

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
MESTRADO EM TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

DANIÉLLY N. MORAIS

DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA
DETERMINAÇÃO DE MULTIMICOTOXINAS EM LEITES

DISSERTAÇÃO

MEDIANEIRA

2019

DANIÉLLY NASCIMENTO MORAIS

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA
DETERMINAÇÃO DE MULTIMICOTOXINAS EM LEITES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós
Graduação em Tecnologia de Alimentos, nível
mestrado acadêmico, da Universidade
Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus
Medianeira, como requisito parcial à obtenção do
título de Mestre em Tecnologia de Alimentos
Orientadora: Profa. Dra. Deisy Alessandra
Drunkler
Co-orientador: Prof. Dr. Flávio Dias Ferreira

MEDIANEIRA

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

M828d

Morais , Daniélly N.

Desenvolvimento de método analítico para determinação de multimicotoxinas em leites / Daniélly N. Moraes – 2019.

112 f.: il.; 30 cm.

Texto em português com resumo em inglês

Orientadora: Profa. Dra. Deisy Alessandra Drunkler

Coorientador: Prof. Dr. Flávio Dias Ferreira

Dissertação (Mestrado) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos. Medianeira, 2019.

Inclui bibliografias.

1. Cromatografia a líquido 2. Ocratoxinas 3. Leite - Qualidade 4. Alimentos – Dissertações. I. Drunkler, Deisy Alessandra, orient. II. Ferreira, Flávio Dias, coorient. III. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos. IV. Título.

CDD: 664

Biblioteca Câmpus Medianeira
Fernanda Cristina Gazolla Bem dos Santos 9/1735



TERMO DE APROVAÇÃO

VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA DETERMINAÇÃO DE MULTIMICOTOXINAS EM LEITES

Por

DANIÉLLY NASCIMENTO MORAIS

Essa dissertação foi apresentada às 19 horas, do dia 24 de julho de 2019 como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Tecnologia de Alimentos, Linha de Pesquisa Ciência e Tecnologia de Produtos Alimentícios, no Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos - PPGTA, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná. A candidata foi arguida pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho aprovado.

Prof(a). Dr(a) Deisy A. Drunkler (Orientadora – PPGTA)

Prof(a). Dr(a).

Daneysa Lahis Kalschne (Membro Interno – PPGTA)

Prof(a). Dr(a). Tânia A. Becker-Algeri (Membro Externo)

* A via original com as assinaturas encontra-se na secretaria do programa.

Dedico este trabalho à todos aqueles que lutam pela educação pública, inclusiva e de qualidade.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a minha mãe Maria Helena, que com amor, entusiasmo e positivismo sempre me acalma, me apoia e me impulsiona para ir mais longe. A minha irmã Jennifer, aos meus sobrinhos João Pedro e Helena, e a minha doce Keli, a todos vocês muito obrigada pelo incentivo, compreensão, paciência e carinho.

Agradeço a prof. Dra. Deisy A. Drunkler, pela confiança em mim depositada para realização deste trabalho, pela orientação, disponibilidade, paciência, colaboração e incentivo.

Ao meu coorientador prof. Dr. Flávio Dias Ferreira, pelo apoio, auxílio e disponibilidade no laboratório, pela paciência e incentivo no decorrer dos trabalhos executados.

Aos Prof. Dra. Eliane Colla e Dr. Oldair Donizeti Leite, pela disponibilidade que ambos tiveram no esclarecimento de dúvidas e aconselhamentos prestado no decorrer deste trabalho.

Aos meus companheiros de curso e agora amigos, Ediane Ferrazzo e Djhonatan Adamante, com os quais compartilhei longas horas de estudo e muitas emoções. A Thaís e o Jr Dameto pelo carinho, amizade e incentivo.

A Maria Clara, Jaciara, Juliana e Elizandra, alunas da Engenharia de alimentos e iniciação científica, que me auxiliaram e compartilharam comigo as frustrações e alegrias das rotinas de pesquisa laboratorial.

A Dra. Daneysa L. Kalschne e Dra. Tânia Becker-Algeri, por aceitarem o convite para participar da banca avaliadora e terem feito valiosas contribuições para melhoria da versão final deste trabalho.

A Alexandra Elbakyan, desenvolvedora do *site* Sci-Hub.cc, que disponibiliza gratuitamente artigos científicos das principais editoras internacionais contribuindo para que a informação científica seja acessível.

Ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos da UTFPR – Medianeira pela infraestrutura e por me acolher como discente. A CAPES pela bolsa de mestrado e incentivo a pesquisa.

A todos aqueles que de maneira direta e indiretamente tem contribuído no meu desenvolvimento profissional e humano, muito obrigada!

*A diferença entre o possível e o impossível
está na vontade humana.*

Louis Pasteur

RESUMO

MORAIS, Daniélly N. **Desenvolvimento de método analítico para determinação de multi-micotoxinas em leites**, 2019. 122f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Medianeira, 2019.

Este trabalho teve como objetivo desenvolver e validar um método analítico para determinar multimicotoxinas (aflatoxinas B₁ - AFB₁, G₁ - AFG₁, G₂ - AFG₂ e M₁ - AFM₁, ocratoxina - OTA e zearalenona - ZEA) em leite fluído utilizando cromatografia líquida acoplado a um detector de fluorescência. Os parâmetros cromatográficos foram definidos por planejamentos sequenciais. A fase móvel, acetonitrila e água acidificada a 0,85% (30:70) e acetonitrila, metanol e água acidificada a 0,85% (50:10:40) foi definida empregando planejamento de misturas. O fluxo de 1,4 mL/min foi definido através de um planejamento fatorial fracionário o qual permitiu a aplicação posterior de um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR). Através do DCCR, obteve-se valores de assimetria ótimos para todas as micotoxinas dentro do intervalo de 1,0 e 1,5, considerados ideais para os picos cromatográficos. A resolução de 2,80, desejada entre os picos de ZEA e OTA, foi obtida através da função desejabilidade que indicou as condições para os parâmetros: acidificação da fase móvel, temperatura da coluna e volume de injeção como sendo 0,85%, 35 °C e 35 µL, respectivamente. Em paralelo, um método de extração baseado no método QuEChERS foi desenvolvido. O método foi validado, os limites de quantificação (LQ) foram, 0,16; 1,08; 0,01; 0,12; 0,33 e 8,93 µg.Kg⁻¹ para AFM₁, AFB₁, AFG₁, AFG₂, OTA e ZEA, respectivamente. A recuperação do método variou entre 73 e 114%. Posteriormente o método foi aplicado para avaliar a ocorrência de multimicotoxinas em leite fluído (n=30) comercializado na cidade de Medianeira, região Oeste do Paraná. A presença de AFB₁, AFG₁, AFG₂ e AFM₁ foi detectada em 26%, 30%, 93% e 80% das amostras analisadas, respectivamente; no entanto, a presença de AFM₁ esteve abaixo do limite máximo permitido pela legislação brasileira (0,5 µg.Kg⁻¹). Não foram encontradas OTA e ZEA nas amostras analisadas. Assim sendo, o método foi eficiente para identificar e quantificar multimicotoxinas em leite fluído e pode ser aplicado como método de rotina para monitorar a qualidade do leite, objetivando oferecer produtos seguros e de qualidade para o consumo humano.

Palavras-Chave: Aflatoxinas, zearalenona, ocratoxina, leite, cromatografia.

ABSTRACT

MORAIS, Daniélly N. **Development of analytical method for determination of mycotoxins in milk**, 2019. 122f. Project (Master's Degree) - Post-Graduate Program in Food Technology, Federal Technological University of Paraná. Medianeira, 2019.

This work aimed to develop and validate an analytical method to determine multimycotoxins (aflatoxins B₁ - AFB₁, G₁ - AFG₁, G₂ - AFG₂ and M₁ - AFM₁, ochratoxin - OTA and zearalenone - ZEA) in fluid milk using detector - coupled liquid chromatography. fluorescence. The chromatographic parameters were defined by sequential designs. The mobile phase, acetonitrile and 0.85% acidified water (30:70) and acetonitrile, methanol and 0.85% acidified water (50:10:40) were defined using mix planning. The flow rate of 1.4 mL / min was defined by fractional factorial design which allowed the subsequent application of a Central Rotational Composite Design (DCCR). Through DCCR, optimal asymmetry values were obtained for all mycotoxins within the range of 1.0 and 1.5, considered ideal for chromatographic peaks. The desired resolution of 2.80 between the ZEA and OTA peaks was obtained through the desirability function which indicated the conditions for the parameters: mobile phase acidification, column temperature and injection volume to be 0.85%, 35 °C and 35 µL, respectively. In parallel, an extraction method based on the QuEChERS method was developed. The method was validated, the quantification limit (LQ) were 0.16; 1.08; 0.01; 0.12; 0.33 and 8.93 µg.Kg-1 for AFM₁, AFB₁, AFG₁, AFG₂, OTA and ZEA, respectively. Method recovery ranged from 73 to 114%. Subsequently, the method was applied to evaluate the occurrence of multimycotoxins in fluid milk (n = 30) sold in the city of Medianeira, Western Paraná. The presence of AFB₁, AFG₁, AFG₂ and AFM₁ was detected in 26%, 30%, 93% and 80% of the analyzed samples, respectively; However, the presence of AFM₁ was below the maximum limit allowed by Brazilian legislation (0.5 µg.Kg-1). No OTA and ZEA were found in the analyzed samples. Therefore, the method was efficient to identify and quantify multimycotoxins in fluid milk and can be applied as a routine method to monitor milk quality, aiming to offer safe and quality products for human consumption.

Key words: Aflatoxins, zearalenone, ochratoxin, milk, chromatography-FL.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fases de crescimento fúngico e localização da síntese de micotoxina	12
Figura 2 - Estrutura química das principais AFs	15
Figura 3 - Vias de conversão dos metabolitos derivados da AFB ₁	16
Figura 4 - Estrutura química da ZEA	17
Figura 5 - Estrutura química da OTA	18
Figura 6 - Representação das etapas principais e exemplos de modificações aplicados ao método QuEChERS	25
Figura 7 - Triângulo do planejamento de mistura com as restrições inferiores e superiores impostas aos componentes para determinação das composições da fase móvel com os vértices	35
Figura 8 - Fluxograma das etapas principais e exemplos de modificações aplicados ao método QuEChERS	35
Figura 9 - Fluxograma gráfico do método QuEChERS modificado	38
Figura 10 - Cromatograma do branco analítico, amostra de leite sem fortificação	45
Figura 11 - Ensaio P1 do planejamento de misturas	46
Figura 12 - Cromatogramas de identificação dos picos	47
Figura 13 - Ensaio a) combinação entre as proporções de solventes referentes aos ensaios P1 e P8 do planejamento de mistura	48
Figura 14 - Ensaio b) combinação entre as proporções de solventes referentes aos ensaios P1 e P11 do planejamento de misturas	49
Figura 15 – Identificação do pico E	50
Figura 16 - Identificação do pico F	50
Figura 17 - Curvas de contorno para AFM ₁ em função do tempo de retenção.	65
Figura 18 - Curvas de contorno para ZEA em função do tempo de retenção.	66
Figura 19 - Curvas de contorno para ZEA em função do tempo de retenção	70
Figura 20 - Curvas de contorno para ZEA em função do tempo de retenção	73
Figura 21 - Gráfico função desejabilidade para AFM ₁	75
Figura 22 - Gráfico função desejabilidade para ZEA	76

Figura 23 - Cromatograma na banda de eluição das AFs	77
Figura 24 - Cromatograma na banda de eluição da ZEA e OTA	77
Figura 25 - Cromatograma do extrato “branco” de leite desnatado	79
Figura 26 - Percentual do efeito matriz observado na faixa de concentração estudada para as curvas analíticas para cada nível de concentração.	82

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Principais micotoxinas produzidas por espécies fúngicas mais frequentes em alimentos contaminados	14
Tabela 2 - Variação da composição centesimal do leite em função da raça bovina	20
Tabela 3- Limite máximo tolerado (LMT) para as micotoxinas em estudo em alguns alimentos	23
Tabela 4 - Preparo das soluções estoques individuais das 7 micotoxinas estudadas	31
Tabela 5 - Propriedades físico-químicas e espectrais das micotoxinas estudadas para determinação da concentração real das substância química	33
Tabela 6 - Concentração individual das micotoxinas nas solução multimicotoxinas	33
Tabela 7 - Níveis experimentais dos parâmetros cromatográficos avaliados no planejamento fatorial fracionário 2^{4-1}	36
Tabela 8 - Níveis experimentais dos parâmetros cromatográficos avaliados no DCCR	36
Tabela 9 - Concentração individual das micotoxinas empregadas para a confecção da curva analítica	39
Tabela 10 - Níveis de fortificação aplicados para o estudo de recuperação	42
Tabela 11 - Proporção dos solventes correspondentes ao planejamento de mistura com restrições superior e inferior e as respostas obtidas em função do tR dos compostos em cada ponto do planejamento.	45
Tabela 12 - ANOVA para os modelos ajustados aos dados da Tabela 11	51
Tabela 13 - Ajuste sequencial de modelos em ordem de complexidade para uma resposta tempo de retenção assimetria e resolução para a separação entre o pico das micotoxinas	53
Tabela 14 - Ensaio do planejamento fatorial fracionário 2^{4-1} com as respostas para tR, assimetria e resolução para a separação entre o pico das micotoxinas	54
Tabela 15 – Estimativa dos efeitos individuais sobre a variável Tr	56
Tabela 16 - Estimativa dos efeitos individuais sobre a variável a assimetria	57
Tabela 17 - Estimativa dos efeitos individuais sobre a variável resolução	58

Tabela 18 - Matriz do DCCR realizado para otimização do tempo de retenção, assimetria e resolução com níveis reais e codificados dos parâmetros e respostas	60
Tabela 19 - Coeficientes de regressão para a variável independente tempo de retenção (tR) obtidos no DCCR	62
Tabela 20 - ANOVA dos modelos para tempo de retenção das micotoxinas	63
Tabela 21 - Coeficientes de regressão da Assimetria de ZEA	68
Tabela 22 - ANOVA dos modelos para assimetria das micotoxinas	69
Tabela 23 - Coeficientes de regressão da resolução para as micotoxinas AFB ₁ , AFG ₁ e ZEA	71
Tabela 24 - ANOVA dos modelos para assimetria das micotoxinas	72
Tabela 25 - Coeficiente angular (a), coeficiente linear (b), coeficiente de determinação (r ²) e faixa linear de trabalho, obtidos pela análise cromatográfica das soluções de referência	80
Tabela 26 - Limites de detecção e quantificação do instrumento	81
Tabela 27 - Percentuais médios de recuperação e os valores de RSD% obtidos através do estudo de recuperação em leite fluido desnatado, nas três concentrações de fortificação estudadas	83
Tabela 28 - Níveis de micotoxinas em amostras de leite UAT desnatado coletadas aleatoriamente em supermercados na cidade de Medianeira em 2019.	84

LISTA DE SIGLAS E ACRÔNIMOS

ACN	Acetonitrila
AA	Acidificação
BEN	Benzeno
AFB ₁	Aflatoxina B ₁
AFG ₁	Aflatoxina G ₁
AFG ₂	Aflatoxina G ₂
AFLs	Aflatoxinas
AFM ₁	Aflatoxina M ₁
ANVISA	Agencia Nacional de Vigilância Sanitária
AOAC	Association of Official Agricultural Chemistry
ASM	Assimetria do pico
AP	Altura do pico
CFDA	Administração de Alimentos e Medicamentos da China, do inglês - <i>Chinese Food and Drug Administration</i>
DAD	Detector de arranjo de diodo
DCCR	Delineamento composto central rotacional
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática, do inglês - <i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
FAO	Food and Agriculture Organization
FC	Fator de correção
FM	Fase móvel
FL	Fluorescência
FX	Fluxo
Hac	Ácido acético
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência, do inglês - <i>High performance liquid chromatography</i>
IARC	International Agency for Research on Cancer
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial
LD	Limite de detecção
LLE	Extração líquido-líquido
LMT	Limite máximo tolerado
LQ	Limite de quantificação
MERCOSUL	Mercado Comum do Sul
MeOH	Metanol
MS	Espectroscopia de massa, do inglês - <i>mass spectroscopy</i>
MTX	Micotoxinas
NHFPC	Comissão Nacional de Saúde e Planejamento Familiar, do inglês - <i>National Health and Family Planning Commission</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
OTA	Ocratoxina
PC	Ponto central
ppb	Partes por bilhão
ppm	Partes por milhão
PSA	Amina primária secundária, do inglês - <i>primary Secondary Amine</i>
PVDF	Polifluoreto de vinilideno, do inglês - <i>poly vinylidene difluorid</i>
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
SPME	Fase sólida com solvente minimizado, do inglês <i>Solid Phase Micro-Extraction</i>
SPE	Extração em fase sólida, do inglês <i>Solid Phase Extraction</i>
SQR	Substância química de referência
TLC	Cromatografia em camada delgada, do inglês <i>Thin Layer Chromatography</i>
tR	Tempo de retenção
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, do inglês - <i>high performance liquid chromatography</i>
UAT	Ultra alta temperatura
VIN	Volume de injeção
ZEA	Zearalenona

LISTA DE SÍMBOLOS

A	Absorbância
ϵ	Absortividade molar específica
α	Alfa
β	Beta
a	Coefficiente angular
r^2	Coefficiente de determinação
b	Coefficiente linear
°C	Graus Celsius
g	Gramma
h	Horas
λ	Comprimento de onda
L	Litro
>	Maior
μ	Micro
mg	Miligramma
mL	Mililitros
mm	Milímetro
min	Minuto
nm	Nanômetro
%	Por cento
kg	Quilo grama
®	Registrado
rpm	Rotação por minuto
T	Temperatura

SUMÁRIO

ABSTRACT	9
1 INTRODUÇÃO	9
2 OBJETIVOS	11
2.1 OBJETIVO GERAL	11
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	11
3 REFERENCIAL TEÓRICO	12
3.1 MICOTOXINAS.....	12
3.1.1 Aflatoxinas	14
3.1.2 Zearalenona	17
3.1.3 Ocratoxina	18
3.2 LEITE E MICOTOXINAS.....	19
3.2.1 Legislação.....	21
3.3 ANÁLISE DE MICOTOXINAS EM LEITE.....	23
3.3.1 Preparo da amostra	23
3.3.2 Determinação instrumental.....	26
3.3.3 Principais fatores que afetam a separação em HPLC	27
3.4 PARÂMETROS ANALÍTICOS PARA VALIDAÇÃO DE MÉTODO.....	28
4 MATERIAL E MÉTODOS	30
4.1 MATERIAIS	30
4.2 PREPARO DAS SOLUÇÕES ESTOQUE.....	30
4.3 PREPARO DAS SOLUÇÕES DE TRABALHO	33
4.4 OTIMIZAÇÃO CROMATOGRÁFICA	34
4.4.1 Preparo dos solventes para o planejamento de mistura	34
4.4.2 Otimização da fase móvel.....	34
4.4.3 Otimização dos parâmetros cromatográficos	36
4.5 MÉTODO DE EXTRAÇÃO QUERCHEERS	37
4.5.1 Condições cromatográficas de análise.....	38
4.5.2 Validação do método	39
4.5.3 Linearidade	39
4.5.4 Limite de detecção e quantificação	40
4.5.5 Avaliação do efeito matriz.....	40

4.5.6 Procedimento de fortificação e recuperação.....	41
4.6 AVALIAÇÃO DE MICOTOXINAS EM LEITE UAT DESNATADO	42
4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	42
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES	44
5.1 DETERMINAÇÃO DA FASE MÓVEL	44
5.1.2 Determinação das variáveis do processo cromatográfico.....	53
5.2 MÉTODO DE EXTRAÇÃO	78
5.3 VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO MULTIMICOTOXINAS PARA DETERMINAÇÃO EM LEITE DESNATADO UAT.....	79
5.3.1 Linearidade	80
5.3.2 Limite de detecção e quantificação	81
5.3.3 Efeito matriz	82
5.3.4 Ensaios de recuperação.....	83
6 AVALIAÇÃO DE MICOTOXINAS EM LEITE UAT DESNATADO.....	84
7 CONCLUSÃO.....	87
8 REFERÊNCIAS	89

1 INTRODUÇÃO

O leite está entre os seis produtos mais importantes da agropecuária brasileira. Sua produção e consumo é crescente, alavancados pelas novas tecnologias de produção, pelo desenvolvimento de novos produtos e pela demanda de alimentos mais saudáveis e nutritivos (VILELA; ALVES, 2015). Estima-se que a quantidade de leite cru produzido no Brasil no ano de 2018, segundo dados da EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária), tenha sido de 24,50 bilhões de litros (EMBRAPA, 2019). Este produto desempenha um importante papel na dieta humana, devido a sua qualidade nutricional no aporte natural de proteínas, carboidratos, gordura e biodisponibilidade de cálcio (GONZÁLEZ-SÁLAMO et al., 2016).

Há uma crescente preocupação com a qualidade do leite, que pode sofrer contaminações diversas, tais como pelas micotoxinas (GIOVATI et al., 2015; HUANG et al., 2014; PATRIARCA; PINTO, 2017). As micotoxinas são compostos bioativos tóxicos do metabolismo secundário de fungos que ocorrem naturalmente. Possuem diversas propriedades físico-químicas em termos de solubilidade, estabilidade ao pH; diversidade de estruturas químicas e peso molecular (GONZÁLEZ-SÁLAMO et al., 2016; HILLMAN; READNOUR; SOLOMON, 2017; HYMERY et al., 2014; JIA et al., 2014; SARTORI et al., 2015). Estes compostos apresentam sérios riscos à saúde humana (KETNEY; SANTINI; OANCEA, 2017) e são responsáveis por várias patologias coletivamente chamadas micotoxicoses (ZUZARTE et al., 2014). Segundo Patriarca e Pinto (2017), as aflatoxinas são potentemente hepatocarcinogênicas, a ocratoxina A pode afetar o rim e a zearalenona o sistema reprodutivo de humanos e animais.

A contaminação do leite por micotoxinas ocorre de forma indireta na maioria dos casos, ou seja, através do consumo de alimentos contaminados pelos animais em estágio de lactação (BRITZI et al., 2013; COFFEY; CUMMINS; WARD, 2009). Desta forma, é possível a transição (*carry over*) de micotoxinas para o leite, o que leva à contaminação por risco de acúmulo nos tecidos celulares e órgãos dos consumidores (DÄNICKE; BREZINA, 2013). São resistentes aos processamentos industriais (tratamentos térmicos, concentração ou secagem) os quais não causam efeitos apreciáveis sobre a redução da sua concentração, o que permite as micotoxinas estarem presentes em qualquer etapa da cadeia de produção leiteira, desde a

obtenção da matéria-prima até etapas posteriores a industrialização (CAMPAGNOLLO et al., 2016a; FLORES-FLORES et al., 2015; JUAN et al., 2017).

A aflatoxina M₁ (AFM₁) é a principal micotoxina de ocorrência no leite, por isso é relatada de forma exaustiva na literatura (ASSEM; MOHAMAD; OULA, 2011; BILANDŽIĆ; VARENINA; SOLOMUN, 2010; HUANG et al., 2014; MASHAK et al., 2016). É um derivado metabólico hidroxilado da aflatoxina B₁ (AFB₁) formado no fígado de ruminantes e secretado nas glândulas mamárias durante a síntese do leite (COFFEY; CUMMINS; WARD, 2009; IHA et al., 2013; KETNEY; SANTINI; OANCEA, 2017; SARTORI et al., 2015). Embora a AFM₁ seja de maior ocorrência em leite não é a única micotoxina passível de transição para essa matriz, e a coexistência de diferentes micotoxinas dentro de um produto alimentar podem afetar sua toxicidade, mostrando efeitos aditivos ou mesmo sinérgicos (FLORES-FLORES; GONZÁLEZ-PEÑAS, 2015; PATRIARCA; PINTO, 2017).

Várias técnicas tem sido empregadas para análises práticas e detecção de um amplo espectro de micotoxinas (DONKOR; RAMCHANDRAN; VASILJEVIC, 2016). Nesse contexto, a validação de métodos é um requisito importante na análise química, que torna confiável o método analítico empregado na determinação, de um ou de vários compostos, de acordo com os regulamentos nacionais e exigências internacionais.

Assim, entende-se que o risco provocado à saúde humana pela exposição indireta à micotoxinas por meio do consumo de leite é alto, admitindo-se que há o aumento da toxidade desses compostos quando ocorrem de forma simultânea diferentes micotoxinas em matriz alimentar. Não obstante, ainda são escassos os trabalhos que abordem a presença de multimicotoxinas em leite, tornando necessária essa abordagem para a obtenção de métodos sensíveis, com ensaios rápidos, econômicos e ferramentas que possibilitem a determinação desses compostos em leite, de maneira que atendam as regras de segurança e padrões determinados pelos órgãos competentes de controle sanitário.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver um método para determinar de forma simultânea multimicotoxinas (AFB₁, AFG₁, AFG₂, AFM₁, OTA e ZEA) em leite ultra alta temperatura (UAT) empregando cromatografia líquida de alta eficiência com detecção fluorescência (FL) acoplado, seguindo a normativa nacional da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2017).

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar um planejamento de mistura com restrições superiores e inferiores para determinar uma fase móvel adequada para eluir e separar as seis micotoxinas em estudo, a saber: AFB₁, AFG₁, AFG₂, AFM₁, OTA e ZEA;
- Otimizar o sistema cromatográfico através de estratégia sequencial de planejamento de experimentos (planejamento fatorial fracionário seguido de delineamento central composto rotacional) para avaliar os parâmetros porcentagem da acidificação da fase móvel, fluxo do sistema, volume de injeção e temperatura da coluna sobre as variáveis de resposta tempo de retenção, resolução e assimetria dos picos cromatográficos;
- Realizar a otimização no sistema cromatográfico em função das variáveis do processo: porcentagem da acidificação da fase móvel, volume de injeção e temperatura da coluna empregando o método de desejabilidade de Derringer e Suich;
- Desenvolver um método de extração para as seis micotoxinas estudadas baseado no método QuERChERS;
- Validar o método proposto de acordo com os procedimentos de validação laboratorial, atendendo aos critérios estabelecidos na Guia Para Validação De Métodos Analíticos e Bioanalíticos da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2017);
- Avaliar a ocorrência das micotoxinas em estudo em leite fluido UAT comercializado na região Oeste do Paraná.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 MICOTOXINAS

Os fungos pertencem ao Reino *Fungi*, são organismos heterotróficos que se encontram distribuídos de forma natural nos solos, no ar, em ambientes aquáticos e em matérias orgânicas. Fungos filamentosos, dentre os quais os principais gêneros são *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium*, são importantes deteriorantes de alimentos e suas diversas espécies tem a capacidade de sintetizar compostos micotoxigênicos (MOHAMMADI et al., 2017).

A cinética de crescimento fúngico em um sistema fechado (Figura 1) é descrita por quatro principais fases: lag, crescimento exponencial, estacionária e declínio. Durante a fase exponencial os fungos se reproduzem e crescem usando precursores do metabolismo primário, como por exemplo ácidos nucleicos, proteínas, carboidratos e lipídios. Na sequência, durante a fase estacionária, diversas alterações bioquímicas, as quais estão relacionadas principalmente ao mecanismo de defesa dos fungos, e a variações na temperatura, umidade, pH e A_w , promovem a síntese de produtos do metabolismo secundário fúngico (ALEXOPOULOS; MIMS; BLACKWELL, 1996; BATTILANI, 2008).

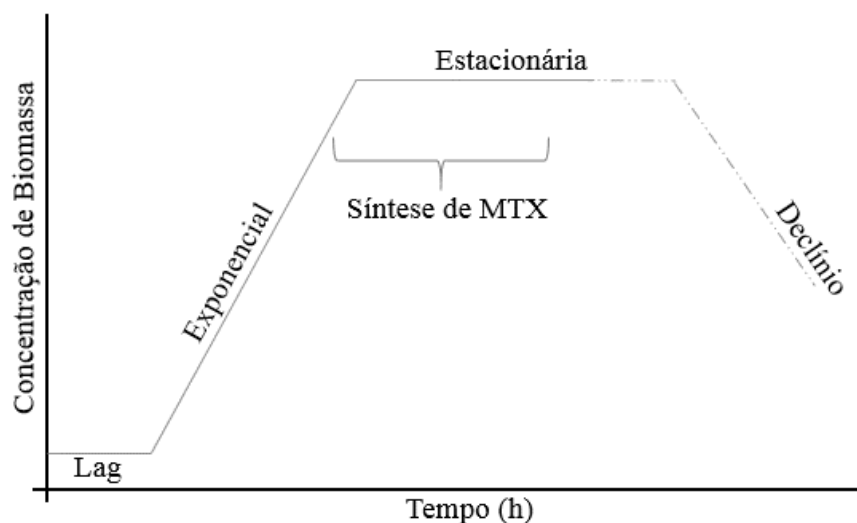


Figura 1 – Fases de crescimento fúngico e localização da síntese de micotoxina
Fonte: Adaptado de Castilho (2007)

A natureza química dos produtos do metabolismo secundário fúngico definirá sua característica bioativa. Em geral, são compostos que apresentam baixo peso molecular, estrutura química complexa e alto potencial farmacológico ou toxigênico a seres humanos e animais, esse último grupo são denominados micotoxinas (HUMPF; RYCHLIK; CRAMER, 2018; TAKAHASHI et al., 2017). As micotoxinas são um dos grupos de contaminantes de produtos alimentares mais importantes, pois apresentam alto potencial tóxico em concentrações muito baixas e efeitos adversos causados por contato dermatológico e inalação, mas, principalmente pela ingestão de alimentos contaminados. Conseqüentemente, representam um enorme risco para a saúde de seres humanos e animais e um desafio para muitos especialistas em segurança alimentar em todo o mundo, que buscam controlar e garantir que os alimentos sejam seguros e saudáveis (STOEV, 2015).

Os relatos científicos apontam a existência de mais de 400 tipos de micotoxinas que se dividem em três tipos: parentais, modificadas e mascaradas (BHAT; RAI; KARIM, 2010; HUMPF; RYCHLIK; CRAMER, 2018). Elas podem acometer diversos tipos de culturas agrícolas (PATRIARCA; PINTO, 2017) como trigo, milho, arroz, cevada e seus derivados (AL-HADITHI; KÖSSLER; KARLOVSKY, 2015; HEIDTMANN-BEMVENUTI et al., 2012; ISMAIL et al., 2018), assim como produtos de origem animal como ovos, leites e derivados (CHAVARRÍA et al., 2017; FLORES-FLORES; GONZÁLEZ-PEÑAS, 2018; FRENICH et al., 2011). Na Tabela 1 são descritas as principais micotoxinas presentes em alimentos, as espécies fúngicas produtoras e os principais alimentos nos quais esses compostos são encontrados.

Em produtos de origem animal e seus derivados, as micotoxinas podem estar presentes devido ao processo de transição denominado de *carry over*, que é a passagem de micotoxinas da ração ou silagem contaminada para esses produtos (KEESE et al., 2008). O *carry over* ocorre de forma heterogênea, é mutável de acordo com a região geográfica, a estação do ano e com fatores nutricionais e fisiológicos intrínsecos ao animal (BHAT; RAI; KARIM, 2010; FINK-GREMMELS, 2008; KEESE et al., 2008).

Tabela 1 - Principais micotoxinas produzidas por espécies fúngicas mais frequentes em alimentos contaminados.

MTX	Fungos Produtores	Alimentos suscetíveis
AFs	<i>Aspergillus flavus</i> , <i>A. parasiticus</i>	Milho, amendoim, nozes, arroz, figo, leites e derivados
OTA	<i>Aspergillus section Nigri</i> , <i>A. ochraceus</i> , <i>Penicillium verrucosum</i>	Cereais, café, cacau, frutos de vinha secos, vinho
ZEA	<i>F. culmorum</i> , <i>F. equiseti</i> , <i>F. verticillioides</i> , <i>F. graminearum</i>	Milho, cevada, trigo, centeio
FUM T-2, HT-2	<i>F. proliferatum</i> , <i>F. verticillioides</i> <i>F. langsethiae</i> , <i>F. poae</i> , <i>F. sporotrichioides</i>	Milho, sorgo e silagem Trigo e milho
DON	<i>Fusarium graminearum</i> , <i>F. poae</i> , <i>F. culmorum</i> , <i>F. crookwellense</i> , <i>F. sporotrichioides</i> , <i>F. tricinctum</i> , <i>F. acuminatum</i>	Trigo, milho, cevada, aveia, centeio
NIV	<i>F. crookwellense</i> , <i>F. poae</i> , <i>F. nivale</i> , <i>F. culmorum</i> , <i>F. graminearum</i>	Trigo, milho, cevada, aveia, centeio
PAT	<i>P. expansum</i>	Maçãs, peras, subprodutos da fruta, tomate
AOH, AME	<i>Alternaria alternata</i> , <i>A. tenuissima</i> , <i>A. arborescens</i>	Tomate e tomate, frutas e produtos à base de frutas, cereais, vinho, cerveja
TeA	<i>A. tenuissima</i> , <i>A. arborescens</i> ATXs	Tomate e tomate, frutas e produtos à base de frutas, cereais, vinho, cerveja
ATXs	<i>Alternaria alternata</i> , <i>A. tenuissima</i> , <i>A. arborescens</i>	Trigo, arroz, sementes de girassol

Legenda: AF, aflatoxinas; AME, éter etílico de alternariol; AOH, alternariol; ATXs, altertoxinas; DON, desoxinivalenol; FUM, fumonisinias; HT-2, toxina HT-2; NIV, nivalenol; OTA, Ocratoxina A; PAT, Patulina; Toxina T-2, T-2; TeA, ido tenuazico; ZEA, zearalenona.

Fonte: Adaptado de Patriarca e Pinto (2017).

O consumo de alimentos contaminados por micotoxinas está relacionado a um conjunto de patologias denominadas micotoxicoses (STOEV, 2015). Vários estudos têm atribuído a esses compostos efeitos agudos e crônicos tóxicos como carcinogenicidade, mutagenicidade, teratogenia e imunossupressão, tanto em animais como em humanos (HYMERY et al., 2014; MARCHESE et al., 2018; REN et al., 2016; ZHANG et al., 2015). Assim sendo, a depender do nível de contaminação por micotoxinas o consumo do alimento se torna impróprio para humanos e animais, o que gera grandes perdas econômicas (FLORES-FLORES; GONZÁLEZ-PEÑAS, 2017)

3.1.1 Aflatoxinas

O grupo das aflatoxinas (AFs) é um dos mais importantes devido a sua ampla distribuição em diversos tipos de alimentos e alto grau de toxicidade (ASHIQ; HUSSAIN;

AHMAD, 2014). Existem cerca de 20 estruturas diferentes de AFs (Figura 2), algumas são produzidas naturalmente por espécies de *Aspergillus*, principalmente por *A. flavus*, *A. parasiticus* e *A. nomius*, são elas AFs B₁, B₂, G₁ e G₂ (ASHIQ; HUSSAIN; AHMAD, 2014; KENSLER et al., 2011; PATRIARCA; PINTO, 2017), outras são produtos metabólicos de AFB₁ e AFB₂, como a AFM₁ e a AFM₂ (PATRIARCA; PINTO, 2017; SARTORI et al., 2015).

