

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS**

**Validação de um método para a determinação de micotoxinas em cevada
maltada e cerveja usando QuEChERS-LC-QToF-MS e calibração por
superposição de matriz**

Laura Oliveira Lago

**Porto Alegre
2021**

Laura Oliveira Lago

Validação de um método para a determinação de micotoxinas em cevada maltada e cerveja usando QuEChERS-LC-QToF-MS e calibração por superposição de matriz

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos como um dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientadora: Prof.^a Dra. Juliane Elisa Welke

Co-Orientador: Prof. Dr. Eliseu Rodrigues

PORTO ALEGRE

2021

CIP - Catalogação na Publicação

Lago, Laura Oliveira

Validação de um método para a determinação de micotoxinas em cevada maltada e cerveja usando QuEChERS-LC-QToF-MS e calibração por superposição de matriz / Laura Oliveira Lago. -- 2021.

92 f.

Orientadora: Juliane Elisa Welke.

Coorientador: Eliseu Rodrigues.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Porto Alegre, BR-RS, 2021.

1. micotoxinas. 2. malte. 3. cerveja. 4. LC-MS. 5. método multi-micotoxina. I. Welke, Juliane Elisa, orient. II. Rodrigues, Eliseu, coorient. III. Título.

Validação de um método para a determinação de micotoxinas em cevada maltada e cerveja usando QuEChERS-LC-QToF-MS e calibração por superposição de matriz

Laura Oliveira Lago

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos como um dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Aprovada em: ___/___/___

Pela Banca Examinadora:

Prof^a Dra. Juliane Elisa Welke
Orientadora – PPGCTA/UFRGS

Prof. Dr. Eliseu Rodrigues
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos (PPGCTA/UFRGS)

Prof. Dr. Eliseu Rodrigues
Coorientador – PPGCTA/UFRGS

Prof^a Dra. Paula Rossini Augusti
Banca - PPGCTA/UFRGS

Prof^a Dra. Liliana de Oliveira Rocha
Banca – PPGCA/UNICAMP

Prof^a Dra. Jaqueline Garda Buffon
Banca – PPGECA/FURG

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos (PPGCTA) e ao ICTA, seus professores, técnicos e funcionários.

Agradeço à minha orientadora, Prof^ª. Dr^ª. Juliane Elisa Welke, e ao meu co-orientador Prof. Dr. Eliseu Rodrigues, pela orientação, disponibilidade, incentivo, paciência e confiança dispensados a mim e a este trabalho.

A todos os colegas do Laboratório de Toxicologia de Alimentos pelo acolhimento e pela convivência, momentos de descontração e risos no laboratório e pelo apoio durante a realização do trabalho. Agradecimento especial à Tássia pela ajuda e por tornar a rotina no laboratório mais leve.

Aos meus pais Larry e Elaine e minha irmã Bruna, pelo amor, carinho, incentivo e apoio incondicional.

Aos meus amigos pela força e apoio para concluir esta etapa.

A CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela bolsa de mestrado e ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pelo auxílio financeiro.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização desse trabalho.

