuste dos dados. As curvas apresentaram linearidade na faixa de concentração estudada, comprovando que os resultados obtidos são proporcionais a estas concentrações.

5.2.2 Limite de detecção e quantificação

O LD e o LQ foram calculados a partir do coeficiente angular e do desvio padrão (s) do coeficiente linear da curva analítica (Tabela 7).

Em acetonitrila todos os analitos apresentaram valores de LD e LQ menores que os analitos em extrato de matriz. Possivelmente, os componentes da matriz exerceram alguma interferência que provocou a supressão do sinal dos íons dos analitos.

Tabela 7 - Limite de detecção (LD) e quantificação (LQ) das micotoxinas e fungicidas em solvente (acetonitrila) e em extrato de matriz de trigo

	LD ($\eta\text{g mL}^{-1}$) em solvente	LQ ($\eta\text{g mL}^{-1}$) em solvente	LD ($\eta\text{g mL}^{-1}$) em extrato de matriz	LQ ($\eta\text{g mL}^{-1}$) em extrato de matriz
AFB ₁	1,21	3,68	1,44	4,38
AFB ₂	0,45	1,45	0,90	2,73
AFG ₁	0,53	1,61	2,09	6,34
AFG ₂	0,53	1,61	1,50	4,55
DON	0,76	2,29	2,21	5,32
OTA	0,56	1,69	1,53	4,63
ZEA	1,56	4,72	2,09	4,99
FB ₁	31,41	95,19	39,12	118,53
Epoxiconazol	0,85	2,58	1,96	5,92
Piraclostrobina	0,53	1,61	1,17	3,53
Protioconazol	1,50	4,53	1,64	4,98
Trifloxistrobina	1,06	3,21	2,28	6,90

LD – Limite de detecção; LQ – Limite de quantificação. Aflatoxina (AFB₁, AFB₂, AFG₁ e AFG₂), deoxinivalenol (DON), ocratoxina A (OTA), zearalenona (ZEA) e fumonisina B₁ (FB₁).

5.2.3 Exatidão

Para a análise de exatidão foram realizados ensaios de recuperação instrumental, ou seja, o extrato da matriz foi fortificado em três concentrações: baixa ($19,5\eta\text{g mL}^{-1}$), intermediária ($312\eta\text{g mL}^{-1}$) e alta ($5000\eta\text{g mL}^{-1}$), utilizando como base a faixa linear da curva analítica (Tabela 8). A média de recuperação variou, para as micotoxinas de $81\% \pm 6$ a $94\% \pm 4$ e para os fungicidas de $85\% \pm 2$ a $89\% \pm 2$. A ANVISA (2003) e SANCO (2013) estabelece a faixa aceitável entre 70 a 120% e a AOAC (2002) recomenda a faixa entre 70 a 125% para analitos na concentração de $\mu\text{g kg}^{-1}$ (ppb). Os valores de recuperação foram aceitáveis ficando dentro do limite especificado pelas diretrizes da ANVISA (2003) e AOAC (2002).

Tabela 8 - Análise do percentual de recuperação das micotoxinas e fungicidas

	% Recuperação			
	Baixo*	Médio*	Alto*	Média
AFB ₁	93	83	77	91 ± 3
AFB ₂	84	82	78	81 ± 3
AFG ₁	97	89	82	94 ± 4
AFG ₂	94	87	81	89 ± 4
DON	77	86	88	84 ± 6
OTA	94	85	83	87 ± 6
ZEA	89	88	85	87 ± 2
FB ₁ **	89	91	86	89 ± 3
Epoxiconazol	88	87	85	87 ± 2
Piraclostrobina	91	89	87	89 ± 2
Protioconazol	84	87	77	85 ± 2
Trifloxistrobina	77	88	87	88 ± 1

* Níveis de fortificação, levando em conta a linearidade da curva analítica. ** níveis de concentração 156ng mL⁻¹ (baixo), 625ng mL⁻¹ (médio), e 5000ng mL⁻¹ (alto). Aflatoxina (AFB₁, AFB₂, AFG₁ e AFG₂), deoxinivalenol (DON), ocratoxina A (OTA), zearalenona (ZEA) e fumonisina B₁ (FB₁).

5.2.4 Precisão

A avaliação da precisão instrumental foi obtida a partir da repetitividade e da precisão intermediária. A partir da análise dos dados apresentados na Tabela 9, pode-se verificar que o coeficiente de variação, tanto para a repetitividade quanto para a precisão intermediária, ficaram abaixo de 5%. A AOAC (2002) sugere que para analitos encontrados em concentração de ppb ($\mu\text{g kg}^{-1}$) o coeficiente de variação (CV%) seja até 15% e o CV% para os analitos em concentrações de ppm ($\mu\text{g g}^{-1}$) seja de até 6%. A SANCO estabelece que o desvio padrão deve ser menor que 20%. Portanto, o método analítico é preciso.

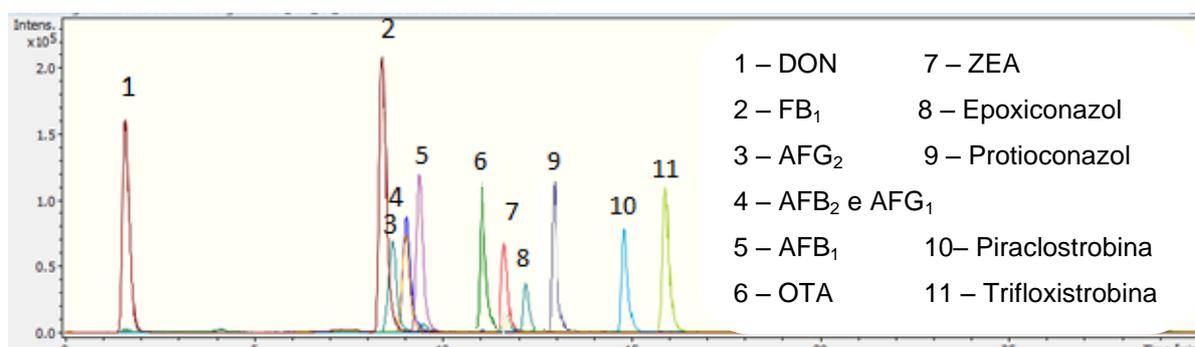
Tabela 9 - Ensaios de repetitividade e precisão intermediária

	Repetitividade*			Precisão intermediária*		
	Baixo**	Médio**	Alto**	Baixo**	Médio**	Alto**
AFB ₁	0,71	3,10	0,70	4,87	3,38	3,39
AFB ₂	1,66	0,90	0,55	1,92	2,57	2,78
AFG ₁	3,59	2,31	1,19	1,04	4,21	3,07
AFG ₂	2,23	1,02	0,85	1,77	4,04	3,97
DON	3,76	4,66	4,78	1,53	4,26	2,59
OTA	0,38	0,45	1,96	4,31	4,15	3,45
ZEA	1,29	1,89	2,01	3,14	2,77	1,66
FB ₁	1,46	2,49	1,91	3,60	2,85	2,20
Epoxiconazol	0,25	0,60	0,35	3,89	4,85	4,95
Piraclostrobina	1,32	3,45	0,63	2,13	2,96	2,41
Protioconazol	2,06	2,11	0,59	1,99	3,71	2,68
Trifloxistrobina	2,12	1,38	0,45	2,25	4,44	4,87

*valores expressos em CV%; ** Níveis de fortificação, levando em conta a linearidade da curva analítica. Aflatoxina (AFB₁, AFB₂, AFG₁ e AFG₂), deoxinivalenol (DON), ocratoxina A (OTA), zearalenona (ZEA) e fumonisina B₁ (FB₁).

5.2.5 Especificidade e seletividade

O método de análise utilizando cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas é considerado altamente seletivo. Neste trabalho foi verificada a ausência de interferentes com íons de mesma relação massa/carga no mesmo tempo de retenção dos analitos avaliados (Figura 31).



Deoxinivalenol (DON), fumonisina B₁ (FB₁), Aflatoxina (AFB₁, AFB₂, AFG₁ e AFG₂), ocratoxina A (OTA), e zearalenona (ZEA).

Figura 31 - Cromatograma das micotoxinas e fungicidas.

Os picos correspondentes aos analitos de interesse foram confirmados utilizando o *software* Data Analysis através da comparação da relação massa/carga $[M + H]^+$ dos padrões com as bibliotecas *online* (KEGG, ChEBI, e ChemSpider), além da comparação do espectro de massas (MS) do íon precursor da fumonisina B₁ (Figura 32), aflatoxina B₁ (Figura 33), aflatoxina B₂ (Figura 34), aflatoxina G₁ (Figura 35), aflatoxina G₂ (Figura 36), zearalenona (Figura 37), ocratoxina A (Figura 38), deoxinivalenol (Figura 39), protioconazol (Figura 40), trifloxistrobina (Figura 41), epoxiconazol (Figura 42) e piraclostrobina (Figura 43). Os picos foram também confirmados pela comparação do espectro UV de cada analito da amostra com os dos padrões (Anexo B - Tabela 1).

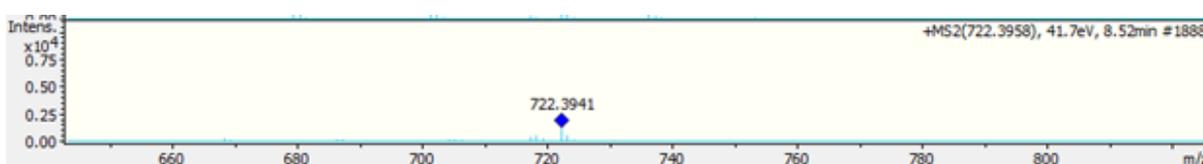


Figura 32 - Espectro de massas da fumonisina B₁.