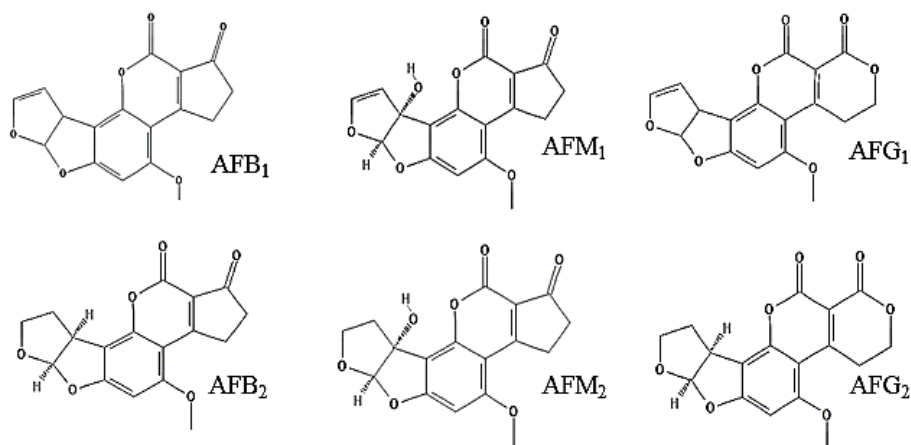


Figura 2 – Estrutura química das principais AFs.

Fonte: PubChem database (2019)

Quimicamente, as AFs são cumarinas altamente substituídas contendo uma porção de diidrofurfurano fundido e são sintetizadas por via polietídica pelas espécies fúngicas supracitadas (KENSLER et al., 2011). AFs B₁ e B₂ são compostos fluorescentes azuis, caracterizados pela fusão de um anel de ciclopentenona ao anel lactona da fração cumarina, enquanto que a G₁ e G₂ apresentam fluorescência verde e contém um anel de lactona fundido (ABRAR et al., 2013). AFB₁ e AFG₁ podem ser epoxidadas nas posições 8-9 não saturadas do seu anel furano terminal, o produto dessa reação aumenta fundamentalmente a sua capacidade cancerígena (KUMAR et al., 2017). AFB₂ e AFG₂ são relativamente não tóxicas porém, podem ser metabolicamente oxidadas para AFB₁ e AFG₁ *in vivo* (KENSLER et al., 2011).

No trato digestório de animais ruminantes a AFB₁ é absorvida e, posteriormente, biotransformada por enzimas hepáticas com funções oxidases que pertencem ao sistema

citocromo P-450, tais como a CYP1A2, CYP3A4, CYP2A6 (DOHNAL; WU; KUČA, 2014; MARCHESE et al., 2018), que convertem à AFB₁ a outros compostos por múltiplas vias (KENSLE et al., 2011) (Figura 3). O principal produto da biotransformação é a AFM₁, que apresenta elevada toxicidade e é frequentemente encontrada em leites e derivados (CAMPAGNOLLO et al., 2016b).

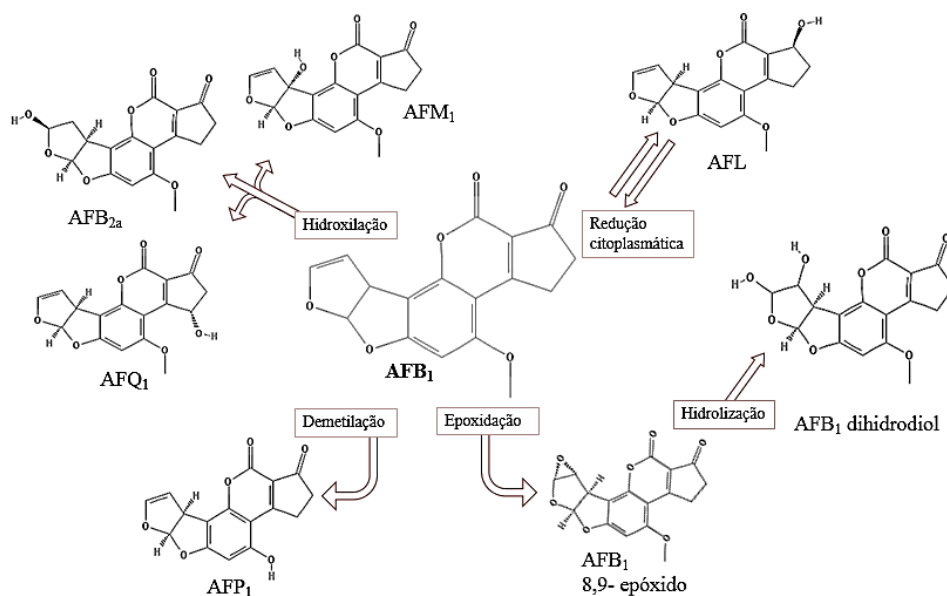


Figura 3 – Vias de conversão dos metabólitos derivados da AFB₁
Fonte: PubChem database (2019)

O consumo de alimentos contaminados por AFs causa vários efeitos adversos à saúde, chamados coletivamente de aflatoxicose. De acordo com a dose de AFs e a duração da exposição, aflatoxicoses agudas ou crônicas podem ser reconhecidas, causando vômitos, doenças do fígado e coração, edema pulmonar, letargia, acúmulo de gordura no fígado e até morte (BHAT; RAI; KARIM, 2010; GIOVATI et al., 2015).

3.1.2 Zearalenona

A zearalenona (ZEA) (Figura 4) é sintetizada por várias espécies fúngicas do gênero *Fusarium*, maior grupo produtor de micotoxinas, do qual são conhecidos mais de 140 metabolitos, sendo *F. graminearum* a principal espécie produtora de ZEA (PATRIARCA; FERNÁNDEZ PINTO, 2017). A ZEA é uma lactona estrogênica do ácido resorsilílico, que tem estrutura semelhante ao estrogênio e compete com 17 β -estradiol para ligar-se ao receptor de estrogênio, derivando em problemas no sistema reprodutivo e na fertilidade de mamíferos (REN et al., 2016; TADPETCH et al., 2016).

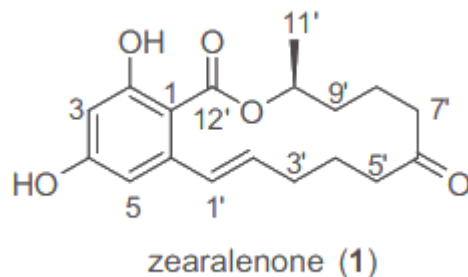


Figura 4 – Estrutura química da ZEA
Fonte: Tadpetch et al. (2016)

Ocorre com frequência em grãos cultivados em regiões de clima temperado úmido, nos estágios anteriores ao armazenamento e durante o armazenamento quando a estocagem não ocorre de forma adequada (PATRIARCA e PINTO, 2017). O milho e seus derivados são mais suscetíveis à contaminação por ZEA; entretanto, o trigo, a cevada, a aveia e o centeio também podem acumular níveis significativamente altos dessa toxina (ASHIQ; HUSSAIN; AHMAD, 2014; STOEV, 2015).

Entre a população humana as crianças são as mais afetadas devido o consumo de alimentos contaminados com ZEA, principalmente, cereais e produtos alimentícios à base de cereais. Esta micotoxina tem sido implicada em incidentes graves de alterações puberais precoces (BHAT; RAI; KARIM, 2010).

Aproximadamente 90% da zearalenona é convertida pela microbiota ruminal em derivado α -zearalenol hidroxi-metabólito e em menor proporção ao β -zearalenol. Embora α -zearalenol seja mais estrogênica do que a zearalenona parental, sua taxa de absorção é menor, além disso ocorre a sua interconversão, processo que ocorre no fígado, para o derivado menos tóxico β -zearalenol, o que resulta em menor risco a saúde do gado leiteiro. Entretanto, tanto a zearalenona como os seus metabolitos podem ser excretados no leite (FINK-GREMMELS, 2008). Huang et al. (2014) constataram a presença de ZEA e α -zearalenol em amostras de leite cru fluído e leite em pó em estudos realizados em Beijim (China).

3.1.3 Ocratoxina

A ocratoxina (OTA) é produzida por várias espécies de *Penicillium* e *Aspergillus*, apresenta uma fração de para-clorofenol contendo um grupo dihidroiso-cumarina que está ligado a amida à β -fenilalanina (Figura 5). É um ácido fraco que permite vários derivados (hidroxilados, conjugados e outros sem a fenilalanina) que ocorrem de forma natural por processos de biotransformação, e outros podem ser formados por degradação térmica (MALIR et al., 2016).

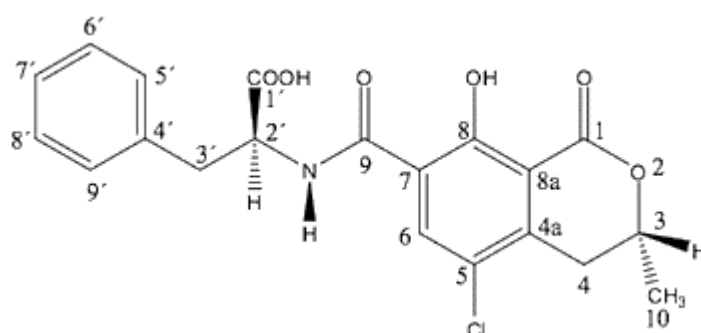


Figura 5 – Estrutura química da OTA
Fonte: Malir et al. (2016)

A OTA está relacionada a diversos efeitos toxicológicos, incluindo nefrotoxicidade, mutagenicidade, teratogenicidade, neurotoxicidade e imunotoxicidade, em animais e seres

humanos. O modo de ação tóxico dessa micotoxina parece estar associado à danos oxidativo e efeitos no controle epigenético (AL-HADITHI; KÖSSLER; KARLOVSKY, 2015; UKWURU; OHAEGBU; MURITALA, 2017). É encontrada em diferentes produtos agrícolas, feijões, amendoim, frutas secas, café, cerveja, vinho, cereais (principal fonte de exposição humana), e alguns produtos de origem animal (AL-HADITHI; KÖSSLER; KARLOVSKY, 2015). Também pode estar presente em leite e derivados, devido à exposição dos animais a ração contaminada, embora em concentrações significativamente mais baixas do que as observadas em cereais (CAPPOZZO et al., 2017).

A microbiota intestinal de ruminantes absorve apenas pequenas quantidades de OTA, pois é capaz de degradar por protozoários do rúmen e também bioconverter frações remanescentes ao derivado OTA- α , menos tóxico. Entretanto, mudanças na composição alimentar que possibilitem uma alta porcentagem de concentrados ricos em proteína na dieta diária de animais lactantes modificam a capacidade de clivagem dos micro-organismos do rúmen, permitindo que quantidades pequenas possam ser detectadas no leite (COFFEY; CUMMINS; WARD, 2009; FINK-GREMMELS, 2008).

3.2 LEITE E MICOTOXINAS

O consumo de leite no Brasil tem aumentado desde 1961, ano em que foram feitos os primeiros registros sobre a cadeia produtiva leiteira do país (VILELA; ALVES, 2015). Este aumento está caracterizado por implementações tecnológicas e melhorias no manejo animal com aumento da produtividade das vacas ordenhadas (JUNG; MATTE, 2016). Atualmente, o leite está entre os seis produtos mais importantes da agropecuária brasileira; as previsões indicam que até 2025 o país passará a produzir mais de 47,5 bilhões de litros de leite anuais, a região Sul do país é uma das mais produtivas com destaque para o estado do Paraná (VILELA; ALVES, 2015). A média de consumo *per capita* de leite no Brasil é de 170 litros, sendo que idosos e crianças são os grupos que mais consomem o produto (EMBRAPA, 2019; VILELA; ALVES, 2015).

O leite é importante na alimentação humana, pois é composto por vários nutrientes, os principais são: água, carboidratos, gordura, proteínas, vitaminas e minerais, que variam em teor

dependendo de vários fatores, tais como ambiente, estágio de lactação, manejo na ordenha, sanidade, alimentação subministrada ao animal, idade do animal e genética, como é mostrado em exemplo na Tabela 2 (CRUZ et al., 2017). Entretanto, a qualidade do leite não tem relação apenas com os teores de nutrientes que o compõe mas também com a ausência de contaminantes, químicos ou biológicos (SHAHBAZI; NIKOUSEFAT; KARAMI, 2017).

Tabela 2 Variação da composição centesimal do leite em função da raça bovina

Raça	Gordura (%)	Proteína (%)	Lactose (%)	Cinzas (%)	Sólidos Totais (%)
Ayrshire	4,1	3,6	4,7	0,7	13,1
Guernsey	5,0	3,8	4,9	0,7	14,4
Holstein	3,5	3,1	4,9	0,7	12,2
Jersey	5,5	3,9	4,9	0,7	15,0
Pardo Suíço	4,0	3,6	5,0	0,7	13,3
Zabul	3,9	3,9	5,1	0,8	14,7

Fonte: Jensen (1995)

Muitos relatos científicos descrevem a contaminação do leite pela AFM₁. Contudo, sabe-se que outras micotoxinas podem estar presentes no leite (BECKER-ALGERI et al., 2016; BIANCO et al., 2012; GONÇALVES et al., 2018; SARTORI et al., 2015).

Sartori et al. (2015) relataram a presença da AFM₂ em 24% (n = 17) de amostras de leite em pó e em 18% (n = 3) das amostras de leite UAT de um total de 88 amostras de leite comercializado em supermercados do Rio de Janeiro. Em estudo publicado por Mao et al. (2018), realizado em amostras de leite cru de cinco diferentes regiões da China, a presença de AFG₁ foi detectada em uma das 250 amostras analisadas. Um outro estudo realizado por Herzallah et al. (2009) sobre leites comercializados em supermercados da Jordânia relatou a presença de AFG₁, AFG₂, AFB₁ além da AFM₁. Gonçalves et al. (2018) analisaram a ocorrência de AFB₁ e AFM₁ em 112 amostras de leite comercial nas cidades de Rio Grande, sul do Brasil (leite integral, semi e desnatado, e leite em pó) e Assomada, em cabo Verde (leite em pó), 16% das amostras do RS estavam contaminadas pela AFB₁. Jia et al. (2014) descreveram a ocorrência de OTA em amostras de leite comercializadas na China.

Scaglioni et al. (2014) ao analisarem leite cru, pasteurizado, concentrado, leite em pó e UHT, observaram contaminação por AFB₁ em 41,7 e 13,3% amostras de leite pasteurizado e UHT, respectivamente; enquanto que a AFM₁ teve incidência de 28,6, 58,3, 66,7 e 66,7% em

amostras de leite cru, pasteurizado, UHT e concentrado, respectivamente. Todas as amostras que apresentaram contaminação por ambas as aflatoxinas estavam acima do limite tolerado pela legislação brasileira, $0,5 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ (BRASIL, 2011a).

A dificuldade em controlar o crescimento de fungos no material orgânico destinado à alimentação animal, principalmente nas regiões tropicais e subtropicais, aumenta a possibilidade de co-ocorrência de micotoxinas em leite de vaca (BHAT; RAI; KARIM, 2010). Apesar do rúmen animal funcionar como uma barreira, metabolizando as micotoxinas à compostos menos tóxicos, a presença de multimicotoxinas, mesmo que em concentrações baixas, tem efeito tóxico aditivo ou sinérgico, aumentando o risco para a saúde humana (FLORES-FLORES; GONZÁLEZ-PEÑAS, 2018).

A co-ocorrência de micotoxinas é uma situação comum nos cereais, silagem e matéria orgânica destinada à alimentação animal (VIDAL et al., 2013). Isso ocorre principalmente por três razões: (i) substratos alimentares podem ser contaminados por vários fungos de maneira concomitante ou em rápida sucessão, (ii) a maioria dos fungos é capaz de produzir várias micotoxinas simultaneamente e (iii) as dietas dos animais são geralmente produzidas de várias fontes de grãos (STREIT et al., 2012). Animais ruminantes ficam mais expostos, pois tem dieta mais variadas que outros animais de criação. Normalmente são alimentados com silagem, ou subprodutos resultantes dos cultivos agrícolas (SMITH et al., 2016).

Embora haja consenso sobre o perigo tóxico eminente da co-ocorrência de micotoxinas em um único produto alimentar, os efeitos reais na saúde humana ainda são desconhecidos (FLORES-FLORES; GONZÁLEZ-PEÑAS, 2017). A questão da toxicidade combinada é complexa, mas geralmente pode-se concluir que a co-exposição a várias micotoxinas pode resultar em efeitos do tipo antagônico, aditivo ou sinérgico, este último caso, particularmente, quando as micotoxinas exercem sua toxicidade por meio de um modo de ação comum (ASSUNÇÃO et al., 2015).

3.2.1 Legislação

Apenas a AFM₁ possui limite regulamentar em matrizes lácteas nos mais de 99 países nos quais há diretrizes para controle de micotoxinas (FAO, 2003). No Brasil, a regulamentação

fica à competência da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), através da RDC nº 7 de fevereiro de 2011 (BRASIL, 2011a) que considera indispensável a regulamentação técnica sobre contaminantes em alimentos e estabelece a aprovação de limites máximos toleráveis para aflatoxinas em leite fluído e leite em pó, além de outros alimentos, bem como atribui métodos de amostragem e análise. Segundo essa resolução, fica estabelecido como limite máximo de AFM₁ em leite fluído, leite em pó e queijos as concentrações de 0,5 µg.kg⁻¹, 5 µg.kg⁻¹ e 2,5 µg.kg⁻¹, respectivamente.

A legislação brasileira é amparada por base nos instrumentos harmonizados no Mercosul relacionados a limites máximos de aflatoxinas em alimentos, estabelecidos pelo Tratado de Assunção, pelo Protocolo de Ouro Preto e o Grupo Mercado Comum (GMC) no regulamento técnico MERCOSUL/GMC/RES. N. 25/02, no qual os países membros do grupo conformaram a concentração máxima de aflatoxina M₁ em leite fluído e em pó de 0,5 µg.kg⁻¹ e 5 µg.kg⁻¹, respectivamente (MERCOSUL/GMC, 2002).

Mundialmente são aceitos limites para AFM₁ no leite para consumo humano na faixa entre 0,05 µg.kg⁻¹ e 0,5 µg.kg⁻¹; no entanto, o Egito determina que leites e derivados devem estar livres de AFs (DEEB; AMAN; EL-HAWARY, 2017). A União Européia, através do Regulamento da Comissão Europeia (CE) nº 1881/2006 de 19 de dezembro de 2006, estabelece o limite máximo para AFM₁ de 0,05 µg.kg⁻¹ para leite cru e produtos lácteos, e 0,025 µg.kg⁻¹ para alimentos infantis a todos os países do bloco (CE, 2006a).

Os Estados Unidos possui o guia regulamentar sobre micotoxinas expedido pela *Food and Drug Administration* (FDA) e este foi revisado em 2011, no qual estabelecem os limites máximos de 0,5 µg.kg⁻¹ para leite fluído e 20 µg.kg⁻¹ para derivados lácteos (FDA, 2011)

Na China, a Comissão Nacional de Saúde e Planejamento Familiar (NHFPC) e a Administração de Alimentos e Medicamentos da China (CFDA) divulgaram em março de 2017 um Padrão Nacional de Segurança Alimentar para Níveis Máximos de Micotoxinas em Alimentos. Este padrão estabelece limites para AFM₁ em leite cru, em pó e produtos lácteos ou com adição de proteínas lácteas na faixa de 0,5 µg.kg⁻¹ (NHFPC, 2017). Outros países da Ásia como Japão, Coreia, Malásia e Indonésia definiram limites máximos de 0,5 µg.kg⁻¹ para leite cru, porém apresentam diferentes níveis máximos permitidos para produtos derivados (FAO, 2003)

No Brasil, outras micotoxinas como AFB₁, AFG₁, AFG₂, OTA e ZEA tem limites de tolerância máximo permitido para vários outros produtos (Tabela 3); entretanto, nenhuma delas está associada a leites e/ou derivados apesar do risco decorrente do *carry over* (BRASIL, 2011a).

Tabela 3 – Limite máximo tolerado (LMT) para as micotoxinas em estudo em alguns alimentos.

Micotoxina	Alimento	Limite Máximo Tolerado ($\mu\text{g}\cdot\text{Kg}^{-1}$)
AFM ₁	Leite fluído	0,5
	Leite em pó	5
AFB ₁ , AFB ₂ , AFG ₁ , AFG ₂	Alimentos à base de cereais para a alimentação infantil	1
	Fórmulas infantis	
OTA	Vinhos e derivados	2
	Suco de uva e polpa de uva	
ZEA	Alimentos à base de cereais	20

Fonte: Adaptado de ANVISA (2011)

3.3 ANÁLISE DE MICOTOXINAS EM LEITE

3.3.1 Preparo da amostra

As micotoxinas encontram-se no leite em concentrações baixas, o que requer métodos analíticos sensíveis e confiáveis para sua detecção. O emprego de métodos padrões é limitado e atende a necessidade de detecção de um único composto micotoxicológico por vez, inviabilizando muitas vezes a rotina de trabalhos laboratoriais que recebem amostras contaminadas com multimicotoxinas que muitas das vezes apresentam estruturas químicas variadas (ANDRADE; LANÇAS, 2015). Previamente antes de executar as análises, etapas de limpeza são requeridas pois a amostra deve estar adequada ao tipo de instrumentação utilizada e ao resultado exigido (PRESTES; ADAIME; ZANELLA, 2011). Os métodos de extração e limpeza devem ser confiáveis e são vitais para o sucesso da análise (IAMANAKA; OLIVEIRA; TANIWAKI, 2013). A maioria dos métodos tradicionais de extração são morosos, empregam grandes volumes de solventes orgânicos, tem alto custo, etc. Por isso, recentemente, vem

ocorrendo o desenvolvimento de novos métodos analíticos, visando contornar esses inconvenientes (PRESTES; ADAIME; ZANELLA, 2011).

Uma ampla variedade de métodos de preparações de amostras está relatada na literatura para micotoxinas, como extração líquido-líquido (LLE) (HUANG et al., 2014), extração em fase sólida (SPE) (HERZALLAH, 2009), microextração em fase sólida com solvente minimizado (SPME) (AL-HADITHI; KÖSSLER; KARLOVSKY, 2015) e extração por coluna de imunoafinidade (MASHAK et al., 2016).

O método QuEChERS (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe*) foi desenvolvido por Anastassiades et al. (2003) com o objetivo de debelar as limitações dos métodos multi-resíduos até então existentes, a princípio o método foi aplicado para a extração de resíduos de pesticidas em alimentos (PRESTES; ADAIME; ZANELLA, 2011). É um método vantajoso por ser rápido, fácil, econômico, efetivo, robusto e seguro, cumprindo os limites máximos de micotoxinas estabelecidos por rigorosas legislações internacionais e assegura extratos que podem ser analisados por diferentes métodos cromatográficos (CABRERA et al., 2012). Dessa forma, devido a sua simplicidade e eficácia, modificações tem sido implementadas ao método (SUN et al., 2016), o que tem permitido sua aplicação na extração de multimicotoxinas em diversas matrizes alimentares, incluindo leite (ANDRADE; DA SILVA; CALDAS, 2013; FLORES-FLORES; GONZÁLEZ-PEÑAS, 2018) e derivados (FURLANI et al., 2015; NADIRA et al., 2017; RODRÍGUEZ-CARRASCO et al., 2018).

O método é composto por três principais etapas: extração, partição e *clean up* (Figura 6) (CABRERA et al., 2012). A escolha do solvente de extração depende da matriz e dos analitos a serem extraídos, pois as diferentes misturas químicas podem afetá-los. Nesse sentido, o emprego de solventes orgânicos puros (FURLANI et al., 2015) ou em misturas (DZUMAN et al., 2014; JIA et al., 2014) tamponadas com ácidos fracos (FLORES-FLORES; GONZÁLEZ-PEÑAS, 2017; SARTORI et al., 2015) para extração de multimicotoxinas tem sido estudados para aumentar a capacidade de recuperação do método.

A etapa de partição permite o efeito *salting out* por adição de sais, com o objetivo de remover a água e diminuir a solubilidade do analito na fase aquosa e, assim, propiciar sua partição na fase orgânica (CABRERA et al., 2012). Diferentes misturas salinas e proporções tem sido descritas. Sartori et al. (2015) aplicaram $MgSO_4$ em combinação com NaCl na proporção de 6:1,5 (m.m⁻¹) para leite, enquanto que Furlani et al. (2015) aplicaram os mesmos

sais na proporção de 4:1 (m.m^{-1}) para iogurte. Carrasco et al. (2017) empregaram Na_2SO_4 e NaCl na proporção de 4:1,2 (m.m^{-1}) para amostras de leite e Karaseva et al. (2014) aplicam a mistura de sais contendo NaCl , $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ e $\text{Na}_2\text{HC}_6\text{H}_5\text{O}_7$ nas proporções de 1:1:0,5 (m.m^{-1}) para amostras de leite e derivados.

O último passo na obtenção do extrato analítico, o *clean up*, reduz componentes interferentes da matriz que eventualmente podem aderir no sistema de injeção e na coluna cromatográfica, é uma etapa fundamental para promover robustez e confiabilidade aos resultados obtidos (PRESTES; ADAIME; ZANELLA, 2011). Adsorventes como o C_{18} em mistura com sais secantes como o MgSO_4 (KARASEVA; AMELIN; TRET, 2014), amina primária secundária (PSA) e Na_2SO_4 (RODRÍGUEZ-CARRASCO et al., 2018), ou mistura contendo celite e MgSO_4 (HEIDTMANN-BEMVENUTI et al., 2012) tem sido utilizadas. Alguns autores tem prescindido do uso destes sais e apenas promovido a limpeza com filtros de seringa de porosidade reduzida (FLORES-FLORES; GONZÁLEZ-PEÑAS, 2015; SARTORI et al., 2015).

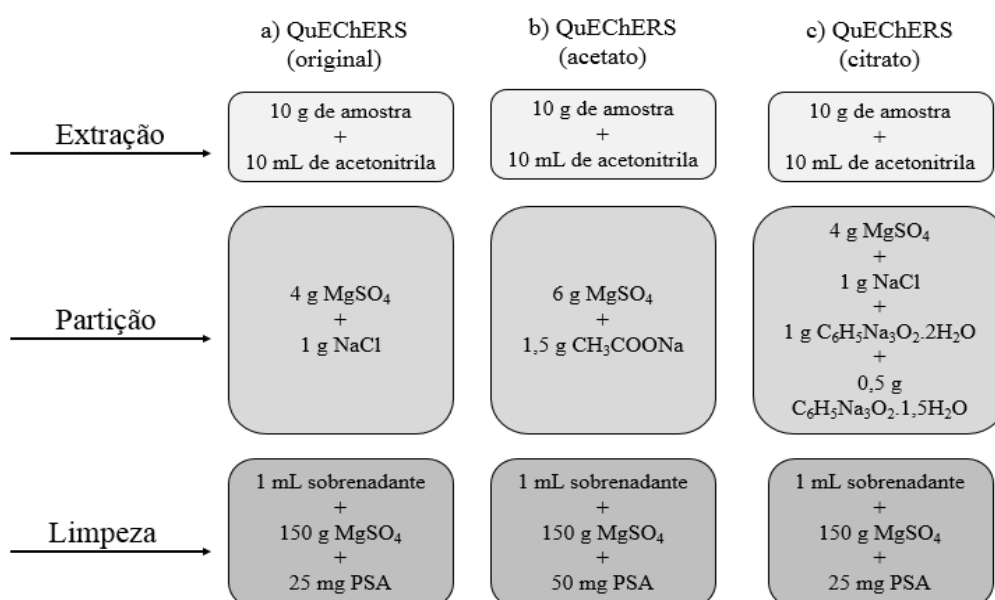


Figura 6 – Representação das etapas principais e exemplos de modificações aplicados ao método QuEChERS

Legenda: a) original; b) acetato; e c) citrato.

Fonte: Prestes; Adaime; Zanella (2011)

3.3.2 Determinação instrumental

Para a detecção de micotoxina em matrizes alimentares várias técnicas podem ser empregadas. A cromatografia em camada delgada (TLC) é um método popular usado para análise quantitativa e semi-quantitativa de micotoxinas. Ela tem a capacidade de rastrear um grande número de amostras de cada vez e é econômica. Porém, após sua aplicação são necessárias análises confirmatórias envolvendo técnicas mais avançadas (DONKOR; RAMCHANDRAN; VASILJEVIC, 2016).

Outro método para detecção e também para determinar a concentração de micotoxinas é o ELISA (*Enzyme-linked Immunosorbent Assay*) que tornou-se popular devido à facilidade de aplicação, rapidez e alta especificidade. No entanto, os *kits* ELISA comercialmente disponíveis são de uso único, pois para detecção de micotoxinas estão baseados em um formato de ensaio competitivo que usa um anticorpo primário específico para a molécula alvo ou uma conjugação de uma enzima e o alvo requerido, o que encarece sua aplicação (LI et al., 2014; RAZA; KIM, 2018).

A análise moderna de micotoxinas baseia-se na separação por HPLC (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, do inglês - *High Performance Liquid Chromatography*) empregando vários adsorventes, dependendo da estrutura física e química da micotoxina (RAZA; KIM, 2018). Colunas de fase normal ou reversa são usadas para separar e purificar toxinas com base na polaridade (ANDRADE; LANÇAS, 2015). Os métodos de detecção comumente usados são violeta (UV) ou fluorescência (FL), que dependem da presença de um cromóforo nas moléculas analisadas (DONKOR; RAMCHANDRAN; VASILJEVIC, 2016). Os benefícios do sistema HPLC, juntamente com a alta qualidade de separação e baixo limite de detecção (LD), e a possibilidade de combinar múltiplos sistemas de detecção FL, UV, detector de arranjo de fotodiodo (DAD) e espectroscopia de massa (MS), permite a detecção múltipla de compostos de uma amostra. Além disso, o sistema pode ser automatizado, o que confere a primazia dessa técnica sobre as outras já citadas (DONKOR; RAMCHANDRAN; VASILJEVIC, 2016).

3.3.3 Principais fatores que afetam a separação em HPLC

Em cromatografia líquida de alta eficiência é comum se deparar com as chamadas variáveis de processo, são parâmetros do sistema que podem sofrer ajustes de forma independente uns dos outros (BREITKREITZ; JARDIM; BRUNS, 2009). Algumas variáveis do processo cromatográfico podem ser o tipo de fase estacionária, a temperatura da coluna, a vazão da fase móvel (FM), o volume de injeção, escolha da FM, acidificação da FM, entre outros (KIRKLAND; GLAJCH, 1983; REIS et al., 1998). No sistema HPLC, os efeitos mais importantes sobre a separação dos analitos são influenciados pela composição da FM; no entanto, todos os outros parâmetros supracitados devem ser considerados (MUHLEN; LANÇAS, 2004). A FM é uma combinação de solventes orgânicos, demanda-se que sejam de elevada pureza e devem exercer sobre os analitos de interesse força cromatográfica (para retenção dos compostos) e seletividade (para separação entre os compostos). Ambas características serão influenciadas pelo tipo de solvente e proporção empregada na mistura da FM, esses dois parâmetros, classicamente, tem sido determinados por três vias: empiricamente, diminuindo-se gradativamente a proporção do modificador orgânico, através do uso de equações e através do emprego de um gradiente linear (BREITKREITZ; JARDIM; BRUNS, 2009); entretanto, outras abordagens tem sido empregadas para esse fim (ANDERSSON et al., 1994; FERREIRA et al., 2004; GLAJCH; KIRKLAND, 1989).

Alguns trabalhos científicos tem aplicado diferentes tipos de planejamento experimental para separação de picos em cromatografia líquida (BREITKREITZ; JARDIM; BRUNS, 2009; HIBBERT, 2012; NOWAK; SEUBERT, 1999).

A otimização das condições cromatográficas passa pelo controle e ajuste adequado de cada uma das condições variáveis envolvidas no processo. Por outro lado, a problemática em amostras com multicompostos envolve a inter separação dos picos de interesse e a separação entre picos de interesse e os interferentes da amostra. Caso as condições cromatográficas sejam ajustadas adequadamente a separação será alcançada. No entanto, essa tarefa não é fácil, pois pequenas alterações podem comprometer todo o cromatograma, criando distorções nos picos e reduzindo a seletividade (MUHLEN; LANÇAS, 2004; NETO, 2009a). A definição das metas

do processo torna-se, então, parte fundamental para obtenção de bons resultados (BREITKREITZ; JARDIM; BRUNS, 2009).

Crítérios elementares são formados por propriedades tais como a resolução (R_s), o fator de separação (α) e a retenção relativa (RR) para a descrição da separação de pares de picos. No entanto, na coexistência de picos de interesse no cromatograma, a proporção de solventes na FM deverá ser adequada para a separação de todos os analitos de interesse (VANBEL; TILQUIN; SCHOENMAKERS, 1996).

3.4 PARÂMETROS ANALÍTICOS PARA VALIDAÇÃO DE MÉTODO

Desenvolver um método analítico, adaptá-lo ou implementá-lo, exige uma avaliação sistemática que comensem sua eficiência quando aplicado à rotina do laboratório. Essa avaliação é denominada validação (BRASIL, 2017). Alguns critérios estabelecidos por Resolução devem ser atendidos para que o método seja considerado validado. Sendo assim, distinguem-se a execução de experimentos que determinam os diversos parâmetros (coleta dos dados experimentais) e a validação (POLESE; RIBEIRO, 2003). Se o método analítico for adequado para o propósito estabelecido a validação será capaz de demonstrar assegurando a confiabilidade dos resultados (RIBANI et al., 2004).

Vários trabalhos disponíveis na literatura descrevem a validação de métodos analíticos para determinação e quantificação de micotoxinas (FLORES-FLORES; GONZÁLEZ-PEÑAS, 2015; RAHMANI; JINAP; SOLEIMANY, 2010). Os parâmetros de validação podem variar entre um estudo e outro, a depender da necessidade específica de cada um; no entanto, ressalta-se a exatidão, a precisão e os limites de detecção e quantificação como parâmetros básicos a serem avaliados.

No Brasil, as duas agências credenciadoras para certificar a idoneidade de laboratórios de ensaios e métodos analíticos são: a ANVISA, através da resolução Nº 166, de 24 de julho de 2017 (BRASIL, 2017) e o INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial), através da DOQ-CGCRE-008 (INMETRO, 2018).

A linearidade está associada com a eficiência do método para fornecer resultados que sejam diretamente proporcionais à concentração do analito em exame, dentro de uma

determinada faixa de aplicação (RIBANI et al., 2004). Pode ser determinada por equação matemática ou curva analítica do sinal medido de pelo menos 7 pontos, a qual é relacionada com a concentração do analito de interesse. Aplica-se então a regressão linear para obter-se os coeficientes de regressão **a** e **b** e o coeficiente de correlação **r**, o qual deve ser o mais próximo possível a 1,0 (RIBANI et al., 2004).

A exatidão é o grau de concordância entre os resultados individuais do método em estudo em relação a um valor aceito como verdadeiro. Verificam-se nove determinações, mínimo, no intervalo linear do método em estudo em três concentrações: baixa, média e alta, conduzidas em triplicata. Estas amostras devem ser preparadas de maneira independente (BRASIL, 2017).

