

## Área: Ciência de Alimentos

# DETERMINAÇÃO DE DESOXINIVALENOL EM FARINHA DE TRIGO: AVALIAÇÃO DA RECUPERAÇÃO E EFEITO MATRIZ DO MÉTODO (QuEChERS)

Maria Luciner Mosselin<sup>(1)</sup>, Denise Felippin de Lima Rocha<sup>(2)\*</sup>, Melissa dos Santos Oliveira<sup>(3)</sup>,  
Gislaine Hermanns<sup>(3)</sup>, Jamile Zeni<sup>(4)</sup>, Rogério Luis Cansian<sup>(4)</sup>

(1) Aluna de graduação em Tecnologia de Alimentos do Instituto Federal Farroupilha, Campus Santo Augusto, (2) Técnica de Laboratório do Instituto Federal Farroupilha Campus Santo Augusto, Rua Fábio João Andolhe nº 1100, Bairro Floresta, CEP 98590-000; Mestranda do Programa de Pós-Graduação de Engenharia de Alimentos URI Erechim, (3) Professor orientador do Instituto Federal Farroupilha, Campus Santo Augusto, (4) Professor orientador URI-Erechim. \* email: denise.rocha@iffarroupilha.edu.br

**RESUMO** - Este trabalho teve objetivo de avaliar a recuperação e o efeito da matriz do método utilizado na determinação de desoxinivalenol (DON) em farinha de trigo. Foram construídas curvas padrão da micotoxina diluída no solvente e no extrato da matriz, utilizando placas de CCDAE (cromatografia em camada delgada de alta eficiência). A construção da curva padrão envolveu a aplicação de diferentes concentrações da solução padrão de DON em placas cromatográficas, que foram eluídas, derivatizadas e visualizadas sob luz UV. Sob esta condição, as placas foram fotografadas e as imagens analisadas pelo programa ImageJ e os dados obtidos foram utilizados para estimar as equações da curva, com auxílio do Microsoft Excel. A faixa de linearidade das curvas foi de 100 a 400 ng. Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) da CCDAE foram 30 e 90 ng, respectivamente. A recuperação (exatidão) apresentou variação de 80 a 105% e o efeito matriz foi de supressão da resposta da CCDAE em 28%.

**Palavras-chave:** micotoxinas, DON, efeito matriz.

## 1 INTRODUÇÃO

O trigo produzido no Brasil, destinado à moagem industrial em 2014, foi de aproximadamente 11,8 milhões de toneladas (CONAB, 2014). O trigo (*Triticum aestivum*) é um dos cereais mais consumidos no mundo, é uma cultura de inverno, cultivado principalmente na região Sul do Brasil, tendo o estado do Rio Grande do Sul como o segundo maior produtor do País (CONAB, 2014).

As condições climáticas dos países tropicais com chuvas e temperaturas elevadas são favoráveis a proliferação de fungos responsáveis pela produção de micotoxinas nos produtos agrícolas, principalmente em grãos e seus derivados, originando contaminações nos alimentos provenientes destas regiões. A grande maioria destes alimentos é suscetível à contaminação por fungos, pois se constituem de substâncias orgânicas e, dentre

elas, inúmeros nutrientes que propiciam a proliferação de fungos filamentosos que durante seu metabolismo secundário produzem as micotoxinas.

A ocorrência de micotoxinas nos cereais é um problema difícil de evitar e que podem ser apenas parcialmente removidos por processamento industrial, e o monitoramento da cadeia de produção é essencial para avaliar os riscos aos quais os consumidores podem estar expostos (SKRBIC et al., 2012).

A preocupação com a saúde humana e animal com a ingestão de alimentos contaminados tornou-se um problema de nível mundial, caracterizando-se como um risco que afeta principalmente a segurança dos alimentos. A análise de micotoxinas é um desafio, uma vez que estão normalmente presentes em baixas concentrações em matrizes complexas, podendo ocorrer em várias combinações produzidas por um único ou por várias espécies de fungos (SKRBIC et al., 2012). Neste sentido, métodos de extração alternativos têm surgido recentemente, como o QuEChERS. Este método chama atenção por minimizar o uso de solventes, ter menor tempo de análise e alta recuperação, sendo aplicado na extração de micotoxinas em diversas matrizes (FRENICH et al., 2011, HACKBART et al., 2012, HEIDTMANN-BEMVENUTI et al., 2012, PAIGA et al., 2012).