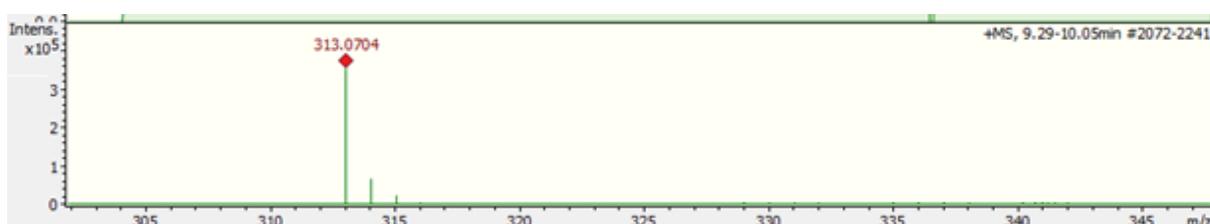


Figura 33 - Espectro de massas da aflatoxina B₁.

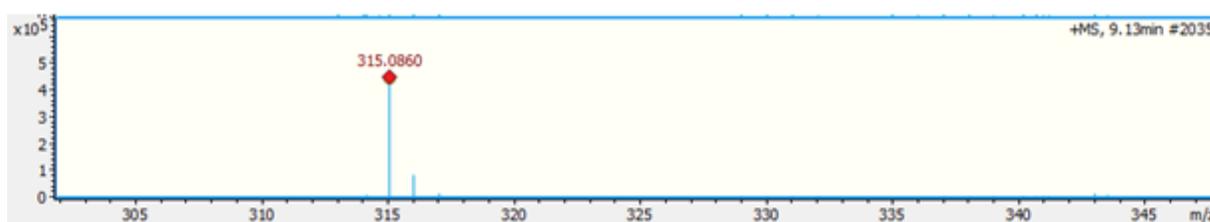


Figura 34 - Espectro de massas da aflatoxina B₂.

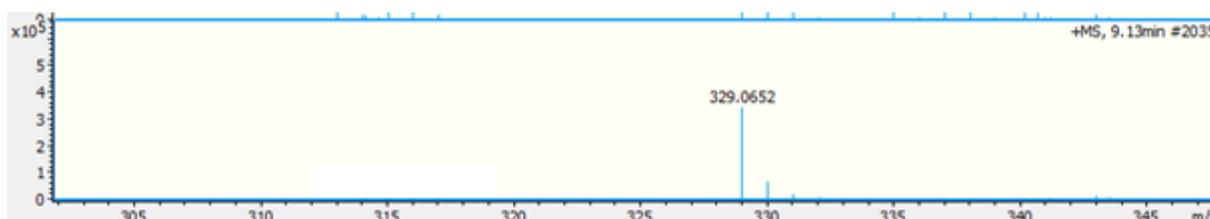


Figura 35 - Espectro de massas da aflatoxina G₁.

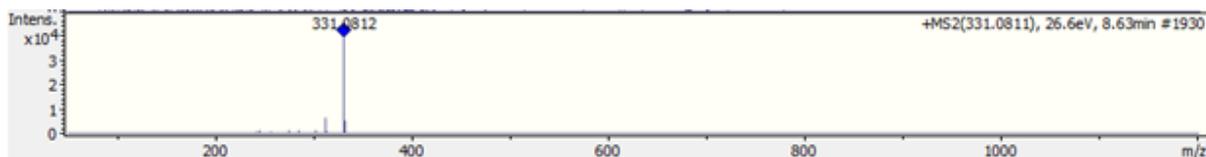
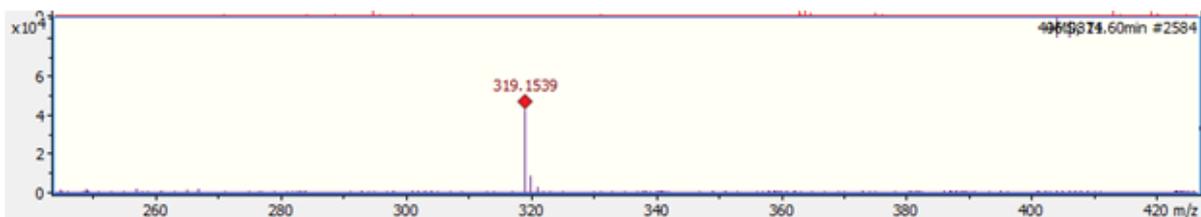
Figura 36 - Espectro de massas da aflatoxina G₂.

Figura 37 - Espectro de massas da zearalenona.

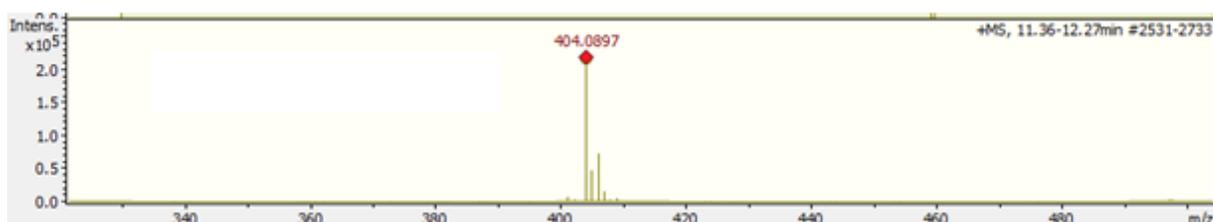


Figura 38 - Espectro de massas da ocratoxina A.

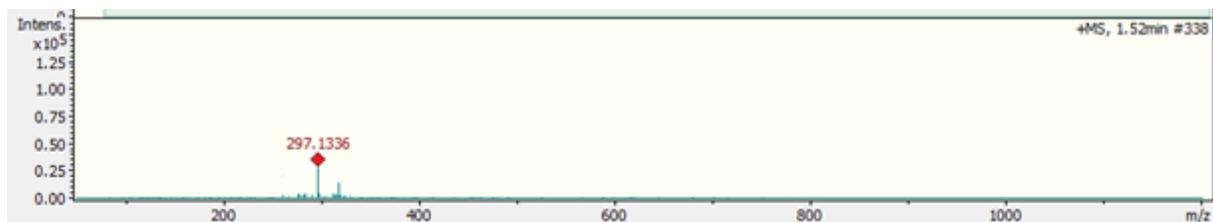


Figura 39 - Espectro de massas da deoxinivalenol.

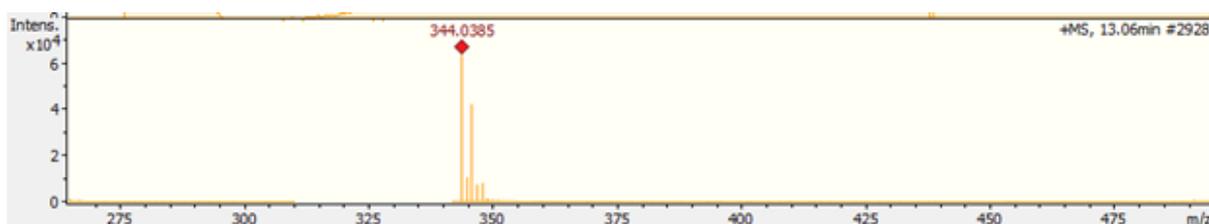


Figura 40 - Espectro de massas da prothioconazol.

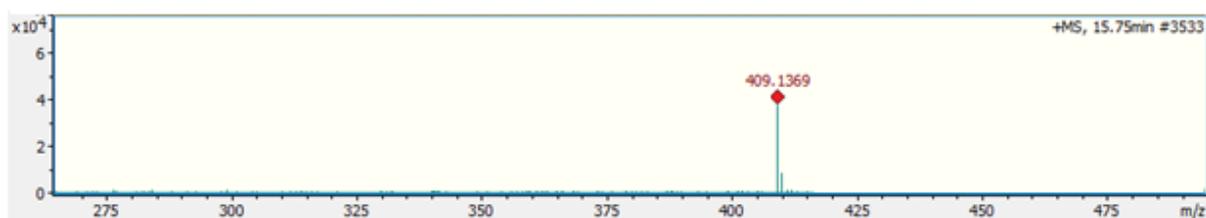


Figura 41 - Espectro de massas da trifloxistrobina.

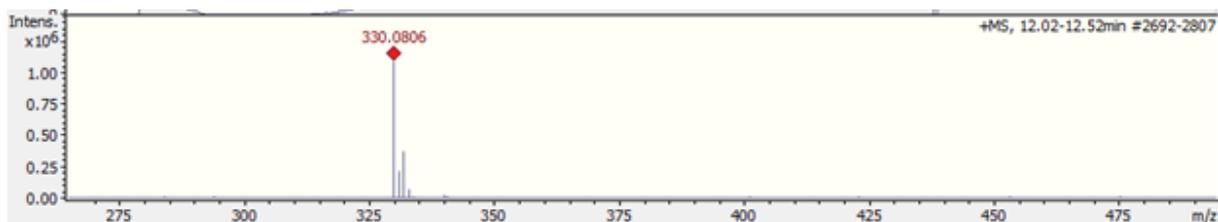


Figura 42 - Espectro de massas da epoxiconazol.