A precisão é o grau de dispersão entre resultados de ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, nas condições definidas como método. Para isso, calcula-se o desvio padrão relativo (DPR) da série de medições (RIBANI et al., 2004).

O efeito matriz deve ser determinado por meio da comparação entre os coeficientes angulares das curvas de calibração construídas com a solução química de referência (SQR) do analito em solvente e com a amostra fortificada com a SQR do analito. As curvas devem ser estabelecidas da mesma forma que na linearidade para os mesmos níveis de concentração, utilizando, no mínimo, 5 (cinco) concentrações diferentes em, no mínimo, triplicata (BRASIL, 2017).

O limite de detecção, deve ser demonstrado pela obtenção da menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado; porém, não necessariamente quantificado nas condições do método estabelecido. Pode ser determinado por método visual ou pela razão sinal-ruído por emprego de um branco analítico (BRASIL, 2017).

O limite de quantificação é a menor quantidade do analito presente na amostra que pode ser determinada pelo método estabelecido com precisão e exatidão aceitáveis. Para a determinação deste parâmetro aplica-se a razão sinal-ruído que deve ser no mínimo de 10:1 (BRASIL, 2017).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS

Os padrões das micotoxinas AFB₁, AFG₁, AFG₂, AFM₁, OTA e ZEA foram adquiridos da *Sigma Chemical Company*® (St. Louis, MO, EUA).

Foi empregado o cromatógrafo à líquido de alta eficiência (HPLC) acoplado ao detector de fluorescência (FL), amostrador automático com sistema de bombas quaternário (Thermo Fisher, UltiMate 3000, Sunnyvale, Estados Unidos) e coluna cromatográfica C₁₈ Acclaim PA2, 5µm Analítica (4.6 x 250 mm); para controle e aquisição de dados foi empregado o *Software Chromeleon 7.2*

Os solventes e reagentes empregados foram de grau analítico PA, com exceção de os solventes utilizados na cromatografia líquida que possuíam pureza analítica grau HPLC. A água utilizada foi purificada em sistema purificador de água por osmose reversa (Osmose 10 LX, Gehaka, 2010) acoplado a um sistema purificador de água (Master System P&D TOC, MS 2000, Gehaka).

Amostras de leite ultra alta temperatura (UAT) desnatado (30 amostras), de diferentes marcas e lotes, foram adquiridas no comércio local da cidade de Medianeira localizada no estado do Paraná.

4.2 PREPARO DAS SOLUÇÕES ESTOQUE

Cada solução estoque de micotoxina foi preparada de forma individual e a massa indicada pelo fabricante foi considerada para a solvência (Tabela 4). Para isso, removeu-se o lacre metálico dos frascos originais sem causar a abertura do septo, evitando-se assim que ocorresse a dispersão aérea das partículas sólidas cristalizadas de micotoxinas.

O septo foi perfurado com uma agulha descartável e o solvente/solução de diluição foi injetado dentro do frasco com o auxílio de uma seringa. O frasco foi homogeneizado em vórtex (Logen Scientific, LSM56/4-BIV, São Paulo) por um minuto e então aberto cuidadosamente. O volume foi transferido integralmente para um balão volumétrico graduado e repetidas

lavagens do frasco original foram sequencialmente efetuadas para completar a transferência do material de referência. Em seguida, o balão foi avolumado até o menisco, homogeneizado em vórtex por um minuto e a solução estoque foi quantitativamente transferida para um frasco âmbar identificado.

Tabela 4 – Preparo das soluções estoques individuais das micotoxinas estudadas.

MTX	Massa (mg)	Solução diluente (fração)	Vol. de sol. diluente (mL)	Concentração sol. Estoque ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	Ref.
AFM ₁	0,005	BEN:ACN (99:1)	5	1	AOAC, 2005
AFB ₁	1	BEN:ACN (98:2)	10	100	AOAC, 2005
AFG ₁	1	BEN:ACN (98:2)	100	10	AOAC, 2005
AFG ₂	1	BEN:ACN (98:2)	100	10	AOAC, 2005
ZEA	3	BEN	10	500	IAL, 2008
OTA	1	BEN:Hac (99:1)	20	50	IAL, 2008

Legenda: MTX, micotoxinas; BEN, benzeno; ACN, acetonitrila; Hac, ácido acético; Ref., referências

Fonte: IAL (2008)

Com o intuito de determinar a concentração final das soluções estoque, essas foram quantificados em espectrofotômetro UV-VIS (Perkin Elmer, Lambda XLS, Waltham, Estados Unidos). Inicialmente, foi determinado o fator de correção do instrumento. Para tal, preparou-se dois litros solução de ácido sulfúrico (H_2SO_4) 0,009 M (padrão). Em um litro da solução 0,009M foram diluídas 78 mg de dicromato de potássio ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) previamente seco e obteve-se a solução A [$0,25 \text{ mmol L}^{-1}$]. Posteriormente, realizou-se a diluição de 25 mL de solução A em 25 mL da solução de H_2SO_4 0,009 M para obter-se a solução B [$0,125 \text{ mmol L}^{-1}$]. Por último, diluiu-se 25 mL da solução B em 25 mL da solução de H_2SO_4 0,009 M para obter-se a solução C [$0,0625 \text{ mmol L}^{-1}$]. As três soluções preparadas foram lidas em espectrofotômetro UV-VIS em comprimento de onda de 350 nm, usando como branco a solução de H_2SO_4 (0,009 M). A absorvidade molar específica (ϵ) de cada solução foi calculada usando a Equação 1 (AOAC, 2005).

$$\epsilon = \frac{A \times 1000}{C} \quad (1)$$

Onde:

A = absorbância solução A, B ou C

C = concentração solução A, B ou C em mmol^{-1}

Com os valores obtidos foi feita a médias das 3 leituras utilizando a Equação 2.

$$\text{Média } (\bar{\epsilon}) = \frac{\epsilon A + \epsilon B + \epsilon C}{3} \quad (2)$$

Onde:

ϵA = absortividade molar solução A de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$

ϵB = absortividade molar solução B de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$

ϵC = absortividade molar solução C de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$

Por último, foi aplicada a Equação 3 para obter-se o fator de correção do instrumento.

$$FC = \frac{3160}{\bar{\epsilon}} \quad (3)$$

Onde,

FC = Fator de correção do espectrofotômetro

$\bar{\epsilon}$ = Média da absortividade específica das soluções

O intervalo de aceitabilidade do FC: $1,05 > FC > 0,95^{-1}$

A Equação 4 foi empregada para determinar a concentração real das micotoxinas.

$$\text{Micotoxina } \mu\text{g, mL} = \frac{A, FC, Mm, 1000}{\epsilon} \quad (4)$$

Onde:

A = Absorbância

FC = Fator de correção do equipamento

Mm = Massa molar micotoxina

ϵ = Absortividade molar da micotoxina

Foram realizadas leituras nos comprimentos de onda de máxima absorção específicas de cada micotoxina (Tabela 5) (IAL, 2008) e as concentrações reais foram definidas.

Posteriormente, os frascos foram devidamente vedados e armazenados sob temperatura de congelamento (-20 °C).

Tabela 5 – Propriedades físico-químicas e espectrais das micotoxinas estudadas e valor da concentração real das substância química.

MTX	Massa Molar	Solução diluente (%)	Comprimento de onda (nm)	Coefficiente de absorvidade molar (ϵ)	Conc. real sol. estoque ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)
AFM1	328	BEN:ACN (99:1)	350	18815	1
AFB1	312	BEN:ACN (98:2)	350	19800	97,70
AFG1	328	BEN:ACN (98:2)	350	17100	9,57
AFG2	330	BEN:ACN (98:2)	350	18200	9,32
ZEA	318	BEN	317	6060	54
OTA	296,3	BEN:Hac (99:1)	403	5550	300

Legenda: MTX, micotoxinas; BEN, benzeno; ACN, acetonitrila; Hac, ácido acético

Fonte: IAL, 2008

4.3 PREPARO DAS SOLUÇÕES DE TRABALHO

Preparou-se uma solução multimicotoxinas (Tabela 6) (solução de trabalho) para os testes de otimização cromatográfica. As soluções foram preparadas em metanol (MeOH). Para o preparo da solução, as micotoxinas nas concentrações desejadas foram transferidas para um frasco âmbar e levadas a estufa (Cienlab, CE-205/36, São Paulo, Brasil) a 52 °C até evaporação do solvente. A seguir, o frasco contendo as substâncias químicas de referência foram adicionados de 1 mL de MeOH e homogeneizados em vórtex (Logen Scientific, LSM56/4-BIV, São Paulo, Brasil) por 1 minuto. O frasco com a solução foi devidamente vedado e armazenado sob temperatura de congelamento (-20 °C) até a realização das análises.

Tabela 6 – Concentração individual das micotoxinas nas solução multimicotoxinas

MTX	AFM ₁	AFB ₁	AFG ₁	AFG ₂	OTA	ZEA
$\mu\text{g.kg}^{-1}$	0,3	0,7	3,1	0,2	0,6	7,0

Legenda – MTX, micotoxinas

Fonte: Morais (2019)

4.4 OTIMIZAÇÃO CROMATOGRÁFICA

4.4.1 Preparo dos solventes para o planejamento de mistura

Para preparar a fase móvel, foram utilizados como solventes: acetonitrila (ACN), metanol (MeOH), ambos com grau analítico HPLC, e água purificada por sistema de osmose reversa, deionizador e filtro microbiológico (OS 20LX, Gehaka Ltda, São Paulo-Brasil) acidificada com ácido acético a 1 % (H₂O 1% v/v). Todos os solventes foram filtrados através de uma membrana Millipore (PVDF, porosidade 0,22 µm); em seguida, foram armazenados em frascos de vidro borossilicato e desgaseificados em bomba de ultrassom na frequência de 37 Hz, amplitude 100 % por 20 min (P120H, Elma Analogic, Singen-Alemanha).

4.4.2 Otimização da fase móvel

Na primeira etapa, para definir a fase móvel que permitisse a separação entre as micotoxinas e os interferentes da amostra, realizou-se um planejamento de misturas com restrições inferiores e superiores. Para este modelo os vértices e *N* centroides dimensionais foram calculados para todos os pares de vértices e para todo o conjunto de três vértices (Figura 7). As restrições impostas à mistura, assim como os parâmetros iniciais (temperatura da coluna 35 °C, vazão de fase móvel em 1 mL/ min e volume de injeção de 20 µL), foram consideradas com base na literatura (ABRUNHOSA et al., 2017; AOAC, 2005; SAKIN et al., 2018; SCAGLIONI et al., 2014; VIDAL et al., 2013).

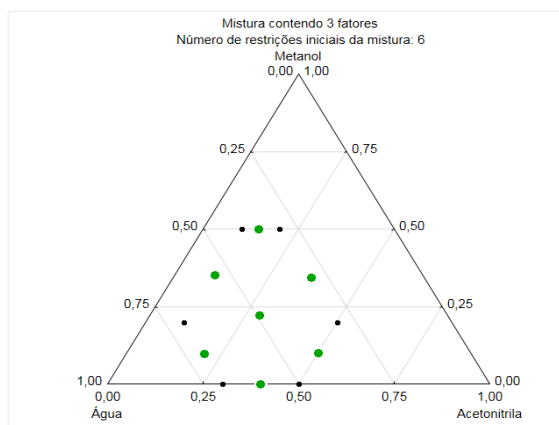


Figura 7 - Triângulo do planejamento de mistura com as restrições inferiores e superiores impostas aos componentes para determinação das composições da fase móvel com os vértices (●) e N dimensionais (■).

Fonte: Morais (2019)

Para avaliar o tempo de retenção, a assimetria dos picos e a resolução entre os componentes da amostra, as corridas cromatográficas foram realizadas com uma amostra de leite extraída pelo método QuEChERS segundo Sartori et al. (2015) (Figura 8), com algumas modificações e fortificada com a solução multimicotoxinas conforme descrito no item 4.3. A fortificação foi realizada após o processo de extração para evitar perdas e garantir a presença de todas as micotoxinas na amostra.

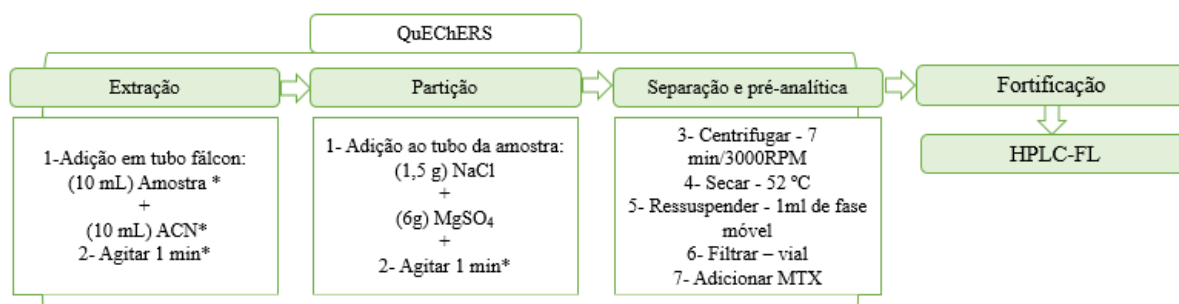


Figura 8 - Fluxograma das etapas principais e exemplos de modificações aplicados ao método QuEChERS

Legenda: ACN, acetonitrila; MTX, micotoxinas; Modificações*
(Sartori et al.(2015): 15 mL amostra, 15 mL ACN, 30 segundos de agitação)

Fonte: Adaptado de SARTORI et al. (2015)

4.4.3 Otimização dos parâmetros cromatográficos

Foi realizado um planejamento fatorial fracionário 2^{4-1} (4 pontos centrais, totalizando 12 ensaios) em 3 níveis (Tabela 7) para avaliar a influência dos parâmetros porcentagem de ácido acético na fase móvel (AA, %), fluxo (FX, mL/ min), volume de injeção (VIN, μ L) e temperatura da coluna cromatográfica (TC, $^{\circ}$ C) sobre as variáveis dependentes tempo de retenção (min, tR), assimetria dos picos (Asp) e resolução (Res). Para estes ensaios empregou-se uma amostra de leite extraída pelo método QuEChERS (descrito no item 4.4.2) e fortificada.

Tabela 7 – Níveis experimentais dos parâmetros cromatográficos avaliados no planejamento fatorial fracionário 2^{4-1}

Parâmetros	AA (%)	FX (mL/min)	VIN (μ L)	TC ($^{\circ}$ C)
Nível				
+1	5	1,4	35	40
0	3	1,2	20	35
-1	1	1,0	5	30

Legenda – AA, acidificação; FX, fluxo; VIN, volume de injeção; TC, temperatura da coluna

Fonte: Morais (2019)

Sequencialmente, foi realizado um delineamento composto central rotacional (DCCR) do tipo 2^3 , com 3 pontos centrais, totalizando 17 ensaios (Tabela 8). Os parâmetros estudados foram porcentagem de acidificação da fase móvel (AA, %), temperatura da coluna cromatográfica (TC, $^{\circ}$ C) e volume de injeção da amostra (VIN, μ L). As variáveis dependentes avaliadas foram tempo de retenção (tR, min), resolução (Res) e assimetria dos picos (Asp).

Tabela 8 – Níveis experimentais dos parâmetros cromatográficos avaliados no DCCR

Parâmetros	AA (%)	VIN (μ L)	TC ($^{\circ}$ C)
Nível			
+1,68	5	80	50
+1	3,75	65	46
0	2,5	50	42
-1	1,25	35	38
-1,68	0	20	35

Legenda – AA, acidificação; FX, fluxo; VIN, volume de injeção; TC, temperatura da coluna

Fonte: Morais (2019)

Para otimizar as respostas assimetria e resolução, garantindo um bom formato de picos e uma adequada separação na linha de base, empregou-se função de desejabilidade Derringer e Suich (1980). Construíram-se dois modelos através das condições preditas para as micotoxinas AFM₁ e ZEA. A abordagem geral consiste em converter primeiro cada resposta y_i em função da desejabilidade individual, que varia em uma faixa de $0 < di < 1$. Se a resposta for aquela que se quer, $di = 1$ e se a resposta estiver fora da região aceitável, $di = 0$. Assim, as variáveis independentes são escolhidas de modo a maximizar a desejabilidade global.

4.5 MÉTODO DE EXTRAÇÃO QuERChERS

Para a extração das micotoxinas, foi avaliado o método de QuEChERS citado por Sartori et al. (2015) e a partir deste foram realizadas modificações com o objetivo de melhorar o processo de extração (Figura 9).

Para realização do método foram transferidos 10 mL de leite UAT desnatado e fortificado (conforme no item 4.3) para tubo tipo falcón de 50 mL. Foram adicionados à amostra 10 mL de ACN acidificado com 1% de ácido acético e na sequência o tubo foi agitado manualmente por 2 minutos em vórtex. Posteriormente, adicionou-se 4 g de MgSO₄ e 1 g de NaCl ao tubo e agitou-se novamente. Após as duas etapas anteriores os tubos foram levados à centrifuga refrigerada (Cientec, CT 400, Minas Gerais, Brasil), a 21 °C por 15 minutos a 4000 rpm. A centrifugação promoveu a separação ternária dos componentes da mistura, o sobrenadante (ACN), a fase intermédia (proteína) e a fase inferior (água). Oito mL do sobrenadante foram retirados e transferidos para um tubo tipo fálcon de 15 mL contendo 0,30 g de MgSO₄ e 0,20 g de celite. Os tubos foram agitados manualmente por 30 segundos e centrifugados por 7 minutos a 4000 rpm. Alíquotas de cinco mL do sobrenadante foram acondicionados em frasco âmbar e levados à estufa (Cienlab, CE-205/36, São Paulo, Brasil) até secura na temperatura de 52 °C. O extrato seco foi resuspendido em 1 mL de MeOH, homogeneizado em vortex por 30 segundos e foi transferido através de filtro de seringa (PVDF, 25mm x 0,22 µm, Analítica, São Paulo, Brasil) para um *vial* e posteriormente foi analisado no HPLC-FL. Essas modificações foram aplicadas ao método após revisão bibliográfica de trabalhos científicos envolvendo o método de extração QuEChERS em amostras de leite e

derivados (FLORES-FLORES; GONZÁLEZ-PEÑAS, 2017; HEIDTMANN-BEMVENUTI et al., 2012; JIA et al., 2014; JUAN et al., 2017; PEREIRA, 2014).

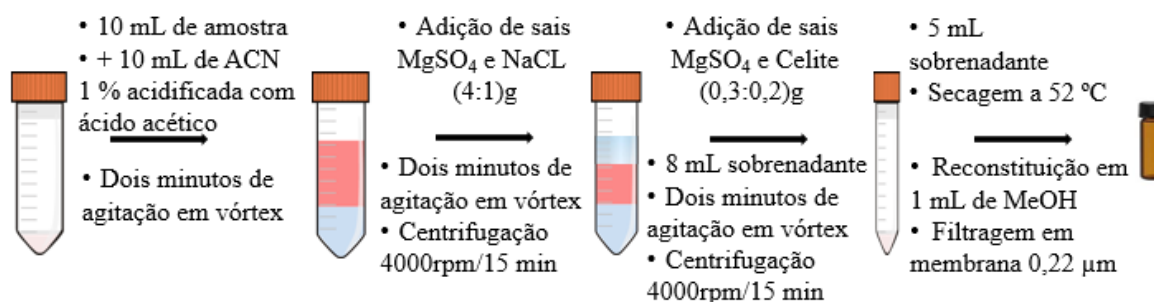


Figura 9 - Fluxograma gráfico do método QuEChERS modificado
Fonte: Morais (2019).

O branco analítico (matriz isenta dos compostos de interesse) foi avaliado para o uso como matriz “branco”. Para tal, as amostras “branco” foram preparadas conforme descrito anteriormente e injetadas no HPLC antes da injeção das amostras fortificadas, para evitar eluição de compostos remanescentes na coluna entre uma análise e outra. O cromatograma com o tempo de retenção das micotoxinas nas amostras fortificadas foi comparado com o cromatograma da amostra “branco”. Não havendo no cromatograma das amostras “branco” picos no mesmo tempo de retenção observado para as micotoxinas nas amostras fortificadas, o branco foi considerado isento de micotoxinas.

4.5.1 Condições cromatográficas de análise

A fase móvel foi constituída por um gradiente de eluição composto por duas misturas de solventes: A - ACN:Água acidificadas a 0,85% com ácido acético (30:70) e B - ACN:MeOH:Água acidificadas a 0,85% com ácido acético (50:10:40). O gradiente foi formado pela mistura A (0-12 min), B (12,3-22 min), retornando para a mistura A (23 – 35 min) para reequilíbrio da coluna cromatográfica. O fluxo do sistema foi de 1,4 µL/min, a temperatura da coluna foi mantida em 35 °C e o volume de injeção foi de 35 µL.

4.5.2 Validação do método

Os parâmetros de validação avaliados neste trabalho foram: linearidade, efeito matriz, limite de detecção e limite de quantificação, exatidão e precisão por meio da estimativa do desvio padrão relativo (DPR) dos ensaio de fortificação e recuperação.

4.5.3 Linearidade

Foram construídas curvas de calibração para cada uma das micotoxinas estudadas por diluição em solvente orgânico (MeOH). Foram realizadas de 7 a 8 injeções das substâncias químicas de interesse em ordem decrescente de concentração (Tabela 9) na proporção de 1:2. Os dados gerados foram analisados por regressão múltipla para a obtenção de uma curva analítica ($y = ax + b$) para cada micotoxina estudada, na qual a concentração de micotoxina foi plotada no eixo das abscissas e a área respectiva obtida foi plotada no eixo das ordenadas. Dessa forma, obteve-se o coeficiente de determinação (r^2), o coeficiente angular (a) e o coeficiente linear (b), bem como a Equação da reta para cada micotoxina (RIBANI et al., 2004).

Tabela 9 – Concentração individual das micotoxinas empregadas para a confecção da curva analítica

MTX	Conc. das diluições ($\mu\text{g.kg}^{-1}$)	λ em nm
AFM ₁	50; 24,0; 12,0; 6,0; 3,0; 1,50; 0,75	360-450
AFB ₁	57,60; 28,80; 14,4; 7,2; 3,6; 1,8; 0,9	
AFG ₁	500; 250; 125; 62,3; 31; 15,60; 7,8	
AFG ₂	25; 12,5; 6,3; 3,1; 1,6; 0,8; 0,4	274-455
ZEA	100; 50,0; 25,0; 12,5; 6,4; 3,2; 1,6	
OTA	25; 12,5; 6,3; 3,1; 1,6; 0,8; 0,4	333-460

Legenda – MTX, micotoxinas; λ , comprimento de onda; nm, nanometro

Fonte: Morais (2019)

4.5.4 Limite de detecção e quantificação

Para a determinação do limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) foram realizadas injeções das soluções de referência química em ordem decrescente de concentração até que o sinal do pico atingisse uma altura três vezes superior ao sinal ruído da linha de base. Para a determinação do LQ, adotou-se o sinal ruído da linha de base como sendo 10 vezes superior ao sinal do analito. Ambos parâmetros foram definidos no tempo de retenção do composto de interesse. O LD e LQ foram expressos pelas equações 5 e 6.

$$LD = \frac{3 \times s}{S} \quad (5)$$

Onde:

s = Desvio padrão do ruído.

S = Coeficiente angular da curva analítica.

$$LQ = \frac{3 \times s}{S} \quad (6)$$

Onde:

s = Desvio padrão do ruído.

S = Coeficiente angular da curva analítica.

4.5.5 Avaliação do efeito matriz

Para averiguar o grau de interferência provocado pela matriz sobre os analitos estudados, aplicou-se o método de comparação entre as áreas obtidas das soluções analíticas em solvente orgânico e as obtidas com soluções analíticas preparadas no extrato de cada matriz (triplicata) (BRASIL, 2017). Duas curvas, preparadas de maneira similar as da linearidade foram preparadas: uma em MeOH e outra no leite, confeccionadas a partir da concentração

superior a concentração mais baixa para cada micotoxina, compreenderam 5 (cinco) concentrações diferentes de cada micotoxina e foram realizadas em triplicata. As curvas preparadas em MeOH foram comparadas com as curvas preparadas no leite, extraído conforme o método QuERChERS desenvolvido, e foi efetuado o cálculo através da Equação 7 para determinar se os componentes da amostra atuam de forma positiva ou negativa sobre a resposta analítica. Considera-se que interferências entre -20 e + 20% são aceitáveis em amostras complexas (SANCO, 2013).

$$\text{Efeito matriz (\%)} = \frac{A1-A2}{A2} \times 100 \quad (7)$$

Onde:

A1 = média das áreas da solução em extrato da matriz, em uma determinada concentração;

A2 = média das áreas da solução em solvente orgânico, em uma determinada concentração.

4.5.6 Procedimento de fortificação e recuperação

Para realização dos estudos de fortificação e recuperação, aplicou-se a fortificação em 3 níveis de concentração com 3 repetições para cada nível. Em frascos de vidro borossilicato de tampa rosqueável e capacidade de 100 mL foram adicionadas as respectivas concentrações de micotoxinas descritas na Tabela 10. Os frascos foram levados à estufa a 52 °C até secagem das soluções. Após a evaporação do solvente, 50 mL de leite foram adicionados aos frascos, agitados em vortex e armazenados em geladeira por 12 h antes da extração. O processo de extração foi realizado conforme descrito no item 4.5. Uma mostra “branco” do leite (sem fortificar) foi preparada seguindo o mesmo procedimento para aferir a real concentração das micotoxinas em estudo, no leite.

Tabela 10 - Níveis de fortificação aplicados para o estudo de recuperação.

Micotoxina	Níveis de fortificação ($\mu\text{g.kg}^{-1}$)		
	1	2	3
AFM ₁	0,40	0,80	1,16
AFB ₁	1,00	2,00	4,00
AFG ₁	2	4	6
AFG ₂	0,10	0,20	0,40
OTA	0,40	0,80	1,60
ZEA	4	8	16

Fonte: Morais (2019)

4.6 AVALIAÇÃO DE MICOTOXINAS EM LEITE UAT DESNATADO

O total de 30 amostras de leite ultra alta temperatura desnatado, de diferentes marcas e, quando selecionadas mesmas marcas, de lotes distintos de fabricação, foram adquiridas aleatoriamente no comércio local da cidade de Medianeira, no período de maio a julho de 2019, na embalagem original e transportadas até o Laboratório de Análise de Alimentos, onde foram armazenadas ao abrigo da luz e à temperatura ambiente (25 ± 1 °C) até a realização das análises. Nenhuma das amostras empregadas no estudo estavam com o prazo de validade expirado.

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os ensaios pertinentes aos planejamentos foram realizados de maneira aleatória e casual. Os resultados dos efeitos das superfícies de resposta e a função desejabilidade foram tratados e gerados com o programa *STATISTICA* 10.0 (Statsoft Inc., Tulsa, OK, USA). A veracidade dos modelos foi avaliada através de análise de variância (ANOVA) em nível de significância de 5%.

A regressão linear foi calculada para obtenção do coeficiente de determinação (r^2) por análise de variância (ANOVA). Os ensaios de recuperação foram realizadas em triplicata e os resultados expressos como média \pm desvio-padrão relativo. Os resultados do efeito matriz foram

analisados estatisticamente pelo teste de *F student* e as médias foram comparadas pelo teste de *T student* considerando-se um nível de significância de 5%.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 DETERMINAÇÃO DA FASE MÓVEL

Dentre os fatores que afetam a retenção e a seletividade em HPLC, a composição da fase móvel é o de maior influência, visto que é na fase móvel onde ocorre de fato interação química com os componentes da amostra (MUHLEN; LANÇAS, 2004). Por essa razão, foi fundamental que, inicialmente, fosse determinada a composição da fase móvel.

Eluições isocráticas em métodos cromatográficos nos quais deseja-se a separação de multianalitos na maioria das vezes são ineficientes, pois não permitem a separação correta entre os analitos de interesse e interferentes e/ou entre os diferentes analitos de interesse. Para contornar esse problema são aplicados gradientes de eluição (LANÇAS, 2008). Sendo assim optou-se por construir um gradiente de eluição por emprego do planejamento de mistura.

Na Tabela 11, encontram-se as composições do planejamento de mistura, com as porcentagens dos três solventes estudados e as respostas referentes ao tempo de retenção dos compostos eluídos na coluna cromatográfica. Inicialmente, por desconhecer a qual micotoxina corresponde cada pico, os picos foram denominados conforme ordem de eluição em compostos A, B, C, D, E e F.

O planejamento de misturas permitiu o mapeamento dos dois conjuntos de compostos interferentes e micotoxinas, indicando o tempo de retenção de cada conjunto. Traçou-se como objetivo principal obter-se uma fase móvel que permitisse a eluição dos interferentes e dos picos de interesse sem que houvesse sobreposições. Por conveniência, levando-se em conta o consumo de reagentes e agilidade que os métodos de rotina requerem, o tempo estimado para cada corrida cromatográfica foi definido como satisfatório ao estar próximo ou igual a 35 minutos.

Tabela 11– Proporção dos solventes correspondentes ao planejamento de mistura com restrições superior e inferior e as respostas obtidas em função do tR dos compostos em cada ponto do planejamento.

ENSAIOS	Fase Móvel			tR						
	H ₂ O 1%	ACN	MeOH	IN	A	B	C	D	E	F
P1	0,7	0,3	0,0	6,54	7,24	9,40	12,14	15,80	48,56	50,61
P2	0,7	0,1	0,2	11,72	20,39	21,97	34,47	39,27	53,51	54,55
P3	0,5	0,5	0,0	4,10	4,26	4,49	4,87	5,40	12,73	13,69
P4	0,3	0,5	0,2	3,67	3,77	4,12	4,36	4,55	6,41	6,87
P5	0,4	0,1	0,5	4,00	4,31	4,53	5,13	5,53	22,15	21,62
P6	0,3	0,2	0,5	3,48	3,67	3,8	4,15	4,31	9,012	9,49
P7	0,6	0,4	0,0	4,41	4,62	5,77	6,54	7,69	34,85	37,29
P8	0,3	0,35	0,35	3,37	3,64	3,77	4,07	4,17	7,64	8,26
P9	0,7	0,20	0,10	6,36	7,43	10,99	12,23	15,59	55,00	55,50
P10	0,55	0,10	0,35	7,95	8,04	9,61	11,35	14,41	23,54	23,51
P11	0,4	0,50	0,10	2,61	2,97	3,77	3,90	4,28	8,89	9,73
P12	0,35	0,15	0,50	2,70	3,90	4,09	4,54	4,97	13,32	13,67
P13 (2)	0,48	0,28	0,23	4,90	5,45	5,74	6,30	7,39	14,33	14,31

Legenda - tR – tempo em que são observados os compostos eluídos; H₂O 1 %, água acidificada com 1 % de ácido acético; ACN, acetonitrila; MeOH, metanol; IN – Interferentes.

Fonte: Morais (2019)

Para distinguir os grupos de compostos eluídos (interferentes e micotoxinas) um branco analítico (leite sem fortificação) foi avaliado em todas os ensaios do planejamento, cujo cromatograma é apresentado na Figura 10 e corresponde a fase móvel ACN:H₂O 1% (30:70).

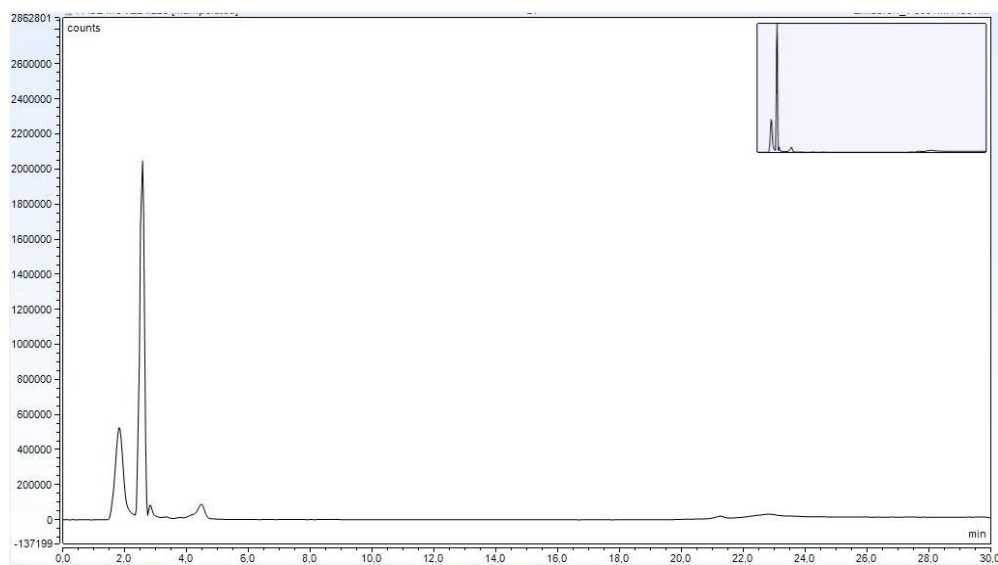


Figura 10 – Cromatograma do branco analítico, amostra de leite sem fortificação

Legenda: Ensaio P1 do planejamento de misturas

Fonte: Morais (2019)

Os pontos com maior apolaridade (< 50 min) (P3, P4, P5, P6, P7, P8, P11 e P12) foram os pontos que apresentaram rápida eluição dos compostos de interesse (micotoxinas) e também dos interferentes, ocorrendo a sobreposição entre os picos. O leite é uma matriz heterogênea muito complexa, composta por diversos componentes polares e apolares. Para o último caso, podemos citar diversos aminoácidos residuais da caseína de caráter hidrofóbicos (ORDÓÑEZ et al., 2005). Alguns desses compostos remanescentes do processo de extração podem coeluir com os compostos de interesse, dependendo da polaridade da fase móvel (MARTINS; ARAÚJO; BITTENCOURT, 2013).

Os ensaios P1 e P2 não foram adequados para eluição dos compostos E e F, pois aumentam excessivamente o tempo de análise; porém, o P1 apresenta resolução satisfatória entre quatro compostos: A, B, C e D. A Figura 11 mostra o último pico dos compostos interferentes eluindo em 6,54 minutos, enquanto que o primeiro pico dos compostos de interesse (A) apresentou um tempo de retenção de 7,24 minutos.