RESUMO

Micotoxinas são compostos tóxicos produzidos por fungos filamentosos. Os cereais são as culturas mais sensíveis à contaminação fúngica e, conseqüentemente, à presença de micotoxinas. As micotoxinas podem ser transferidas da cevada maltada contaminada para a cerveja. Na literatura, métodos para a análise de malte ou cerveja têm sido otimizados apenas para grupos de micotoxinas estruturalmente relacionadas, como tricotecenos (desoxinivalenol, toxinas T-2 e HT-2) e aflatoxinas (B1, B2, G1 e G2), ou apenas para toxinas de *Fusarium*. O objetivo deste estudo foi desenvolver e validar um método para a quantificação simultânea de dezessete micotoxinas legisladas [aflatoxinas (B1, B2, G1 e G2), ocratoxina A (OTA), desoxinivalenol (DON), toxina T-2, toxina HT-2, fumonisina B1 (FB1) e zearalenona (ZEA)] e emergentes [beauvericina (BEA), eniatinas (A, A1, B e B1), moniliformina (MON) e esterigmatocistina (STG)] em cevada maltada e cerveja. A abordagem QuEChERS (acrônimo derivado do inglês: *Quick* (rápido), *Easy* (fácil), *Cheap* (barato), *Effective* (efetivo), *Rugged* (robusto) e *Safe* (seguro)) foi usada na etapa de preparação das amostras, seguida pela cromatografia líquida acoplada a um espectrômetro de massas com analisador quadrupolo-tempo de voo (LC-QToF-MS). A calibração por superposição de matriz (MMC) foi empregada para superar o efeito de matriz. O desempenho geral do método foi satisfatório para quantificar todos os compostos em ambas as matrizes. O uso de curvas MMC foi crucial para evitar a quantificação incorreta dos analitos que mostraram um forte efeito de matriz: BEA (SSE: 105% para malte e cerveja) e ZEA (SSE: 165% e 120% para malte e cerveja, respectivamente) exibiram intensificação do sinal e DON (SSE de 32% e 15% para malte e cerveja, respectivamente) e MON (SSE de 29% e 15% para malte e cerveja, respectivamente) exibiram supressão do sinal. As curvas analíticas obtidas com MMC apresentaram linearidade e precisão aceitáveis, com coeficientes de determinação (R^2) superiores a 0,99 para malte e cerveja e recuperações variando de 72 a 102% para malte e de 73 a 100% para cerveja. Os valores de limite de detecção (LOD) (0,01-15 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para malte e cerveja) e limite de quantificação (LOQ) (0,05-50 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para malte e cerveja) mostraram que o método é suficientemente sensível para determinar as 17 micotoxinas. Além disso, a precisão

e a sensibilidade estavam de acordo com as diferentes diretrizes de validação de método. Outra vantagem foi o rendimento aprimorado, exigindo 1,2 min de análise para cada analito. O método multi-micotoxinas QuEChERS-LC-QToF-MS com o uso de calibração por superposição de matriz permite avaliar micotoxinas legisladas para verificar a adequação aos parâmetros regulatórios e gerar dados para apoiar o estabelecimento de limites máximos para uma gama maior de compostos a fim de proteger a saúde da população.

Palavras-chave: Micotoxinas. Malte. Cerveja. LC-MS.

ABSTRACT

Mycotoxins are toxic compounds produced by filamentous fungi. Cereals are the most sensitive crops to fungal contamination and, consequently, to the presence of the mycotoxins. Mycotoxins can be transferred from contaminated malted barley to beer. In the literature, methods for malt or beer analysis have been optimized only for groups of structurally related mycotoxins, such as trichothecenes (deoxynivalenol, T-2 and HT-2 toxins) and aflatoxins (B1, B2, G1 and G2), or just for *Fusarium* toxins. The objective of this study was to develop and validate a method for the simultaneous quantification of seventeen legislated [aflatoxins (B1, B2, G1 and G2), ochratoxin A (OTA), deoxynivalenol (DON), T-2 toxin, HT-2 toxin, fumonisin B1 (FB1) and zearalenone (ZEA)] and emerging mycotoxins [beauvericin (BEA), enniatins (A, A1, B and B1), moniliformin (MON) and sterigmatocystin (STG)] in malted barley and beer. The QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe) approach was used in the sample preparation step, which was followed by liquid chromatography coupled to quadrupole time-of-flight mass spectrometry (LC-QToF-MS). Matrix-matched calibration (MMC) was employed to overcome the matrix effect. The overall method performance was satisfactory to evaluate all the compounds in both matrices. The use of MMC curves was crucial to avoid the incorrect quantification of the analytes that showed a strong matrix effect: BEA (SSE: 105% for malt and beer) and ZEA (SSE: 165% and 120% for malt and beer, respectively) showed signal enhancement and DON (SSE of 32% and 15% for malt and beer, respectively) and MON (SSE: 29% and 15% for malt and beer, respectively) showed signal suppression. Analytical curves obtained with MMC showed adequate linearity and precision, with coefficients of determination (R^2) higher than 0.99 for malt and beer and recoveries ranging from 72 to 102% for malt and from 73 to 100% for beer. The values of limit detection (LOD) ($0.01\text{-}15\ \mu\text{g kg}^{-1}$ for malt and beer) and limit quantification (LOQ) ($0.05\text{-}50\ \mu\text{g kg}^{-1}$ for malt and beer) showed that the method is sufficiently sensitive to determine the 17 mycotoxins. In addition, precision and sensitivity were in accordance with the different guidelines of method validation. Another advantage was the improved yield, requiring 1.2 min of analysis for each analyte. The QuEChERS-LC-QToF-MS multi-mycotoxin method using matrix-

matched calibration allows the evaluation of legislated mycotoxins to verify compliance with regulatory parameters and generates data to support the establishment of limits for a wider range of compounds in order to protect the health of the population.