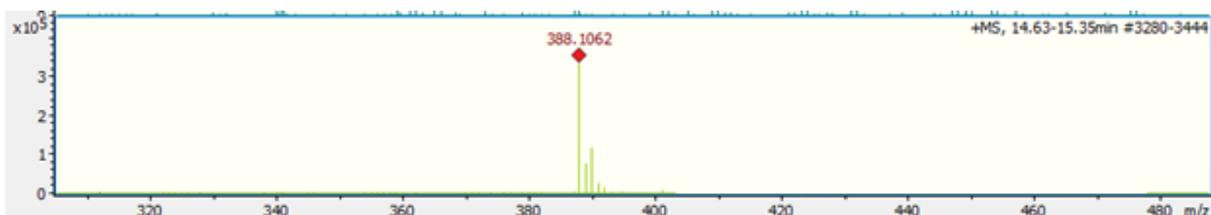


Figura 43 - Espectro de massas da piraclostrobina.

A partir das técnicas utilizadas para verificação da seletividade ou pureza de cada pico pode-se afirmar que o método é seletivo para os analitos estudados, sendo possível a quantificação sem a interferência de elementos co-extraídos advindos da matriz.

5.2.6 Efeito de matriz

A Tabela 10 apresenta os valores em percentagem do efeito da matriz (trigo) sobre as micotoxinas e fungicidas avaliados neste trabalho. É possível verificar que os interferentes da matriz exerceram uma supressão baixa sobre os analitos avaliados (acima de -20%). A maior supressão foi encontrada para a aflatoxina B₂ (-19 ± 3%).

A supressão dos íons pode ocorrer pela competição dos analitos de interesse com os componentes da matriz pelos íons na etapa de ionização; ou pelo aumento da tensão superficial ou da viscosidade provocada pelos componentes da matriz, dificultando a evaporação do solvente, fazendo com que os componentes não-voláteis da matriz co-precipitem e arrastem os analitos antes da formação dos íons gasosos (STAHNKE et al., 2012); ou ainda em função do tipo de fonte utilizada, condições de análise e configurações do espectro de massas, que podem variar entre os diversos modelos (FERRER et al., 2011).

A 11 apresenta a média dos valores dos pontos de concentração baixa, intermediária e alta para cada molécula nos fatores de diluição do extrato de 2 (FD2)

e 5 vezes (FD5) que foram realizadas na tentativa de reduzir o efeito de matriz para próximo de zero. Quanto maior o fator de diluição menor foi o efeito de matriz.

Tabela 10 - Efeito de matriz (%) sobre os analitos

	Baixo**	Médio**	Alto**	Média
AFB ₁	-7	-17	-23	-16 ± 8
AFB ₂	-16	-18	-22	-19 ± 3
AFG ₁	-3	-11	-18	-11 ± 8
AFG ₂	-6	-13	-19	-13 ± 7
DON	-23	-14	-12	-16 ± 6
OTA	-6	-15	-17	-13 ± 6
ZEA	-11	-12	-15	-13 ± 2
FB ₁	-11	-9	-14	-11 ± 3
Epoxiconazol	-12	-13	-15	-13 ± 2
Piraclostrobina	-9	-11	-13	-11 ± 2
Protioconazol	-16	-13	-23	-17 ± 5
Trifloxistrobina	-23	-12	-13	-16 ± 6

**Níveis de fortificação, levando em conta a linearidade da curva analítica. Aflatoxina (AFB₁, AFB₂, AFG₁ e AFG₂), deoxinivalenol (DON), ocratoxina A (OTA), zearalenona (ZEA) e fumonisina B₁ (FB₁).

Tabela 11 - Diluição da amostra para verificação do efeito de matriz sobre os sinais dos analitos

	FD2	FD5
AFB ₁	-15 ± 2	-12 ± 2
AFB ₂	-16 ± 3	-11 ± 3
AFG ₁	- 10 ± 2	-9 ± 2
AFG ₂	-13 ± 3	-10 ± 4
DON	-11 ± 4	-10 ± 2
OTA	-9 ± 3	-7 ± 2
ZEA	-12 ± 1	-11 ± 3
FB ₁	-10 ± 2	-8 ± 3
Epoxiconazol	-8 ± 2	-7 ± 2
Piraclostrobina	-7 ± 3	-3 ± 3
Protioconazol	-10 ± 2	-6 ± 5
Trifloxistrobina	-6 ± 3	-6 ± 2

*Fator de diluição: FD2 – duas vezes; FD5 – cinco vezes. Média dos pontos baixo, intermediário e alto. Aflatoxina (AFB₁, AFB₂, AFG₁ e AFG₂), deoxinivalenol (DON), ocratoxina A (OTA), zearalenona (ZEA) e fumonisina B₁ (FB₁).

5.3 Avaliação dos grãos de trigo

Na Tabela 12 estão expressos os valores de contaminação por aflatoxinas (B₁, B₂, G₁ e G₂), deoxinivalenol, fumonisina B₁, ocratoxina A e zearalenona em grãos de trigo submetidos aos seguintes tratamentos: T1 – controle (sem aplicação); T2 – Trifloxistrobina (15% m/v) e protioconazol (5% m/v) (0,4L ha⁻¹); T3 – Epoxiconazol (5% m/v) e piraclostrobina (13,3% m/v) (1L ha⁻¹); T4 – mancozebe (75% m/m) (2kg ha⁻¹); T5 – Trifloxistrobina (15% m/v), protioconazol (5% m/v) e mancozebe (75% m/m) (0,4L ha⁻¹ + 2kg ha⁻¹); T6 – Trifloxistrobina (15% m/v), protioconazol (5% m/v) e mancozebe (75% m/m) (0,2L ha⁻¹ + 1kg ha⁻¹); T7 – Epoxiconazol (5% m/v), piraclostrobina (13,3% m/v) e mancozebe (75% m/m) (1L ha⁻¹ + 2kg ha⁻¹); T8 – Epoxiconazol (5% m/v), piraclostrobina (13,3% m/v) e mancozebe (75% m/m) (0,5L ha⁻¹ + 1kg ha⁻¹).

Todas as amostras avaliadas apresentaram contaminação por micotoxinas. Inicialmente, esperava-se que a utilização dos fungicidas inibissem e/ou reduzissem a contaminação por micotoxinas nos grãos, porém não foi o que aconteceu, inclusive em alguns casos, houve um incremento na produção de micotoxinas, quando comparada ao controle. Em geral, as micotoxinas são produzidas quando o fungo

está sob estresse, ou seja, quando a temperatura, a atividade da água ou a quantidade de oxigênio tornam-se menos favoráveis ao seu desenvolvimento. A combinação de estresses por condições climáticas, associada à aplicação de agrotóxicos (fungicidas) em doses sub letais também podem causar estresse no fungo, aumentando a produção de micotoxinas (RAMIREZ et al., 2004).

Os teores de deoxinivalenol e zearalenona encontrados neste trabalho foram superiores aos limites máximos toleráveis estabelecidos pela legislação brasileira (RDC N°- 7, de 18 de fevereiro de 2011 e RDC n° 59, de 26 de dezembro de 2013, que prorroga os prazos estabelecidos pela primeira para adequação até 1° de janeiro de 2017) que estabelece o valor máximo de 1000 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para o trigo integral. As demais micotoxinas não são mencionadas especificamente para o trigo integral nesta legislação. O limite máximo tolerável de ocratoxina A em cereais em geral é de 20 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e de aflatoxina ($B_1 + B_2 + G_1 + G_2$) é de 5 $\mu\text{g kg}^{-1}$, estas micotoxinas também apresentaram acima do limite máximo tolerável para os grãos de trigo. Das cinco fumonisinas (A_1, A_2, B_1, B_2, B_3 e B_4) que podem ser encontradas em cereais a FB_1 é a predominante, representando 70% do total de contaminação (PERAICA et al., 1999).

Tabela 12 - Teor de aflatoxina (B₁, B₂, G₁ e G₂), deoxinivalenol, fumonisina B₁, ocratocina A e zearalenona ($\mu\text{g kg}^{-1}$) em amostras de trigo

Tratamento	AFB ₁	AFB ₂	AFG ₁	AFG ₂	DON	FB ₁	OTA	ZEA
T1(Controle)	489,01 ^a	185,26 ^f	334,92 ^b	242,81 ^c	3159,24 ^b	974,49 ^a	22,85 ^d	395,06 ^c
T2	255,84 ^b	260,73 ^b	362,53 ^a	227,88 ^e	2206,89 ^{de}	960,54 ^b	21,02 ^e	242,43 ^f
T3	252,99 ^b	257,99 ^b	319,77 ^d	Nd	2358,69 ^{de}	975,13 ^a	5,21 ^f	385,14 ^d
T4	253,35 ^b	264,59 ^a	327,62 ^c	172,01 ^f	3516,91 ^a	960,08 ^b	6,92 ^f	372,78 ^e
T5	66,34 ^f	199,07 ^e	328,78 ^c	318,93 ^a	2394,35 ^{cd}	944,41 ^c	26,82 ^c	1078,73 ^a
T6	74,81 ^e	209,66 ^d	306,49 ^e	284,10 ^b	2180,34 ^e	943,76 ^c	2,79 ^h	599,71 ^b
T7	158,92 ^d	262,62 ^a	329,79 ^c	232,45 ^d	2548,38 ^c	939,45 ^c	34,17 ^a	124,62 ^g
T8	193,65 ^c	244,17 ^c	335,34 ^b	233,09 ^d	3042,94 ^b	938,98 ^c	32,58 ^b	103,42 ^h

Médias seguidas por letras minúsculas diferentes na coluna diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Nd = molécula não detectada. T1 – controle (sem aplicação); T2 – Trifloxistrobina (15% m/v) e protioconazol (5% m/v) ($0,4\text{L ha}^{-1}$); T3 – Epoxiconazol (5% m/v) e piraclostrobina (13,3% m/v) (1L ha^{-1}); T4 – mancozebe (75% m/m) (2kg ha^{-1}); T5 – Trifloxistrobina (15% m/v), protioconazol (5% m/v) e mancozebe (75% m/m) ($0,4\text{L ha}^{-1} + 2\text{kg ha}^{-1}$); T6 – Trifloxistrobina (15% m/v), protioconazol (5% m/v) e mancozebe (75% m/m) ($0,2\text{L ha}^{-1} + 1\text{kg ha}^{-1}$); T7 – Epoxiconazol (5% m/v), piraclostrobina (13,3% m/v) e mancozebe (75% m/m) ($1\text{L ha}^{-1} + 2\text{kg ha}^{-1}$); T8 – Epoxiconazol (5% m/v), piraclostrobina (13,3% m/v) e mancozebe (75% m/m) ($0,5\text{L ha}^{-1} + 1\text{kg ha}^{-1}$).