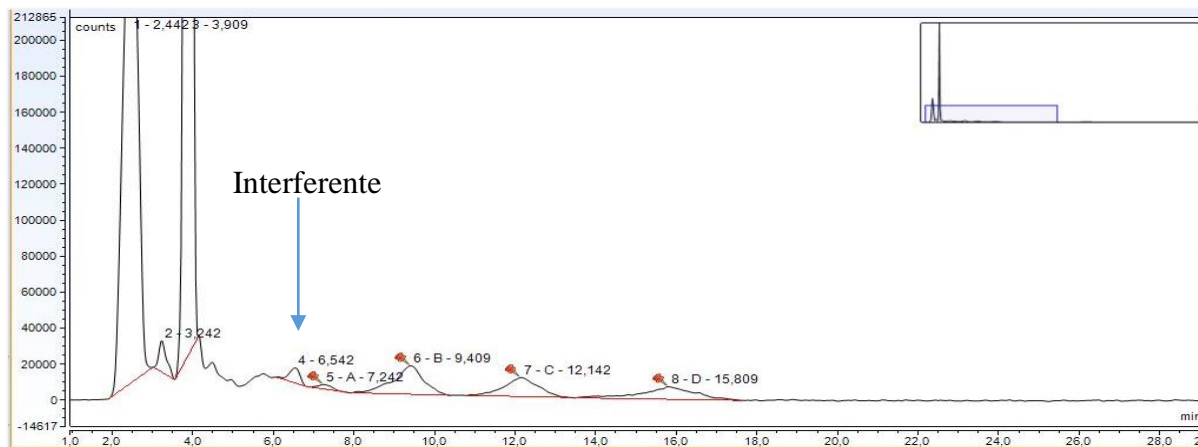


Figura 11 – Ensaio P1 do planejamento de misturas

Legenda – Cromatograma em λ 360-460 nm no tempo de retenção de interesse para separação das primeiras 4 micotoxinas A, B, C e D

Fonte: Morais (2019)

É observada a ausência de picos após o minuto sete no cromatograma do branco analítico, indicando o tempo de eluição das micotoxinas A (7,24 min), B (9,40 min), C (12,14 min) e D (15,80).

Kabak e Ozbey (2012) indicam que a polaridade das micotoxinas segue a ordem teórica de mais polar para menos polar em função da fase móvel: $AFM_1 > AFG_2 > AFG_1 > AFB_1$. Seguindo essa estimativa os primeiros quatro compostos observados seriam as AFs. A hipótese foi confirmada pela comparação entre os cromatogramas das amostras fortificadas e dos cromatogramas gerados com os padrões de cada micotoxina individualmente, tal e como é observado na Figura 12.

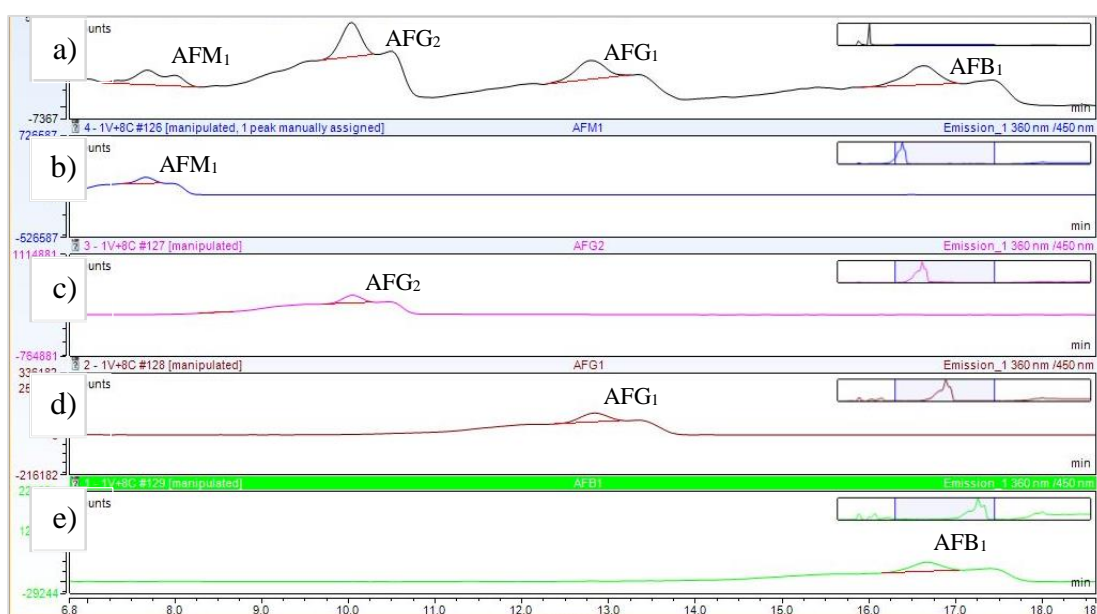


Figura 12 – Cromatogramas de identificação dos picos

Legenda – Recorte do cromatograma a) amostra fortificada contendo todas as micotoxinas; b) solução de referência de AFM_1 ; c) solução de referência de AFG_2 ; d) solução de referência de AFG_1 ; e) solução de referência de AFB_1 em λ 360-450 nm

Fonte: Morais (2019)

Os ensaios individuais permitiram confirmar a ordem das micotoxinas, da primeira para a última a eluir, como sendo: AFM_1 (7,67 min), AFG_2 (10,04 min), AFG_1 (12,80 min), AFB_1 (16,60), estando em conformidade com o descrito por Kabak e Ozbey (2012). No método empregado por Sakin et al. (2018), um gradiente de $H_2O:MeOH$ (55:45 v/v) acidificado com ácido nítrico (35 μL) e brometo de potássio (12 mg) para AFG_2 , AFG_1 e AFB_1 e água:acetonitrila:metanol (68:24:8; v/v/v) para AFM_1 no HPLC-FL, foram utilizados na análise de derivados de leite, e a sequência de eluição foi a mesma a observada neste estudo; porém,

com tempo de retenção de cada composto inferior, AFM₁ (5,22 min.); AFG₂ (5,73 min.); AFG₁ (7,02 min.) e AFB₁.

Foram observadas ligeiras alterações nos tempos de retenção dos quatro picos (A, B, C e D) entre as corridas cromatográficas do planejamento de mistura e as do teste de identificação. Apesar do condicionamento da coluna (20 min) inter-análises para algumas das proporções estudadas pode não ter sido suficiente e ter provocado diferença nos tempos de retenção entre um análise e outra, pois tempo de condicionamento é intrínseco a fase móvel e é o tempo necessário para restabelecer o equilíbrio entre a coluna e o gradiente nas condições iniciais (MOGOLLÓN et al., 2014). No entanto, não implicou em redução na qualidade do cromatograma.

O ensaio P1 continua até os 60 minutos e as outras duas micotoxinas são observadas eluindo tardiamente nos minutos 48 e 50 (não mostradas); no entanto, uma fase móvel isocrática não é eficiente quando tratamos de multicompostos e, por isso, buscou-se um outro ponto do planejamento de misturas que permitisse eluir com mais rapidez os últimos dois compostos.

Assim sendo, uma segunda análise visual sobre os cromatogramas indicou que os ensaios P8 e P11 permitiam ao composto E, que é sempre seguido da eluição do composto F, eluir em 7,64 e 8,89, respectivamente. Dois testes combinatórios: a) P1+P8 (Figuras 13) e b) P1+P11 (Figura 14), foram realizados a fim de eluir os compostos E e F.

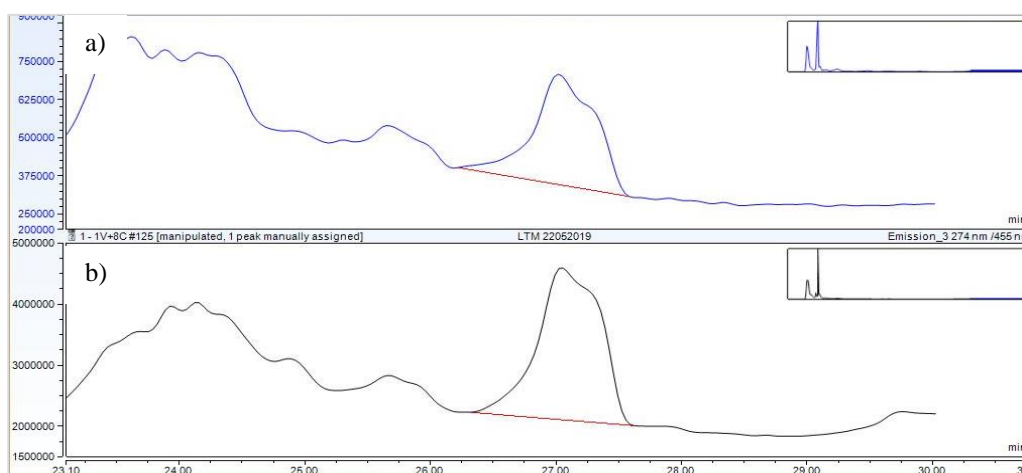


Figura 13 – Ensaio a) combinação entre as proporções de solventes referentes aos ensaios P1 e P8 do planejamento de misturas

Legenda – Recorte do cromatogramas nos λ a) 335-460 nm e b) 274-455 nm

Fonte: Morais (2019)

O gradiente formado com os ensaio P1+P8 apresentou resolução nula entre os picos E e F, apesar de estarem em comprimentos de onda diferentes a depender da concentração a micotoxina E (observada no λ 335-460 nm) pode ser vista interferindo na leitura da micotoxina F (λ 274- 455 nm), o que atrapalha qualitativa e quantitativamente as análise.

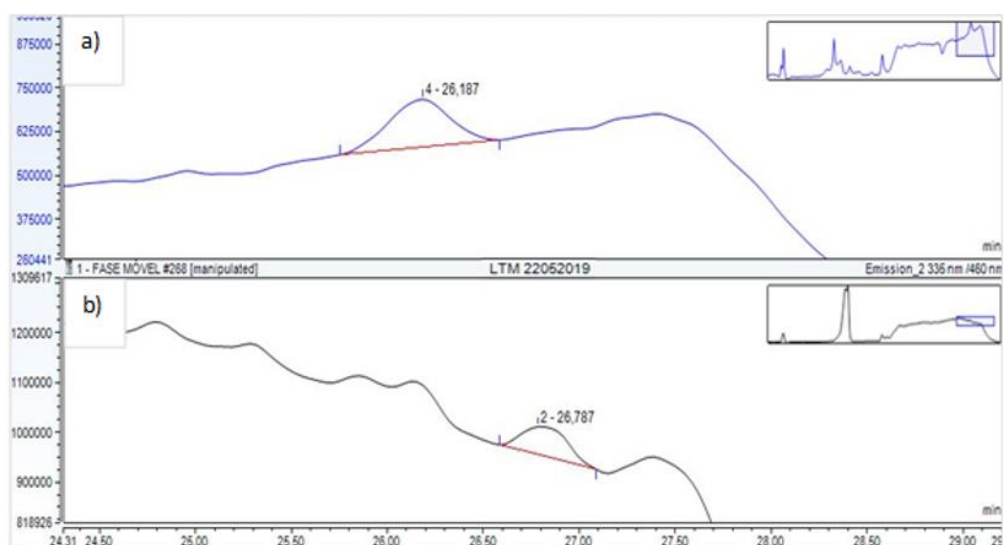


Figura 14 – Ensaio b) combinação entre as proporções de solventes referentes aos ensaios P1 e P11 do planejamento de misturas

Legenda – Cromatogramas nos λ a) 274-455 nm e b) 335-460 nm

Fonte: Morais (2019)

Em contrapartida, o gradiente formado entre P1+P11 apresentou melhor resolução entre os dois últimos picos de interesse. O quinto pico a eluir foi retido no minuto 26,18 e o sexto no minuto 26,80. Foi observado que o ensaio P11 é uma fase móvel mais polar o que acarretou na troca da ordem de eluição dos compostos. No ensaio P8 a primeira micotoxina a eluir era observada no λ 335-460 nm, no entanto no ensaio P11 a primeira a eluir é a micotoxina observada em λ 274-455 nm.

A identificação dos picos foi realizada por injeção de soluções de referência de cada uma das micotoxinas, individualmente, em comparação com o cromatograma da amostra fortificada, como podem ser observadas na Figura 15 e 16.

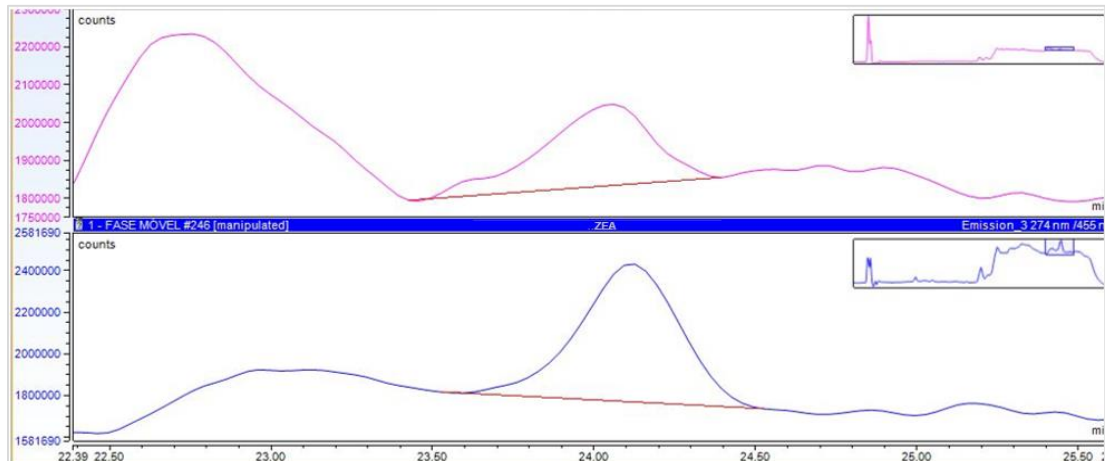


Figura 15 – Identificação do pico E

Legenda – Cromatograma no λ 274-455 nm: a) solução de referência da ZEA
b) amostra fortificada

Fonte: Morais (2019)

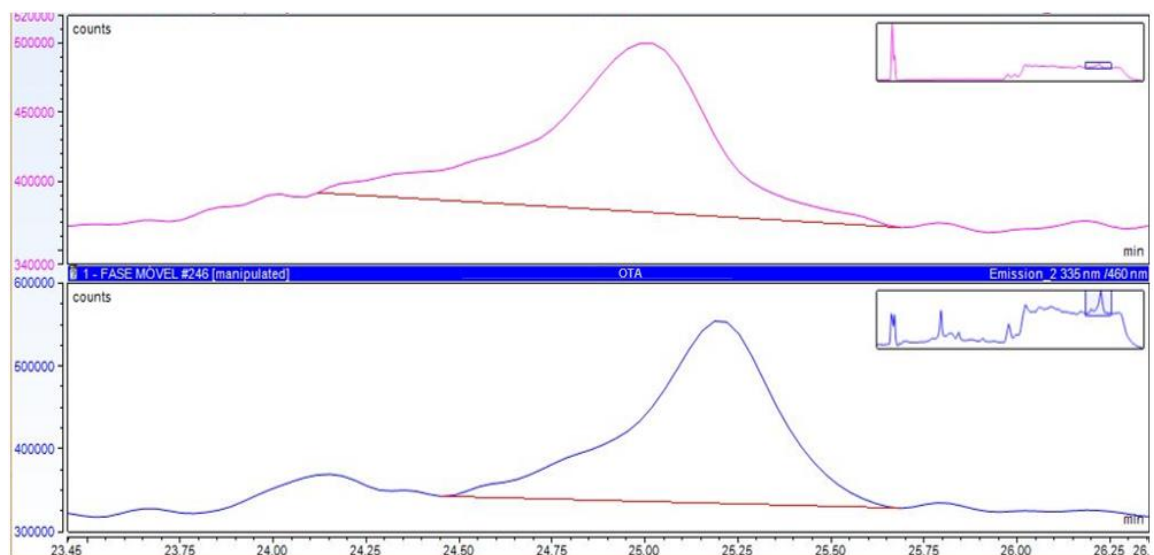


Figura 16 – Identificação do pico F

Legenda – Cromatograma no λ 335-460nm: a) solução de referência da OTA
b) amostra fortificada

Fonte: Morais (2019)

O tempo de retenção final para ZEA e OTA foi de 24,20 e 25,25 minutos, respectivamente. Segundo Kabak e Ozbey (2012) a polaridade do meio influencia de forma significativa na eluição dessas duas micotoxinas; por isso, ao aumentar a apolaridade da fase móvel adicionando mais solvente orgânico o composto menos apolar, ZEA, eluiu antes.

A fase móvel foi então determinada pela mistura inicial de acetonitrila e água acidificadas a 0,85 % com ácido acético (30:70) do tempo zero até 17 minutos, gradativamente alterado para acetonitrila, metanol e água acidificadas a 0,85 % com ácido acético (40:10:50), permanecendo contínuo até o minuto 27 e retornando para a fase inicial de 28 a 35 minutos para reequilíbrio da coluna. O tempo de retenção (em min) para cada uma das micotoxinas foi de: 7,67 para a AFM₁, 10,04 para a AFG₂, 12,80 para a AFG₁, 16,64 para a AFB₁ em λ de 360 – 450 nm; 24,20 para a ZEA em λ de 335 – 460 nm e 25,25 para a OTA em λ de 274 – 455 nm.

As análises visuais são estritamente necessárias uma vez que o planejamento de mistura foi aplicado como análise exploratória para otimização da fase móvel. Posteriormente, foram feitos os ajustes sequenciais de modelos de crescente ordem de complexidade para avaliação individual do efeito das misturas sobre as micotoxinas em relação ao tempo de retenção. Os melhores modelos são apresentados na Tabela 12.

Tabela 12 - ANOVA para os modelos ajustados aos dados da Tabela 8

	SS	gl	MS	SS	gl	MS	Fcal	p-	R ²	R ²
	Efeito	Efeito	Efeito	Erro	Erro	Erro		valor		ajust
AFM₁										
Linear	137,00	2	68,50	115,88	10	11,59	5,91	0,02	0,54	0,45
Quadrático	64,89	3	21,63	50,98	7	7,28	2,97	0,10	0,79	0,65
Especial	2,09	1	2,09	48,89	6	8,15	0,26	0,63	0,80	0,61
Cubo	28,99	3	9,66	19,90	3	6,64	1,46	0,38	0,92	0,68
Total ajustado	252,88	12	21,07							
AFG₂										
Linear	208,69	2,00	104,34	107,81	10	10,78	9,68	0,00	0,66	0,59
Quadrático	76,32	3,00	25,44	31,49	7	4,50	5,66	0,03	0,90	0,83
Cubo	0,83	1,00	0,83	30,66	6	5,11	0,16	0,70	0,90	0,81
Especial	20,52	3,00	6,84	10,14	3	3,38	2,02	0,29	0,97	0,87
Total ajustado	316,50	12,00	26,37							

Continuação Tabela 12

	SS Efeito	gl Efeito	MS Efeito	SS Erro	gl Erro	MS Erro	Fcal	p- valor	R ²	R ² ajust
AFG₁										
Linear	475,99	2,00	237,99	361,81	10	36,18	6,58	0,02	0,57	0,48
Quadrático	214,58	3,00	71,53	147,23	7	21,03	3,40	0,08	0,82	0,70
Cubo	4,11	1,00	4,11	143,12	6	23,85	0,17	0,69	0,83	0,66
Especial	89,78	3,00	29,93	53,34	3	17,78	1,68	0,34	0,94	0,75
Total ajustado	837,79	12,00	69,82							
AFB₁										
Linear	696,60	2	348,30	520,39	10	52,04	6,69	0,01	0,57	0,49
Quadrático	356,83	3	118,94	163,56	7	23,37	5,09	0,04	0,87	0,77
Cubo	0,08	1	0,08	163,48	6	27,25	0,00	0,96	0,87	0,73
Especial	97,62	3	32,54	65,86	3	21,95	1,48	0,38	0,95	0,78
Total ajustado	1216,99	12	101,42							
OTA										
Linear	3498,36	2	1749,18	422,30	10	42,23	41,42	0,00	0,89	0,87
Quadrático	310,08	3	103,36	112,22	7	16,03	6,45	0,02	0,97	0,95
Cubo	6,02	1	6,02	106,21	6	17,70	0,34	0,58	0,97	0,95
Especial	79,38	3	26,46	26,82	3	8,94	2,96	0,20	0,99	0,97
Total ajustado	3920,66	12	326,72							
ZEA										
Linear	3433,56	2	1716,78	478,43	10	47,84	35,88	0,00	0,88	0,85
Quadrático	401,62	3	133,87	76,81	7	10,97	12,20	0,00	0,98	0,97
Cubo	25,00	1	25,00	51,81	6	8,63	2,90	0,14	0,99	0,97
Especial	33,84	3	11,28	17,97	3	5,99	1,88	0,31	1,00	0,98
Total ajustado	3911,98	12	326,00							

Legenda – (p > 0,05)

Fonte: Morais (2019)

O modelo linear é estatisticamente significativo para AFM₁ e AFG₁, enquanto que para as outras micotoxinas o melhor modelo foi quadrático. Teoricamente, em comparação, o modelo quadrático é superior ao modelo linear e deve ser escolhido de maneira preferencial sempre que possível (BARROS; SPACINO; EDWARD, 2001).

A significância dos efeitos em cada um dos modelos obtidos encontram-se apresentados na Tabela 13. Em todos os modelos percebe-se que a água tem forte influência sobre o tempo de retenção, principalmente sobre as micotoxinas OTA e ZEA, contribuindo de forma a aumentar o tempo de retenção. Já nos sistemas binários, todos os modelos quadráticos apresentaram sinal negativo, ou seja, reduzem o tempo de retenção.

Tabela 13 - Ajuste sequencial de modelos em ordem de complexidade para uma resposta tempo de retenção

Micotoxina	Modelos	r ²
AFM₁	y = 15,00água-1,20ACN+4,94MeOH	0,5417
AFG₂	y = 31,08água+10,85ACN+3,22MeOH-63,71AB-14,88AC-12,90BC	0,9001
AFG₁	y = 30,56água-19,11ACN-2,34MeOH	0,8243
AFB₁	y = 58,74água+20,83ACN+3,99MeOH-142,39AB-36,66AC-32,23BC	0,8656
OTA	y = -4,50água-8,78ACN-26,28MeOH+34,34AB+85,29AC+96,23-251,83ABC	0,8610
ZEA	y = 119,58água+13,09ACN+18,68MeOH-150,35AB-136,29AC-34,88BC	0,9896

Legenda – ACN, acetonitrila; MeOH, metanol. (p > 0,05)

Fonte: Morais (2019)

Apesar da relevância estatística em todos os casos vale lembrar que essas condições são particulares a cada micotoxina e, no entanto, o sistema é constituído de multicompostos a serem avaliados simultaneamente. Por isso, optou-se por não apresentar as superfícies de respostas obtidas, uma vez que elas representam individualmente cada micotoxina e não atribuem resultados superior aos dados já apresentados para a escolha da combinação de solventes para a fase móvel. Assim sendo, a qualidade dos pontos experimentais do planejamento de mistura foi avaliado apenas quanto a qualidade visual dos cromatogramas gerados.

5.1.2 Determinação das variáveis do processo cromatográfico

Todas as micotoxinas apresentaram menor tempo de retenção nos pontos P3, P4 e P8, com exceção para ZEA que apresentou menor tempo de retenção em P3, P4 e P7 (Tabela 14). Os tempos observados são inferiores aos tempos de referência; no entanto, pouca ou nenhuma melhora foi observada nos tempos de retenção para ZEA e OTA.

Teoricamente, a assimetria apresenta valores descritos como ótimo na faixa entre 0,9 e 1,10 que pode ser ampliada para até 1,50 quando os métodos de trabalho exigem outras especificidades (VANBEL; TILQUIN; SCHOENMAKERS, 1996). Na maioria dos ensaios a simetria esteve dentro da faixa teórica, com exceção os ensaios P1, P2, P3, P6 da AFM₁, P6 AFG₂ e AFG₁ e P2 da OTA que não apresentaram valores adequados a faixa proposta.

Tabela 14 – Ensaios do planejamento fatorial fracionário 2⁴⁺¹ com as respostas para tR, assimetria e resolução para a separação entre o pico das micotoxinas

Ensaio s	tR									
	(%) AA	(mL/min) FX	(µL) VIN	(°C) TC	AFM ₁	AFG ₂	AFG ₁	AFB ₁	ZEA	OTA
P1	-1 (1)	-1 (1)	-1 (5)	-1 (30)	7,27	9,85	12,68	16,25	27,52	28,09
P2	1 (5)	-1 (1)	-1 (5)	1 (40)	7,07	8,25	10,2	12,95	26,18	26,59
P3	-1 (1)	1 (1,4)	-1 (5)	1 (40)	5,57	6,62	8,32	10,65	24,45	24,76
P4	1 (5)	1 (1,4)	-1 (5)	-1 (30)	5,07	6,48	8,15	10,41	24,61	24,89
P5	-1 (1)	-1 (1)	1 (35)	1 (40)	7,51	9,02	11,35	14,52	26,59	27,09
P6	1 (5)	-1 (1)	1 (35)	-1 (30)	6,88	8,51	10,81	13,85	26,88	27,32
P7	-1 (1)	1 (1,4)	1 (35)	-1 (30)	5,77	7,08	9,08	11,68	25,05	25,39
P8	1 (5)	1 (1,4)	1 (35)	1 (40)	5,22	6,05	7,55	9,55	26,18	24,29
P9	0 (3)	0 (1,2)	0 (20)	0 (35)	6,07	7,28	9,15	11,62	25,42	25,69
P10	0 (3)	0 (1,2)	0 (20)	0 (35)	6,07	7,32	9,15	11,62	25,42	25,69
P11	0 (3)	0 (1,2)	0 (20)	0 (35)	6,07	7,32	9,15	11,65	25,42	25,69
P12	0 (3)	0 (1,2)	0 (20)	0 (35)	6,07	7,32	9,15	11,62	25,42	25,69
Ref.					7,67	10,04	12,80	16,64	25,25	24,20
Assimetria										
P1	-1 (1)	-1 (1)	-1 (5)	-1 (30)	2,67	1,01	0,77	1,24	1,26	0,92
P2	1 (5)	-1 (1)	-1 (5)	1 (40)	0,78	1,32	1,25	1,82	1,10	0,77
P3	-1 (1)	1 (1,4)	-1 (5)	1 (40)	0,82	1,33	0,94	1,67	1,07	1,10
P4	1 (5)	1 (1,4)	-1 (5)	-1 (30)	1,35	1,08	0,99	1,22	1,03	1,23
P5	-1 (1)	-1 (1)	1 (35)	1 (40)	1,17	1,28	1,30	1,21	1,14	1,14
P6	1 (5)	-1 (1)	1 (35)	-1 (30)	0	0,87	0,83	1,16	1,06	1,06
P7	-1 (1)	1 (1,4)	1 (35)	-1 (30)	1,27	1,05	0,95	1,25	0,99	1,11
P8	1 (5)	1 (1,4)	1 (35)	1 (40)	1,13	1,08	0,94	1,21	1,11	1,21
P9	0 (3)	0 (1,2)	0 (20)	0 (35)	1,03	1,24	1,10	1,31	0,92	1,22
P10	0 (3)	0 (1,2)	0 (20)	0 (35)	1,27	1,07	1,12	1,3	0,93	1,27
P11	0 (3)	0 (1,2)	0 (20)	0 (35)	1,30	1,00	1,13	1,26	0,94	1,27
P12	0 (3)	0 (1,2)	0 (20)	0 (35)	1,21	1,03	1,12	1,40	0,92	1,28
Resolução										
P1	-1 (1)	-1 (1)	-1 (5)	1 (40)	4,66	1,61	1,04	1,59	1,55	1,33
P2	1 (5)	-1 (1)	-1 (5)	1 (40)	3,51	1,41	0,99	1,69	1,39	0,87
P3	-1 (1)	1 (1,4)	-1 (5)	-1 (30)	3,36	1,32	1,54	1,21	1,18	1,21
P4	1 (5)	1 (1,4)	-1 (5)	1 (40)	0,68	1,45	1,67	1,92	1,35	1,39
P5	-1 (1)	-1 (1)	1 (35)	-1 (30)	3,5	1,46	1,55	1,59	2,42	2,42
P6	1 (5)	-1 (1)	1 (35)	-1 (30)	0,77	0,78	0,85	1,22	1,32	4,00
P7	-1 (1)	1 (1,4)	1 (35)	1 (40)	3,96	1,33	1,17	1,54	1,36	1,92
P8	1 (5)	1 (1,4)	1 (35)	0 (35)	2,61	1,33	0,94	1,62	1,34	2,91
P9	0 (3)	0 (1,2)	0 (20)	0 (35)	3,82	1,46	1,43	1,63	1,24	0,62
P10	0 (3)	0 (1,2)	0 (20)	0 (35)	3,77	1,38	1,44	1,66	1,28	1,04
P11	0 (3)	0 (1,2)	0 (20)	0 (35)	3,93	1,37	1,44	1,52	1,26	0,88
P12	0 (3)	0 (1,2)	0 (20)	-1 (30)	3,95	1,37	1,44	1,66	1,26	2,73

Legenda: AA, % acidificação da fase móvel; FX, fluxo no sistema; VIN, µL de amostra injetada. p < 0,05. Em negrito, valores extremos obtidos para cada micotoxina.

Fonte: Morais (2019)

Picos alargados reduzem diretamente a resolução cromatográfica, uma vez que a capacidade de separação entre os picos fica comprometida; baixa resolução resulta em aglomeração entre picos, enquanto que muito alta pode aumentar o tempo de corrida. Desta forma, valores entre 1,80 e 2,80 são bons parâmetros a serem seguidos (NETO, 2009b). Nesse sentido, os ensaios P8 e P1 para AFM₁ e AFG₂, P4 para AFG₁ e AFB₁, e P5 e P7 para ZEA e OTA foram considerados adequados.

Todos os parâmetros que apresentaram significância estatística tiveram efeito antagônico sobre o tempo de retenção, ou seja, ao passar do nível -1 para +1 reduziu-se o tempo de retenção das micotoxinas (Tabela 15). Esse comportamento foi observado na alteração da acidificação para AFM₁, AFG₂, AFG₁, AFB₁ e OTA; no fluxo para todas as micotoxinas e na temperatura para AFG₂, AFG₁ e OTA. Também é observado que, dentre os parâmetros que foram significativos o fluxo exerce maior influência sobre o tempo de retenção, e foi mais expressivo sobre as micotoxinas AFB₁ e AFG₁ (-3,82 e -2,99). De forma aditiva, todos os 3 parâmetros contribuem para a redução do tempo total de análise o que é positivo quando se tem vários compostos para eluir na mesma análise.

Muhlen e Lanças (2004) destacam a importância que a temperatura exerce sobre parâmetros físicos como solubilidade, pressão de vapor, viscosidade e difusividade e, decorrendo inevitavelmente sobre a retenção. Os mesmos autores também advertem para a escolha adequada do fluxo (entre 0,5 e 2 mL/min) no sistema convencional de HPLC quando empregadas colunas com diâmetro entre 3,2 a 4,6 mm. Não obstante, é preciso ter cautela para que os valores de fluxo empregados não resultem na produção de um alto volume de resíduos químicos (DIONÍSIO et al., 2010). O volume de injeção não apresentou efeito significativo nas faixas estudadas (Tabela 15).

Na sequência, Tabela 16 e 17 os efeitos dos parâmetros independentes sobre o tempo de retenção, assimetria e resolução são apresentados e discutidos, respectivamente.

Ao elevar a temperatura (nível -1 para +1) houve redução na simetria (efeito negativo) sobre AFM₁. A simetria dos picos de ZEA e OTA não sofreu influência significativa de nenhum dos parâmetros avaliados (Tabela 16). Esse dado é importante pois o aumento na temperatura da coluna contribui na redução do tempo de retenção mas pode comprometer a qualidade do cromatograma provocando distorções sobre alguns dos picos estudados.

Tabela 15 – Estimativa dos efeitos individuais sobre a variável tR

Parâmetros	Efeito	Erro padrão	T (7)	p-Valor	Estimativa por Intervalo (95%)	
					Limite Inferior	Limite superior
AFM₁						
Média	6,22	0,05	113,22	0,00	6,11	6,33
(%) AA	-0,47	0,14	-3,38	0,01	-0,75	-0,20
(mL/min) FX	-1,77	0,14	-12,65	0,00	-2,04	-1,50
(µL) VI	0,10	0,14	0,69	0,51	-0,18	0,37
(°C) TC	0,10	0,14	0,70	0,51	-0,17	0,37
AFG₂						
Média	6,22	0,05	113,22	0,00	6,11	6,33
(%) AA	-0,47	0,14	-3,38	0,01	-0,75	-0,20
(mL/min) FX	-1,77	0,14	-12,65	0,00	-2,04	-1,50
(µL) VI	0,10	0,14	0,69	0,51	-0,18	0,37
(°C) TC	0,10	0,14	0,70	0,51	-0,17	0,37
AFG₁						
Média	9,56	0,13	74,78	0,00	9,32	9,80
(%) AA	-1,18	0,31	-3,77	0,01	-1,77	-0,59
(mL/min) FX	-2,99	0,31	-9,53	0,00	-3,58	-2,39
(µL) VI	-0,14	0,31	-0,45	0,67	-0,73	0,45
(°C) TC	-0,83	0,31	-2,63	0,03	-1,42	-0,23
AFB₁						
Média	12,20	0,17	71,22	0,00	11,87	12,52
(%) AA	-1,59	0,42	-3,78	0,01	-2,38	-0,79
(mL/min) FX	-3,82	0,42	-9,11	0,00	-4,61	-3,03
(µL) VI	-0,16	0,42	-0,39	0,71	-0,96	0,63
(°C) TC	-1,13	0,42	-2,69	0,03	-1,92	-0,34
ZEA						
Média	25,76	0,19	137,47	0,00	25,41	26,12
(%) AA	0,06	0,46	0,13	0,90	-0,81	0,93
(mL/min) FX	-1,72	0,46	-3,75	0,01	-2,59	-0,85
(µL) VI	0,48	0,46	1,06	0,33	-0,38	1,35
(°C) TC	-0,16	0,46	-0,36	0,73	-1,03	0,70
OTA						
Média	25,93	0,07	373,84	0,00	25,80	26,06
(%) AA	-0,56	0,17	-3,30	0,01	-0,88	-0,24
(mL/min) FX	-2,44	0,17	-14,36	0,00	-2,76	-2,12
(µL) VI	-0,06	0,17	-0,35	0,73	-0,38	0,26
(°C) TC	-0,74	0,17	-4,36	0,00	-1,06	-0,42

Legenda: AA, % acidificação da fase móvel; FX, fluxo no sistema; VIN, µL de amostra injetada. Em negrito p <0,05.

Fonte: Morais (2019)

O aumento no volume de amostra injetada no HPLC (5 µL para 35 µL) provocou redução na simetria do pico da AFB₁. Problemas com sobrecarga de amostra introduzida na coluna podem ocorrer quando as amostras estiverem muito concentradas, geralmente os picos mais intensos começam a apresentar alargamento e cauda (NETO, 2009c).