Keywords: Mycotoxins. Malt. Beer. LC-MS

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Número de cervejarias registradas por ano no Brasil	17
Figura 2	Visão geral dos critérios usados para avaliar o método proposto em relação às micotoxinas legisladas e emergentes, considerando dados da literatura, legislações diferentes e guias para validação do método	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Massa molecular (g mol^{-1}), coeficiente de partição (Log P), fórmula molecular e estrutura química das micotoxinas	19
Tabela 2	Amostras de cerveja artesanal analisadas pelo método QuEChERS-LC-QToF-MS quanto à ocorrência de 17 micotoxinas legisladas (AFB1, AFB2, AFG1, AFG2, OTA, DON, ZEA, FB1, T-2 e HT-2) e micotoxinas emergentes (BEA, MON, STG, ENA, ENB, ENA1 e ENB1).	38
Tabela 3	Fórmula molecular, Log P, tempo de retenção, razão massa/carga (m/z) dos íons precursores e produtos das micotoxinas analisadas por LC-QToF-MS	41
Tabela 4	Desempenho do método baseado na calibração por superposição de matriz (MMC) e cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas com analisador quadrupolo-tempo de voo (LC-QToF-MS) usado para determinar dezessete micotoxinas (legisladas e emergentes) em malte e cerveja.	43
Tabela 5	Legislação estabelecida para micotoxinas em produtos de cereais para consumo humano pela Comissão Europeia, Brasil e FDA, em que malte e/ou cerveja podem ser enquadrados e os limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) obtidos no método LC-QToF-MS proposto.	48
Tabela 6	Visão geral dos métodos da literatura usados para análise de micotoxinas em malte e cerveja, a fim de comparar com o método QuEChERS-LC-QToF-MS proposto (destacado em fonte azul) validado para 17 micotoxinas usando calibração por superposição de matriz (MMC) e com tempo de análise instrumental de 20 min (média de 1,2 min para cada micotoxina).	51
Tabela 7	Comparação dos resultados do método QuEChERS-LC-QToF-MS com os critérios de desempenho para métodos de micotoxinas definidos pelo Regulamento da Comissão da União Europeia (EU) No 519/2014.	62
Tabela 8	Critérios de validação para métodos analíticos focados em contaminantes de alimentos (incluindo, mas não limitado a micotoxinas) estabelecidos pela Administração de Alimentos e Medicamentos (FDA) dos Estados Unidos para comparar com os dados obtidos para as micotoxinas emergentes no método QuEChERS-LC-QToF-MS	63
Tabela 9	Recuperação e repetibilidade aceitáveis dependendo da concentração do analito estabelecida pela Associação de Químicos Analíticos Oficiais (AOAC) e seguida pelo Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO) do Brasil para comparar com os dados obtidos no método QuEChERS-LC-QToF-MS para as micotoxinas emergentes	64