Todos os tratamentos com fungicidas reduziram a aflatoxina B₁, quando comparados ao controle, sendo que os tratamentos T5 (trifloxistrobina, protioconazol e mancozebe) e T6 (trifloxistrobina, protioconazol e mancozebe; metade da concentração de T5) foram os mais eficazes, proporcionando uma redução de 86,4% e 84,7%, respectivamente em relação ao controle. Por outro lado, a quantidade encontrada de aflatoxina B₂ foi maior em grãos de trigo de plantas tratadas com fungicidas, porém os tratamentos T5 e T6 foram os tratamentos que tiveram os menores efeitos de indução sobre a produção AFB₂.

A maioria dos tratamentos efetuados no trigo (T3 - T7) reduziram AFG₁ em relação ao controle. O tratamento T8 (epoxiconazol, piraclostrobina e mancozebe) não diferiu do controle e o tratamento T2 (trifloxistrobina e protioconazol) apresentou um teor maior de AFG₁ que o controle.

A AFG₂ não foi detectada na amostra do tratamento T3 (epoxiconazole e piraclostrobina). Grãos de trigos dos tratamentos T2, T4, T7 e T8 apresentaram teores de AFG₂ menores que o controle. Já os tratamentos (T5 e T6) que foram os mais eficazes na redução de AFB₁ levaram a um aumento de AFG₂ em relação ao controle.

Os fungos *A. flavus* e *F. moniliforme*, responsáveis pela produção de aflatoxinas e fumonisinas, respectivamente, crescem principalmente em plantas no estágio de senescência ou em plantas estressadas (FAO, 2016). Durante o experimento a campo observou-se que as plantas entraram no estágio de senescência antes de completar seu ciclo o que pode ter favorecido o desenvolvimento destes patógenos e promovido uma elevada produção de aflatoxinas e fumonisina. Outra explicação é que as amostras de trigo avaliadas neste trabalho foram armazenadas durante um período de doze meses a 5°C, podendo ter ocorrido aumento no teor destas micotoxinas. Giray et al. (2007) encontraram contaminação por aflatoxina em amostras de trigo em armazéns na Turquia, no entanto, não mencionaram o tempo de armazenamento das amostras. A percentagem de amostras positivas para AFB₁, AFB₂, AFG₁ e AFG₂ foi de 42, 12, 37, e 12%, respectivamente. A concentração de AFB₁ variou de 10,4 a 144,2 $\mu\text{g kg}^{-1}$, AFB₂ de 12,9 a 36,4 $\mu\text{g kg}^{-1}$, AFG₁ de 21,0 a 446,1 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e a AFG₂ de 27,2 a 128,7 $\mu\text{g kg}^{-1}$.

De uma forma geral os tratamentos mais eficientes para a inibição da produção das aflatoxinas foram os tratamentos T5 (trifloxistrobina, protioconazol e

mancozebe) para a AFB₁, o T6 (trifloxistrobina, protioconazol e mancozebe) para a AFG₁ e o tratamento T3 (epoxiconazol e piraclostrobina) para a AFG₂.

Neste estudo a contaminação por DON foi reduzida com a aplicação dos tratamentos T2 (trifloxistrobina, protioconazol), T3 (epoxiconazol, piraclostrobina), T5 (epoxiconazol, piraclostrobina e mancozebe) e T6 (epoxiconazol, piraclostrobina e mancozebe) em relação ao controle. Já o tratamento T4 (mancozebe) induziu um aumento de DON, quando comparado ao controle. É possível que o mancozebe possa ter causado um estresse no fungo, aumentando a produção da micotoxina, no entanto, quando combinado outros princípios ativos (T5 - T8) o mancozebe não apresentou efeito estimulador da produção de DON. Uma hipótese para esse resultado é que outros princípios ativos tenham anulado o efeito estressor do mancozebe (T4) ou tiveram maior capacidade de comprometer o metabolismo do fungo para produzir DON. Jones et al. (2000) quando testaram o mancozebe isoladamente não verificaram efeito sobre o produção de DON em trigo.

Magan et al. (2002) avaliaram a influência de fungicidas e atividade de água (aw) sobre a produção de DON em trigo. Os autores relataram um aumento na produção de DON em trigo tratado com epoxiconazol e propioconazol associados com a atividade de água (aw) de 0,97. No presente estudo a aplicação de epoxiconazol associada com outros princípios ativos propiciaram uma diminuição no teor de DON quando comparado com o controle.

No Sul do Brasil nos anos de 2009 a 2012 foi realizado um levantamento da contaminação de trigo comercial por DON. No ano de 2009 foi constatada uma epidemia de giberela em trigo com teores de DON excedendo os limites máximos tolerados pela legislação (2000ppb) (TIBOLA et al., 2013). O teor de DON encontrado nos quatro anos avaliados (2009 a 2012) variou de 1000 a 2200ppb. Estudos mais recentes também relatam contaminação de amostras de trigo provenientes de várias localidades do Brasil variando de 183 a 3000µg kg⁻¹ (MACHADO et al., 2015; TRALAMAZZA et al., 2016).

Os valores elevados de DON encontrados neste estudo podem estar relacionados com a grande incidência de fungos observada neste experimento. A severidade da giberela foi de até 32,5% o que pode explicar a contaminação elevada por DON. Foi observada durante o experimento precipitação pluviométrica bastante acentuada o que promoveu o molhamento da espiga e juntamente com outros

fatores climáticos, como a temperatura, a umidade relativa e dias encobertos, favoreceram o desenvolvimento da giberela.

Fungos do gênero *Fusarium* causadores da giberela além de produzir DON tem a capacidade de produzir ZEA e fumonisinas. O teor de fumonisina B₁ da amostra de trigo referente ao tratamento T3 (epoxiconazol e piraclostrobina) não diferiu do controle. Os demais tratamentos apresentaram reduzidos teores quando comparados ao controle.

Na região Sul do Brasil, Mallmann et al. (2001) avaliaram, quanto a presença de fumonisina B₁, 407 amostras de diversos cereais (trigo, arroz, milho, cevada farelo de soja a aveia) obtidos de diferentes armazéns e constataram que 32% das amostras estavam contaminadas com este metabólito, sendo que o trigo (24,35 $\mu\text{g g}^{-1}$) estava entre os que apresentavam o maior teor. Cirillo et al. (2003) observaram contaminação de fumonisinas A₁ e A₂ em trigo e derivados obtidos em supermercados, sendo 26% das amostras contaminadas com A₁ (100 a 2870 $\mu\text{g kg}^{-1}$) e 35% com A₂ (100 a 790 $\mu\text{g kg}^{-1}$). Palacios et al. (2011) encontraram fumonisinas B₁ e B₂ em 97% das amostras de grãos de trigo obtidos de diferentes pontos comerciais da Argentina, com níveis que variaram de 10,5 a 1245,7 $\mu\text{g g}^{-1}$. Mendes et al. (2015), encontraram 54% das amostras de grãos de trigo, obtidos diretamente de fazendas, contaminadas com fumonisina B₁ com teores variando de 958 a 4906 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Stanković et al. (2012) detectaram a presença de fumonisina B₁ em 92% das amostras de trigo avaliadas com teores variando de 750 a 5400 $\mu\text{g kg}^{-1}$.

No que diz respeito à ocratoxina A, o controle diferiu significativamente de todos os tratamentos, sendo os tratamentos T5 (trifloxistrobina, protioconazol e mancozebe), T7 (epoxiconazol, piraclostrobina e mancozebe) e T8 (epoxiconazol, piraclostrobina e mancozebe) aqueles que apresentaram incremento na produção de OTA, quando comparados com o controle. Os demais tratamentos, T6 (trifloxistrobina, protioconazol e mancozebe), T3 (epoxiconazol e piraclostrobina) e T4 (mancozebe) propiciaram redução de 87,8; 77,2 e 69,7% no teor de OTA, respectivamente. É importante ressaltar que os tratamentos T5 e T6 utilizaram a mesma combinação de princípios ativos, porém o T6 foi aplicado com a metade da dosagem do T5. Assim, é possível verificar que a menor concentração de trifloxistrobina, protioconazol e mancozebe (0,2L ha⁻¹ trifloxistrobina, protioconazol + 1kg ha⁻¹ mancozebe) foi mais eficaz na redução de OTA, quando comparado com o controle.

García-Cela et al. (2012) também observaram um incremento na produção de OTA com a aplicação dos fungicidas epoxiconazol e o tetraconazol quando aplicados em condições climáticas extremas (35 – 15 °C equivalente ao dia e a noite e umidade relativa de 25-40%).

Schmidt-Heydt et al. (2013) observaram que mancozebe *in vitro* inibiu completamente o crescimento do *Verticillium dahliae*, reduziu significativamente o crescimento do *Cladosporium* sp., no entanto, não teve efeito no *Penicillium* e levou a um aumento na produção de ocratoxina A e B.