Tabela 16 – Estimativa dos efeitos individuais sobre a variável a assimetria

Parâmetros	Efeito	Erro padrão	T (7)	p-Valor	Estimativa por Intervalo (95%)	
					Limite Inferior	Limite superior
AFM₁						
Média	1,32	0,13	10,46	0,00	1,07	1,56
(%) AA	-0,21	0,32	-0,66	0,53	-0,84	0,41
(mL/min) FX	-0,47	0,32	-1,45	0,20	-1,09	0,16
(µL) VI	-0,06	0,32	-0,18	0,86	-0,68	0,57
(°C) TC	-0,80	0,32	-2,49	0,05	-1,43	-0,18
AFG₂						
Média	1,11	0,03	39,55	0,00	1,06	1,17
(%) AA	-0,08	0,07	-1,16	0,28	-0,21	0,05
(mL/min) FX	0,02	0,07	0,22	0,83	-0,12	0,15
(µL) VI	-0,11	0,07	-1,67	0,14	-0,25	0,02
(°C) TC	0,25	0,07	3,63	0,01	0,12	0,38
AFG₁						
Média	1,04	0,05	23,04	0,00	0,95	1,12
(%) AA	0,01	0,11	0,11	0,91	-0,20	0,22
(mL/min) FX	-0,08	0,11	-0,75	0,48	-0,29	0,13
(µL) VI	0,02	0,11	0,16	0,88	-0,19	0,23
(°C) TC	0,22	0,11	2,02	0,08	0,01	0,43
AFB₁						
Média	1,34	0,04	30,90	0,00	1,26	1,42
(%) AA	0,01	0,11	0,09	0,93	-0,19	0,21
(mL/min) FX	-0,02	0,11	-0,19	0,86	-0,22	0,18
(µL) VI	-0,28	0,11	-2,64	0,03	-0,48	-0,08
(°C) TC	0,26	0,11	2,45	0,04	0,06	0,46
ZEA						
Média	1,04	0,03	30,38	0,00	0,97	1,10
(%) AA	-0,04	0,08	-0,48	0,65	-0,20	0,12
(mL/min) FX	-0,09	0,08	-1,07	0,32	-0,25	0,07
(µL) VI	-0,04	0,08	-0,48	0,65	-0,20	0,12
(°C) TC	0,02	0,08	0,24	0,82	-0,14	0,18
OTA						
Média	1,13	0,04	25,81	0,00	1,05	1,21
(%) AA	0,00	0,11	0,00	1,00	-0,20	0,20
(mL/min) FX	0,19	0,11	1,77	0,12	-0,01	0,39
(µL) VI	0,13	0,11	1,16	0,28	-0,08	0,33
(°C) TC	-0,03	0,11	-0,23	0,82	-0,23	0,18

Legenda: AA, % acidificação da fase móvel; FX, fluxo no sistema; VIN, µL de amostra injetada. Em negrito p < 0,05.

Fonte: Morais (2019)

A resolução foi afetada negativa e significativamente pela acidificação para AFM₁ (p = 0,02) e, positiva e significativamente para OTA pelo volume de injeção (Tabela 17). As outras micotoxinas não sofrem influência significativa por nenhum dos parâmetros avaliados para a resolução.

Tabela 17 – Estimativa dos efeitos individuais sobre a variável resolução

Parâmetro	Efeito	Erro padrão	T (7)	p-Valor	Estimativa por Intervalo (95%)	
					Limite Inferior	Limite superior
AFM₁						
Média	2,88	0,33	8,75	0,00	2,08	3,69
Curvatura	1,97	1,14	1,73	0,13	-0,82	4,76
(%) AA	-1,98	0,66	-3,00	0,02	-3,59	-0,37
(mL/min) FX	-0,46	0,66	-0,69	0,51	-2,07	1,15
(µL) VI	-0,34	0,66	-0,52	0,62	-1,95	1,27
(°C) TC	0,73	0,66	1,11	0,31	-0,88	2,34
AFG₂						
Média	1,36	0,05	25,10	0,00	1,25	1,46
(%) AA	-0,19	0,13	-1,42	0,20	-0,44	0,06
(mL/min) FX	0,04	0,13	0,32	0,76	-0,21	0,29
(µL) VI	-0,22	0,13	-1,68	0,14	-0,47	0,03
(°C) TC	0,09	0,13	0,66	0,53	-0,16	0,34
AFG₁						
Média	1,29	0,08	15,57	0,00	1,13	1,45
(%) AA	-0,21	0,20	-1,05	0,33	-0,60	0,17
(mL/min) FX	0,22	0,20	1,09	0,31	-0,16	0,61
(µL) VI	-0,18	0,20	-0,90	0,40	-0,57	0,20
(°C) TC	0,07	0,20	0,36	0,73	-0,31	0,46
AFB₁						
Média	1,57	0,06	24,36	0,00	1,45	1,69
(%) AA	0,13	0,16	0,82	0,44	-0,17	0,43
(mL/min) FX	0,05	0,16	0,32	0,76	-0,25	0,35
(µL) VI	-0,11	0,16	-0,70	0,51	-0,41	0,19
(°C) TC	-0,04	0,16	-0,25	0,81	-0,34	0,26
ZEA						
Média	1,41	0,08	16,74	0,00	1,29	1,53
(%) AA	-0,28	0,21	-1,34	0,22	-0,57	0,01
(mL/min) FX	-0,36	0,21	-1,75	0,12	-0,65	-0,07
(µL) VI	0,24	0,21	1,17	0,28	-0,05	0,53
(°C) TC	0,19	0,21	0,91	0,39	-0,10	0,48
OTA						
Média	1,78	0,26	6,93	0,00	1,17	2,38
(%) AA	0,57	0,63	0,91	0,39	-0,91	2,06
(mL/min) FX	-0,30	0,63	-0,47	0,65	-1,78	1,19
(µL) VI	1,61	0,63	2,57	0,04	0,13	3,10
(°C) TC	-0,31	0,63	-0,49	0,64	-1,79	1,18

Legenda: AA, % acidificação da fase móvel; FX, fluxo no sistema; VIN, µL de amostra injetada. Em negrito p < 0,05.

Fonte: Morais (2019)

Após a análise de efeitos do planejamento fracionário algumas considerações foram feitas. O aumento do fluxo diminuiu o tempo de retenção para a maioria das micotoxinas; entretanto, aumentar esse parâmetro pode comprometer a qualidade da separação entre a AFM₁ e os interferentes da amostra, bem como pode levá-la a eluir como “volume morto” (MUHLEN; LANÇAS, 2004). Decidiu-se fixar o fluxo no nível superior estudado (1,4 mL/min).

A temperatura apresentou efeito positivo significativo sobre a assimetria e tempo de retenção de algumas micotoxinas. A faixa estudada neste planejamento para esta variável foi de 30 a 40 °C, sendo que para o DCCR contemplou-se a ampliação da faixa entre 35 e 50 °C.

O efeito negativo da porcentagem de acidificação da fase móvel permitiu obter-se tempos de eluição reduzidos, sem efeito para as outras variáveis. Por motivos técnicos, relacionada a sensibilidade do material de empacotamento da coluna, a ampliação dessa faixa para mais é limitada; porém, foi considerado o estudo da fase móvel sem acidificação até 5 % (0 a 5 %).

O volume de injeção foi aumentado em função da sua não significância sobre as variáveis dependentes na faixa inicialmente proposto nesse estudo (5 - 35 µL). Considerou-se a ampliação a partir do ponto central 20 µL até 80 µL, ponderando entre o limite do equipamento (100 µL) e o pré-conhecimento sobre a possibilidade de sobrecarga de analitos da amostra na coluna.

Considerando as premissas expostas no item 5.2.1, um delineamento composto central rotacional (DCCR) foi realizado para a otimização do tempo de retenção, da resolução e da simetria, considerando como variáveis independentes os parâmetros acidificação, temperatura da coluna e volume de injeção. A matriz dos ensaios com os valores codificados e reais (entre parênteses) dos parâmetros estudados no DCCR, bem como, as respostas obtidas para o tempo de retenção, assimetria e resolução estão apresentadas na Tabela 18.

Houve variação com relação ao menor tempo de retenção de cada micotoxina e ensaio. O menor tempo de retenção foi observado no ensaio P10 para AFM₁ (4,78 min) e AFG₂ (5,92 min), no ensaio P8 para AFG₁ (7,32 min), AFB₁ (8,32 min) e ZEA (18,22 min) e no ensaio P7 para OTA (18,32 min).

Ao realizar a análise estatística dos resultados obtiveram-se os coeficientes de regressão que são apresentados na Tabela 19. Os parâmetros não significativos foram incorporados aos resíduos do modelo para o cálculo da análise de variância (ANOVA) apresentada na Tabela 20.

Tabela 18 - Matriz do DCCR realizado para otimização do tempo de retenção, assimetria e resolução com níveis reais e codificados dos parâmetros e respostas.

tR									
Ensaios	(%) AA	(°C) TC	VIN	AFM ₁	AFG ₂	AFG ₁	AFB ₁	ZEA	OTA
P1	-1 (1,5)	-1 (38)	-1 (35)	5,37	6,29	8,78	11,38	19,08	19,09
P2	-1 (1,5)	-1 (38)	1 (65)	5,41	6,82	8,78	11,48	18,88	19,06
P3	-1 (1,5)	1 (46)	-1 (35)	5,21	6,52	8,18	9,75	18,62	18,62
P4	-1 (1,5)	1 (46)	1 (65)	5,41	6,52	8,18	9,82	18,45	18,59
P5	1 (4,0)	-1 (38)	-1 (35)	5,04	6,32	7,92	9,45	18,58	18,72
P6	1 (4,0)	-1 (38)	1 (65)	5,04	6,32	7,88	9,42	18,58	18,72
P7	1 (4,0)	1 (46)	-1 (35)	4,81	5,95	7,48	8,28	18,35	18,32
P8	1 (4,0)	1(46)	1 (65)	4,81	5,95	7,32	8,32	18,22	19,29
P9	-1.68 (0)	0 (42)	0 (50)	5,01	6,35	7,92	13,12	20,42	18,46
P10	1.68 (5,0)	0 (42)	0 (50)	4,78	5,92	7,45	8,35	18,35	18,36
P11	0 (2,5)	-1.68 (35)	0 (50)	5,31	6,82	8,60	10,98	19,12	19,12
P12	0 (2,5)	1.68 (50)	0 (50)	4,91	6,12	7,62	8,82	18,28	18,29
P13	0 (2,5)	0 (42)	-1.68 (20)	5,32	6,75	8,48	10,32	18,75	18,72
P14	0 (2,5)	0 (42)	1.68 (80)	5,34	6,48	8,12	10,38	18,52	18,49
P15	0 (2,5)	0 (42)	0 (50)	5,14	6,45	8,08	9,85	18,72	18,69
P16	0 (2,5)	0 (42)	0 (50)	5,13	6,48	8,12	9,88	18,71	18,72
P17	0 (2,5)	0 (42)	0 (50)	5,14	6,47	8,12	9,88	18,70	18,72
Assimetria									
P1	-1 (1,5)	-1 (38)	-1 (35)	1,33	1,29	1,28	0,92	0,70	0,70
P2	-1 (1,5)	-1 (38)	1 (65)	1,52	1,41	1,42	0,82	0,98	0,70
P3	-1 (1,5)	1 (46)	-1 (35)	1,25	1,12	1,35	2,17	0,8	0,79
P4	-1 (1,5)	1 (46)	1 (65)	0,82	1,15	1,47	1,90	1,21	0,71
P5	1 (4,0)	-1 (38)	-1 (35)	1,63	2,13	1,35	1,71	0,91	0,67
P6	1 (4,0)	-1 (38)	1 (65)	1,61	1,90	1,41	1,84	0,91	0,66
P7	1 (4,0)	1 (46)	-1 (35)	1,30	2,36	1,04	3,37	0,70	0,70
P8	1 (4,0)	1(46)	1 (65)	1,72	2,41	1,67	2,83	0,83	0,68
P9	-1.68 (0)	0 (42)	0 (50)	1,66	1,43	1,26	1,89	0,77	0,75
P10	1.68 (5,0)	0 (42)	0 (50)	1,63	1,75	1,05	2,01	0,75	0,71
P11	0 (2,5)	-1.68 (35)	0 (50)	1,57	1,29	1,25	1,50	0,69	0,69
P12	0 (2,5)	1.68 (50)	0 (50)	1,50	1,25	1,20	1,89	0,75	0,70
P13	0 (2,5)	0 (42)	-1.68 (20)	0,94	0,64	0,74	0,97	0,71	0,74
P14	0 (2,5)	0 (42)	1.68 (80)	0,94	0,90	1,66	0,87	0,97	0,99
P15	0 (2,5)	0 (42)	0 (50)	1,41	1,26	1,58	1,99	0,69	0,71
P16	0 (2,5)	0 (42)	0 (50)	1,52	1,18	1,48	1,93	0,71	0,68
P17	0 (2,5)	0 (42)	0 (50)	1,65	1,24	1,49	2,07	0,72	0,69

Legenda: AA, % acidificação da fase móvel; FX, fluxo no sistema; VIN, µL de amostra injetada. Em negrito p <0,05.

Continuação tabela 18

Ensaio	Resolução								
	(%) AA	(°C) TC	VIN	AFM ₁	AFG ₂	AFG ₁	AFB ₁	ZEA	OTA
P1	-1 (1,5)	-1 (38)	-1 (35)	1,69	1,67	2,51	5,44	1,89	> 4
P2	-1 (1,5)	-1 (38)	1 (65)	1,74	2,57	1,42	6,04	3,35	> 4
P3	-1 (1,5)	1 (46)	-1 (35)	2,36	1,47	1,12	7,63	6,19	> 4
P4	-1 (1,5)	1 (46)	1 (65)	1,22	2,26	1,15	7,2	3,52	> 4
P5	1 (4,0)	-1 (38)	-1 (35)	1,46	1,41	1,18	8,51	4	> 4
P6	1 (4,0)	-1 (38)	1 (65)	1,54	1,38	1,18	8,57	4	> 4
P7	1 (4,0)	1 (46)	-1 (35)	1,40	1,55	1,09	3,37	0,92	> 4
P8	1 (4,0)	1(46)	1 (65)	1,36	1,30	1,27	2,83	1,07	> 4
P9	-1.68 (0)	0 (42)	0 (50)	1,61	1,48	1,83	3,09	3	> 4
P10	1.68 (5,0)	0 (42)	0 (50)	1,63	1,63	0,78	7,2	1,67	> 4
P11	0 (2,5)	-1.68 (35)	0 (50)	1,81	2,61	1,69	6,3	2,10	> 4
P12	0 (2,5)	1.68 (50)	0 (50)	1,42	1,29	1,36	5,91	2,78	> 4
P13	0 (2,5)	0 (42)	-1.68 (20)	2,46	2,13	1,48	6,71	1,29	> 4
P14	0 (2,5)	0 (42)	1.68 (80)	2,24	1,46	1,74	7,43	6,08	> 4
P15	0 (2,5)	0 (42)	0 (50)	1,59	2,35	1,3	7,72	6,41	> 4
P16	0 (2,5)	0 (42)	0 (50)	1,58	2,31	1,29	7,52	6,6	> 4
P17	0 (2,5)	0 (42)	0 (50)	1,59	2,34	1,28	7,48	6,52	> 4

Legenda: AA, % acidificação da fase móvel; FX, fluxo no sistema; VIN, μ L de amostra injetada. Em negrito $p < 0,05$.

Fonte: Morais (2019)

O $F_{\text{calculado}}$ para a regressão foi significativo na maioria dos casos: AFM₁ ($p = 0,0013$), AFG₂ ($p = 0,0043$), AFG₁ ($p = 0,000029$), AFB₁ ($p = 0,00009$) e ZEA ($p = 0,0143$) e maior que o F_{tabelado} , exceção para OTA. O percentual de variação explicado pelos modelos: AFM₁ ($R^2 \approx 88\%$), AFG₂ ($R^2 \approx 80\%$), AFG₁ ($R^2 \approx 90\%$), AFB₁ ($R^2 \approx 91\%$) e ZEA ($R^2 \approx 64\%$), foi adequado considerando a variabilidade inerente aos processos cromatográficos (NETO, 2009d). Dessa maneira, pode-se concluir que os modelos se ajustaram bem aos dados experimentais, sendo possível construir as superfícies de resposta.

A análise das curvas de contorno mostra que há uma região ótima para o menor tempo de retenção da AFM₁, na faixa concomitante de temperatura da coluna de 42 a 50 °C, volume de injeção de 35 a 65 μ L com a acidificação da fase móvel a 2,5 %. Pode-se observar que a retenção está mais condicionada a alterações na temperatura da coluna que sobre os outros parâmetros, fato esse observado anteriormente quando apresentados os coeficientes do modelo.

O tempo de retenção observado para a AFM₁ na faixa descrita foi entre 5,15 e 4,95 minutos, semelhante ao descrito por Rodriguez-Carrasco et al. (2018) (4,60 min) ao analisarem amostras de leite; no entanto, os autores empregaram a técnica de cromatografia líquida acoplado a um detector de massas quadrupolo

Tabela 19 - Coeficientes de regressão para a variável dependente tempo de retenção (tR) obtidos no DCCR.

Variáveis	Coef. regressão	Erro padrão	T (7)	p-Valor	Estimativa por Intervalo (95%)	
					Limite inferior	Limite superior
AFM₁						
Média	5,131	0,042	121,741	0,000	5,035	5,226*
x1 (L)	-0,153	0,026	-5,797	0,000	-0,212	-0,093*
x1 (Q)	-0,078	0,028	-2,828	0,020	-0,141	-0,016*
x2 (L)	-0,095	0,026	-3,591	0,006	-0,154	-0,035*
x3 (L)	0,020	0,026	0,760	0,467	-0,040	0,080
x3 (Q)	0,075	0,028	2,721	0,024	0,013	0,138*
x1 . x2	-0,037	0,034	-1,089	0,305	-0,115	0,040
x1 . x3	-0,030	0,034	-0,871	0,406	-0,108	0,048
AFG₂						
Média	6,454	0,068	94,544	0,000	6,301	6,606*
x1 (L)	-0,171	0,043	-4,001	0,003	-0,266	-0,076*
x1 (Q)	-0,128	0,045	-2,852	0,017	-0,228	-0,028*
x2 (L)	-0,146	0,043	-3,408	0,007	-0,241	-0,050*
x3 (L)	0,006	0,043	0,130	0,899	-0,090	0,101
x3 (Q)	0,042	0,045	0,928	0,375	-0,058	0,142
x1 . x2	-0,084	0,056	-1,501	0,164	-0,208	0,041
AFG₁						
Média	8,116	0,071	114,653	0,000	7,961	8,272*
x1 (L)	-0,301	0,044	-6,797	0,000	-0,398	-0,204*
x1 (Q)	-0,144	0,047	-3,082	0,010	-0,246	-0,041*
x2 (L)	-0,282	0,044	-6,363	0,000	-0,379	-0,184*
x3 (L)	-0,059	0,044	-1,332	0,210	-0,156	0,038
x3 (Q)	0,074	0,047	1,588	0,141	-0,029	0,176
AFB₁						
Média	9,951	0,205	48,582	0,000	9,495	10,408*
x1 (L)	-1,097	0,128	-8,562	0,000	-1,383	-0,812*
x1 (Q)	0,159	0,135	1,180	0,265	-0,141	0,459
x2 (L)	-0,673	0,128	-5,254	0,000	-0,959	-0,388*
x2 (Q)	-0,136	0,135	-1,012	0,336	-0,436	0,164
x3 (L)	0,021	0,128	0,161	0,876	-0,265	0,306
x1 . x2	0,127	0,167	0,762	0,464	-0,245	0,500
ZEA						
Média	18,731	0,187	100,390	0,000	18,315	19,147*
x1 (L)	-0,350	0,088	-3,999	0,003	-0,546	-0,155*
x1 (Q)	0,167	0,096	1,731	0,114	-0,048	0,382
x2 (L)	-0,212	0,088	-2,421	0,036	-0,407	-0,017*
x2 (Q)	-0,075	0,096	-0,780	0,453	-0,290	0,140
x3 (L)	-0,065	0,088	-0,744	0,474	-0,260	0,130
x3 (Q)	-0,098	0,096	-1,019	0,332	-0,313	0,117

Legenda - L, (linear); Q, (quadrático); x1, acidificação; x2, temperatura da colona; x3, volume de injeção; termos significativos ($p \leq 0,05$)*.

Fonte: Morais (2019)

Tabela 20 - ANOVA dos modelos para tempo de retenção das micotoxinas.

AFM ₁						
Fonte de Var.	SQ	GL	MQ	Fcalculado	FTabelado	p-valor
Regressão	0,654	7,000	0,093	9,852	3,293	0,0013
Resíduos	0,085	9	0,009			
Total	0,739	16				
R ² =	88,50			R ajust = 80 %; Erro padrão = 0,10		
AFG ₂						
Fonte de Var.	SQ	GL	MQ	Fcalculado	FTabelado	p-valor
Regressão	1,012	6,000	0,169	6,777	3,217	0,0043
Resíduos	0,248	10	0,024			
Total	1,261	16				
R ² =	80,00			R ajust = 70 %; Erro padrão = 0,15		
AFG ₁						
Fonte de Var.	SQ	GL	MQ	Fcalculado	FTabelado	p-valor
Regressão	2,772	5,000	0,554	20,701	3,204	0,000029
Resíduos	0,294	11	0,026			
Total	3,066	16				
R ² =	90,39			R ajust = 86 %; Erro padrão = 0,16		
AFB ₁						
Fonte de Var.	SQ	GL	MQ	Fcalculado	FTabelado	p-valor
Regressão	23,45	6,000	3,910	17,441	3,217	0,00009
Resíduos	2,241	10	0,224			
Total	25,709	16				
R ² =	91,27			R ajust = 86 %; Erro padrão = 0,47		
ZEA						
Fonte de Var.	SQ	GL	MQ	Fcalculado	FTabelado	p-valor
Regressão	3,040	6,000	0,507	4,832	3,217	0,0144
Resíduos	1,048	10	0,104			
Total	4,088	16				
R ² =	74,35			R² ajust = 60 %; Erro padrão = 0,32		
OTA						
Fonte de Var.	SQ	GL	MQ	Fcalculado	FTabelado	p-valor
Regressão	0,875	9,000	0,097	1,414	3,677	0,3312
Resíduos	0,481	7	0,068			
Total	1,356	16				
R ² =	64,511			R ajust = 18 %; Erro padrão = 0,26		

Legenda: p≤0,05
 Fonte: Morais (2019)

As Equações 9-13 representam o modelo quadrático para a resposta tempo de retenção, em função da porcentagem de acidificação, temperatura da coluna e volume de injeção para todas as micotoxinas com exceção da OTA, para a qual o modelo não foi significativo.

$$\text{AFM}_1 \quad (9)$$

$$tR \text{ (min)} = 5,13 - 0,15.x_1 - 0,07.x_1^2 - 0,09.x_2 + 0,02.x_2^2 + 0,07.x_3 - 0,03.x_1.x_2 - 0,03.x_1.x_3$$

$$\text{AFG}_2 \quad (10)$$

$$tR \text{ (min)} = 6,45 - 0,17.x_1 - 0,128.x_1^2 - 0,14.x_2 + 0,01.x_3 + 0,04.x_3^2 - 0,08.x_1.x_2$$

$$\text{AFG}_1 \quad (11)$$

$$tR \text{ (min)} = 8,11 - 0,30.x_1 - 0,14.x_1^2 - 0,28.x_2 - 0,05.x_3 + 0,07.x_3^2$$

$$\text{AFB}_1 \quad (12)$$

$$tR \text{ (min)} = 9,951 - 1,097.x_1 + 0,15.x_1^2 - 0,67.x_2 - 0,13.x_2^2 + 0,02.x_3 + 0,12.x_1.x_2$$

$$\text{ZEA} \quad (13)$$

$$tR \text{ (min)} = 18,73 - 0,35.x_1 + 0,16.x_1^2 - 0,21.x_2 - 0,07.x_2^2 - 0,06.x_3 - 0,09.x_3^2$$

Para a discussão são exibidas as curvas de contorno do tempo de retenção para as micotoxinas AFM₁ (Figura 17) e ZEA (Figura 18), pois o tempo de retenção total está diretamente associado com o primeiro e o último composto de interesse a eluir; no entanto, como a OTA não apresentou qualidade estatística para o modelo assignou-se a ZEA, por eluir muito próximo a OTA, a análise. Em razão dos resultados obtidos conseguiu-se atingir, tempos inferiores a cinco minutos para a AFM₁ e não superior a 21 minutos para a OTA (Tabela de resultados).

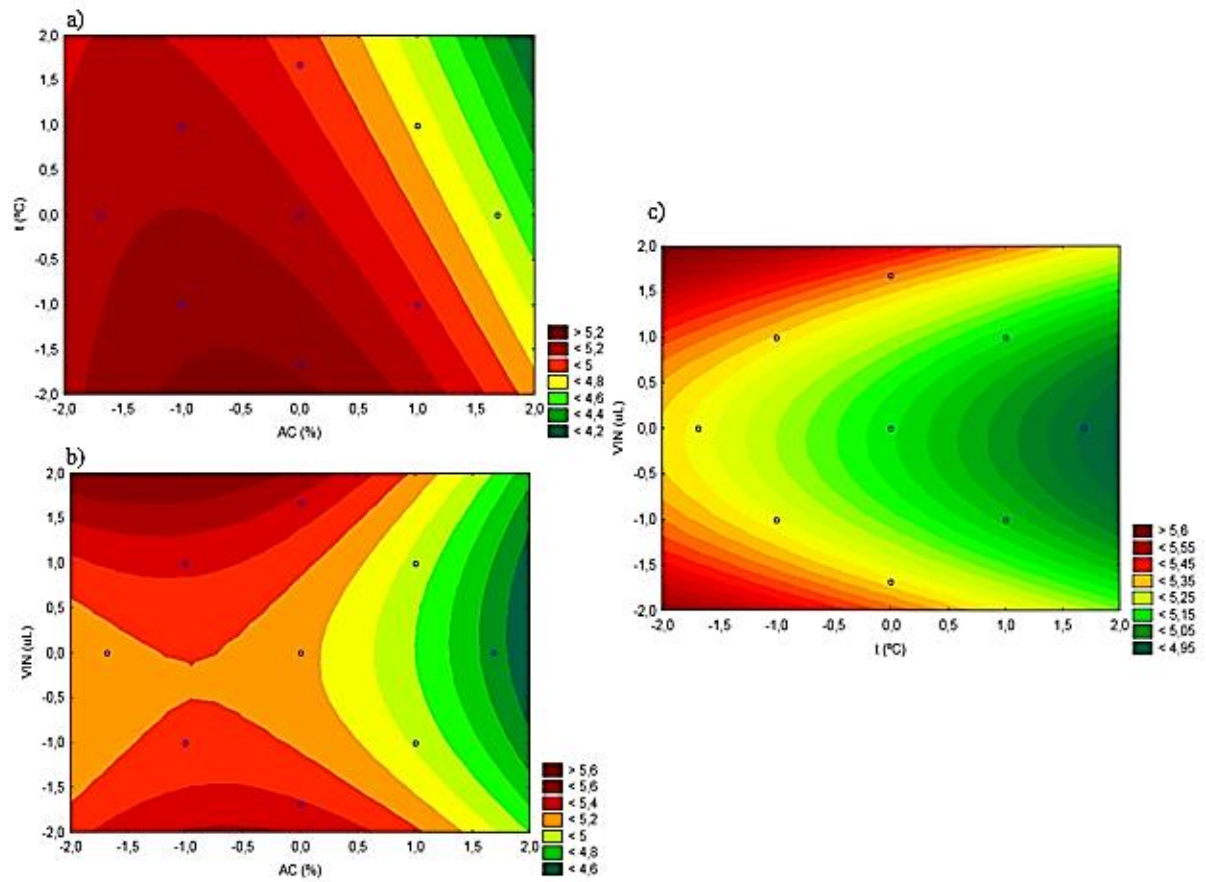


Figura 17 - Curvas de contorno para AFM₁ em função do tempo de retenção.

Legenda - a) temperatura da coluna em função da acidificação; b) volume de injeção em função da acidificação; c) volume de injeção em função da temperatura da coluna.

Fonte: Morais (2019)

A análise das curvas de contorno mostra que há uma região ótima para o menor tempo de retenção da AFM₁, na faixa concomitante de temperatura da coluna de 42 a 50 °C, volume de injeção de 35 a 65 µL com a acidificação da fase móvel a 2,5 %. Pode-se observar que a retenção está mais condicionada a alterações na temperatura da coluna que sobre os outros parâmetros, fato esse observado anteriormente quando apresentados os coeficientes do modelo. O tempo de retenção observado para a AFM₁ na faixa descrita foi entre 5,15 e 4,95 minutos, semelhante ao descrito por Rodriguez-Carrasco et al. (2018) (4,60 min) ao analisarem amostras de leite; no entanto, os autores empregaram a técnica de cromatografia líquida acoplado a um detector de massas quadrupolo.

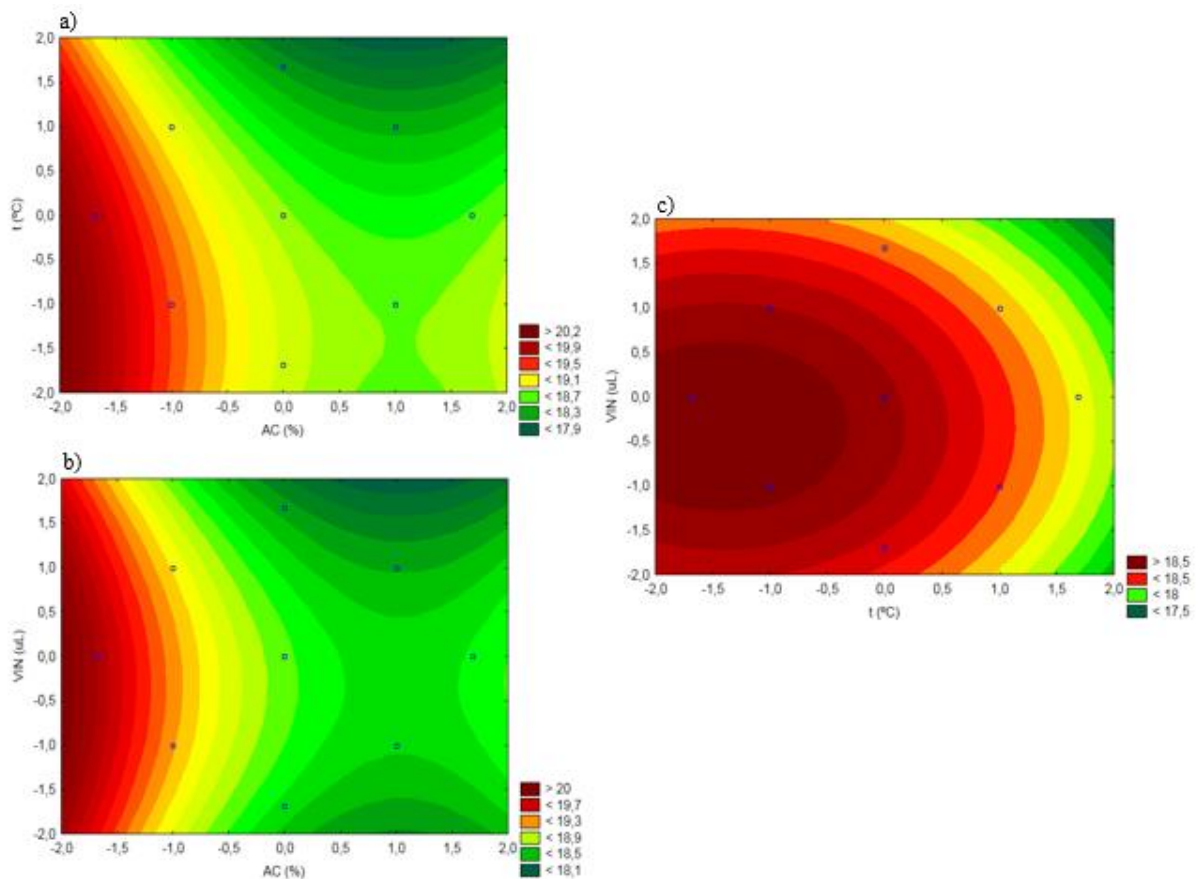


Figura 18 - Curvas de contorno para ZEA em função do tempo de retenção.

Legenda - a) temperatura da coluna vs acidificação; b) volume de injeção vs acidificação; c) volume de injeção vs temperatura da coluna.

Fonte: Morais (2019)

Na análise das curvas de contorno (Figura 18) do tempo de retenção da ZEA podemos observar que, alterações na acidificação da fase móvel tem maior influência sobre a retenção. Assim como na análise anterior, observa-se uma região ótima para o menor tempo de retenção para a ZEA, que oscila entre 2,5 e 4,0% de acidificação, 42 e 50 °C na temperatura da coluna com volume de injeção em 50 µL. O tempo de retenção observado para a ZEA nessa região foi entre 18,70 e 18,30 minutos. Ao analisar amostras de leite por HPLC acoplado a detector de massa (quadrupolo triplo), Flore-Flores e Gonzálvez-Peña (2017) obtiveram a eluição da ZEA em, aproximadamente, 17 minutos.

Pode-se observar que os parâmetros avaliados foram capazes de contribuir na melhora da viscosidade e, conseqüentemente, no aumento da difusividade dos analitos, obtendo-se maiores velocidades lineares sem usar pressão superiores na bomba (MUHLEN; LANÇAS, 2004). O estudo de todo o espaço experimental possibilitou a redução do tempo total de análise o que em rotinas laboratoriais reflete diretamente sobre os custos e geração de resíduos químicos. É válido acrescentar que, se compararmos com os resultados obtidos no planejamento fatorial fracionário (Tabela 14), houve redução no tempo de retenção de todas as micotoxinas e mais expressivamente para ZEA e OTA, tornando válida a abordagem de planejamentos sequenciais na busca por condições ótimas para os parâmetros estudados.

Valores de assimetria referidos como bons estão entre 1,00 e 1,20 (NETO, 2009a). Para ZEA, apenas o ensaio P14 apresentou assimetria dentro dessa faixa, para as demais micotoxinas vários ensaios atendem ao proposto. Os ensaios P3, P13 e P14 apresentaram bons resultados para AFM₁; P3, P4 e P14 para AFG₂; P7, P10 e P14 para AFG₁; P1, P2 e P13 para AFB₁, P2, P4, P5, P6, P8 e P14 para ZEA. A assimetria é peculiar de cada analito, tende a sofrer influência da capacidade de protonação de cada molécula no meio eluente, da temperatura da coluna e da capacidade de formação de complexos com traços de metais presentes no sistema cromatográfico (MIYABE, 2018; PORWAL et al., 2015).

Ao realizar a análise estatística dos resultados da assimetria obteve-se os coeficientes de regressão que são apresentados na Tabela 21.