LISTA DE SIGLAS

ABRACERVA	Associação Brasileira de Cerveja Artesanal
AFM1	aflatoxina M1 (do inglês: <i>aflatoxin M1</i>)
AFs	aflatoxinas (do inglês: <i>aflatoxins</i>)
AOAC	Associação de Químicos Analíticos Oficiais (do inglês: <i>Association of Official Analytical Chemists</i>)
ASE	extração acelerada de solvente (do inglês: <i>accelerated solvent extraction</i>)
ATA	aleucia tóxica alimentar (do inglês: <i>alimentary toxic aleukia</i>)
BEA	beauvericina (do inglês: <i>beauvericin</i>)
CYP	citocromo P450 (do inglês: <i>cytochrome P450</i>)
DAD	detector de arranjo de diodos (do inglês: <i>diode array detector</i>)
DOM-1	deepoxi-desoxinivalenol (do inglês: <i>deepoxy- deoxynivalenol</i>)
DON	desoxinivalenol (do inglês: <i>deoxynivalenol</i>)
d-SPE	extração em fase sólida dispersiva (do inglês: <i>dispersive-solid phase extraction</i>)
ENs	eniatinas (do inglês: <i>enniatins</i>)
FB1	fumonisina B1 (do inglês: <i>fumonisin B1</i>)
FDA	Administração de Alimentos e Medicamentos (do inglês: <i>Food and Drug Administration</i>)
FLD	detector de fluorescência (do inglês: <i>fluorescence detector</i>)
FMs	fumonisininas (do inglês: <i>fumonisinins</i>)
HPLC	cromatografia líquida de alta performance (do inglês: <i>high performance liquid chromatography</i>)
HT-2	toxina HT-2 (do inglês: <i>HT-2 toxin</i>)
IAC	colunas de imunoafinidade (do inglês: <i>immune-affinity columns</i>)
IARC	Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (do inglês: <i>International Agency for Research on Cancer</i>)
ICH	Conferência Internacional de Harmonização (do inglês: <i>International Conference on Harmonization</i>)
ILIS	padrões internos marcados com isótopos (do inglês: <i>isotope labelled internal standards</i>)
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
IPA	India Pale Ale
ISO	Organização Internacional para Padronização (do inglês: <i>International Organization for Standardization</i>)
LC	cromatografia líquida (do inglês: <i>liquid chromatography</i>)
LC-HRMS	cromatografia líquida acoplada a um espectrômetro de massa de alta resolução (do inglês: <i>liquid chromatography-high-resolution mass spectrometry</i>)
LC-ITMS	cromatografia líquida acoplada a detecção por espectrometria de massa de armadilha de íons (do inglês: <i>liquid chromatography coupled to ion trap mass spectrometry detection</i>)
LC-MS	cromatografia líquida com detecção de espectrometria de massa (do inglês: <i>liquid chromatography with mass spectrometry detection</i>)