Com relação à contaminação por zearalenona o controle diferiu significativamente de todos tratamentos. Os tratamentos T5 e T6 (trifloxistrobina, protioconazol e mancozebe) propiciaram um incremento na produção de ZEA. O tratamento T6 [Trifloxistrobina (15% m/v), protioconazol (5,0% m/v) e mancozebe (75% m/m) (0,2L ha⁻¹ + 1kg ha⁻¹)], com a metade da dosagem do T5, apresentou maior redução na produção desse metabólito. O restante dos tratamentos diminuiu a concentração de ZEA em relação ao controle.

Stanković et al. (2012) encontraram 94,6% das amostras avaliadas contaminadas com ZEA com teores variando de 10 a 201µg kg⁻¹. Estudos que avaliaram a presença de ZEA em trigo da região Sul do Brasil apresentaram contaminação em até 84% das amostras com teores que variaram de 20 a 2960ppb (TIBOLA et al., 2013; TRALAMAZZA et al., 2016).

Amostras de farinha de trigo oriundas do Rio Grande do Sul foram avaliadas com relação ao teor de ZEA e a contaminação foi em mais de 26% das amostras com teores variando de 18,3 a 87,9µg kg⁻¹ (VIEIRA et al., 1999; VALBRING et al. 2014). Os valores superiores de ZEA foram encontrados no presente estudo se devem, muito provavelmente, ao fato de se ter utilizado todo grão enquanto que no processamento da farinha, algumas partes do grão de trigo são removidas, reduzindo as concentrações de micotoxinas encontradas (NOGUEIRA e OLIVEIRA, 2006).

Em relação ao efeito de dose de aplicação, observou-se que utilização combinada dos princípios ativos trifloxistrobina, protioconazol e mancozebe (T5 e T6) e epoxiconazol, piraclostrobina e mancozebe (T7 e T8) quando aplicados na dose recomendada (T5 e T7) foram mais eficientes na redução de AFB₁ enquanto que metade da dose recomendada (T6 e T8) foi mais eficiente na redução de AFG₁, OTA e ZEA. A dose não influenciou no teor de FB₁. Já a contaminação por DON foi

menor na dose reduzida de trifloxistrobina, protioconazol e mancozebe e na dose recomendada de epoxiconazol, piraclostrobina e mancozebe.

A Tabela 13 apresenta os resíduos dos princípios ativos dos fungicidas utilizados nos tratamentos do trigo em campo.

Com relação às moléculas de fungicidas a trifloxistrobina não foi detectada nos tratamentos T5 e T6. A piraclostrobina nos tratamentos T3, T7 e T8 (esse princípio ativo foi aplicado somente nessas amostras) ficaram dentro dos limites permitidos pela legislação brasileira (Tabela 13).

Tabela 13 - Teor de trifloxistrobina, protioconazol, epoxiconazol, piraclostrobina ($\mu\text{g kg}^{-1}$) em amostras de trigo

Tratamento	Trifloxistrobina (T)	Protioconazol (Pr)	Epoxiconazol (E)	Piraclostrobina (Pi)
T1(Controle)	Na	Na	Na	Na
T2 (T+Pr)	77,48	705,51 ^c	Na	Na
T3 (E+Pi)	Na	Na	2684,73 ^c	355,64 ^a
T4 (M)	Na	Na	Na	Na
T5 (T+Pr+M)	Nd	1019,44 ^b	Na	Na
T6 (T+Pr+M)	Nd	1305,52 ^a	Na	Na
T7 (E+Pi+M)	Na	Na	3735,78 ^a	321,29 ^b
T8 (E+Pi+M)	Na	Na	3178,12 ^b	324,20 ^b

Médias seguidas por letras minúsculas diferentes na coluna diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Nd = molécula não detectada. Na = molécula não aplicada; T1 – controle (sem aplicação); T2 – Trifloxistrobina (15% m/v) e protioconazol (5% m/v) ($0,4\text{L ha}^{-1}$); T3 – Epoxiconazol (5% m/v) e piraclostrobina (13,3% m/v) (1L ha^{-1}); T4 – mancozebe (75% m/m) (2kg ha^{-1}); T5 – Trifloxistrobina (15% m/v), protioconazol (5% m/v) e mancozebe (75% m/m) ($0,4\text{L ha}^{-1} + 2\text{kg ha}^{-1}$); T6 – Trifloxistrobina (15% m/v), protioconazol (5,0% m/v) e mancozebe (75% m/m) ($0,2\text{L ha}^{-1} + 1\text{kg ha}^{-1}$); T7 – Epoxiconazol (5% m/v), piraclostrobina (13,3% m/v) e mancozebe (75% m/m) ($1\text{L ha}^{-1} + 2\text{kg ha}^{-1}$); T8 – Epoxiconazol (5% m/v), piraclostrobina (13,3% m/v) e mancozebe (75% m/m) ($0,5\text{L ha}^{-1} + 1\text{kg ha}^{-1}$).

Foi possível detectar a presença de fungicidas em todas as amostras que receberam aplicação excetuando-se as amostras do tratamento T4 (mancozebe), pois não foi possível a detecção do princípio ativo utilizando a metodologia otimizada neste trabalho, e o tratamento T1 que foi o controle sem aplicação.

As amostras de trigo tratadas com trifloxistrobina (T5 e T6) atenderam o LMT estabelecidos pelas legislações Brasileira e da União Europeia. A piraclostrobina também ficou dentro dos LMT estabelecido pela legislação Brasileira (ANVISA) nos tratamentos em que esta molécula foi utilizada (T3, T7 e T8), porém acima do LMT estabelecido na legislação da União Europeia. O epoxiconazol foi o princípio ativo que apresentou a maior concentração residual nos grãos de trigo, ficando 97% acima do permitido pela legislação brasileira e 84% acima do LMT estipulado pela legislação da União Europeia.

Deve-se salientar que as plantas de trigo entraram em senescência antes de completar seu ciclo com isso sua capacidade de metabolização dos fungicidas pode ter sido afetada contribuindo para permanência de resíduos em concentrações elevadas em alguns casos.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Todos os parâmetros de validação do método analítico para identificação e quantificação por LC-ESI-QToF-MS ficaram dentro dos limites estipulados pela AOAC, ANVISA e SANCO sendo possível utiliza-lo para o monitoramento das micotoxinas aflatoxina B₁, B₂, G₁ e G₂, deoxinivalenol, fumonisina B₁, ocratoxina A e zearalenona e dos fungicidas protioconazol, trifloxistrobina, epoxiconazol e piraclostrobina em grãos de trigo.

As moléculas que apresentaram maior concentração nos grãos de trigo foram epoxiconazol e DON. Todos os fungicidas aplicados (trifloxistrobina, protioconazol, piraclostrobina e epoxiconazol) foram detectados em pelo menos uma amostra e todas as amostras estavam contaminadas com micotoxinas.

Por fim salienta-se que este foi um estudo inicial, com aplicações a campo e, portanto, sujeitas a influência das condições climáticas que acarretar o desenvolvimento de doenças fúngicas na cultura trigo. Desse modo avaliações em safras subsequentes devem ser feitos a fim de ampliar as evidencias dos efeitos dos princípios ativos testados nas micotoxinas encontradas.

REFERÊNCIAS

AGUILERA-LUIZ, M. M.; PLAZA-BOLAÑOS, P.; ROMERO-GONZÁLEZ, R.; VIDAL, J. L. M.; FRENICH, A. G. Comparison of the efficiency of different extraction methods for the simultaneous determination of mycotoxins and pesticides in milk samples by ultra high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 399, p. 2863-2875, 2011.

ALGÜL, I.; KARA, D. Determination and chemometric evaluation of total aflatoxin, aflatoxin B1, ochratoxin A and heavy metals content in corn flours from Turkey. **Food Chemistry**, v. 157, p. 70-76, 2014.

ALEXOPOULOS, C. J.; MIMS, C. W.; BLACKWELL, M. Introductory mycology. New York: John Wiley & Sons, p. 865, 1996.

ANASTASSIADES, M.; LEHOTAY, S.; Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive SPE” for the determination of pesticide residues in produce. **Journal of AOAC International**, v. 86, p. 412- 431, 2003.

ANASTASSIADES. M.; SCHERBAUM. E.; TASDELEN, B.; STAJNBAHER, D. Developments in QuEChERS methodology for pesticide multiresidue crop protection, public health, environmental, **Pesticide Chemistry**, v. 93, p. 316, 2007.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitárias. Programa de análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos (PARA). Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br>>. Acesso em: 06 maio 2015.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitárias. Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. 2003.

AOAC. Guidelines for single laboratory validation of chemical methods for dietary supplements and botanicals. **Association of Official Analytical Chemists International**, 2002.

ATAS, M.; YARDIMCI, Y.; TEMIZEL, A. A new approach to aflatoxin detection in chili pepper by machine vision, **Computers and Electronics in Agriculture**, v. 87, p. 129-141, 2012.

BARBOSA, L. C. A. Os pesticidas o homem e o Meio Ambiente. Editora UFV, Viçosa, p. 215, 2004.

BENNETT, J. W.; KLICH, M. Mycotoxins. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 16, n. 3, p. 497-516, 2003.

BIRCAN, C. Incidence of ochratoxin A in dried fruits and co-occurrence with aflatoxins in dried figs, **Food and Chemical Toxicology**, v. 47, p. 1996-2001, 2009.