Tabela 21 - Coeficientes de regressão para a variável dependente Assimetria de ZEA obtidos no DCCR

Variáveis	Coef. regressao	Erro padrão	T (7)	p-Valor	Estimativa por Intervalo (95%)	
					Limite inferior	Limite superior
AFM₁						
Média	1,538	0,081	18,893	0,000	1,354	1,722*
x1 (L)	0,094	0,051	1,855	0,097	-0,021	0,210
x1 (Q)	0,046	0,054	0,863	0,411	-0,075	0,167
x2 (L)	-0,082	0,051	-1,608	0,142	-0,197	0,033
x3 (L)	0,012	0,051	0,230	0,823	-0,103	0,127
x3 (Q)	-0,203	0,054	-3,793	0,004	-0,324	-0,082*
x1 . x2	0,070	0,067	1,052	0,320	-0,080	0,220
x1 . x3	0,080	0,067	1,203	0,260	-0,070	0,230
AFB₁						
Média	1,934	0,225	8,615	0,000	1,434	2,435*
x1 (L)	0,223	0,140	1,589	0,143	-0,090	0,536
x1 (Q)	0,183	0,148	1,237	0,244	-0,146	0,512
x2 (L)	0,413	0,140	2,938	0,015	0,100	0,726*
x3 (L)	-0,069	0,140	-0,494	0,632	-0,382	0,244
x3 (Q)	-0,296	0,148	-2,007	0,073	-0,625	0,033*
x2 . x3	-0,105	0,184	-0,572	0,580	-0,514	0,304
ZEA						
Média	0,700	0,045	15,435	0,000	0,595	0,805*
x1 (L)	-0,027	0,021	-1,285	0,235	-0,076	0,022
x1 (Q)	0,042	0,023	1,776	0,114	-0,012	0,096
x2 (L)	0,010	0,021	0,484	0,641	-0,039	0,059
x2 (Q)	0,027	0,023	1,173	0,275	-0,027	0,082
x3 (L)	0,092	0,021	4,322	0,003	0,043	0,141*
x3 (Q)	0,070	0,023	2,983	0,018	0,016	0,124*
x1 . x2	-0,077	0,028	-2,785	0,024	-0,142	-0,013*
x1 . x3	-0,070	0,028	-2,515	0,036	-0,134	-0,006*

Legenda - L, (linear); Q, (quadrático); x1, acidificação; x2, temperatura da coluna; x3, volume de injeção; termos significativos ($p \leq 0,05$)*.

Fonte: Morais (2019)

Os parâmetros não significativos foram incorporados ao resíduo do modelo para o cálculo da análise de variância (ANOVA) apresentada na Tabela 22.

Tabela 22 - ANOVA dos modelos para assimetria das micotoxinas.

AFM ₁						
Fonte de Var.	SQ	GL	MQ	Fcalculado	FTabelado	p-valor
Regressão	0,926	7	0,132	3,738	3,293	0,0351
Resíduos	0,319	9	0,035			
Total	1,244	16				
R ² =	75 %			R ajust = 54 %; Erro padrão = 0,18		
AFB ₁						
Fonte de Var.	SQ	GL	MQ	Fcalculado	FTabelado	p-valor
Regressão	5,061	6,000	0,844	3,131	3,217	0,0500
Resíduos	2,693871	10	0,269387			
Total	7,755353	16				
R ² =	65 %			R ajust = 44 %; Erro padrão = 0,51		
ZEA						
Fonte de Var.	SQ	GL	MQ	Fcalculado	Ftabelado	p-valor
Regressão	0,275	8,000	0,034	5,554	3,438	0,0128
Resíduos	0,049	8	0,006			
Total	0,324	16				
R ² =	85 %			R ajust = 70 %; Erro padrão = 0,08		

Legenda: $p \leq 0,05$
 Fonte: Moraes (2019)

As Equações 12, 13 e 14 representam o modelo quadrático para a assimetria, em função da porcentagem de acidificação, temperatura da coluna e volume de injeção para todas as micotoxinas.

$$\text{AFM}_1 \quad (12)$$

$$\text{Assimetria} = 1,54 + 0,09 \cdot x_1 + 0,05 \cdot x_1^2 - 0,08 \cdot x_2 + 0,01 \cdot x_3 - 0,20 \cdot x_3^2 + 0,07x_1 \cdot x_2 + 0,08x_1 \cdot x_3$$

$$\text{AFB}_1 \quad (13)$$

$$\text{Assimetria} = 1,93 + 0,22 \cdot x_1 + 0,18 \cdot x_1^2 + 0,41 \cdot x_2 - 0,07 \cdot x_3 - 0,30 \cdot x_3^2 - 0,11x_2 \cdot x_3$$

$$\text{ZEA} \quad (14)$$

$$\text{Assimetria} = 0,700 - 0,02 \cdot x_1 + 0,04 \cdot x_1^2 + 0,010 \cdot x_2 + 0,03 \cdot x_2^2 + 0,09 \cdot x_3 + 0,07 \cdot x_3^2 - 0,08x_1 \cdot x_2 - 0,070x_1 \cdot x_3$$

O $F_{calculado}$ para a regressão foi significativo para a AFM_1 ($p = 0,0351$), AFB_1 ($p = 0,0500$) e ZEA ($p = 0,0128$) e maior que o $F_{Tabelado}$. O percentual de variação explicado pelos modelos: AFM_1 ($R^2 \approx 75\%$), AFB_1 ($R^2 \approx 65\%$) e ZEA ($R^2 \approx 80\%$). Dessa maneira, pode-se observar que o modelo que melhor se ajusta aos dados experimentais, é o da ZEA sendo possível construir as superfícies de resposta (Figura 19).

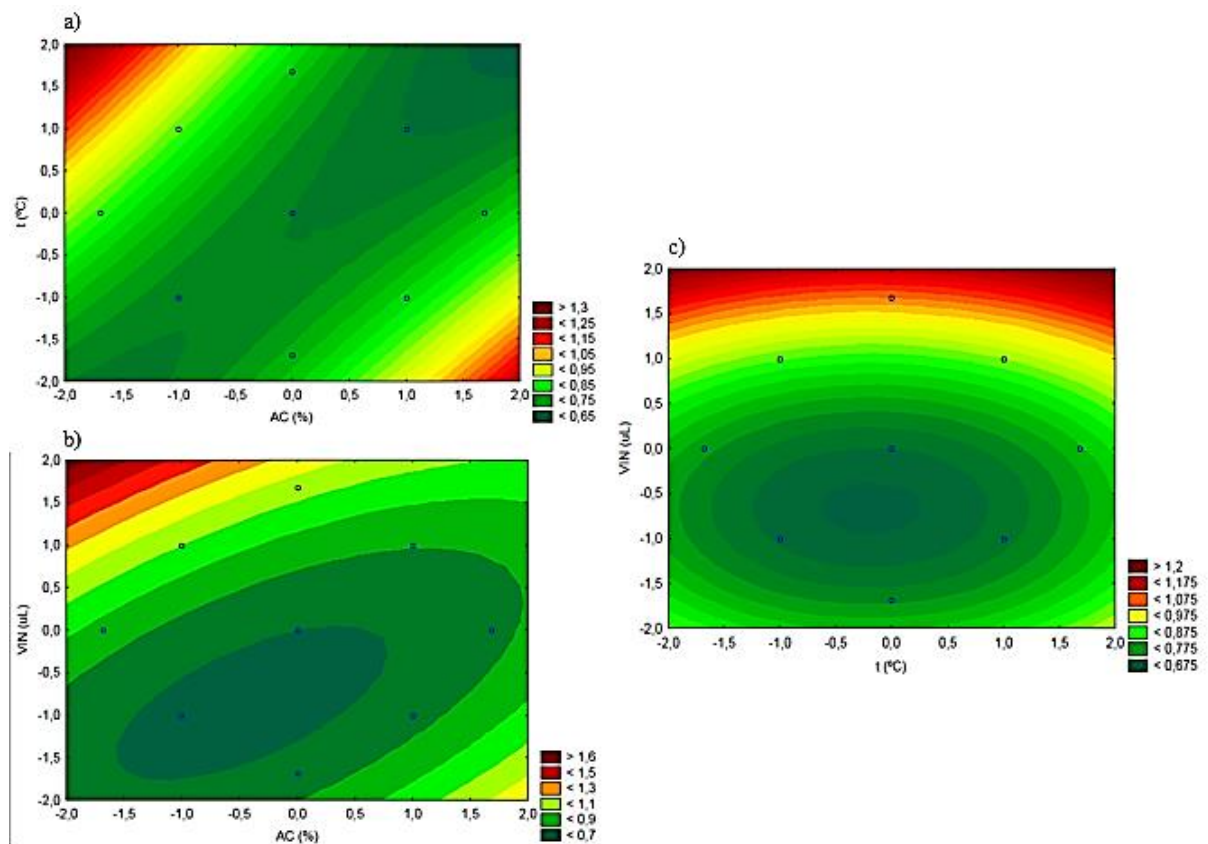


Figura 19 – Curvas de contorno para ZEA em função do tempo de retenção
Legenda - a) temperatura da coluna vs acidificação; b) volume de injeção vs acidificação;
 c) volume de injeção vs temperatura da coluna
Fonte: Moraes (2019)

Observa-se que diferentemente do que ocorria no planejamento fracionário o volume de injeção no DCCR apresentou significância sobre a variável assimetria para a micotoxina ZEA, isso pode ter ocorrido pela ampliação na faixa de estudo desse parâmetro. Ademais os termos correspondentes a interação entre acidificação e temperatura e, acidificação e volume de injeção também foram significativos. Dois pontos são apontados como críticos dentro da região estudada, no primeiro o volume de injeção é de 80 μL , a temperatura da coluna 42 $^{\circ}\text{C}$ e

a acidificação da fase móvel é fixa em 2,5 % e, no segundo, o volume de injeção é de 50 μ L, a acidificação da fase móvel é de 1,5 % e a temperatura da coluna 50 $^{\circ}$ C, apontado como ponto crítico dentro da região estudada, nela a assimetria do composto é \approx 1.

A resolução possui valores de aceitabilidade na faixa entre 1,80 e 2,80 (NETO, 2009b), para AFM₁ nos ensaios P11, P13 e P14; para AFG₂, em P2, P4, P11, P13, P15, P16 e P17; para AFG₁, em P1 e P9; para ZEA em P1, P4, P11 e P12; para AFB₁ e OTA todos os ensaios são observados como ótimos uma vez que essas micotoxinas não apresentam picos adjacentes posteriores próximos. Na Tabela 23, são apresentados os coeficientes de regressão para os termos mantidos e que representarão a Equação matemática do modelo da resolução.

Tabela 23 - Coeficientes de regressão para a variável dependente resolução para AFB₁, AFG₁ e ZEA obtidas no DCCR

Variáveis	Coef. regressao	Erro padrão	T (7)	p-Valor	Estimativa por Intervalo (95%)	
					Limite inferior	Limite superior
AFG₁						
Média	1,436	0,075	19,223	0,000	1,267	1,605*
x1 (L)	-0,238	0,061	-3,869	0,004	-0,377	-0,099*
x1 (Q)	-0,055	0,063	-0,870	0,407	-0,197	0,088
x2 (L)	-0,162	0,061	-2,641	0,027	-0,301	-0,023*
x3 (L)	-0,032	0,061	-0,528	0,610	-0,171	0,107
x1 . x2	0,207	0,080	2,586	0,029	0,026	0,389*
x1 . x3	0,155	0,080	1,931	0,085	-0,027	0,337
x2 . x3	0,162	0,080	2,025	0,074	-0,019	0,344
AFB₁						
Média	7,386	0,468	15,771	0,000	6,342	8,429*
x1 (L)	0,284	0,293	0,970	0,355	-0,368	0,937
x1 (Q)	-0,778	0,308	-2,525	0,030	-1,464	-0,091*
x2 (L)	-0,599	0,293	-2,046	0,068	-1,252	0,053
x2 (Q)	-0,438	0,308	-1,423	0,185	-1,125	0,248
x3 (L)	0,066	0,293	0,225	0,826	-0,587	0,719
x1 . x2	-1,779	0,383	-4,648	0,001	-2,632	-0,926*
ZEA						
Média	6,476	0,709	9,132	0,000	4,841	8,112*
x1 (L)	-0,527	0,333	-1,582	0,152	-1,295	0,241
x1 (Q)	-1,360	0,367	-3,711	0,006	-2,206	-0,515*
x2 (L)	-0,029	0,333	-0,087	0,933	-0,797	0,739
x2 (Q)	-1,323	0,367	-3,610	0,007	-2,168	-0,478*
x3 (L)	0,512	0,333	1,538	0,163	-0,256	1,280
x3 (Q)	-0,883	0,367	-2,409	0,043	-1,728	-0,038*
x1 . x2	-1,310	0,435	-3,011	0,017	-2,313	-0,307*
x2 . x3	-0,498	0,435	-1,143	0,286	-1,501	0,506

Legenda: L, (linear); Q, (quadrático); x1, acidificação; x2, temperatura da coluna; x3, volume de injeção; termos significativos ($p \leq 0,05$)*.

Fonte: Morais (2019)

Definido o modelo, foi gerada a ANOVA (Tabela 24) para testar a variação total intrínseca da variável resolução comparada com a variação do modelo e seus níveis de significância.

Tabela 24 – ANOVA dos modelos para assimetria das micotoxinas.

AFG₁						
Fonte de Var.	SQ	GL	MQ	Fcalculado	FTabelado	p-valor
Regressão	1,932	7,000	0,276	5,357	3,293	0,0116
Resíduos	0,463	9	0,051			
Total	2,395	16				
R²=	81 %			R² ajust = 66 %; Erro padrão = 0,22		
AFB₁						
Fonte de Var.	SQ	GL	MQ	Fcalculado	FTabelado	p-valor
Regressão	39,738	6,000	6,623	5,652	3,217	0,0084
Resíduos	11,718	10	1,171			
Total	51,455	16				
R²=	77 %			R² ajust = 63 %; Erro padrão = 1,08		
ZEA						
Fonte de Var.	SQ	GL	MQ	Fcalculado	FTabelado	p-valor
Regressão	55,401	6,000	6,623	5,652	3,217	0,0084
Resíduos	12,117	10	1,171			
Total	67,518	16				
R²=	82 %			R² ajust = 64 %; Erro padrão = 1,23		

Legenda – $p \leq 0,05$.
Fonte: Morais (2019)

O *Fcalculado* para a regressão foi significativo para a AFG₁ ($p = 0,011$), AFB₁ ($p = 0,008$) e ZEA ($p = 0,008$) e maior que o FTabelado e o percentual de variação explicado pelos modelos: AFG₁ ($R^2 \approx 81\%$), AFB₁ ($R^2 \approx 77\%$) e ZEA ($R^2 \approx 82\%$). Dessa maneira, pode-se observar que o modelo que melhor se ajusta aos dados experimentais foi o da ZEA sendo possível construir as superfícies de resposta.

Os valores matemáticos do modelo predito para a variável dependente resolução podem ser descrito pelas equações 15, 16 e 17.

$$\text{AFG}_1 \quad (15)$$

$$\text{Resolução} = 1,436 - 0,24 \cdot x_1 - 0,05 \cdot x_1^2 - 0,16 \cdot x_2 - 0,03x_3 \cdot x_2 + 0,21x_1 \cdot x_2 + 0,15x_1 \cdot x_3 + 0,162x_2 \cdot x_3$$

$$\text{AFB}_1 \quad (16)$$

$$\text{Resolução} = 7,38 + 0,28 \cdot x_1 - 0,77 \cdot x_1 - 0,59 \cdot x_2 - 0,44 \cdot x_2 + 0,06 \cdot x_3 - 1,77x_1 \cdot x_2$$

$$\text{ZEA} \quad (17)$$

$$\text{Resolução} = 6,47 - 0,52 \cdot x_1 - 1,36 \cdot x_1 - 0,03 \cdot x_2 - 1,32 \cdot x_2 + 0,51 \cdot x_3 - 0,88 \cdot x_3 - 1,31x_1 \cdot x_2 - 0,49x_2 \cdot x_3$$

O modelo foi considerado adequado para descrever as superfícies de resposta, para melhor visualização dos pontos otimizados pelo modelo são apresentadas as curvas de contorno de cada resposta (Figura 20).

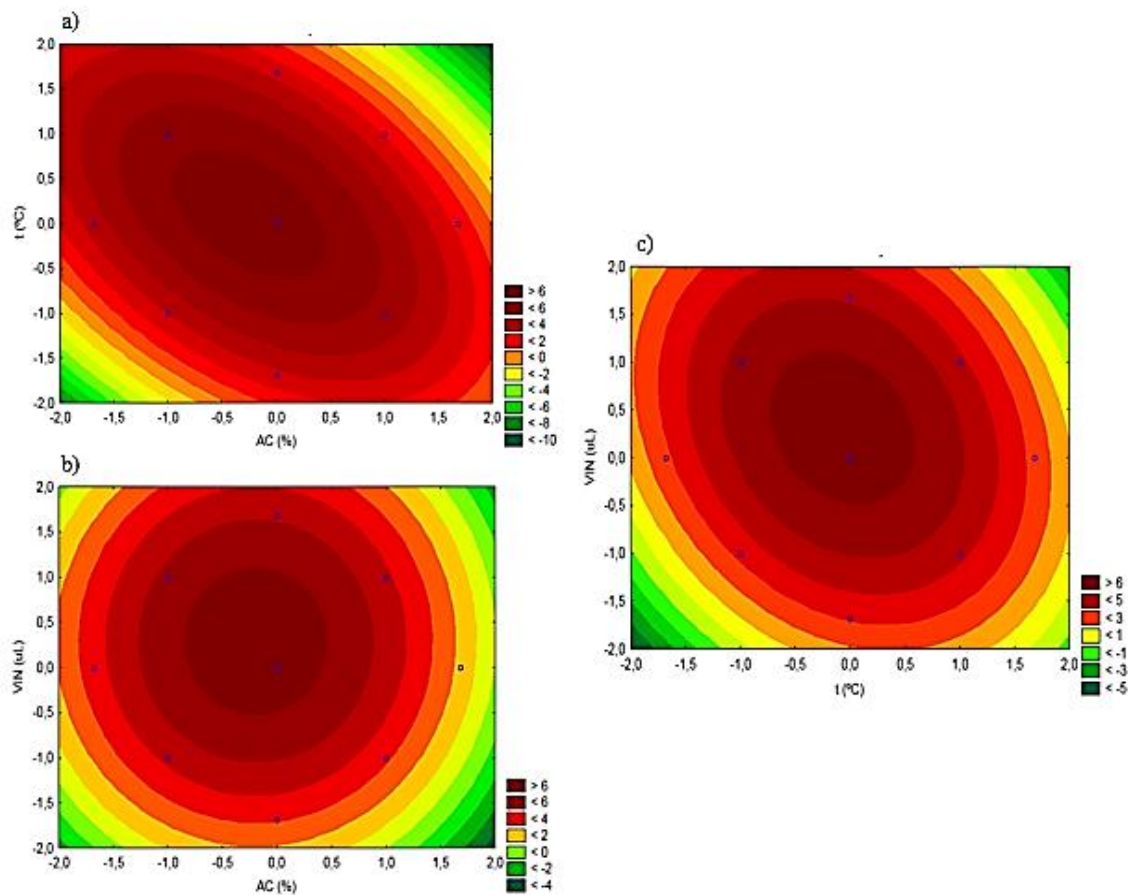


Figura 20 – Curvas de contorno para ZEA em função do tempo de retenção
Legenda - a) temperatura da coluna vs acidificação; b) volume de injeção vs acidificação;
 c) volume de injeção vs temperatura da coluna.

Fonte: Moraes (2019)

A resolução é uma medida quantitativa de separação entre dois componentes consecutivos, é calculada a partir da distância mais extrema de separação entre os dois picos dividido pela largura média nas respectivas bases (MOGOLLÓN et al., 2014). Deste modo, a finalidade da resolução é possibilitar maior poder de separação e distribuição dos analitos na fase móvel, quanto maior é esse valor maior será a separação dos componentes da amostra no espaço (GRAZIELI; BOTTOLI; COLLINS, 2016). Para esta interpretação considerou-se os resultados obtidos para resolução entre ZEA e OTA. Esses picos, apesar de serem observados em comprimentos de ondas distintos, eluem consecutivamente próximos e a depender de suas concentrações nas amostras podem ser observadas sobreposições, o que interfere na análise quantitativa.

Se buscássemos o ponto máximo, pelas curvas de contorno, poderíamos observar que o ponto crítico estaria situado no ponto central do espaço estudado, obtendo-se resoluções próximas a 6. No entanto, deve-se observar que a resolução muito alta pode aumentar o tempo total de análise. Para que isso não ocorra, convencionalmente usa-se a faixa de controle, se a resolução for inferior a um ($R < 1$) poderá ocorrer interferência na simetria do pico provocada pela formação de cauda, admite-se valores entre 1,80 e 2,80 (NETO, 2009d; VANBEL; TILQUIN; SCHOENMAKERS, 1996). Dois pontos experimentais indicaram condições na perspectiva supracitada, primeira: acidificação a 5 % da água, volume de injeção de 50 μ L e temperatura da coluna fixa em 42 °C, segunda: volume de injeção 50 μ L, acidificação fixa em 2,5 % e a temperatura em 35 °C ou 50 °C.

Os dados apresentados até o momento revelam a complexidade inerente à otimização de condições cromatográficas em uma análise multicompostos com emprego de detectores mais simples, como é o caso do fluorescência. Satisfazer todas as variáveis dependentes observando-se a banda cromatográfica como um todo é complicado; por isso, este trabalho tem abordado a interpretação seletiva dos compostos que são mais interessantes para quantificar cada resposta.

Considerando todos os resultados obtidos com a leitura das curvas de contorno, observa-se que não fora alcançado um valor ótimo para a assimetria e resolução da micotoxina ZEA. Para encontrar a faixa desejada, foi aplicada a técnica da desejabilidade.

Aplicou-se a função desejabilidade aos dados obtidos para a AFM₁ (Figura 21) para controlar o tempo de retenção da primeira micotoxinas a eluir e verificar o comportamento das

outras AFs que eluem na mesma mistura de solventes e para os dados obtidos de ZEA para tentar encontrar um ponto crítico que atende-se melhor a faixa de simetria e resolução esperada.

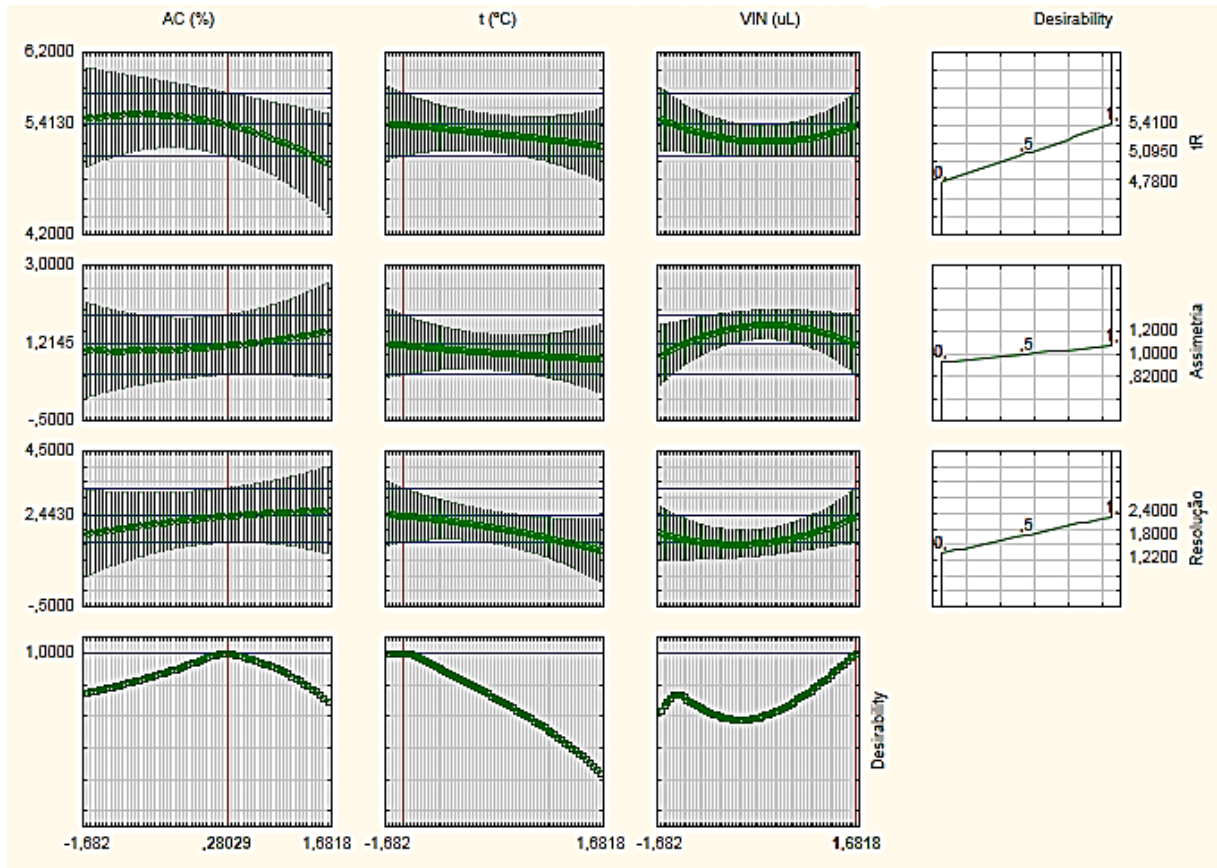


Figura 21 – Gráfico função desejabilidade para AFM_1
Fonte: Morais (2019)

Figura 21 mostra os valores dos pontos ótimos das 3 variáveis dependente: tempo de retenção - 5,41 minutos; assimetria de 1,00 a 1,20 e resolução entre 1,80 e 2,40, as condições operacionais que levam ao ótimo das respostas são: acidificação da fase móvel - 0,85%; temperatura da coluna - 35 °C e volume de injeção 80 μ L. A função desejabilidade global foi igual a 1,00.

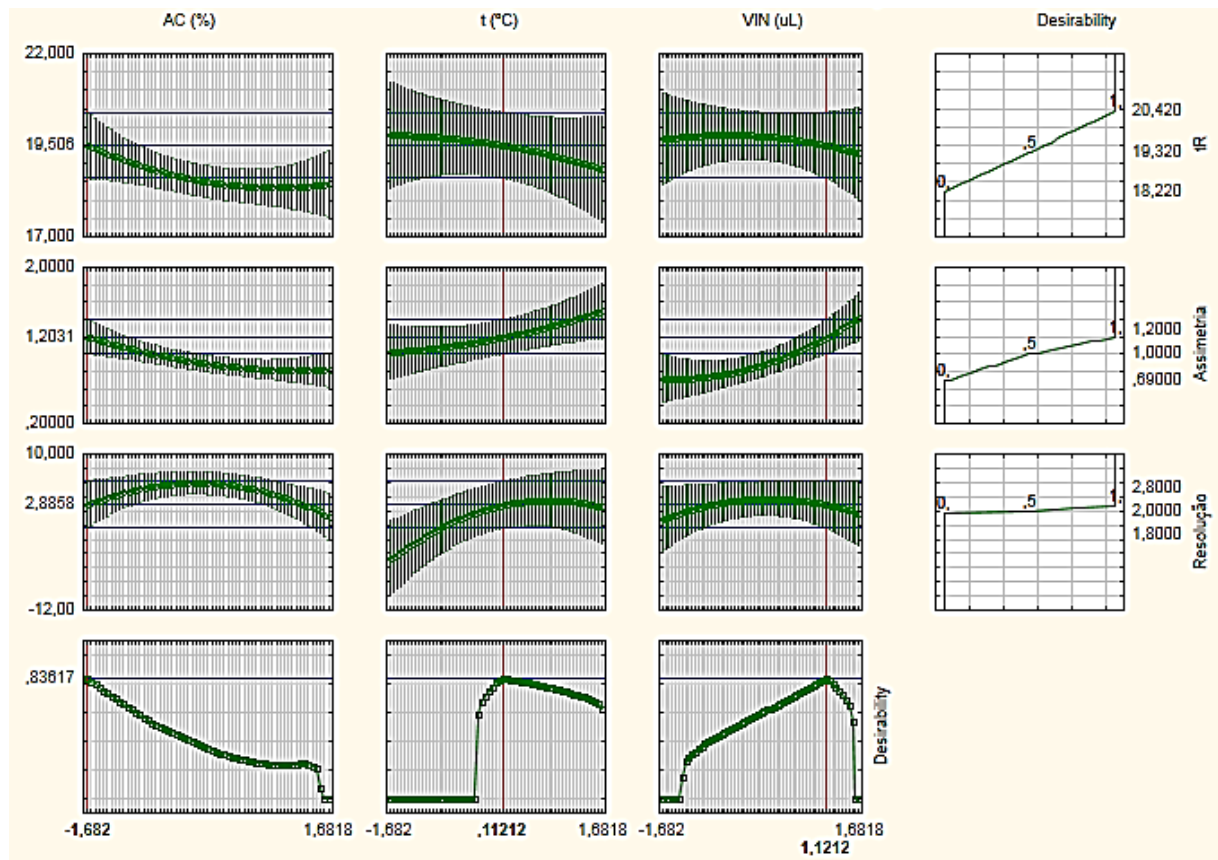


Figura 22 – Gráfico função desejabilidade para ZEA
Fonte: Morais (2019)

A Figura 22 mostra os valores dos pontos ótimos das três variáveis dependentes tempo de retenção de 20 minutos e 40 segundos; assimetria de 1,00 a 1,20 e resolução entre 1,80 e 2,40, onde as condições operacionais que levam ao ótimo das respostas são acidificação da fase móvel - 0%, temperatura da coluna - 50 °C e volume de injeção 50 µL. A função desejabilidade global foi igual a 0,84. As duas condições foram testadas e obtiveram os cromatogramas das Figuras 23 e 24

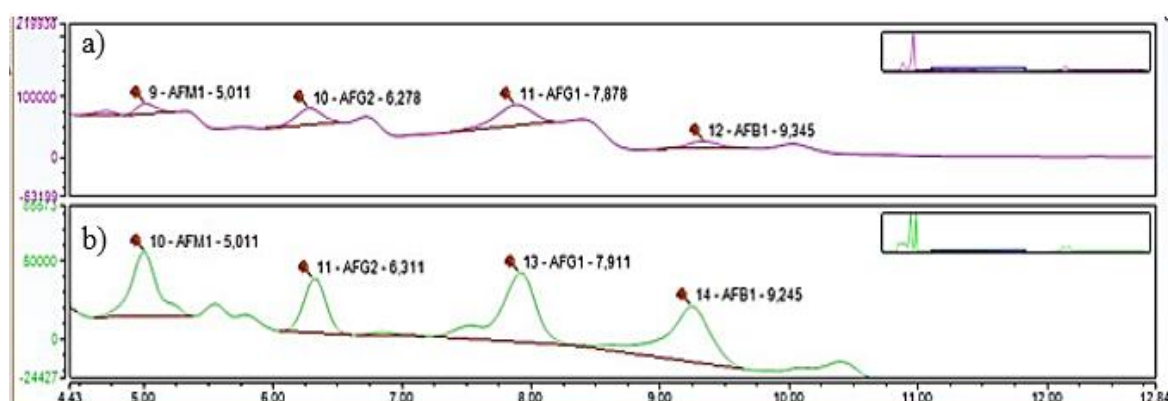


Figura 23 – Cromatograma na banda de eluição das AFs

Legenda - Parâmetros instrumentais: a) temperatura da coluna - 50 °C, volume de injeção - 50 µL, acidificação - 0 % e; b) temperatura da coluna - 35 °C, volume de injeção 80 µL e acidificação - 0,85 %

Fonte: Morais (2019)

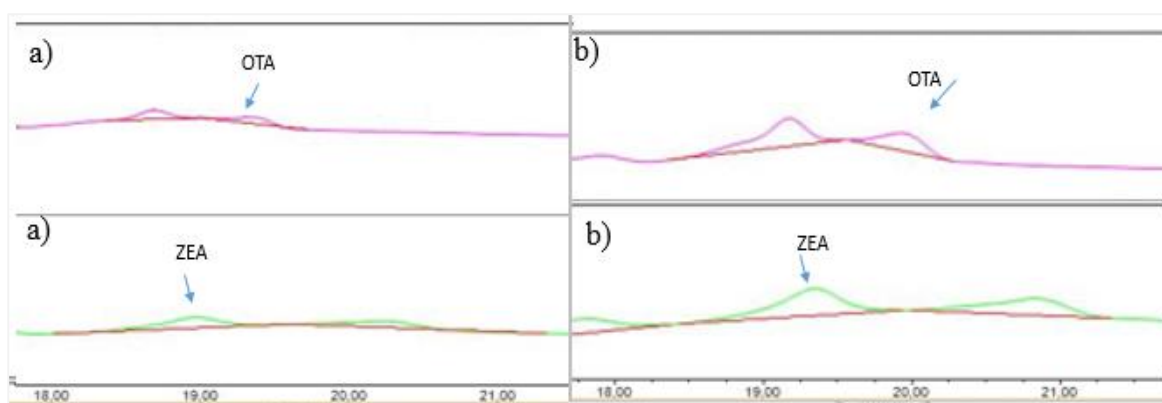


Figura 24 – Cromatograma na banda de eluição da ZEA e OTA

Legenda - Parâmetros instrumentais: a) acidificação - 0 %, temperatura da coluna - 50 °C e volume de injeção - 50 µL; b) acidificação - 0,85 %; temperatura da coluna - 35 °C e volume de injeção 80 µL.

Fonte: Morais (2019)

Após os cromatogramas obtidos com auxílio da função desejabilidade os parâmetros otimizados para o método cromatográfico foram estabelecidos em: acidificação a 0,85% da água da fase móvel e temperatura da coluna em 35 °C, conforme a desejabilidade aplicada à ZEA. No entanto, optou-se por manter o volume de injeção em 35 µL pois, na prática, observa-se uma redução considerável da resolução entre os picos de ZEA e OTA com o aumento do volume de amostra injetada no sistema. Suplementa-se que o fluxo já havia sido previamente determinado pelo planejamento fracionário e permaneceu fixado em 1,4 mL/min.

5.2 MÉTODO DE EXTRAÇÃO

Excelentes percentuais de recuperação (> 85%) de vários analitos de diferentes polaridades, inclusive micotoxinas, em diferentes tipos de matrizes alimentares foram obtidos com algumas modificações sobre o método QuERChERS original (DIONÍSIO et al., 2010).

O método QuERChERS modificado para este estudo não empregou hexano, pois o leite desnatado apresenta teor de gordura inferior a 0,05% (BRASIL, 2018), o solvente orgânico empregado para extração foi a acetonitrila acidificada a 1% (v/v) com ácido acético. A acidificação da solução extratora com ácido acético ajuda a preservar alguns analitos e melhora a solubilidade de outros. Um exemplo é a OTA, que possui caráter ácido ($pK_a = 4,4$) e está ionizada em meio alcalino, conseqüentemente, sua solubilidade em solventes fica reduzida. A redução do pH da solução extratora aumenta a capacidade dessa micotoxina de se solubilizar, pois passa a sua forma neutra, migrando com mais facilidade para o solvente extrator (ANDRADE; LANÇAS, 2015; DIONÍSIO et al., 2010; PRESTES; ADAIME; ZANELLA, 2011). Diversos autores empregaram solução extratora acidificada e obtiveram bons resultados de recuperação em análises multimicotoxinas (JIA et al., 2014; FLORES-FLORES; GONZÁLEZ-PEÑAS, 2017)

A proporção entre volume de amostra e solvente foi reduzida para 10:10 (v/v), seguindo um método de extração de multimicotoxinas publicado recentemente por Juan et al. (2017). Foi ampliado para 2 minutos o tempo de agitação em vortex, pois um estudo realizado por Pereira (2014) analisou o potencial de recuperação de micotoxinas em função da alteração das diversas variáveis que compreendem todo o método QuERChERS e os autores observaram um aumento de cerca de 30% na recuperação dos analitos ao aumentar o tempo de agitação durante a etapa de extração. Uma etapa de *clean-up* foi incorporada ao método, $MgSO_4$ e celite (0,30:0,20 g), a fim de resguardar o sistema cromatográfico e reduzir o efeito matriz. Essa abordagem foi aplicada com sucesso por Heidtmann-Bemvenuti et al. (2012) na limpeza de extrato de arroz para análise de ZEA.