A possibilidade de aplicar o método de extração QuEChERS, uma técnica simples, rápida, de baixo custo, e a análise por cromatografia de camada delgada de alta eficiência, técnica analítica confiável para a triagem e quantificação de micotoxinas em alimentos devido a sua alta seletividade e sensibilidade, poderá contribuir com a segurança alimentar, com a conservação do ambiente (HEIDTMANN-BEMVENUTTI et al., 2012) e possibilitar o monitoramento e levantamento de dados em laboratórios com infraestrutura básica.

As características inerentes de cada matriz utilizada para a extração QuEChERS pode contribuir positivamente ou negativamente para a recuperação da micotoxina a partir do meio, devido ao efeito de supressão de alguns compostos na fluorescência da substância a analisar (KUPSKI, BADIALE-FURLONG, 2015). A aplicação de um método analítico envolve um processo de avaliação que ateste a sua eficiência em usos de rotina, denominado validação. O efeito de matriz é um parâmetro de validação que tem por objetivo avaliar se os componentes da matriz interferem no sinal do analito. Para verificação do efeito de matriz, devem-se comparar os coeficientes angulares e lineares de curvas analíticas construídas a partir do solvente e do extrato branco da matriz original. A variação do coeficiente angular é responsável por introduzir nos resultados um erro sistemático proporcional, já a variação no coeficiente linear, um erro sistemático constante (KRUBE et al., 2009).

Considerando que a farinha de trigo apresenta diversas aplicações industriais e caseiras na produção de alimentos, tendo muita importância no aspecto nutricional da alimentação humana e também fonte de contaminação direta de micotoxinas, este trabalho tem como objetivo avaliar a recuperação e o efeito matriz na extração de desoxinivalenol (DON), em farinha de trigo, pelo método QuEChERS.

## **2 MATERIAL E METODOS**

### **Método QuEChERS para extração de DON**

A extração da micotoxina em farinha de trigo foi realizada de acordo com o procedimento de QuEChERS adaptado por Heidtmann-Bemvenuti et al. (2012) para determinação de desoxinivalenol. Foram pesados 10g de amostra e adicionou-se 20 mL de água e 20 mL de acetonitrila acidificada com ácido acético a 1%. A homogeneização foi realizada em agitador (5 min/800g) e banho ultrassônico (10 min), seguido de adição dos sais (1,5 g de sulfato de magnésio e 0,85 g de acetato de sódio), agitados por mais 5 min e centrifugado (10 min/1400g). Uma alíquota de 10 mL do sobrenadante foi separado e adicionados os sais de limpeza (0,3 g de sulfato de magnésio e 0,2 g de celite), seguido de agitação manual por 1 min e centrifugação (10 min/1400g). O sobrenadante foi seco sob fluxo de nitrogênio e ressuspenso em 300  $\mu$ L de benzeno e quantificado em cromatografia de camada delgada de alta eficiência.

### **Condições cromatográficas para a determinação de DON**

Para a determinação da presença e quantificação da micotoxina DON foram utilizadas placas de CCDAE (cromatografia de camada delgada de alta eficiência), de nano sílica gel de 0,2 mm (Alugran), sem prévia ativação. A solução padrão foi aplicada nas placas com microsseringas (Hamilton), em volumes variando entre 5 e 30  $\mu$ L, abrangendo a faixa de linearidade de visualização da fluorescência dos padrões sob luz UV. As micotoxinas foram eluídas com uma mistura dos solventes tolueno, acetato de etila e ácido fórmico na proporção de 60:40:10 (v/v/v). Após a eluição, as placas foram derivatizadas em solução etanólica (85%) de cloreto de alumínio 15%, e secas a 130 °C por 10 min. As manchas fluorescentes da micotoxina foram visualizadas sob luz UV (364 nm).

### **Validação do método**

Os parâmetros de desempenho avaliados seguiram o recomendado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA (BRASIL, 2003a) e Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial - INMETRO (BRASIL, 2003b), sendo eles: curva analítica, linearidade, limite de detecção, limite de quantificação e exatidão (recuperação).