LC-MS/MS	cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas sequencial (do inglês: <i>liquid chromatography tandem mass spectrometry</i>)
LC-QToF-MS	cromatografia líquida acoplada a um espectrômetro de massas com analisador quadrupolo-tempo de voo (do inglês: <i>liquid chromatography coupled to quadrupole time-of-flight mass spectrometry</i>)
LC-QTrapMS	cromatografia líquida acoplada a detecção por espectrometria de massa de captura de íons linear/tríplo quadrupolo (do inglês: <i>liquid chromatography coupled to triple quadrupole/linear ion trap mass spectrometry detection</i>)
LC-tandem quadrupolo MS	cromatografia líquida acoplada a espectrômetro de massa quadrupolo tandem (do inglês: <i>liquid chromatography coupled with tandem quadrupole mass spectrometer</i>)
LLE	extração líquido-líquido (do inglês: <i>liquid-liquid extraction</i>)
LOD	limite de detecção (do inglês: <i>limit of detection</i>)
LOQ	limite de quantificação (do inglês: <i>limit of quantification</i>)
MAE	extração assistida por micro-ondas (do inglês: <i>microwave-assisted extraction</i>)
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MAPKs	proteínas quinases ativadas por mitógenos (do inglês: <i>mitogen-activated protein kinases</i>)
MMC	calibração por superposição de matriz (do inglês: <i>matrix-matched calibration</i>)
MON	moniliformina (do inglês: <i>moniliformin</i>)
MRM	monitoramento de reação múltipla (do inglês: <i>multiple reaction-monitoring</i>)
MS	espectrometria de massas (do inglês: <i>mass spectrometry</i>)
MS/MS	espectrometria de massas sequencial (do inglês: <i>tandem mass spectrometry</i>)
OAT	transporte de ânions orgânicos (do inglês: <i>organic anion transport</i>)
OTA	ocratoxina A (do inglês: <i>ochratoxin A</i>)
PSA	amina secundária primária (do inglês: <i>primary secondary amine</i>)
PTFE	politetrafluoroetileno (do inglês: <i>polytetrafluoroethylene</i>)
Q-ToF	quadrupolo-tempo de voo (do inglês: <i>quadrupole-time-of-flight</i>)
QuEChERS	Rápido, Fácil, Barato, Eficaz, Robusto e Seguro (do inglês: <i>Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe</i>)
RSD	desvio padrão relativo (do inglês: <i>relative standard deviation</i>)
SANTE	Direção Geral de Saúde e Segurança Alimentar da Comissão Europeia (do inglês: <i>European Commission's Directorate-General for Health and Food Safety</i>)
SFE	extração com fluido supercrítico (do inglês: <i>supercritical fluid extraction</i>)
SLE	extração sólido-líquido (do inglês: <i>solid-liquid extraction</i>)
SPE	extração em fase sólida (do inglês: <i>solid phase extraction</i>)
SSE	supressão/intensificação do sinal (do inglês: <i>signal suppression/enhancement</i>)
STG	esterigmatocistina (do inglês: <i>sterigmatocystin</i>)
T-2	toxina T-2 (do inglês: <i>T-2 toxin</i>)
ToF	tempo de voo (do inglês: <i>time-of-flight</i>)
UV	ultravioleta (do inglês: <i>ultraviolet</i>)
ZEA	zearalenona (do inglês: <i>zearalenone</i>)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1 Cerveja	16
2.2 Micotoxinas	18
2.2.1 Aflatoxinas (AFs)	21
2.2.2 Beauvericina (BEA)	21
2.2.3 Eniáticas (ENs)	22
2.2.4 Esterigmatocistina (STG)	22
2.2.5 Fumonisina B1 (FB1)	23
2.2.6 Moniliformina (MON)	23
2.2.7 Ocratoxina A (OTA)	24
2.2.8 Tricotecenos	24
2.2.9 Zearalenona (ZEA)	25
2.3 Determinação de micotoxinas em alimentos	26
2.3.1 Preparação da amostra: extração e limpeza	26
2.3.2 Métodos instrumentais	28
2.3.3 Métodos multi-micotoxinas	29
2.3.4 Validação de método	32
3 MATERIAIS E MÉTODOS	37
3.1 Reagentes e produtos químicos	37
3.2 Amostras	37
3.3 Extração das micotoxinas do malte e cerveja	38
3.4 Determinação das micotoxinas usando LC-QToF-MS	39
3.5 Avaliação do efeito de matriz	40
3.6 Validação do método	40
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
4.1 Desempenho do método QuEChERS-LC-QToF-MS	41

4.2 Aplicação do método validado QuEChERS-LC-QToF-MS para análise de cerveja	66
5 CONCLUSÃO	68
6 PERSPECTIVAS	68
REFERÊNCIAS	69
APÊNDICE A – ESPECTROS DE MASSA MOSTRANDO PADRÃO DE FRAGMENTAÇÃO DAS DEZESSETE MICOTOXINAS ANALISADAS COM LC-QToF-MS	81

1 INTRODUÇÃO

As micotoxinas são os contaminantes mais comuns em plantações agrícolas. Esses compostos tóxicos são metabólitos secundários produzidos por fungos filamentosos, principalmente dos gêneros *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium*, que colonizam plantas hospedeiras no campo durante o armazenamento, transporte e/ou processamento (ALSHANNAQ, YU, 2017; AGRIOPOULOU, STAMATELOPOULOU, VARZAKAS, 2020). Os cereais, utilizados para a produção de vários tipos de alimentos e bebidas, são as culturas mais sensíveis à contaminação por fungos toxigênicos e, conseqüentemente, à presença de micotoxinas (MORETTI; LOGRIECO; SUSCA, 2017; KHANEGHAAHA *et al.*, 2019). Entre mais de 300 compostos identificados, as mais encontradas e legisladas em cereais são: aflatoxinas (AFs), fumonisinas (FMs), desoxinivalenol (DON), ocratoxina A (OTA), zearalenona (ZEA), toxina T-2 e toxina HT-2 (WEIDENBÖRNER, 2017). Além das micotoxinas legisladas, existem as micotoxinas chamadas “emergentes”. Esses compostos não são avaliados rotineiramente e não possuem limites máximos estabelecidos em alimentos. Entretanto, quando pesquisadas são detectadas em elevada frequência e concentração em cereais, com destaque para beauvericina (BEA), eniatinas (ENs), moniliformina (MON) e esterigmatocistina (STG) (WEIDENBÖRNER, 2017; FILIPPO, ANTONIO, TERENCEIO, 2020).