Sartori et al. (2015) aplicaram o método QuERChERS para amostras de leite UAT e leite em pó na extração de AFs M_1 , M_2 , B_1 , B_2 , G_1 , e G_2 e OTA com percentuais de recuperação variáveis na faixa entre 72 a 102%. Esses autores, na parte de extração, empregaram 15 mL de

amostra de leite com 10 mL de hexano e 15 mL de acetonitrila acidificada a 1% com ácido acético.

5.3 VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO MULTIMICOTOXINAS PARA DETERMINAÇÃO EM LEITE DESNATADO UAT

O método multimicotoxinas desenvolvido para determinação das micotoxinas de interesse em leite desnatado UAT foi validado.

Uma amostra de leite desnatado UAT foi avaliada pelo procedimento de extração descrito no item 4.4, não houve detecção de contaminantes do tipo micotoxina na amostra de leite avaliada como branco (Figura 25).

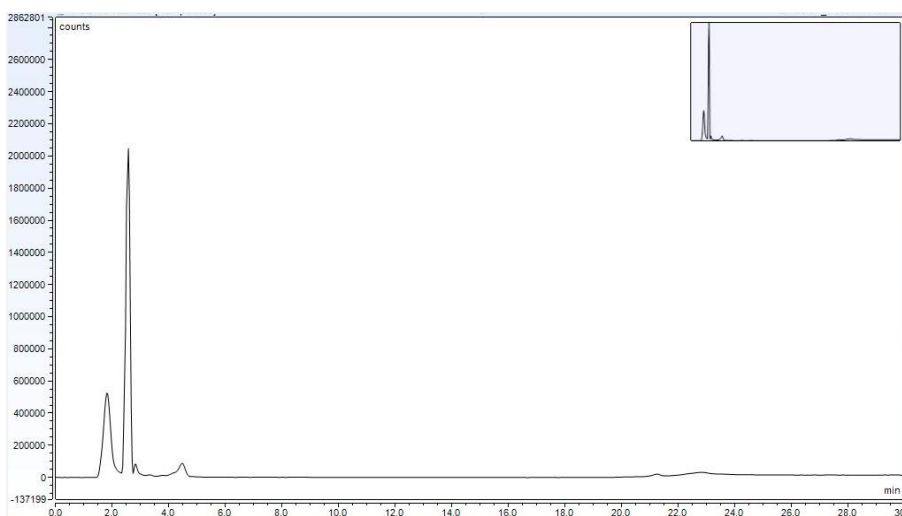


Figura 25 - Cromatograma do extrato “branco” de leite desnatado

Fonte: Morais (2019)

5.3.1 Linearidade

No método analítico, a linearidade corresponde à capacidade de gerar resultados diretamente proporcionais à concentração da substância presente na amostra, dentro de um intervalo específico de concentração (RIBANI et al., 2004).

O valor do coeficiente de determinação expressa de forma numérica a proporção da variação total do sinal analítico (y) em função da variabilidade que ocorre na concentração do analito (x). Essa proporção, como qualquer outra, oscila de 0 a 100% e o valor de r^2 , sendo a expressão numérica do mesmo, oscila de 0 a 1. Quanto mais próximos de um os valores de r^2 , melhor será a qualidade das curvas analíticas (RIBANI et al., 2004). Os coeficientes de regressão para a equação linear obtidos por regressão múltipla são mostrados na Tabela 25.

Tabela 25 - Coeficiente angular (a), coeficiente linear (b), coeficiente de determinação (r^2) e faixa linear de trabalho, obtidos pela análise cromatográfica das soluções de referência

MICOTOXINAS	Curva Analítica				DP
	a	b	r^2	r	
AFB₁	394078,8	-106,60	0,9999	0,9999	187,05
AFG₁	453891,70	3501,50	0,9992	0,9996	4475,70
AFG₂	22397584,00	-1327,00	0,9999	0,9999	2034,2
AFM₁	3014300,10	1657,00	0,9984	0,9992	8933,79
OTA	4172183,00	-3528,00	0,9971	0,9985	8738,10
ZEA	837798,10	4955,00	0,9998	0,9999	3443,30

Legenda: DP, desvio padrão; $p \leq 0,05$

Fonte: Morais (2019)

Observa-se a alta correlação linear de todas as curvas realizadas. O aumento dos valores das áreas dos picos (y) tende a ocorrer ao mesmo tempo que há o aumento dos valores da concentração (x) e vice-versa. O coeficiente de determinação (r^2) foi de 99% para todas as micotoxinas. Estes resultados mostram que o termo descrito está fortemente relacionado de forma positiva com a resposta, ou seja, quanto maior a área do pico maior concentração de micotoxina presente na solução. Estes parâmetros atendem aos dispostos pela ANVISA para os estudos sobre linearidade e respostas analíticas individuais (ANVISA, 2017).

5.3.2 Limite de detecção e quantificação

O limite de detecção e quantificação (LD) são apresentados na Tabela 26. Os valores foram obtidos por cálculos (Equação 6) conforme estabelecidos na RDC 116/2017 (BRASIL, 2017).

Tabela 26 – Limites de detecção e quantificação do método

Micotoxina	LQ $\mu\text{g.kg}^{-1}$	LD $\mu\text{g.kg}^{-1}$
AFM ₁	0,12	0,03
AFB ₁	0,16	0,049
AFG ₁	1,08	0,33
AFG ₂	0,01	0,003
OTA	0,33	0,09
ZEA	8,93	2,68

Fonte: Morais (2019)

Para as micotoxinas AFB₁, AFG₁ e AFG₂, OTA e ZEA não há de limite máximo de tolerância determinado pela legislação vigente no Brasil em leite e seus derivados. No entanto, observou-se que quando comparamos os resultados obtidos neste estudo com o limite tolerado para essas micotoxinas em outras matrizes, tais como AFB₁, AFG₁ e AFG₂ em fórmulas infantis para lactentes e crianças de primeira infância - máximo tolerado 1 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ e, OTA e ZEA em alimentos à base de cereais para alimentação infantil - máximo tolerado 2 e 20 $\mu\text{g.kg}^{-1}$, respectivamente, ambas estão dentro da faixa preconizada pela legislação (ANVISA, 2011).

O limite máximo tolerado para AFM₁ pela legislação brasileira é de 0,5 $\mu\text{g.kg}^{-1}$, neste trabalho o limite de quantificação foi de 0,12 $\mu\text{g.kg}^{-1}$, abaixo da tolerância observada pela RDC 07/2011 (ANVISA, 2011) e pode detectar dentro do limite máximo permitido pela União Européia 0,05 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ (CE, 2006).

Os valores obtidos neste estudo para LQ e LD são ligeiramente superiores aos obtidos por Sakin et al. (2018) para AFM₁ (0,07 e 0,03 $\mu\text{g.kg}^{-1}$) e AFG₂ (0,16 e 0,061 $\mu\text{g.kg}^{-1}$) e AFG₁ (0,14 e 0,053 $\mu\text{g.kg}^{-1}$) em derivados de leite por emprego de HPLC-FL; e inferiores aos obtidos por Arroyo-Manzanares et al. (2013) para AFB₁ (1,87 e 0,56 $\mu\text{g.kg}^{-1}$) OTA (1,95 e 0,59 $\mu\text{g.kg}^{-1}$), ZEA (98,7 e 29,6 $\mu\text{g.kg}^{-1}$) em amostras de chá por emprego de HPLC acoplado a espectrofotômetro de massa tandem.

5.3.3 Efeito matriz

Há diferenças químicas entre as micotoxinas o que gera, ocasionalmente, diferentes respostas individuais; por isso, a sensibilidade individual das micotoxinas de interesse é um fator importante que precisa ser determinado. O efeito matriz (Figura 26) corresponde a porcentagem de efeitos causados pelos componentes da matriz sobre a resposta analítica (BRASIL, 2017).

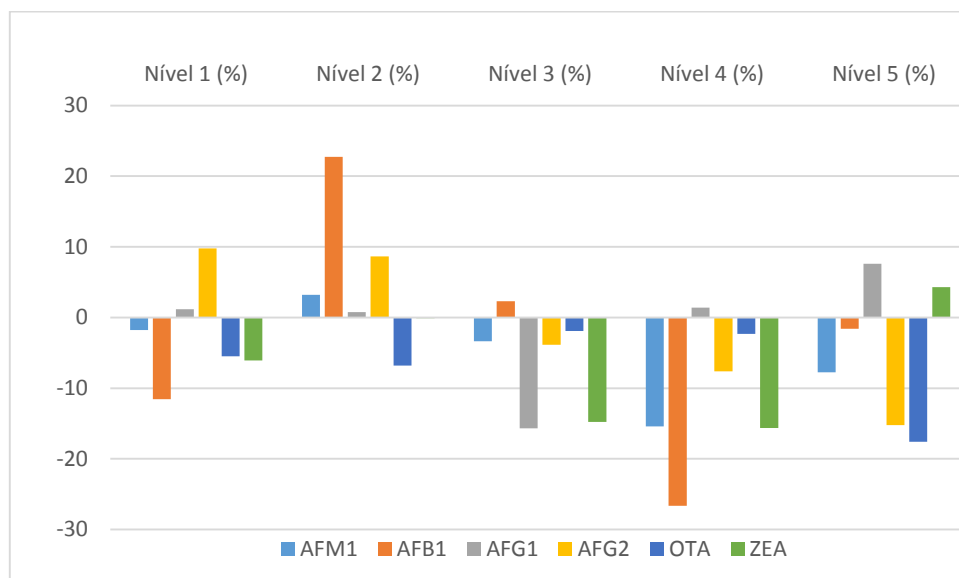


Figura 26 - Percentual do efeito matriz observado na faixa de concentração estudada para as curvas analíticas em cada nível de concentração.

Fonte: Moraes (2019)

De maneira geral, o efeito matriz foi baixo nas concentrações preparadas no extrato do leite, com exceção para as concentração do nível 2 e 4 de AFB₁. O efeito matriz está diretamente relacionado com a interação entre analito e os componentes da amostra, diminuindo ou aumentando a resposta instrumental (RIBANI et al., 2004). Scaglioni et al. (2014) analisaram a distribuição de AFB₁ sobre as frações soro e proteína do leite e verificaram que há maior adesão desses compostos na fração proteica, o que pode ter influenciado sobre a recuperação de AFB₁ nos níveis 2 e 4.

Considera-se que desvios entre -20% e + 20% não influenciam de maneira relevante os resultados obtidos sobre os demais parâmetros (SANCO, 2013). No decorrer do tempo, o efeito matriz pode sofrer variações, por isso, é recomendável que seja avaliado regularmente.

5.3.4 Ensaios de recuperação

A seguir, na Tabela 27, são apresentadas as recuperações médias de cada micotoxina extraídas pelo método modificado.

Tabela 27 -Percentuais médios de recuperação e os valores de RSD% obtidos através do estudo de recuperação em leite fluido UAT desnatado, nas três concentrações de fortificação estudadas.

Micotoxinas	Níveis de fortificação					
	Nível 1 (baixo)		Nível 2 (médio)		Nível 3 (alto)	
	Rec. (%)	RSD (%)	Rec. (%)	RSD (%)	Rec. (%)	RSD (%)
AFM₁	101,60	7,34	109,99	4,44	92,03	5,67
AFB₁	73,51	13,90	91,14	11,83	73,33	6,34
AFG₁	89,41	14,41	114,32	24,65	85,67	0,01
AFG₂	105,26	4,33	102,95	3,18	106,31	5,21
ZEA	99,80	14,05	92,61	12,91	111,93	4,85
OTA	106,43	3,94	72,64	4,33	108,71	6,44

Legenda: Rec., recuperação; RSD, desvio padrão relativo.

Fonte: Morais (2019)

A exatidão, expressa como percentual de recuperação, apresentou valores entre 73,33 e 114,32%. Para amostras com maior complexidade analítica, como é o caso do leite devido aos vários componentes presentes, aceita-se, geralmente, intervalos de recuperação entre 70 e 120%, com o qual os valores obtidos se encontram dentro da faixa adequada (RIBANI et al., 2004). Os dados de precisão mostram valores abaixo de 20% na maioria dos casos, com exceção da AFG₁ para a qual o valor obtido foi de 24%. Esses resultados indicam que o método é repetível, o percentual de RSD varia em função da micotoxina observada devido as características químicas intrínsecas de cada uma. A precisão de até 20 % é aceitável mas pode ser ampliada a depender do tipo de amostra analisada (BRASIL, 2017).

Rodríguez-Carrasco et al. (2018) ao desenvolver um método baseado em QuEChERS para extração simultânea de AFB₁ e AFM₁ em leite fluido, usando cromatografia líquida de alta

performance acoplada a espectrometria de massa de alta resolução, obteve recuperações no intervalo de 81 a 96% para AFB₁ e 75 a 91% para AFM₁. Um método de extração e identificação de multomicotoxinas para leite fluído, similar ao método QuEChERS, foi desenvolvido por Flores-Flores et al. (2017) para análise por cromatografia líquida acoplado espectrometria de massa. O método apresentou recuperação entre 85 e 87% para AFG₂, 85 e 90% para AFG₁ e 84 e 87% para OTA. Abdallah et al (2019) empregou colunas de imunoafinidade para multomicotoxinas para a extração e utilizou-se um sistema HPLC-FL com uma derivação fotoquímica pós-coluna em linha para a detecção das micotoxina: AFB₁, AFG₁, AFG₂, OTA e ZEA e obteve percentuais de recuperações de: 100, 84, 80, 100 e 85%, respectivamente.

Os percentuais de recuperação são intrínsecos de cada método e vão variar principalmente devido à complexidade de cada amostra, concentração dos analitos na amostra, interação entre grupos moleculares presentes na amostra e nos analitos de interesse e entre os analitos de interesse (RIBANI et al., 2004)

6 AVALIAÇÃO DE MICOTOXINAS EM LEITE UAT DESNATADO

Posterior a validação do método QuEChERS modificado foram analisadas amostras de leite UAT desnatado obtidas no comercio local da cidade de Medianeira, região Oeste do Estado do Paraná. Trinta amostras de quatro marcas distintas e de diferentes lotes foram analisadas (Tabela 28), para averiguar a possível presença e concentração das micotoxinas AFB₁, AFG₁, AFG₂, AFM₁, OTA e ZEA.

Tabela 28- Níveis de micotoxinas em amostras de leite UAT desnatado coletadas aleatoriamente em supermercados na cidade de Medianeira em 2019.

MTX	n (%)	µg.Kg ⁻¹	LQ (µg.Kg ⁻¹)	LD (µg.Kg ⁻¹)
AFB ₁	13 (43)	0,32-2,87	0,16	0,049
AFG ₁	16 (53)	1,18-4,25	1,08	0,33
AFG ₂	28 (93)	0,03-0,21	0,01	0,003
AFM ₁	6 (20)	0,16-0,18	0,12	0,03
OTA	-	<LQ	0,33	0,09
ZEA	-	<LQ	8,93	2,68

Legenda: MTX, micotoxinas; n = 30; LQ, limite de quantificação; LD, limite de detecção.

Fonte: Morais (2019)

A presença de AFB₁, AFG₁, AFG₂ e AFM₁ foi detectada nas amostras de leite UAT desnatado analisadas, em diferentes intervalos de concentração. No entanto, a legislação brasileira assim como a de outros países, citados no item 3.2.1, não possui limite máximo imposto para presença de AFB₁, AFG₁ e AFG₂ em leites e/ou derivados. A contaminação por AFM₁ foi inferior ao máximo permitido pela legislação brasileira (0,5 µg.kg⁻¹) em todos os lotes de avaliados (BRASIL, 2011b). Porém, se tomarmos como referência o limite estabelecido pela Comunidade Europeia (0,05 µg.kg⁻¹) essas amostras estariam acima do limite máximo tolerado (CE, 2006b). OTA e ZEA não foram detectadas em nenhuma das amostras analisadas dentro do limite estabelecido para o método.

Em Minas Gerais, um total de 129 amostras de leite cru provenientes de fazendas leiteiras foram avaliadas quanto a presença de AFM₁. Todas as amostras apresentaram contaminação em nível inferior ao estabelecido pela legislação brasileira (ANVISA, 2011). Por outro lado, 18 amostras (13,95%) apresentaram contaminação com AFM₁ acima de 0,05 µg.kg⁻¹, limite permitido pela Comissão Europeia (CE, 2006b)

Oitenta e oito marcas de leite em pó e UAT de supermercados do Rio de Janeiro foram analisadas quanto a contaminação por AFs. AFM₁ foi observada em 74% (53) das amostras de leite em pó (1,19 a 8 µg.kg⁻¹), sendo que, nesse produto o limite permitido pela legislação brasileira é de 2,5 µg.kg⁻¹ (ANVISA, 2011). Das amostras de leite UAT, 69 % (11) estavam contaminadas (0,005 a 0,042 µg.kg⁻¹); porém, em concentrações inferiores ao nível máximo permitido pela legislação brasileira. Além disso, neste trabalho, os autores relataram a presença da aflatoxina M₂ (AFM₂) em 24% (17) das amostras de leite em pó e em 18% (3) das amostras de leite UAT (SARTORI et al., 2015).

Entre 2011 e 2014, 360 amostras de leite cru e leite pasteurizado foram coletadas em diferentes regiões produtoras do Rio de Janeiro. A incidência de AFM₁ nas amostras foi de 25,45% (92) em concentrações que variaram de 0,010 a 1,50 µg.kg⁻¹. Entretanto, os autores não indicaram o percentual de amostras com concentração acima dos limites permitidos pela legislação brasileira (KELLER et al., 2016).

De oitenta e quatro amostras de leite cru e pasteurizado provenientes de sistemas orgânicos e convencionais que foram analisadas para AFM₁ em Londrina, estado do Paraná, Brasil, 75% (63) apresentaram AFM₁; no entanto, nenhuma estava acima dos limites tolerados pela legislação brasileira e não foram observadas diferença nos níveis de contaminação entre

os sistemas orgânicos e convencionais (ANVISA, 2011; SANTOS et al., 2016).

Entre 2014 e 2015, 52 amostras de leite cru foram analisadas da região de Concórdia, Santa Catarina. Todas apresentaram AFM₁, a concentração variou entre 0,09 e 3,38 $\mu\text{g.kg}^{-1}$; 40,4% (21) das amostras estavam acima do limite permitido pela legislação brasileira e 59,6% (31) acima do limite estabelecido pela Comunidade Européia (CE, 2006b; GONÇALVES et al., 2017).

Todas as demais micotoxinas contempladas neste estudo carecem de monitoramento em leites, isso porque, como já foi comentado anteriormente, não são ponderadas como contaminantes desses produtos. Contudo, alguns autores relataram a ocorrência de AFB₁, AFG₁, AFG₂ e OTA em leites e também seus derivados (GONÇALVES et al., 2018; HERZALLAH, 2009; MAO et al., 2018).

Um estudo publicado por Mao et al. (2018) realizado sobre amostras de leite cru de cinco diferentes regiões da China, detectou a presença de AFG₁ na concentração de 0,012 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ em uma das 250 amostras analisadas. Herzallah (2009) sobre leites comercializados em supermercados da Jordânia relatou a presença de AFG₁ (0,009 $\mu\text{g.kg}^{-1}$), AFG₂ (0,008 $\mu\text{g.kg}^{-1}$), além de AFB₁ (2,27 $\mu\text{g.kg}^{-1}$) e AFM₁ (0,14 $\mu\text{g.kg}^{-1}$).

Silva et al. (2015) analisaram 152 amostras de marcas comerciais de leite UAT disponível no comércio de Maringá, Paraná, no Sul do Brasil, verificaram que destas 87,5% (133) estavam contaminadas por AFM₁, com uma média de 0,019,6 $\mu\text{g.kg}^{-1}$, onde 2,6% (4) exibiam níveis acima do limite estabelecido pela Comunidade Européia (0,050 $\mu\text{g.kg}^{-1}$). Os autores também observaram que a concentração de AFM₁ variou entre as amostras coletadas nas diferentes estações do ano, indicando que há influência das condições climáticas sobre a produção de AFM₁. Seria interessante, desenvolver outros estudos de monitoramento do leite comercializado em diferentes épocas do ano, a fim de averiguar se existem períodos nos quais há maior risco de contaminação do leite por outras micotoxinas sazonais.

7 CONCLUSÃO

Neste trabalho, o método cromatográfico foi definido por estratégia sequencial de planejamento experimental. A fase móvel gradiente, ACN e água acidificada acidificadas a 0,85% com ácido acético (30:70) e ACN, MeOH e água acidificadas a 0,85% com ácido acético (40:10:40), foi definida por planejamento de mistura com restrições superior e inferior. Os parâmetros instrumentais do HPLC foram definidos por planejamento fatorial fracionário, DCCR e por função desejabilidade. O planejamento fatorial fracionário identificou o efeito significativo e os níveis a serem estudados no DCCR, os resultados iniciais permitiram fixar o fluxo da fase móvel em 1,4 mL/min. Na otimização do método cromatográfico a acidificação e a temperatura da coluna provocaram a redução linear significativa do tempo de retenção para a maioria das micotoxinas. Para a assimetria dos picos cromatográficos todos os valores obtidos durante o DCCR foram aceitáveis dentro do intervalo entre 1,0 e 1,5, considerados ideais para picos cromatográficos. A função desejabilidade, indicou as que a acidificação da fase móvel a 0,85% e temperatura da coluna a 35 °C alcançaram valores ótimos de resolução entre os picos de ZEA e OTA, fixado em 2,80. O volume de injeção indicado pela desejabilidade foi de 80 µL; no entanto, foi fixado em 35 µL, pois, na prática, observa-se o sobrecarregamento da coluna por aumento da presença de amostra.

O método desenvolvido baseado no método QuEChERS apresentou limite de quantificação de 0,16; 1,08; 0,01; 0,12; 0,33 e 8,93 µg.kg⁻¹ para AFB₁; AFG₁; AFG₂; AFM₁; OTA e ZEA, respectivamente. O LQ para a AFM₁ ficou dentro do estabelecidos pela legislação brasileira. Para as demais micotoxinas não há legislação vigente no Brasil e no mundo em leites ou derivados. No entanto, elas foram incluídas neste estudo devido a sua elevada toxicidade para humanos. Os valores de RSD% foram aceitáveis dentro da faixa ($\leq 20\%$) para leite, o que demonstra que o método analítico apresenta precisão adequada. As seis micotoxinas estudadas apresentaram coeficiente de determinação (r^2) acima de 0,99. Os valores referentes ao efeito matriz apresentaram boa aceitabilidade e ficaram, na maioria dos casos, na faixa entre -20% e +20%. A recuperação do método, para todas as micotoxinas, ficou dentro da faixa desejada e remendada pela ANVISA, 70-120%.

O método QuERChERS modificado validado e empregado neste estudo para determinação de multimicotoxinas mostrou ser uma alternativa viável na qual não há

necessidade de derivatização, além de ser um método barato é rápido, eficiente e sensível mesmo quando aplicado em uma matriz complexa, como é o caso do leite.

Trinta amostras de leite UAT desnatado foram avaliadas pelo método validado. A presença de AFB₁, AFG₁, AFG₂ e AFM₁ foi detectada em 43% (n = 13), 53 % (n = 16), 93 % (n = 28) e 20 % (n = 6) das amostras analisadas, respectivamente. A contaminação por AFM₁ foi inferior ao máximo permitido pela legislação brasileira (0,5 µg.kg⁻¹) em todos os lotes de avaliados. Para as outras micotoxinas países não há limite de tolerância máximo em leites e/ou derivados. OTA e ZEA não foram detectadas em nenhuma das amostras analisadas dentro do limite estabelecido pelo método.

8 REFERÊNCIAS

ABDALLAH; GIRGIN; BAYDAR. Mycotoxin Detection in Maize, Commercial Feed, and Raw Dairy Milk Samples from Assiut City, Egypt. **Veterinary Sciences**, v. 6, n. 2, p. 1-9, 2019. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2306-7381/6/2/57>>. Acesso em: 18 ago. 2018.

ABRAR, M.; ANJUM, F. M.; BUTT, M. S.; PASHA, I.; RANDHAWA, M. A.; SAEED, F.; WAQAS, K. Aflatoxins: Biosynthesis, Occurrence, Toxicity, and Remedies. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 53, n. 8, p. 862–874, 2013. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10408398.2011.563154>>. Acesso em: 14 jan. 2019.

ABRUNHOSA, L.; TAHEUR, F. Ben; FEDHILA, K.; KOUIDHI, B.; CHAIEB, K.; BAKHROUF, A. Adsorption of aflatoxin B1, zearalenone and ochratoxin A by microorganisms isolated from Kefir grains. **International Journal of Food Microbiology**, v. 251, p. 1–7, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.03.021>>. Acesso em: 18 ago. 2019.

AL-HADITHI, N.; KÖSSLER, P.; KARLOVSKY, P. Determination of ochratoxin A in wheat and maize by solid bar microextraction with liquid chromatography and fluorescence detection. **Toxins**, v. 7, n. 8, p. 3000–3011, 2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4549736/>>. Acesso em: 18 ago. 2019.

ALEXOPOULOS, C. J.; MIMS, C. W.; BLACKWELL, M. Evolution and kingdoms of organisms from the perspective of a mycologist. **Mycologia**, v. 84, n.1, p 1-11, 1992. Disponível em: <www.jstor.org/stable/3760397>. Acesso em: 21 jun. 2018.

ANASTASSIADES, M.; LEHOTAY, S.; STAJNBAHER, D.; SCHENCK, F. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid-phase extraction” for the determination of pesticide residues in produce. **Journal of AOAC**

International, v. 86, n. 2, p. 412–431, 2003. Disponível em < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12723926>>. Acesso em: 08 abr. 2019.

ANDERSSON, A. M.; KARLSSON, A.; JOSEFSON, M.; GOTTFRIES, J. Evaluation of Mobile Phase Additives in LC-Systems Using Chemometrics Experimental Introduction. **Chromatographia**, v. 38, n. 11/12, p. 715-722, 1994. Disponível em < <https://link.springer.com/article/10.1007/BF02269626> >. Acesso em: 14 jan. 2019.

ANDRADE, M. A.; LANÇAS, F. M. Estado-da-arte na análise cromatográfica de Ocratoxina A em amostras de alimentos. **Scientia Chromatographica**, v. 7, n. 1, p. 31-52, 2015. Disponível em < <https://bdpi.usp.br/single.php?id=002721394> >. Acesso em: 18 ago. 2019.

ANDRADE, P. D.; DA SILVA, J. L. G.; CALDAS, E. D. Simultaneous analysis of aflatoxins B1, B2, G1, G2, M1 and ochratoxin A in breast milk by high-performance liquid chromatography/fluorescence after liquid-liquid extraction with low temperature purification (LLE-LTP). **Journal of Chromatography A**, v. 1304, p. 61-68, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2013.06.049>>. Acesso em: 21 jun. 2018.

ANVISA. Estabelecer os limites máximos para aflatoxinas (AFB1+AFB2+AFG1+AFG2 e AFM1), ocratoxina A (OTA), desoxinivalenol (DON), fumonisinas (FB1 + FB2), patulina (PAT) e zearalenona (ZON) admissíveis em alimentos prontos para oferta ao consumidor e em matérias-p, v. 354, n. 7, 2011. Disponível em: <http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2011/res0007_18_02_2011_rep.html>. Acesso em: 18 ago. 2019.

AOAC. Association Of Official Analytical Chemists. Official Methods Of Analysis Of Aoac International. **Official Methods of Analysis of the AOAC International**, Gailhersburg, Gailhersburg, v. 18th ed, chapt 49, 2005.

ASHIQ, S.; HUSSAIN, M.; AHMAD, B. Natural occurrence of mycotoxins in medicinal plants: A review. **Fungal Genetics and Biology**, v. 66, p. 1–10, 2014. Disponível em:

<<https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-84898885937&partnerID=40&md5=58ca8ea9b4b706c80264ecd2533ffa01>> Acesso em: 08 abr. 2019.

ASSEM, E.; MOHAMAD, A.; OULA, E. A. A survey on the occurrence of aflatoxin M1 in raw and processed milk samples marketed in Lebanon. **Food Control**, v. 22, n. 12, p. 1856–1858, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.04.026>> Acesso em: 18 ago. 2019.

ASSUNÇÃO, R.; VASCO, E.; NUNES, B.; LOUREIRO, S.; MARTINS, C.; ALVITO, P. Single-compound and cumulative risk assessment of mycotoxins present in breakfast cereals consumed by children from Lisbon region, Portugal. **Food and Chemical Toxicology**, v. 86, n. 9, p. 274–281, 2015. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0278691515300867>>. Acesso em: 21 jun. 2018.

BATTILANI, P. Food mycology - a multifaceted approach to fungi and food. **World Mycotoxin Journal**, v. 1, n. 2, p. 223–224, 2008. Disponível em: <<http://www.wageningenacademic.com/doi/10.3920/WMJ2008.x017>> Acesso em: 18 ago. 2019.

BECKER-ALGERI, T. A.; CASTAGNARO, D.; BORTOLI, K. De; SOUZA, C. De; DRUNKLER, D. A.; BADIALE-FURLONG, E. Mycotoxins in Bovine Milk and Dairy Products : A Review. **journal of food science**, v. 81, n. 3, p. 544–552, 2016. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26799355> > Acesso em: 14 jan. 2019.

BENÍCIO DE BARROS, N.; IEDA SPACINO, S.; ROY EDWARD, B. **Como fazer experimentos**. Ed. Unicamp, 2001.

BHAT, R.; RAI, R. V; KARIM, A. A. Mycotoxins in Food and Feed : Present Status and Future Concerns. v. 9, p. 57–81, 2010.

BIANCO, G.; RUSSO, R.; MARZOCCO, S.; VELOTTO, S.; AUTORE, G.; SEVERINO, L. Modulation of macrophage activity by aflatoxins B1 and B2 and their metabolites aflatoxins M1 and M2. **Toxicon**, v. 59, n. 6, p. 644–650, 2012. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0041010112000499>>. Acesso em: 21 jun. 2018.

BILANDŽIĆ, N.; VARENINA, I.; SOLOMUN, B. Aflatoxin M1 in raw milk in Croatia. **Food Control**, v. 21, n. 9, p. 1279–1281, 2010. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/248511943_Aflatoxin_M_1_in_raw_milk_in_Croatia>. Acesso em: 18 ago. 2019.

BRASIL. **Resolução de Diretoria Colegiada nº.7, de 18 de fevereiro de 2011. Limites máximos tolerados para micotoxinas em alimentos.** BRASÍLIA. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2968262/RDC_07_2011_COMP.pdf/>. Acesso em: 08 abr. 2019.

BRASIL. **Ministério da Saúde - Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA- Dispõe sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos.:** RDC Nº 07, de 18 de fevereiro de 2011. BRASÍLIA. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2968262/RDC_07_2011_COMP.pdf/>. Acesso em: 18 ago. 2019.

BRASIL. **Ministério da Saúde - Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA -Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos.:** RDC Nº 166, de 24 de junho de 2017. BRASÍLIA. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2721567/RDC_166_2017_COMP.pdf/d5fb92b3-6c6b-4130-8670-4e3263763401>. Acesso em: 18 ago. 2019.

BRASIL. **Ministério da Agricultura. Instrução Normativa Nº 76, DE 26 de Novembro de 2018:** Diário Oficial da União. BRASÍLIA, DF, 30 nov. 2018. Disponível em:<http://www.in.gov.br/materia/-/asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/52750137/do1-2018-11-30-instrucao-normativa-n-76-de-26-de-novembro-de-2018-52749894IN%2076>

Acesso em: 14 jan. 2019.

BREITKREITZ, M. C.; JARDIM, I. C. S. F.; BRUNS, R. E. Combined column – mobile phase mixture statistical design optimization of high-performance liquid chromatographic analysis of multicomponent systems, **Journal of Chromatography A**, v. 1216, p. 1439–1449, 2009. Disponível em:<<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S002196730900017X>> Acesso em: 21 jun. 2018.

BRITZI, M.; FRIEDMAN, S.; MIRON, J.; SOLOMON, R.; CUNEAH, O.; SHIMSHONI, J. A.; SOBACK, S.; ASHKENAZI, R.; ARMER, S.; SHLOSBERG, A. Carry-over of aflatoxin B1 to aflatoxin M1 in high yielding Israeli cows in mid- and late-lactation. **Toxins**, v. 5, n. 1, p. 173–183, 2013. Disponível em:<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3564076/>> Acesso em: 08 abr. 2019.

CABRERA, L. C.; MARTINS, M. L.; PRIMEL, E. G.; PRESTES, O. D.; ADAIME, M. B.; ZANELLA, R. Extração em Fase Sólida Dispersiva na determinação de r - esíduos e contaminantes em alimentos Dispersive Solid Phase Extraction in the determination. **Scientia Chromatographica**, v. 4, n. 3, p. 227–240, 2012. Disponível em:<https://www.researchgate.net/publication/274692311_Extracao_em_Fase_Solida_Dispersiva_na_determinacao_de_residuos_e_contaminantes_em_alimentos> Acesso em: 18 ago. 2019.

CAMPAGNOLLO, F. B.; GANEV, K. C.; KHANEGHAH, A. M.; PORTELA, J. B.; CRUZ, A. G.; GRANATO, D.; CORASSIN, C. H.; OLIVEIRA, C. A. F.; SANT'ANA, A. S. The occurrence and effect of unit operations for dairy products processing on the fate of aflatoxin M1: A review. **Food Control**, v. 68, p. 310–329, 2016. a. Disponível em:<<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956713516301761>> Acesso em: 18 ago. 2019.

CAMPAGNOLLO, F. B.; GANEV, K. C.; KHANEGHAH, A. M.; PORTELA, J. B.; CRUZ, A. G.; GRANATO, D.; CORASSIN, C. H.; OLIVEIRA, C. A. F.; SANT'ANA, A. S. The occurrence and effect of unit operations for dairy products processing on the fate of aflatoxin

M1: A review. **Food Control**, v. 68, p. 310–329, 2016. b. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0956713516301761>>. Acesso em: 5 set. 2018.

CAPPOZZO, J.; JACKSON, L.; LEE, H. J.; ZHOU, W. E. I.; AL-TAHER, F.; ZWEIGENBAUM, J.; RYU, D. Occurrence of Ochratoxin A in Infant Foods in the United States. **Journal of Food Protection**, v. 80, n. 2, p. 251–256, 2017. Disponível em: <https://jfoodprotection.org/doi/10.4315/0362-028X.JFP-16-339>>. Acesso em: 5 set. 2018.

CASTILLO, J. M. S. Del. **Micotoxinas en alimentos**, Ed. Díaz de Santos. v. 14. Disponível em: <<https://www.editdiazdesantos.com/wwwdat/pdf/9788479788087.pdf>>. Acesso em: 5 set. 2018.

CE. Comisión de las Comunidades Europeas -Fija el Contenido Máximo de Determinados Contaminantes en los Productos Alimenticios: N. 1881/2006 de la Comisión de 19 de diciembre de 2006. BRUXELAS. Disponível em: <http://www.aecosan.msssi.gob.es/AECOSAN/web/seguridad_alimentaria/subdetalle/micotoxinas.htm>. Acesso em: 14 jan. 2019.