### **Curva analítica e linearidade**

A linearidade do método foi avaliada pela construção da curva analítica que envolveu a aplicação de sete pontos com diferentes concentrações da solução padrão de DON, com solvente (benzeno: acetonitrila 98:2) em placas cromatográficas de alta eficiência, que foram eluídas, derivatizadas e visualizadas sob luz UV. Sob esta condição, as placas foram fotografadas (Cannon – Power Shot SX520 HS), sendo as imagens analisadas pelo programa ImageJ e os dados obtidos calculados com auxílio do Microsoft Excel para obtenção da curva padrão e o coeficiente de determinação ( $R^2$ ).

### **Limite de Detecção e Quantificação**

O limite de detecção (LD) foi considerado como sendo a menor concentração da micotoxina que o método distingue, com segurança. Este valor foi determinado aplicando-se nas placas solução padrão que foi sendo diluída até a detecção do ponto de menor fluorescência.

A massa da micotoxina detectável foi estimada a partir deste volume de padrão aplicado na placa e o limite de quantificação (LQ) definido como três vezes superior à massa do limite de detecção (LD).

### Recuperação

A recuperação foi calculada pela relação entre a quantidade de toxina determinada e a adicionada no início do procedimento analítico executado de forma completa. As amostras foram contaminadas com três níveis de contaminação e as médias das recuperações do método para a matriz farinha de trigo foram calculadas a partir de cinco repetições de cada nível de fortificação.

### Efeito matriz

O efeito matriz foi realizado a partir da aplicação, na placa cromatográfica, da micotoxina DON diluída com o extrato da amostra, nas mesmas concentrações utilizadas para a construção da curva analítica. A razão entre a declividade (coeficiente angular) da equação da reta obtida neste experimento, e a declividade (coeficiente angular) da equação da reta da curva analítica com solvente, indica o efeito matriz.

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados apresentados na Tabela 1 mostraram que o procedimento de extração, pelo método QuEChERS, e quantificação, por CCDAE, foram adequados para a determinação da micotoxina desoxinivalenol (DON), uma vez que seus indicadores cumprem as recomendações quanto aos critérios de confiabilidade, pois o INMETRO (BRASIL, 2003b) recomenda um valor acima de 0,90 para o coeficiente de determinação da curva padrão.

Tabela 1: Parâmetros analíticos avaliados em CCDAE.

Parâmetros	Solvente	Matriz
Curva analítica	$Y = 93,71 X + 10177$	$Y = 67,504 X + 27878$
Linearidade (ng)	100 – 400	100- 400
Limite de detecção - LD (ng)	30	30
Limite de Quantificação - LQ (ng)	100	100
Coefficiente de determinação ( $R^2$ )	0,9612	0,9757
Coefficiente de correlação (R)	0,9797	0,9848

Solvente = benzeno: acetonitrila (98:2); Matriz = extrato da amostra obtido pelo método QuEChERS.

O efeito matriz é o efeito observado pelo aumento ou decréscimo do sinal cromatográfico da micotoxina presente no extrato da matriz farinha de trigo, quando comparado com o sinal da micotoxina em solvente orgânico. Esse efeito é dependente do método aplicado na análise, das características físicas e químicas do analito, do tipo e quantidade de matriz presente no extrato e do método de extração aplicado a amostra. Em baixas concentrações (ppm e ppb) o efeito matriz pode tornar-se significativamente relevante, pois ocorre um

decréscimo da ionização da concentração do analito em relação a concentração desse na matriz (PIZZUTTI, 2006).

Neste estudo, verificou-se que a micotoxina DON sofre o efeito da matriz farinha de trigo, de forma inibitória, reduzindo o sinal cromatográfico. Os resultados obtidos demonstram que o efeito matriz situou-se em - 28% indicando um efeito negativo. A matriz farinha de trigo exerce um efeito de supressão do sinal cromatográfico da micotoxina (DON), diminuindo a intensidade do sinal através da interferência dos componentes provenientes da matriz farinha de trigo.

A eficiência do método foi avaliada pelo estudo de recuperação feito em amostras de farinha de trigo livres naturalmente da desoxinivalenol. As amostras foram contaminadas artificialmente com três níveis de concentrações DON, 12,5, 22,0 e 33,0 µg em 10 g de amostra. A matriz artificialmente contaminada foi mantida em exaustor por 24 horas, para evaporar o solvente da solução padrão, e posteriormente procedeu-se a extração por QuEChERS e quantificação em CCDAE, conforme metodologia descrita. A recuperação foi calculada pela relação entre a quantidade de toxina quantificada e a adicionada no início do procedimento analítico executado de forma completa.