Alimentos contaminados com micotoxinas representam uma ameaça à saúde humana e animal. Os principais efeitos tóxicos associados à exposição a esses compostos são hepatotoxicidade, nefrotoxicidade, distúrbios gastrointestinais, problemas reprodutivos, imunossupressão e carcinogenicidade (AGRIOPOULOU; STAMATELOPOULOU; VARZAKAS, 2020). A Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC, do inglês: *International Agency for Research on Cancer*) classifica as substâncias tóxicas em quatro grupos, de acordo com a carcinogenicidade para humanos: no grupo 1 estão os compostos carcinogênicos para humanos, aplicado quando há evidência suficiente de carcinogenicidade em humanos; o grupo 2A inclui substâncias provavelmente carcinogênicas para humanos, aplicado quando há evidência limitada de carcinogenicidade em humanos, mas evidência suficiente de carcinogenicidade em animais de laboratório; no grupo

2B estão compostos possivelmente carcinogênicos para humanos, aplicado quando há evidência suficiente de carcinogenicidade em animais de laboratório, e há forte evidência de que o mecanismo de carcinogenicidade envolvido não opera em humanos; no grupo 3 estão as substâncias não classificáveis quanto à sua carcinogenicidade para humanos, aplicado quando o composto tem potencial carcinogênico desconhecido e os dados disponíveis são limitados. A IARC classifica as aflatoxinas B1, G1, B2 e G2 no grupo 1, a fumonisina B1 (FB1), OTA e STG no grupo 2B e a DON, ZEA e a toxina T-2 no grupo 3 (IARC, 2019, 2020).

Devido ao potencial tóxico, limites máximos são estabelecidos para esses compostos para proteger os consumidores. A legislação europeia estabelece o limite para a soma de aflatoxinas (B1, B2, G1 e G2: $4 \mu\text{g kg}^{-1}$) e OTA ($3 \mu\text{g kg}^{-1}$) em cereais e produtos derivados, nos quais tanto o malte (de qualquer cereal) quanto a cerveja podem ser enquadrados (EUROPEAN COMMISSION, 2006). Em relação à HT-2 e T-2, a soma dessas toxinas deve ser igual ou inferior a $200 \mu\text{g kg}^{-1}$ na cevada para malte (EUROPEAN COMMISSION, 2013). DON e ZEA são legislados em alimentos processados à base de cereais (200 e $20 \mu\text{g kg}^{-1}$, respectivamente) (EUROPEAN COMMISSION, 2006), incluindo qualquer cereal maltado usado na fabricação de cerveja. As fumonisinas (soma de FB1 e FB2, $200 \mu\text{g kg}^{-1}$) são legisladas para alimentos à base de milho (EUROPEAN COMMISSION, 2007), abrangendo milho maltado que também pode ser usado na produção de cerveja. No Brasil, os regulamentos são aplicados a cereais e produtos derivados para a soma de AFs (B1, B2, G1, G2), OTA, ZEA e DON é 5, 10, 100 e $750 \mu\text{g kg}^{-1}$, respectivamente (BRASIL, 2011, 2017). Esses limites incluem malte e cerveja, pois são produtos de cereais. As fumonisinas (soma de FB1 e FB2, $1000 \mu\text{g kg}^{-1}$) são legisladas para alimentos à base de milho (BRASIL, 2017).

A cevada (*Hordeum vulgare*) é uma das culturas mais antigas cultivadas no mundo, sendo o quarto cereal mais cultivado, depois do trigo, milho e arroz (VERSTEGEN *et al.*, 2014; TRICASE *et al.*, 2018). A maior parte da colheita é usada para alimentação animal, mas a cevada de melhor qualidade é destinada para a produção de malte. O malte é uma fonte de proteínas, fibras, vitaminas do complexo

B e minerais, sendo bastante utilizado nas indústrias de panificação e confeitaria (BAIK; ULLRICH, 2008). No entanto, a produção de cerveja continua sendo a principal aplicação do malte (TRICASE *et al.*, 2018; ROSENTRATER; EVERS, 2018).