CHAVARRÍA, G.; MOLINA, A.; LEIVA, A.; MÉNDEZ, G.; WONG-GONZÁLEZ, E.; CORTÉS-MUÑOZ, M.; RODRÍGUEZ, C.; GRANADOS-CHINCHILLA, F. Distribution, stability, and protein interactions of Aflatoxin M1 in fresh cheese. **Food Control**, v. 73, p. 581–586, 2017. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956713516304972>>. Acesso em: 5 set. 2019.

COFFEY, R.; CUMMINS, E.; WARD, S. Exposure assessment of mycotoxins in dairy milk. **Food Control**, v. 20, n. 3, p. 239–249, 2009. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956713508001254>>. Acesso em: 508 abr. 2019.

CRUZ, A.; OLIVEIRA, C.; SÁ, P.; CORASSIN, C. H. **Química, bioquímica, análise**

sensorial e nutrição no processamento de leite e derivados. Rio de Janeiro: Ed. Elsevier 2016.

DÄNICKE, S.; BREZINA, U. Kinetics and metabolism of the Fusarium toxin deoxynivalenol in farm animals: Consequences for diagnosis of exposure and intoxication and carry over. **Food and Chemical Toxicology**, v. 60, p. 58–75, 2013. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23872131>>. Acesso em: 5 set. 2019.

DEEB, A. M.; AMAN, I. M.; EL-HAWARY, I. Determination of Aflatoxin M 1 and B1 in Egyptian Raw Milk , Soft Cheese and Table Eggs using ELISA. **International Journal of Innovative Reserarch in Science & Engineering**, v. 4, n. 11, p. 154–159, 2017. Disponível em: <<http://ijirse.in/docs/nov16/IJRSE161102.pdf>>. Acesso em: 5 set. 2019.

DIONÍSIO, A. G. G.; BASTITÃO, M. B.; SANTOS, V. B. Dos; ICERI, Taciane M.; CASSIANO, N. M.; CASS, Q. B. Novas Tendências em Preparo de Amostras para Cromatografia Líquida. **Scientia Chromatographica**, v. 2, n. 3, p. 19–29, 2010. Disponível em: <<http://scientiachromatographica.com/files/v2n3/v2n3a2.pdf>>. Acesso em: 5 set. 2019.

DOHNAL, V.; WU, Q.; KUČA, K. Metabolism of aflatoxins: Key enzymes and interindividual as well as interspecies differences, **Arch Toxicol**, v. 88, n9 p. 1635–1644, 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00204-014-1312-9>>. Acesso em: 14 jan. 2019.

DONKOR, O.; RAMCHANDRAN, L.; VASILJEVIC, T. Techniques for Detection, Quantification and Control of Mycotoxins in Dairy Products. **Microbial Toxins in Dairy Products**, p. 201–228, 2016. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9781118823095.ch8>>. Acesso em: 08 abr. 2019.

DZUMAN, Z.; ZACHARIASOVA, M.; LACINA, O.; VEPRIKOVA, Z.; SLAVIKOVA, P.; HAJSLLOVA, J. A rugged high-throughput analytical approach for the determination and quantification of multiple mycotoxins in complex feed matrices. **Talanta**, v. 121, p. 263–272, 2014.

Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2013.12.064>>. Acesso em: 18 ago. de 2018.

EMBRAPA. Novos produtos e novas estratégias da cadeia do leite para ganhar competitividade e conquistar os clientes finais. **Anuario Leite 2019**, n. 104, 2019. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/gado-de-leite/busca-de-publicacoes>>. Acesso em: 18 ago. de 2018.

FAO. **Worldwide regulations for mycotoxins in food and feed in 2003**. Disponível em: <<ftp://ftp.fao.org/>>. Acesso em: 18 ago. de 2018.

FDA. **Guidance for Industry: Action Levels for Poisonous or Deleterious Substances in Human Food and Animal Feed, Silver Spring: FDA U.S. Food and Drug Administration, 2011**. U.S. Disponível em: <<https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/guidance-industry-action-levels-poisonous-or-deleterious-substances-human-food-and-animal-feed#afla>>. Acesso em: 18 ago. de 2018.

FERREIRA, S. L. C.; WALTER, N. L.; QUINTELLA, C. M.; NETO, B.; BOSQUE-SENDRA, J. M. Doehlert matrix : a chemometric tool for analytical chemistry — review. **Talanta**, v. 63, n. 4, p. 1061–1067, 2004. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0039914004000384>>. Acesso em: 18 ago. de 2019.

FINK-GREMMELS, J. Mycotoxins in cattle feeds and carry-over to dairy milk: A review. **Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment**, v. 25, n. 2, p. 172–180, 2008. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/02652030701823142>>. Acesso em: 18 ago. de 2019.

FLORES-FLORES, M. E.; GONZÁLEZ-PEÑAS, E. Development and validation of a high performance liquid chromatographic – mass spectrometry method for the simultaneous quantification of 10 trichothecenes in ultra-high temperature processed cow milk. **Journal of Chromatography A**, v. 1419, p. 37–44, 2015. Disponível em: <

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021967315013898?via%3Dihub>>.

Acesso em: 08 abr. 2019.

FLORES-FLORES, M. E.; GONZÁLEZ-PEÑAS, E. An LC–MS/MS method for multi-mycotoxin quantification in cow milk. **Food Chemistry**, v. 218, p. 378–385, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.09.101>>. Acesso em: 14 jan. 2019.

FLORES-FLORES, M. E.; GONZÁLEZ-PEÑAS, E. Short communication: Analysis of mycotoxins in Spanish milk. **Journal of Dairy Science**, v. 101, n. 1, p. 113–117, 2018. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022030217309396>>. Acesso em: 18 ago. de 2019.

FLORES-FLORES, M. E.; LIZARRAGA, E.; LÓPEZ DE CERAIN, A.; GONZÁLEZ-PEÑAS, E. Presence of mycotoxins in animal milk: A review. **Food Control**, v. 53, p. 163–176, 2015. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956713515000353>>. Acesso em: 18 ago. de 2019.

FRENICH, A. G.; ROMERO-GONZÁLEZ, R.; GÓMEZ-PÉREZ, M. L.; VIDAL, J. L. M. Multi-mycotoxin analysis in eggs using a QuEChERS-based extraction procedure and ultra-high-pressure liquid chromatography coupled to triple quadrupole mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, n. 28, p. 4349–4356, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2011.05.005>>. Acesso em: 21 jun. 2018.

FURLANI, R. P. Z.; DIAS, F. F. G.; NOGUEIRA, P. M.; GOMES, F. M. L.; TFOUNI, S. A. V.; CAMARGO, M. C. R. Occurrence of macrocyclic lactones in milk and yogurt from Brazilian market. **Food Control**, v. 48, p. 43–47, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.04.004>>. Acesso em: 18 ago. de 2019.

GIOVATI, L.; MAGLIANI, W.; CIOCIOLA, T.; SANTINOLI, C.; CONTI, S.; POLONELLI, L. AFM1 in milk: Physical, biological, and prophylactic methods to mitigate contamination.

Toxins, v. 7, n. 10, p. 4330–4349, 2015. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4626737/>>. Acesso em: 08 abr. 2019.

GLAJCH, J. L.; KIRKLAND, J. J. Method development in high-performance liquid chromatography using retention mapping and experimental design techniques. **journal of chromatography**, v. 485, p. 51–63, 1989. Disponível em: < <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021967301891329>>. Acesso em: 18 ago. de 2019

GONÇALVES, K. D. M.; SIBAJA, K. V. M.; FELTRIN, A. C. P.; REMEDI, R. D.; DE OLIVEIRA GARCIA, S.; GARDA-BUFFON, J. Occurrence of aflatoxins B1 and M1 in milk powder and UHT consumed in the city of Assomada (Cape Verde Islands) and southern Brazil. **Food Control**, v. 93, p. 260–264, 2018. Disponível em: < <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956713518302998?via%3Dihub>>. Acesso em: 14 jan. 2019.

GONÇALVES, L.; DALLA ROSA, A.; GONZALES, S. L.; FELTES, M. M. C.; BADIÁLE-FURLONG, E.; DORS, G. C. Incidence of aflatoxin M1 in fresh milk from small farms. **Food Science and Technology**, v. 37, n. spe, p. 11–15, 2017. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-20612017000700011&lng=en&tlng=en>. Acesso em: 18 ago. de 2019

GONZÁLEZ-SÁLAMO, J.; SOCAS-RODRÍGUEZ, B.; HERNÁNDEZ-BORGES, J.; RODRÍGUEZ-DELGADO, M. Á. Core-shell poly(dopamine) magnetic nanoparticles for the extraction of estrogenic mycotoxins from milk and yogurt prior to LC–MS analysis. **Food Chemistry**, v. 215, p. 362–368, 2016. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27542487>>. Acesso em: 21 jun. 2018.

GRAZIELI, C. G. A. Da; BOTTOLI, C. B.; COLLINS, C. H. Cromatografia por interações hidrofílicas (hilic): estado da arte e aplicações. **Quim. Nova**, v. 39, n. 2, p. 210–220, 2016. Disponível em: < <http://www.scielo.br/pdf/qn/v39n2/0100-4042-qn-39-02-0210.pdf>>. Acesso

em: 18 ago. de 2019.

HEIDTMANN-BEMVENUTI, R.; HACKBART, H. C. dos S.; DE SOUZA, M. M.; ADIALE-FURLONG, E. Determinação de deoxinivalenol e zearalenona em arroz natural e parboilizado e suas frações utilizando QuEChERS e HPLC/UV-FL. **Quimica Nova**, v. 35, n. 6, p. 1242–1246, 2012. Disponível em: <http://quimicanova.sbq.org.br/imagebank/pdf/Vol35No6_1244_32-NT11844.pdf>. Acesso em: 18 ago. de 2019.

HERZALLAH, S. M. Determination of aflatoxins in eggs, milk, meat and meat products using HPLC fluorescent and UV detectors. **Food Chemistry**, v. 114, n. 3, p. 1141–1146, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.10.077>> Acesso em: 18 ago. de 2019.

HIBBERT, D. B. Experimental design in chromatography: A tutorial review. **Journal of Chromatography B**, v. 910, p. 2–13, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jchromb.2012.01.020>>. Acesso em: 18 ago. de 2019.

HILLMAN, E. T.; READNOUR, L. R.; SOLOMON, K. V. Exploiting the natural product potential of fungi with integrated -omics and synthetic biology approaches. **Current Opinion in Systems Biology**, v. 5, n. Figure 1, p. 50–56, 2017. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2452310017301531>> Acesso em: 21 jun. 2018.

HUANG, L. C.; ZHENG, N.; ZHENG, B. Q.; WEN, F.; CHENG, J. B.; HAN, R. W.; XU, X. M.; LI, S. L.; WANG, J. Q. Simultaneous determination of aflatoxin M1, ochratoxin A, zearalenone and a-zearalenol in milk by UHPLC–MS/MS. **Food Chemistry**, v. 146, p. 242–249, 2014. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24176338>>. Acesso em: 08 abr. 2019.

HUMPF, H.-U.; RYCHLIK, M.; CRAMER, B. Modified Mycotoxins: A New Challenge? **Encyclopedia of Food Chemistry**, p. 393-400, 2018. Disponível em: <

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780081005965218027?via%3Dihub>>.

Acesso em: 18 ago. de 2019.

HYMERY, N.; VASSEUR, V.; COTON, M.; MOUNIER, J.; JANY, J. L.; BARBIER, G.; COTON, E. Filamentous fungi and mycotoxins in Cheese: A review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 13, n. 4, p. 437–456, 2014. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/1541-4337.12069>>. Acesso em: 14 jan. 2019.

IAL. Métodos físicos-químicos para análises de alimentos. In: ZENEBO, O.; PASCUET, N. S.; TIGLEA, P. (Eds.). **Métodos físicos-químicos para análises de alimentos**. 4^o ed. São Paulo. p. 1020. Disponível em: <http://www.ial.sp.gov.br/resources/editorinplace/ial/2016_3_19/analisedealimentosial_2008.pdf>. Acesso em: 18 ago. de 2019.

IAMANAKA, B. T.; OLIVEIRA, I. S.; TANIWAKI, M. H. Micotoxinas Em Alimentos. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agrônômica**, v. 7, n. 0, p. 138–161, 2013. Disponível em: <<http://journals.ufrpe.br/index.php/apca/article/view/128>>. Acesso em: 18 ago. de 2019.

IBGE. Instituto brasileiro de geografia e estatística. **Pesquisa Trimestral do Leite**, Rio de Janeiro, p. 1, Rio de Janeiro, 2018. Disponível em: <<https://www.ibge.gov.br/estatisticas-novoportal/economicas/agricultura-e-pecuaria/9209-pesquisa-trimestral-do-leite.html?=&t=destaques>>. Acesso em: 21 jun. 2018.

IHA, M. H.; BARBOSA, C. B.; OKADA, I. A.; TRUCKSESS, M. W. Aflatoxin M1 in milk and distribution and stability of aflatoxin M1 during production and storage of yoghurt and cheese. **Food Control**, v. 29, n. 1, p. 1–6, 2013. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956713512002927>>. Acesso em: 18 ago. de 2019.

INMETRO: Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial

(INMETRO). **Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos**, DOQ-CGCRE-008, 7ª revisão, 2018. Disponível em: < <http://www4.inmetro.gov.br/>>. Acesso em: 08 abr. 2019.

ISMAIL, A.; GONÇALVES, B. L.; NEEFF, D. V. de.; PONZILACQUA, B.; COPPA, C. F. S. C.; HINTZSCHE, H.; SAJID, M.; CRUZ, A. G.; CORASSIN, C. H.; OLIVEIRA, C. A. F. Aflatoxin in foodstuffs: Occurrence and recent advances in decontamination. **Food Research International**, v. 113, p. 74–85, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.06.067>>. Acesso em: 18 ago. de 2019.

JENSEN, R. G. Bovine milk lipids : Handbook of milk composition. In: PRESS, A. (Ed.). **Handbook of Milk Composition**, v. 85, n. 2, p. 295-350. Disponível em: < <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022030202740794>>. Acesso em: 18 ago. de 2019.

JIA, W.; CHU, X.; LING, Y.; HUANG, J.; CHANG, J. Multi-mycotoxin analysis in dairy products by liquid chromatography coupled to quadrupole orbitrap mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1345, p. 107–114, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2014.04.021>>. Acesso em: 21 jun. 2018.

JUAN, C.; BERRADA, H.; MAÑES, J.; OUESLATI, S. Multi-mycotoxin determination in barley and derived products from Tunisia and estimation of their dietary intake. **Food and Chemical Toxicology**, v. 103, p. 148–156, 2017. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28249780>>. Acesso em: 18 ago. de 2019.

JUNG, C. F.; MATTE, A. A. J. Produção leiteira no Brasil e características da bovinocultura leiteira no Rio Grande do Sul. **Ágora**, v. 19, n. 1, p. 34-47, 2016. Disponível em: <<https://online.unisc.br/seer/index.php/agora/article/view/8446>>. Acesso em: 14 jan. 2019.

KABAK, B.; OZBEY, F. Assessment of the bioaccessibility of aflatoxins from various food matrices using an in vitro digestion model, and the efficacy of probiotic bacteria in reducing

bioaccessibility. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 27, n. 1, p. 21–31, 2012. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0889157512000774>>. Acesso em: 08 abr. 2019.

KARASEVA, N. M.; AMELIN, V. G.; TRET, A. V. QuEChERS coupled to dispersive liquid – liquid microextraction for the determination of aflatoxins B1 and M1 in dairy foods by HPLC. **Journal of Analytical Chemistry**, v. 69, n. 5, p. 510–515, 2014. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1134/S1061934814030071>>. Acesso em: 5 set. 2018.

KEESE, C.; MEYER, U.; VALENTA, H.; SCHOLLENBERGER, M.; STARKE, A.; WEBER, I. A.; REHAGE, J.; BREVES, G.; DÄNICKE, S. No carry over of unmetabolised deoxynivalenol in milk of dairy cows fed high concentrate proportions. **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 52, n. 12, p. 1514–1529, 2008. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18803258>>. Acesso em: 5 set. 2018.

KELLER, L. A. M.; ARONOVICH, M.; KELLER, K. M.; CASTAGNA, A. A.; CAVAGLIERI, L. R.; DA ROCHA ROSA, C. A. Incidence of Mycotoxins (AFB1 and AFM1) in Feeds and Dairy Farms from Rio de Janeiro State, Brazil. **Veterinary Medicine**, v. 1, n. 1, p. 29–35, 2016. Disponível em: <<http://openventio.org/Volume1-Issue1/Incidence-of-Mycotoxins-AFB1-and-AFM1-in-Feeds-and-Dairy-Farms-from-Rio-de-Janeiro-State-Brazil-VMOJ-1-106.pdf>>. Acesso em: 14 jan. 2019.

KENSLER, T. W.; ROEBUCK, B. D.; WOGAN, G. N.; GROOPMAN, J. D. Aflatoxin: A 50-year Odyssey of mechanistic and translational toxicology. **Toxicological Sciences**, v. 120, n.1, p. 28–48, 2011. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3043084/>>. Acesso em: 5 set. 2018.

KETNEY, O.; SANTINI, A.; OANCEA, S. Recent aflatoxin survey data in milk and milk products: A review. **International Journal of Dairy Technology**, v. 70, n. 3, p. 320–331, 2017. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/1471-0307.12382>>. Acesso em: 08 abr. 2019.

KIRKLAND, J. J.; GLAJCH, J. L. Optimization of mobile phases for multisolvent gradient elution liquid chromatography. **Journal of Chromatographic Science**, v. 255, p. 27–39, 1983. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021967301882716>>. Acesso em: 5 set. 2018.

KUMAR, P.; MAHATO, D. K.; KAMLE, M.; MOHANTA, T. K.; KANG, S. G. Aflatoxins: A global concern for food safety, human health and their management. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. 2170, p. 1–10, 2017. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5240007/>>. Acesso em: 21 jun. 2018.

LANÇAS, F. M. Como economizar (ou eliminar o uso de) acetonitrila em tempos de “ crise ”?. **Scientia Chromatographica**, v. 1, n. 1, p. 51-60, 2009. Disponível em: <<http://www.iicweb.org/scientiachromatographica.com/files/v1n1.pdf#page=51>>. Acesso em: 5 set. 2018.

LI, P.; ZHANG, Y.; LEI, H.; WANG, H.; XU, Z.; SHEN, Y.; SUN, Y.; PANG, J.; YANG, J. Development of chemiluminescent enzyme immunoassay for the determination of aflatoxin M 1 in milk products. **Food and Agricultural Immunology**, v. 26, n. 2, p. 157–169, 2014. Disponível em: <<http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84920623614&partnerID=tZOtx3y1>>. Acesso em: 5 set. 2018.

MALIR, F.; OSTRY, V.; PFOHL-LESZKOWICZ, A.; MALIR, J.; TOMAN, J. Ochratoxin A: 50 years of research. **Toxins**, v. 8, n. 7, p. 12–15, 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27384585>>. Acesso em: 14 jan. 2019.

MAO, J.; ZHENG, N.; WEN, F.; GUO, L.; FU, C.; OUYANG, H.; ZHONG, L.; WANH, J.; LEI, S. Multi-mycotoxins analysis in raw milk by ultra high performance liquid chromatography coupled to quadrupole orbitrap mass spectrometry. **Food Control**, v. 84, p. 305–311, 2018. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956713517304036>>. Acesso em: 5 set.

2019.

MARCHESE, S.; POLO, A.; ARIANO, A.; VELOTTO, S.; COSTANTINI, S.; SEVERINO, L. Aflatoxin B1 and M1: Biological Properties and Their Involvement in Cancer Development. **Toxins**, v. 10, n. 6, p. 214, 2018. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/2072-6651/10/6/214>> Acesso em: 08 abr. 2019.

MARTINS, C. R.; ARAÚJO, W.; BITTENCOURT, J. Solubilidade das substâncias orgânicas orgânicas. **Química Nova**, v. 36, n. 8, p. 1248–1255, 2013. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422013000800026> Acesso em: 5 set. 2019.

MASHAK, Z.; SOHI, H. J.; HESHMATI, A.; NEJAD, A. S. M. Assessment of AflatoxinM1 contamination in UHT flavored milk samples in Karaj, Iran. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research**, v. 15, n. 3, p. 407–411, 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27980575>> Acesso em: 5 set. 2019.

MERCOSUL/GMC. Regulamento técnico Mercosul sobre limites máximos de aflatoxinas admissíveis no leite, amendoim e milho. **Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento**, v. 56/94, n. 25/02, 2002. Disponível em: <http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2002/res0274_15_10_2002.html>. Acesso em: 14 jan. 2019.

MIYABE, K. Numerical correction for asymmetrical peak profiles for moment analysis of chromatographic behavior. **Journal of Chromatography A**, v. 1567, p. 1–9, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2018.06.067>>. Acesso em: 5 set. 2019.

MOGOLLÓN, N. G. S.; DE LIMA, P. F.; GAMA, M. R.; FURLAN, M. F.; BRAGA, S. C. G. N.; PRATA, P. S.; JARDIM, I. C. S. F.; AUGUSTO, F. O estado da arte da cromatografia líquida bidimensional: Conceitos fundamentais, instrumentação e aplicações. **Química Nova**, v. 37, n. 10, p. 1680–1691, 2014. Disponível em: <

http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422014001000018>.

Acesso em: 5 set. 2019.

MOHAMMADI, H.; MAZLOOMI, S. M.; ESKANDARI, M. H.; AMINLARI, M.; NIAKOUSARI, M. The Effect of Ozone on Aflatoxin M1, Oxidative Stability, Carotenoid Content and the Microbial Count of Milk. **Ozone: Science and Engineering**, v. 39, n. 6, p. 447–453, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/01919512.2017.1329647>> Acesso em: 08 abr. 2019.

MUHLEN, C. Von; LANÇAS, F. M. Cromatografia unificada. **Quimica Nova**, v. 27, n. 5, p. 747–753, 2004. Disponível em: <http://www.quimicanova.s bq.org.br/imagebank/pdf/Vol27No5_747_13-RV03078.pdf> Acesso em: 14 jan. 2019.

NADIRA, A. F.; ROSITA, J.; NORHAIZAN, M. E.; REDZWAN, S. M. Screening of aflatoxin M1 occurrence in selected milk and dairy products in Terengganu, Malaysia. **Food Control**, v. 73, p. 209–214, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.08.004>>. Acesso em: 5 set. 2019.

NETO, Á. J. dos S. Problemas com o formato dos picos em cromatografia líquida 1. **Scientia Chromatographica**, v. 1, n. 3, p. 69–77, 2009. a. Disponível em: <<http://www.scientiachromatographica.com/files/v1n3/v1n3a7.pdf>>. Acesso em: 5 set. 2019.

NETO, Á. J. dos S. Uma visão técnica para a compreensão e resolução de problemas em sistemas de cromatografia líquida. **Scientia Chromatographica**, v. 1, n. 2, p. 83–96, 2009. b. Disponível em: <<http://www.iicweb.org/scientiachromatographica.com/files/v1n3.pdf>>. Acesso em: 5 set. 2019.

NETO, Á. J. dos S. Problemas com o formato dos picos em cromatografia líquida 2. **Scientia Chromatographica**, v. 1, n. 3, p. 69–77, 2009. c. Disponível em: <<http://www.scientiachromatographica.com/files/v1n3/v1n3a7.pdf>>. Acesso em: 5 set. 2019.

NETO, Á. J. dos S. Problemas com o formato dos picos em cromatografia líquida - Parte 4. **Scientia Chromatographica**, v. 1, n. 3, p. 69–77, 2009. d. Disponível em: <<http://www.scientiachromatographica.com/files/v1n3/v1n3a7.pdf>>. Acesso em: 08 abr. 2019.

NHFPC. **National Health and Family Planning Commission (NHFPC, currently the National Health Commission) and the China Food and Drug Administration (CFDA, currently the State Administration of Market Regulation) released the National Food Safety Standard for Maxi**. Disponível em: <<https://www.fas.usda.gov/data/china-china-releases-national-food-safety-standard-food-processing-meal>>. Acesso em: 14 jan. 2019.

NOWAK, M.; SEUBERT, A. Application of experimental design for the characterisation of a novel elution system for high-capacity anion chromatography with suppressed conductivity detection. **Journal of Chromatography A**, v. 855, p. 91–109, 1999. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021967399006834>>. Acesso em: 5 set. 2019.

ORDÓÑEZ, J. A. Características gerais do leite e componentes fundamentais: **Tecnologia de Alimentos - Alimentos de Origem Animal**, 1. Porto Alegre: Ed. Artmed, 2005.

PATRIARCA, A.; PINTO, V. F. Prevalence of mycotoxins in foods and decontamination. **Current Opinion in Food Science**, v. 14, p. 50–60, 2017. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S2214799317300152>>. Acesso em: 21 jun. 2018.

PEREIRA, L. T. P. **Desoxinivalenol em farinha de trigo: otimização de método analítico, validação e ocorrência**. 2014. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, 2014. Disponível em: <<https://repositorio.unesp.br/handle/11449/116017>>. Acesso em: 5 set. 2019.

POLESE, L.; RIBEIRO, M. L. Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. **Pesticidas: R.Ecotoxicol. e Meio Ambiente**, v. 13, p. 129–146, 2003. Disponível em: <

<https://revistas.ufpr.br/index.php/pesticidas/article/viewFile/3173/2546>>. Acesso em: 08 abr. 2019.

PORWAL, P. K.; AKHALAQUE, A. A. R.; CHHAJED, S. S.; CHATPALLIWAR, V. A. Liquid Chromatographic Method for Simultaneous Quantitation of Clopidogrel, Aspirin and Atorvastatin in Rat Plasma and Its Application to the Pharmacokinetic Study. **Journal of Chromatographic Science**, v. 53, n. 7 p. 1155–1162, 2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25609600> >. Acesso em: 14 jan. 2019.

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, n. 1, p. 51–64, 2011. Disponível em: <<http://doi.editoracubo.com.br/10.4322/sc.2011.004>>. Acesso em: 5 set. 2019.

PUBCHEM DATABASE. **Estruturas químicas: AFB1, AFM1, AFG1, AFG2, OTA e ZEA**. 2019. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>>. Acesso em: 5 set. 2019.

RAHMANI, A.; JINAP, S.; SOLEIMANY, F. Validation of the procedure for the simultaneous determination of aflatoxins ochratoxin a and zearalenone in cereals using HPLC-FLD. **Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment**, v. 27, n. 12, p. 1683–1693, 2010. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20960359>>. Acesso em: 5 abr. 2019.

RAZA, N.; KIM, K. H. Quantification techniques for important environmental contaminants in milk and dairy products. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 98, p. 79–94, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.trac.2017.11.002>>. Acesso em: 08 abr. 2019.

REIS, C.; ANDRADE, J. C. De; BRUNS, R. E.; MORAN, R. C. C. P. Application of the split-plot experimental design for the optimization of a catalytic procedure for the determination of Cr (VI). **Analytica Chimica Acta**, v. 369, p. 269–279, 1998. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003267098002463>>. Acesso em: 5 mai.

2019.

REN, Z. H.; DENG, H. D.; DENG, Y. T.; DENG, J. L.; ZUO, Z. C.; YU, S. M.; SHEN, L. H.; CUI, H. M.; XU, Z. W.; HU, Y. C. Effect of the Fusarium toxins, zearalenone and deoxynivalenol, on the mouse brain. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 46, p. 62–70, 2016. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1382668916301661>>. Acesso em: 5 mai. 2019.

RIBANI, M.; GRESPAN BOTTOLI, C. B.; COLLINS, C. H.; FONTES JARDIM, I. C. S.; COSTA MELO, L. F. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Quimica Nova**, v. 27, n. 5, p. 771–780, 2004. Disponível em: <http://quimicanova.sbq.org.br/imagebank/pdf/Vol27No5_771_16-RV03165.pdf>. Acesso em: 5 jul. 2019.

RODRÍGUEZ-CARRASCO, Y.; IZZO, L.; GASPARI, A.; GRAZIANI, G.; MAÑES, J.; RITIENI, A. Simultaneous Determination of AFB1 and AFM1 in Milk Samples by Ultra High Performance Liquid Chromatography Coupled to Quadrupole Orbitrap. **Beverages**, v. 43, n. 4, p. 1–9, 2018. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2306-5710/4/2/43>>. Acesso em: 5 jan. 2018.

SAKIN, F.; TEKELI, I. O.; YIPEL, M.; CEMIL, K. Occurrence and health risk assessment of aflatoxins and ochratoxin A in Sürk, a 2 Turkish dairy food, as studied by HPLC. **Food Control**, v. 90, p. 317–323, 2018. Disponível em: <<https://scinapse.io/papers/2793513997>>. Acesso em: 5 ago. 2019.

SANCO. (Directorate-General for Health and Consumer Protection). **Guidance document on analytical quality control and validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed**, p. 46, 2013. Disponível em: <https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/plant/docs/pesticides_mrl_guidelines_wrkdoc_2017-11813.pdf>. Acesso em: 5 jan. 2019.

SANTOS, J. S. Dos; GRANELLA, V.; PIGATTO, G. M.; REINIGER, L. R. S.; COSTABEBER, I. H. Aflatoxin M1 in pasteurized and raw milk from organic and conventional systems. **Journal fur Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit**, v. 11, n. 4, p. 299–304, 2016. Disponível em: <<https://pubag.nal.usda.gov/catalog/5697328>>. Acesso em: 7 abr. 2019.

SARTORI, A. V.; SWENSSON DE MATTOS, J.; DE MORAES, M. H. P.; DA NÓBREGA, A. W. Determination of Aflatoxins M1, M2, B1, B2, G1, and G2 and Ochratoxin A in UHT and Powdered Milk by Modified QuEChERS Method and Ultra-High-Performance Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry. **Food Analytical Methods**, v. 8, n. 9, p. 2321–2330, 2015. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s12161-015-0128-4>> Acesso em: 10 abr. 2019.

SCAGLIONI, P. T.; BECKER-ALGERI, T.; DRUNKLER, D.; BADIALE-FURLONG, E. Aflatoxin B1 and M1 in milk. **Analytica Chimica Acta**, v. 829, p. 68–74, 2014. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003267014004905>>. Acesso em: 5 fev. 2017.

SHAHBAZI, Y.; NIKOUSEFAT, Z.; KARAMI, N. Occurrence, seasonal variation and risk assessment of exposure to aflatoxin M1 in Iranian traditional cheeses. **Food Control**, v. 79, p. 356–362, 2017. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956713517302049>>. Acesso em: 5 ago. 2017.

SILVA, M. V.; JANEIRO, V.; BANDO, E.; MACHINSKI, M. Occurrence and estimative of aflatoxin M1 intake in UHT cow milk in Paraná State, Brazil. **Food Control**, v. 53, p. 222–225, 2015. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956713515000468>>. Acesso em: 5 set. 2017.

SMITH, M. C.; MADEC, S.; COTON, E.; HYMERY, N. Natural Co-occurrence of mycotoxins in foods and feeds and their in vitro combined toxicological effects. **Toxins**, v. 8, n. 4, 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4848621/>>. Acesso em: 5 out. 2017.

STOEV, S. D. Foodborne mycotoxicoses, risk assessment and underestimated hazard of masked mycotoxins and joint mycotoxin effects or interaction. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 39, p. 794–809, 2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25734690>>. Acesso em: 5 out. 2018.

STREIT, E.; SCHATZMAYR, G.; TASSIS, P.; TZIKA, E.; MARIN, D.; TARANU, I.; TABUC, C.; NICOLAU, A.; APRODU, I.; PUEL, O.; OSWALD, I. P. Current situation of mycotoxin contamination and co-occurrence in animal feed focus on Europe. **Toxins**, v. 4, n. 10, p. 788–809, 2012. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23162698>>. Acesso em: 5 fev. 2019.

SUN, J.; LI, W.; ZHANG, Y.; HU, X.; WU, L.; WANG, B. QuEChERS purification combined with ultrahigh-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry for simultaneous quantification of 25 mycotoxins in cereals. **Toxins**, v. 8, n. 12, 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5198569/>>. Acesso em: 5 abr. 2019.

TADPETCH, K.; KAEWMEE, B.; CHANTAKAEW, K.; KANTEE, K.; RUKACHAISIRIKUL, V.; PHONGPAICHIT, S. Synthesis and cytotoxic activities of semisynthetic zearalenone analogues. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 26, n. 15, p. 3612–3616, 2016. Disponível em: <<http://europepmc.org/abstract/med/27311894>>. Acesso em: 5 mar. 2019.

TAKAHASHI, J. A.; LIMA, G. S.; LYRA, F. H.; SILVA-HUGHES, A. F.; GONÇALVES, A. G. Fungos Filamentosos e Química : Velhos Conhecidos , Novos Aliados. **Revista Virtual de Química**, v. 9, n. 6, 2017. Disponível em: <<http://rvq-sub.sbq.org.br/index.php/rvq/article/view/2171>>. Acesso em: 5 jan. 2019.

UKWURU, M.; OHAEGBU, C.; MURITALA, A. An Overview of Mycotoxin Contamination of Foods and Feeds. **Journal of Biochemical and Microbial**, v. 1, n. 1, p. 1–11, 2017. Disponível em: <<https://www.omicsonline.org/open-access/an-overview-of-mycotoxin-contamination-of-foods-and-feeds-95992.html>>. Acesso em: 5 dez. 2018.

VANBEL, P. F.; TILQUIN, B. L.; SCHOENMAKERS, P. J. Criteria for optimizing the separation of target analytes in complex chromatograms. **Chemometrics and intelligent laboratory systems**, v. 35, p. 67–86, 1996. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0169743996000469>>. Acesso em: 5 out. 2018.

VIDAL, A.; MARÍN, S.; RAMOS, A. J.; CANO-SANCHO, G.; SANCHIS, V. Determination of aflatoxins, deoxynivalenol, ochratoxin A and zearalenone in wheat and oat based bran supplements sold in the Spanish market. **Food And Chemical Toxicology**, v. 53, p. 133–138, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2012.11.020>>. Acesso em: 5 nov. 2018.

VILELA, D.; ALVES, E. A evolução do leite no Brasil em cinco décadas. **Política Agrícola**, n. 1, p. 5–24, 2015. Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/163208/1/Evolucao-do-leite-no-brasil.pdf>>. Acesso em: 5 set. 2018.

ZHANG, J.; ZHENG, N.; LIU, J.; LI, F. D. D.; LI, S. L. L.; WANG, J. Q. Q. Aflatoxin B1 and aflatoxin M1 induced cytotoxicity and DNA damage in differentiated and undifferentiated Caco-2 cells. **Food and Chemical Toxicology**, v. 83, p. 54–60, 2015. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0278691515001854>>. Acesso em: 6 out. 2018.

ZUZARTE, M. R.; MARTINS, A. P.; GONCALVES, M. J.; SALGUEIRO, L. R. Mycotoxins Contamination in Food: Alternative Plant Preservatives, Legislation, and Detection Methods. **Handbook of Chemical and Biological Plant Analytical Methods**, 2014. Disponível em: <<http://as.wiley.com/WileyCDA/WileyTitle/productCd-1111.html>> Acesso em: 6 dez. 2018.