BUTKERAITIS, P. Efeitos da fumonisina B₁ em codornas poedeiras (*Coturnix coturnix japônica*). 2003. 108 f. Dissertação apresentada a Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, para a obtenção do Título de Mestre, 2003.

BRUKER, Espectrometro de massas. Material de treinamento, 2015.

CEN - European Committee for Standardization. *CEN, CEN/TC 275 15662:2008: foods of plant origin - Determination of pesticide residues using GC-MS and/or LC-MS/MS following acetonitrile extraction/partitioning and clean-up by dispersive SPE - QuEChERS-method*. European Union; 2008.

CIRILLOY, T.; RITIENIY, A.; GALVANOZ, F.; COCCHIERIY, R. A. Natural co-occurrence of deoxynivalenol and fumonisins B₁ and B₂ in Italian marketed foodstuffs. **Food Additives and Contaminants**, v. 20, n. 6, p. 566-571, 2003.

CORRÊA, J. A. M. Estudo de extratos de plantas da família Solanaceae com atividade a fungos fitopatogênicos. 2015. 164 f. Tese apresentada para a Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", para a obtenção do título de Doutor em Ciências, 2015.

CHANDRASEKHAR, S.; SREELAKSHMI, L. Formal synthesis of fumonisin B₁, a potent sphingolipid biosynthesis inhibitor. **Tetrahedron Letters**, v. 53, p. 3233-3236, 2012.

CHIARADIA, M. C.; COLLINS C. H.; JARDIM, I. C. S. F. The state of the art of chromatography associated with the tandem mass spectrometry for toxic compound analyses in food **Química Nova**, v. 31, p. 623-632, 2008.

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

CROTTI, A. E. M.; VESSECCHI, R.; LOPES, J. L. C.; LOPES, N. P. Espectrometria de massas com ionização por “electrospray”: processos químicos envolvidos na formação de íons de substâncias orgânicas de baixo peso molecular. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 287-292, 2006.

DÖLL, S.; DÄNICKE, S. The *Fusarium* toxins deoxynivalenol (DON) and zearalenone (ZON) in animal feeding. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 2, p. 132-145, 2011.

EMAN. European Mycotoxin Awareness Network co-ordinated by Leatherhead Food Research Association, UK, 2003. Disponível em: <<http://www.lfra.co.uk/eman/index.htm>>. Acesso em: 03 fev. 2016

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. Disponível em: <<http://www.fao.org/wairdocs/x5012o/x5012o01.htm>>. Acesso em: 15 fev. 2016.

FERNANDES, J. M.; PICININI, E. C. Controlando as doenças de trigo na hora certa. Embrapa – documentos *on line*, n. 22, 1999. Disponível em: <<https://www.bdpa.cnptia.embrapa.br/consulta/busca?b=ad&id=852200&biblioteca=vazio&busca=autoria:%22FERNANDES,%20J.%20M.%20C.%22&qFacets=autoria:%22FERNANDES,%20J.%20M.%20C.%22&sort=&paginacao=t&paginaAtual=2>>. Acesso em: 23 nov. 2015.

FERRER, C.; LOZANO, A.; AGÜERA, A.; GIRÓN, J.; FERNÁNDEZ-ALBA, A. R. Overcoming matrix effects using the dilution approach in multiresidue methods for fruits and vegetables. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, p. 7634-7639, 2011.

FREIRE, F. C. O.; VIEIRA, I. G. P.; GUEDES, M. I. F.; MENDES, F. N. P. Micotoxinas: importância na alimentação e na saúde humana e animal. Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza-CE, v. 110, p. 1-48, 2007.

FREITAS, D.; DAMIN, S.; VILANI, A.; KRASBURG, C.; QUEIROZ, J. A.; MAGIMURA, F. Y.; ONOFRE, S. B. Ação de fungicidas sobre o crescimento do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* var. majus (Johnston) tulloch. **SaBios-Revista de Saúde e Biologia**, v. 6, n. 2, p. 50-56, 2011.

GARCÍA-CELA, E.; GIL-SERNA, J.; MARÍN, S.; ACEVEDO, H.; PATIÑO, B.; RAMOS, A. J. Effect of preharvest anti-fungal compounds on *Aspergillus steynii* and *A. carbonarius* under fluctuating and extreme environmental conditions. **International Journal of Food Microbiology**, v. 159, p. 167-176, 2012.

GAUMY, J. L.; BAILLY, J. D.; BURGAT, V. Zéaralénone: propriétés et toxicité expérimentale. **Revue Médecine Vétérinaire**, v. 152, p. 219-234, 2001.

GEORGIANNA, D. R.; PAYNE, G. A. Genetic regulation of aflatoxin biosynthesis: from gene to genome. **Fungal Genetics and Biology**, v. 46, n. 2, p. 113-125, 2009.

GIRAY, B.; GIRGIN, G.; ENGIN, A. B.; AYDIN, S.; SAHIN, G. Aflatoxin levels in wheat samples consumed in some regions of Turkey. **Food Control**, v. 18, p. 23-29, 2007.

GIROLAMO, A.; MCKEAGUE, M.; MILLER, J. D.; DEROSA, M. C.; VISCONTI, A. Determination of ochratoxin A in wheat after clean-up through a DNA aptamer-based solid phase extraction column. **Food Chemistry**, v. 127, p. 1378-1384, 2011.

GONZÁLEZ, R. R.; FRENICH, A. G.; VIDAL, J. L. M.; PRESTES, O. D.; GRIO S. L. Generic sample treatment method for simultaneous determination of multiclass pesticides and mycotoxins in wines by liquid chromatography–mass spectrometry, **Journal of Chromatography A**, v. 1249, p. 32-40, 2012.

GUTKOSKI, L. C.; NODARI, M. L.; NETO, R. J. Evaluation of wheat flour cultivated in the Rio Grande do Sul to production of biscuits. **Food Science and Technology**, v. 23, p. 91-97, 2003.

HAYAMA, T.; TAKADA, M. Simple and rapid method for the determination of ethylenebisdithiocarbamate fungicides in fruits and vegetables using liquid chromatography with tandem mass spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 392, p. 969-976, 2008.

HE, J.; ZHOU, T.; YOUNG, J. C.; BOLAND, G. J.; SCOTT, T. Chemical and biological transformations for detoxification of trichothecene mycotoxins in human and animal food chains: a review. **Trends in Food Science e Technology**, v. 21, p. 67-76, 2010.

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

HOSENEY, R. C. Principios de ciencia y tecnología de los cereales. Zaragoza: Acribia, 1991. 321p

IARC – Agency for research on câncer. Some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins, v. 56. 1993.

IAL - INSTITUTO ADOLFO LUTZ . Métodos físico-químicos para análise de alimentos. São Paulo, 4ª edição, p. 1020, 2008.

ICH- INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION; Validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1), 2005.

ÍNDICE DE MONOGRAFIA – ANVISA, Disponível em:
<<http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/Anvisa+Portal/Anvisa/Inicio/Agrotoxicos+e+Toxicologia/Assuntos+de+Interesse/Monografias+de+Agrotoxicos/Monografias>>.
Acesso em: 12 fev. 2016.

INMETRO – INSTITUTO DE METROLOGIA, NORMATIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL, Orientação sobre validação de métodos analíticos, DOQ-CGCRE-008, 2010.

IUPAC - GUILBAULT, G. G.; HJELM, M. Nomenclature for automated and mechanised analysis. **International Union of Pure and Applied Chemistry**, v. 61, n. 9, p. 1657-1664, 1989.

JONES, R. K. Assessments of Fusarium Head Blight of wheat and barley in response to fungicide treatment. **Plant Disease**, v. 84, p. 1021-1030, 2000.

JULIATTI, F. C. Modo de ação dos fungicidas sobre plantas e fungos. Disponível em:
<[http://www.ipni.net/ppiweb/pbrazil.nsf/1c678d0ba742019483256e19004af5b8/4d4c7e5503f5a2c503256fdd004c4a8f/\\$FILE/Anais%20Fernando%20Juliatti.pdf](http://www.ipni.net/ppiweb/pbrazil.nsf/1c678d0ba742019483256e19004af5b8/4d4c7e5503f5a2c503256fdd004c4a8f/$FILE/Anais%20Fernando%20Juliatti.pdf)>. Acesso em: 13 jan. 2016

KINNEY, C. A.; MOSIER, A. R.; FERRER, I.; FURLONG, E. T.; MANDERNACK, K. W. Effects of the fungicides mancozeb and chlorothalonil on fluxes of CO₂, N₂O, and CH₄ in a fertilized Colorado grassland soil. **Journal of Geophysical Research**, v. 109, p. 1-15, 2004.

KONTIOKARI, V.; MATTSOFF, L. Proposal of environmental quality standards for plant protection products. **Finnish Environment Institute**, p. 1-176, 2011.
Disponível em:
<https://helda.helsinki.fi/bitstream/handle/10138/37029/FE_7_2011.pdf?sequence=3>. Acesso em: 03 março 2016.

KNASMULLER, S.; CAVIN C.; CHAKRABORTY, A.; DARROUDI, F.; MAJER, B.; HUBER, W.; EHRLICH, V.; Structurally related mycotoxins ochratoxin A, ochratoxin B, and citrinin differ in their genotoxic activities and their mode of action in human derived liver (Hep G2) cells: Implications for risk assessment. **Nutricion and cancer**, v. 50, n. 2, p. 190-197, 2004.

KRSKA, R.; PETTERSSON, H.; JOSEPHS, R. D.; LEMMENS, M.; DONALD, M. S.; WELZIG, E. Zearalenone in maize: stability testing and matrix characterisation of a certified reference material. **Food additives and contaminants**, v. 20, p. 1141-1152, 2003.