As micotoxinas podem ser transferidas da cevada maltada contaminada para a cerveja. A co-ocorrência de micotoxinas é muito comum em cereais e produtos derivados, uma vez que um único alimento pode ser contaminado por muitos fungos simultaneamente e a maioria dos fungos é capaz de produzir vários metabólitos secundários ao mesmo tempo. Essas toxinas fúngicas diferem em sua estrutura química, polaridade e solubilidade e são comumente encontradas em concentrações muito baixas em alimentos (MALACHOVÁ *et al.*, 2018). Portanto, a validação de um método analítico eficiente, preciso, rápido, sensível e confiável para a detecção simultânea de um grande número de micotoxinas (análise de múltiplas micotoxinas) é importante para o monitoramento de cereais e produtos derivados, como malte de cevada e cerveja (PERNICA *et al.*, 2019; ALI *et al.*, 2020).

A composição química dos alimentos e bebidas, como malte e cerveja, é altamente complexa, com presença de água, proteínas, carboidratos, gorduras e pigmentos, entre outros. Essas substâncias podem coeluir com os analitos, o que pode causar efeito de matriz significativo na etapa de detecção, levando à supressão ou intensificação do sinal analítico. Esse é o principal problema enfrentado no desenvolvimento de métodos multi-micotoxinas, pois pode causar subestimação ou superestimação da concentração dos compostos avaliados nas amostras. A calibração por superposição de matriz (MMC, do inglês: *matrix-matched calibration*) ou o uso de padrão interno são geralmente empregados para corrigir o efeito de matriz e, assim, realizar a quantificação correta (FABREGAT-CABELLO *et al.*, 2015; ALSHANNAQ, YU, 2017; PERNICA *et al.*, 2019). A preparação da amostra também é uma etapa importante para minimizar os efeitos de matriz, uma vez que reduz a quantidade de substâncias que podem interferir na detecção. O método de preparação de amostras denominado QuEChERS (acrônimo derivado do inglês: *Quick* (rápido), *Easy* (fácil), *Cheap* (barato), *Effective* (efetivo), *Rugged* (robusto) e

Safe (seguro)) envolve uma etapa de extração com uso de solvente na presença de sais seguida por uma etapa de limpeza do extrato. Nos últimos anos, esse método tem sido utilizado para a análise de múltiplas micotoxinas em diferentes matrizes alimentares, tendo em vista sua simplicidade, etapas mínimas e sucesso na redução de compostos interferentes nas amostras (DESMARCHELIER *et al.*, 2014; SUN *et al.*, 2016; JUAN *et al.*, 2017; GONZÁLEZ-JARTÍN *et al.*, 2019; RAUSCH, BROCKMEYER, SCHWERDTLE, 2020; TITTEMIER *et al.*, 2020).

Métodos analíticos baseados em cromatografia líquida com detecção por espectrometria de massas (LC-MS, do inglês: *liquid chromatography with mass spectrometry detection*) têm sido amplamente utilizados para avaliar múltiplas toxinas fúngicas (BOLECHOVÁ *et al.*, 2015; BECCARI *et al.*, 2016; BOGDANOVA *et al.*, 2018; GONZÁLEZ-JARTÍN *et al.*, 2019; WALL-MARTÍNEZ *et al.*, 2019). Métodos para a análise de cevada maltada e/ou cerveja tem sido otimizados apenas para grupos de micotoxinas estruturalmente relacionados, como aflatoxinas (B1, B2, G1, G2) (BENESOVÁ *et al.*, 2012) e tricotecenos (BARTHEL *et al.*, 2012; KSIENIEWICZ-WOZNIAK *et al.*, 2019), ou apenas para toxinas produzidas pelo gênero *Fusarium* (HABLER, RYCHLIK, 2016; HABLER *et al.*, 2017; RODRÍGUEZ-CARRASCO *et al.*, 2015). Abordagens que não incluíram todas as micotoxinas legisladas (BECCARI *et al.*, 2016) ou são realizadas com um escopo limitado de micotoxinas emergentes também estão disponíveis na literatura (TAMURA, UYAMA, MOCHIZUKI, 2011).