Na Tabela 2 encontram-se os resultados dos testes de recuperação do método de extração QuEChERS, calculadas a partir de três níveis de contaminação e cinco repetições de cada nível de fortificação.

De acordo com a recomendação do regulamento (CE) nº 401/2006 da União Europeia a faixa de recuperação deve estar entre 60 a 120% para a maioria das concentrações e segundo o INMETRO (BRASIL, 2003b) a faixa situa-se entre 80- 120%.

Tabela 2: Resultados dos testes de recuperação.

Nível de contaminação (µg/Kg)	Média do nível de contaminação encontrado (µg/Kg)	Recuperação (%)	Coefficiente de variação (%)
12,5	10,02	80,2	10,4
22,0	23,2	105,4	8,55
33,0	28,6	86,7	18,5

\* média de cinco repetições

## 4 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos permitiram concluir que o método usado neste estudo constituiu uma alternativa para a análise de desoxinivalenol (DON), pois além de ter boa sensibilidade e rapidez, tem aplicabilidade em matrizes de farinha de trigo.

## 5 AGRADECIMENTOS

INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA FARROUPILHA – CAMPUS SANTO AUGUSTO, URI Erechim, FURG, CAPES, FAPERGS e CNPq.

## 6 REFERENCIAS

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**, 86 (2003), p. 412–431.

BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA); **Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos**, RE nº 889, 29/5/2003a.

BRASIL, Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO); **Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos**, DOQ-CGCRE-008. Revisão: 01, 2003b.

CONAB. Acompanhamento da Safra Brasileira de Grãos, v.2 safra 2014/2015, n.3 terceiro levantamento, Brasília, p. 1-100, dez. 2014. Disponível em [http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/1412085133\\_boletim\\_grãos\\_dezembro\\_2014](http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/1412085133_boletim_grãos_dezembro_2014). Pdf. Acesso 05/12/2014.

FRENICH, A.G; ROMERO-GONZÁLES, 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**, 1218 (2011), p. 4349–4356.

HACKBART, H.C.S.; SOUZA, M. M.; SCAGLIONI, P.T.; PRIMEL, E. G.; GARDA-BUFFON, J.; BADIALE-FURLONG, E. The QuEChERS method for determination of ochratoxin and citrinin in rice and rice bran. **Química Nova**, 35 (2012), p. 1733–1737.

HEIDTMANN-BEMVENUTI, R.; HACKBART, H.C.S.; SOUZA, M. M.; BADIALE-FURLONG, E.; DORS, G.C.; FAGUNDES.C.A. Determination of deoxynivalenol and zearalenone in natural and parboiled rice and their fractions using QuEChERS and CLAE/UV-FL. **Química Nova**, 35 (2012), p. 1244–1249.

KRUBE, A.; LEITO, I.; HERODES, K. Combating matrix effects in LC/ESI/MS: The extrapolative dilution approach. **Analytica Chimica Acta**, Volume 651, 2009, p. 75-80.

KUPSKI, L.; BADIALE-FURLONG, E. Principal components analysis: An innovative approach to establish interferences in ochratoxin A detection. **Food Chemistry**, Volume 177, 2015, p. 354-360.

PAÍGA, P.; MORAIS, S. OLIVA-TELES, T. CORREIA, M. DELERUE-MATOS,C.; DUARTE, S.C.; PENA, A.; LINO, C. M. Extraction of ochratoxin A in bread samples by the QuEChERS methodology. **Food Chemistry**, 135 (2012), p. 2522–2528.

PIZZUTTI, I. R. **Validação de métodos de extração e desenvolvimento de um GPC limpar método de análise multi-resíduo de pesticidas na cultura da soja por GC-MS, GC-MS / MS e LC-MS / MS**. Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Brasil, 2006. Tese.

SKRBIC, B.; ZIVANCEV, J.; DURISIC-MLADENOVIC, N.; GODULA, M. Principal mycotoxins in wheat flour from the Serbian market: Levels and assessment of the exposure by wheat-based products. **Food Control**. V.25, p. 389-396. 2012.

UNIÃO EUROPÉIA. Regulamento (CE) nº 401/2006 da Comissão de 23 de fevereiro de 2006. Estabelece os métodos de amostragem e de análise para o controle oficial dos teores de micotoxinas nos gêneros alimentícios. **Jornal Oficial da União Europeia**, L 70 de 23 de fevereiro de 2006, p.31.