KRSKA, R.; WELZIG, E.; BOUDRA, H. Analysis of *Fusarium* toxins in feed. **Animal feed Science and Technology**, v. 137, p. 241-264, 2007.

LACINA, O.; ZACHARIASOVA, M.; URBANOVA, J.; VACLAVIKOVA, M.; CAJKA, T.; HAJŠLOVA, J. Critical assessment of extraction methods for the simultaneous determination of pesticide residues and mycotoxins in fruits, cereals, spices and oil seeds employing ultra-high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1262, p. 8-18, 2012.

LANÇAS, F. M. A cromatografia líquida moderna e a espectrometria de massa: “finalmente compatíveis”? **Scientia Chromatographica**, v. 1, n. 2, p. 35, 2009.

LASRAM, S.; OUESLATI, S.; SONIAMARIN, A. V.; GHORBEL, A.; SANCHIS, V. Water activity and temperature effects on fungal growth and ochratoxin A production by ochratoxigenic *Aspergillus carbonarius* isolated from Tunisian grapes. **Journal of Food Science**, v. 75, n. 2, 2010.

LEHOTAY, S. J.; MASTOVSKA, K.; LIGHTFIELD, A. R. Use of buffering and other means to improve results of problematic pesticides in a fast and easy method for residue analysis of fruits and vegetables. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, v. 88, p. 615, 2005.

LICHIHEB, N.; BEDOS, C.; PERSONNE, E.; BENOIT, P.; BERGHEAUD, V.; FANUCCI, O.; BOUHLEL, J.; BARRIUSO, E. Measuring leaf penetration and volatilization of Chlorothalonil and Epoxiconazole applied on wheat leaves in a laboratory-scale experiment. v. 6, p. 1782-1782, 2015.

LIMA, M. I. P. M. Giberela ou Brusone? Orientações para a identificação correta dessas enfermidades em trigo e em cevada, Passo Fundo: Embrapa Trigo,

Embrapa-documentos *on line*, n. 40, 2004. Disponível em:
<http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/do/p_do40.pdf>. Acesso em: 12 jan. 2016.

LORENZZETTI, R. S.; VILAS-BOAS, L. A.; GARCIA, J. E. Aspectos genéticos da biossíntese das fumonisinas, **UNOPAR - Científica Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 8, n. 1, p. 63-70, 2006.

MACHADO, L. V.; MALLMANN, C. A.; MALLMANN, A. O.; COELHO, R. D.; COPETTI, M. V. Prevalência de contaminantes do trigo e derivados: Desoxinivalenol. 2015, Bento Gonçalves. Anais do 5º Simpósio de Segurança Alimentar: Alimentação e Saúde, Bento Gonçalves: UFRGS, 2015.

MAGAN, M.; HOPE, R.; COLLEATE, A.; BAXTER, E.S. Relationship between growth and mycotoxin production by *Fusarium graminearum*, biocides and environment. **European Journal of Plant Pathology**, v. 108, p. 685-690, 2002.

MALEKINEJAD, H.; MAAS-BAKKER, R.; FINK-GREMMELS, J. Bioactivation of zearalenone by porcine hepatic biotransformation. **Veterinary Research**, v. 36, p. 799-810, 2005.

MALLMANN, C. A.; SANTURIO, J. M.; ALMEIDA, C. A. A.; DILKIN, P. Fumonisins B1 levels in cereals and feeds from southern Brazil. **Arquivo do Instituto Biológico** v. 68, n. 1, p. 41-45, 2001.

MARQUES, M. Validação interna dos métodos de determinação de Deoxinivalenol e Zearalenona por HPLC com purificação por colunas de imunoafinidade (Pesquisa de Deoxinivalenol e Zearalenona em milho e alimentos compostos para animais). 2007. 93 f. Dissertação apresentada ao Departamento de Engenharia Química e Biológica do Instituto Superior Técnico para obtenção do grau de licenciatura em engenharia química, orientada por Hermínia Marina Martins, Lisboa, 2007.

MASSON, A. P.; CECATTO, L. Avaliação do processo de limpeza e polimento dos grãos de trigo para eliminação de micotoxina desoxinivalenol. **E-Tech: Tecnologias para Competitividade Industrial**, Florianópolis, v. 5, n. 1, p. 172-187, 2012.

MAŠTOVSKÁ, K.; LEHOTAY, S. J. Evaluation of common organic solvents for gas chromatographic analysis and stability of multiclass pesticide residues. **Journal of Chromatography A**, v. 1040, p. 259-272, 2004.

MENDES, G. R. L.; REIS, T. A. R.; CORRÊA, B.; BADIALE-FURLONG, E. Mycobiota and occurrence of Fumonisin B1 in wheat harvested in Southern Brazil, **Ciência Rural**, v. 45, n. 6, p. 1050-1057, 2015.

MILHOME, M. A. L.; SOUSA, D. O. B.; LIMA, F. A. F.; NASCIMENTO, R. F. Avaliação do potencial de contaminação de águas superficiais e subterrâneas por pesticidas aplicados na agricultura do Baixo Jaguaribe, CE. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 14, n. 3, p. 363-372, 2009.

NOGUEIRA, S. I.; OLIVEIRA, M. B. P. P. Prevalência de ocratoxina A em alimentos e consequentes problemas de segurança alimentar. **Alimentação Humana**, v. 12, n. 2, p. 69-75, 2006.

OPAS. Micotoxinas. Criterios de salud ambiental, Washington, v. 11, p. 131, 1983.

ORTEGA, P. P.; LÓPEZ, B. G.; REYES, J. F. G.; MARTOS, N. R.; DÍAZ, A. M. Generic sample treatment method for simultaneous determination of multiclass pesticides and mycotoxins in wines by liquid chromatography–mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1249, p. 32-40, 2012.

ORSI, R. B.; CORRÊA, B.; POZZI, C. R.; SCHAMMASS, E.; NOGUEIRA, J. R.; DIAS, S. M. C.; MALOZZI, M. Mycoflora and occurrence of fumonisin in fleshly harvested and stored mayze. **Journal of Stored Products Research**, v. 36, p. 75-87, 2000.

PALACIOS, S. A.; RAMIREZ, M. L.; ZALAZAR, M. C.; FARNOCHI, M. C.; ZAPPACOSTA, D.; CHIACCHIERA, S. M.; REYNOSO, M. M.; CHULZE, S. N.; TORRES, A. M. Occurrence of *Fusarium* spp. and fumonisin in durum wheat grains. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 59, p. 12264-12269, 2011.

PERZ, R. C.; LISHAUT, H. V.; SCHWACK, W. CS₂ blinds in Brassica crops: false positive results in the Dithiocarbamate residue analysis by the acid digestion method. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 792-796, 2000.

PRANDINI, A.; SIGOLO, S.; FILIPPI, L.; BATTILANI, P.; PIVA, G. Review of predictive models for *Fusarium* head blight and related mycotoxin contamination in wheat. **Food and Chemical Toxicology**, v. 47, n. 5, p. 927-931, 2009.

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

PEREIRA, M. M. G.; CARVALHO, E. P. C.; PRADO, G. Crescimento e produção de aflatoxinas por *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*, **Boletim do CEPPA**, v. 20, n. 1, p. 141-156, 2002.

PEREIRA, C. L.; CHEN, Y. H.; MCDONALD, F. E. Total synthesis of the sphingolipid biosynthesis inhibitor Fumonisin B1. **Journal of the American Chemical Society**, v. 131, n. 17, 2009.

PRESTES, O. D.; ADAIME, M. B.; ZANELLA, R. QuEChERS: possibilidades e tendências no preparo de amostra para determinação multirresíduo de pesticidas em alimentos. **Scientia Chromatographica**, v. 3, p. 51-64, 2011.

RAMIREZ, M. L.; CHULZE, S.; MAGAN, N. Impact of environmental factors and fungicides on growth and deoxynivalenol production by *Fusarium graminearum* isolates from Argentinian wheat. **Crop Protection**, v. 23, p. 117-125, 2004.

RASF- Food and Feed Safety Alerts. Disponível em:
<http://ec.europa.eu/food/safety/rasff/index_en.htm>. Acesso em: 18 dez. 2015.

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

REITER, E. V.; CICHNA-MARKL, M.; CHUNG, D. H.; SHIM, W. B.; ZENTEK, J.; RAZZAZI-FAZELI, E. Determination of ochratoxin A in grains by immuno-ultrafiltration and HPLC-fluorescence detection after postcolumn derivatisation in an electrochemical cell. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 400, p. 2615-2622, 2011.

REGULATION (CE) n° 396/2005 of the European Parliament and of the Council of 23 February 2005 on maximum residue levels of pesticides in and on the surface of the food and feed of plant origin or animal.

REGULATION (CE) n° 1881/2006 COMMISSION of December 19, 2006. Setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

RIBEIRO, F. A. L.; FERREIRA, M. M. C.; MORANO, S. C.; SILVA, L. R.; SCHNEIDER, R. P. Planilha de validação: uma nova ferramenta para estimar figuras de mérito na validação de métodos analíticos univariados. **Química Nova**, v. 31, n. 1, p. 164-171, 2008.

RIEDE, C. R.; ZUCARELLI, C.; SEIXAS, C. D. S.; GARBUGLIO, D. D.; FOLONI, J. S. S.; et al. Reunião da Comissão Brasileira de Pesquisa de Trigo e Triticale (jul.-ago. de 2012, Londrina, PR). Informações técnicas para trigo e triticale – safra 2013 / Reunião da Comissão Brasileira de Pesquisa de Trigo e Triticale, Londrina, PR, 29 de julho a 2 de agosto de 2012. – Londrina, PR : Instituto Agrônomo do Paraná (IAPAR), p. 220, 2013.

RINGOT, D.; CHANGO, A.; SCHNEIDER, Y. J.; LARONDELLE, Y.; Toxicokinetics and toxicodynamics of ochatoxin A, an update. **Chemico-Biological Interactions**, v. 159, p. 18-46, 2006.

RODRIGUES, M. A. T. Classificação de fungicidas de acordo com o mecanismo de ação proposto pelo FRAC. 2006. 249 f. Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrônômicas da Universidade Estadual Paulista, para a obtenção do título de Mestre, 2006.

SANCO (EUROPEAN COMMISSION), Guidance document on analytical quality control and validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed, documento nº SANCO/12571/ 2013, 19 November 2013.

SASSAHARA, M.; YANAKA, E. K.; NETTO, D. P. Ocorrência de aflatoxina e zearalenona em alimentos destinados ao gado leiteiro na Região Norte do Estado do Paraná. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 24, n. 1, p. 63-72, 2003.

SINGH, S. B.; MUKHERJEE, I.; MAISNAM, J.; KUMAR, P.; GOPAL, M.; KULSHRESTHA, G. Determination of pesticide residues in integrated pest management and nonintegrated pest management samples of apple (*Malus pumila* Mill.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 11277-11283, 2009.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER F. X.; KIEMLE. D. J. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**, 7.ed. Rio de Janeiro: LTC, 2007.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de fanerógamas nativas e exóticas no Brasil. Baseado em APG II. 2. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2008. p. 238-270.

SCHEUER, P. M.; FRANCISCO, A.; MIRANDA, M. Z.; LIMBERGER, V. M. Trigo: características e utilização na panificação, **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 13, n. 2, p. 211-222, 2011.

SCHMIDT-HEYDT, M.; STOLL, D.; GEISEN, R. Fungicides effectively used for growth inhibition of several fungi could induce mycotoxin biosynthesis in toxigenic species. **International Journal of Food Microbiology**, v. 166, p. 407-412, 2013.

SKINNER, C. E.; EMMONS, C. W.; TSUCHIYA, H. M. Fungus diseases of man and animals - general considerations, *Henrici's Molds, Yeasts and Actinomycetes*. John Wiley and Sons Inc., p. 119-140, 1947.

STAHNKE, H.; KITTLAUS, S.; KEMPE, G.; ALDER, L. Reduction of matrix effects in liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry by dilution of the sample extracts: How much dilution is needed? **Analytical Chemistry**, v. 84, p. 1474-1482, 2012.

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

TANIWAKI, M. H.; SILVA, N. Fungos em alimentos: ocorrência e detecção. Campinas ITAL, núcleo de Microbiologia, p. 82, 2001.

TEIXEIRA, T. R. Determinação de ocratoxina A em vinhos da região Sul do Brasil através da cromatografia em camada delgada com detector de carga acoplada. 2011. 56f. Dissertação apresentada ao Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, para a obtenção do Título de Mestre, 2011.

TIBOLA, C. S.; FERNANDES, J. M. C.; DEL PONTE, E. M.; MALLMANN, C. A.; DILKIN, P.; LIMA, M. I. P. M.; PAVAN, W. Indicações técnicas para minimizar a contaminação de trigo por micotoxinas. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**, Embrapa trigo, p. 1-40, 2013.

TRALAMAZZA, S. M.; BEMVENUTI, R. H.; ZORZETE, P.; GARCIA, F. S. G.; CORRÊA, B. Fungal diversity and natural occurrence of deoxynivalenol and zearalenone in freshly harvested wheat grains from Brazil. **Food Chemistry**, v. 196, p. 445-450, 2016.

VALBRING, L.; REICHERT, A. M.; SOUZA, J. G. L.; SONSIN, P. A. Concentração de Aflatoxina, Ocratoxina e Zearalenona em farinhas de trigo. **Blucher Food Science Proceedings**, n. 1, v. 1, 2014.

VIEIRA, A. P.; BADIALE-FURLONG, E.; OLIVEIRA, M. L. M. Ocorrência de micotoxinas e características físico-químicas em farinhas comerciais. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 16, p. 221-225, 1999.

YONEMOTO, P. G.; CALORI-DOMINGUES, M. A.; FRANCO, C. M. L. Effect of granule size on the structural and physicochemical characteristics of wheat starch. **Food Science and Technology**, v. 27, n. 4, p. 761-771, 2007.

ZAIN, M. E. Impact of mycotoxins on humans and animals. **Journal of Saudi Chemical Society**, v. 15, Issue 2, p. 129-144, 2011.

ZANELLA, R.; PRESTES, O. D.; FRIGGI, C. A.; MARTINS, M. L.; ADAIME, M. B. An Overview about recent advances in sample preparation techniques for pesticide residues analysis in cereals and feedstuffs. **INTRCH**, p. 149-170, 2012.

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

ZHANG, J. M.; WU, Y. L.; YAO-BIN LU, Y. B. Simultaneous determination of Carbamate insecticides and mycotoxins in cereals by reversed phase liquid chromatography tandem mass spectrometry using a quick, easy, cheap, effective, rugged and safe extraction procedure. **Journal of Chromatography B**, v. 915-916, p. 13-20, 2013.

Anexos

Anexo A - Distribuição dos tratamentos das plantas de trigo.

Quadro 1 - Casualização dos tratamentos, indicados pelos números 1 a 8, dentro dos blocos (A1 até A4) na área experimental 1

A1	A2	A3	A4
2	6	3	8
3	5	5	3
7	1	7	2
1	3	2	5
8	4	1	6
5	7	4	1
6	2	8	4
4	8	6	7

Anexo B – Soluções para a confirmação das concentrações das soluções das micotoxinas por espectrofotometro

Solução de ácido sulfúrico 0,009M

Em um balão volumétrico de 2000mL, colocou-se água destilada até aproximadamente a metade do balão, pipetou-se 1mL de ácido sulfúrico e o volume foi preenchido até o menisco com água destilada.

Solução A ($K_2Cr_2O_7$ 0,25mM)

Dicromato de potássio (78mg) previamente dessecado foi dissolvido em 1000mL de ácido sulfúrico 0,009M.

Solução B ($K_2Cr_2O_7$ 0,125mM)

Pipetou-se 25mL da solução A em um balão volumétrico de 50mL e completou-se o volume com ácido sulfúrico 0,009M.

Solução C ($K_2Cr_2O_7$ 0,0625mM)

Pipetou-se 25mL da solução B em um balão volumétrico de 50mL e completou-se o volume com ácido sulfúrico 0,009M.

Procedimento de avaliação de desempenho do espectrofotômetro

Absorbância das soluções A, B e C foi medida três vezes em comprimento de onda de 350nm, utilizando o ácido sulfúrico (0,009M) como branco.

Cálculo do fator de correção do espectrofotômetro

Para o calculo do fator de correção do espectrofotômetro foi utilizada a equação a seguir (Equação 1).

$$\text{Absortividade molar } (\epsilon) = A \times 100 / C \quad (1)$$

Onde:

A = absortividade das soluções A, B e C, calculadas separadamente

C = concentração das soluções A, B e C em mM.

Cálculo do Fator de correção

Fator de correção (FC) foi obtido através da determinação da média dos valores encontrados para a absorvidade molar das três soluções de dicromato de potássio (equação 2), onde o número 3160 é o valor teórico para a absorvidade molar da solução de dicromato de potássio (IAL, 2008).

$$FC = 3100/\varepsilon \quad (2)$$

Onde:

ε = absorvidade molar média

CF = fator de correção

O critério de aceitação do fator de correção é de: $1,05 > CF > 0,95$.

Verificação das concentrações das soluções padrões de micotoxinas

No espectrofotômetro foi determinada a absorbância (A) do solvente utilizado para ressuspender a micotoxina em questão (utilizado como branco), para determinar a concentração do padrão, foi feita diluições até a faixa de concentração ideal para cada micotoxina, cada micotoxina tem um comprimento de onda ideal (Tabela 1). Para a determinação das concentrações foi utilizada a equação abaixo:

$$\mu\text{g de micotoxina/mL} = (A \times MM \times 1000 \times FC) / \varepsilon. \quad (3)$$

Onde: FC é o fator de correção calculado para o espectrofotômetro durante a calibração desse equipamento, MM é a massa molecular da micotoxina e ε é a absorvidade molar da micotoxina.

Tabela 1 - Dados para a padronização da concentração das micotoxinas

Micotoxinas	($\mu\text{g mL}^{-1}$) ^{1)*}	Massa molecular (MM)	Solvente	Faixa de comprimento de onda (λ)	Absortividade molar (ϵ)
Aflatoxina B1	8-10	312	Acetonitrila	330-370	20700 (350nm)
Aflatoxina B2	8-10	314	Acetonitrila	330-370	22500 (350nm)
Aflatoxina G1	8-10	328	Acetonitrila	330-370	17600 (350nm)
Aflatoxina G2	8-10	330	Acetonitrila	330-370	18900 (350nm)
Ocratoxina A	40	333	Benzeno: acetoneitrila (98:2 v/v)	300-400	5550 (321nm)
Zearalenona	5-10	318	Benzeno: acetoneitrila (98:2 v/v)	280-380	6020 (316nm)
Deoxinivalenol	5-10	296	Benzeno: acetoneitrila (98:2 v/v)	219	5913 (219nm)
Fumonisina	-	721	Acetonitrila :água (1:1 v/v)	Não absorve	

*Faixa de concentração ideal

Fonte: BENNET e SHOTWELL, 1990; AOAC, 2000; IAL, 2008.