O objetivo deste estudo é validar um método para quantificação simultânea de dezessete micotoxinas legisladas (AFB1, AFB2, AFG1, AFG2, OTA, DON, ZEA, FB1, T-2 e HT-2) e emergentes (BEA, MON, STG, ENA, ENB, ENA1 e ENB1) em cevada maltada e cerveja. A abordagem em estudo combina o uso do procedimento QuEChERS, da cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas com analisador quadrupolo-tempo de voo (LC-QToF-MS, do inglês: *liquid chromatography coupled to quadrupole time of flight mass spectrometry*) e da MMC para determinar simultaneamente micotoxinas legisladas e emergentes em malte e cerveja.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

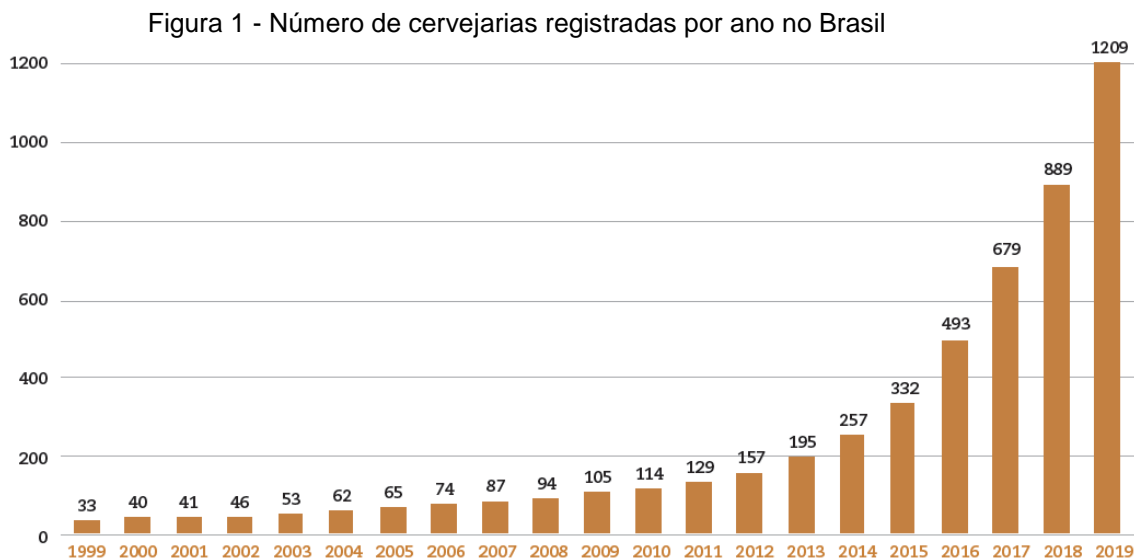
2.1 Cerveja

Segundo o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), cerveja é a bebida resultante da fermentação alcoólica, a partir da levedura cervejeira, do mosto de cevada malteada ou de extrato de malte, submetido previamente a um processo de cocção adicionado de lúpulo ou extrato de lúpulo. O mosto é a solução em água potável de compostos resultantes da degradação enzimática do malte, com ou sem adjuntos cervejeiros. Malte ou cevada malteada é o produto obtido da germinação parcial e posterior desidratação, com ou sem tostagem, do grão de cevada, processo conhecido como malteação. Se outro cereal, exceto a cevada, for submetido à malteação, deve ser denominado “malte de (acrescido do nome do cereal que lhe deu origem)”. Adjuntos cervejeiros são matérias-primas que substituam, em até 45% em peso, o malte ou o extrato de malte na elaboração do mosto cervejeiro, como a cevada cervejeira não malteada e os demais cereais malteados ou não-malteados (MAPA, 2019).

O Brasil ocupa a 28^o posição no *ranking* mundial de consumo de cerveja per capita, com média de 60 litros por ano em 2018, em comparação aos 191,8 litros da primeira colocada República Tcheca (KIRIN HOLDINGS, 2019). A produção da bebida no Brasil se polariza entre as cervejas de massa que são as cervejas tradicionais, predominantemente do estilo Pilsen, produzidas em larga escala pelas grandes indústrias do setor de bebidas e as cervejas artesanais, com variedade de sabores e estilos, que têm conquistado cada vez mais espaço no mercado brasileiro (MATOS, 2011; SEBRAE, 2016).

A atividade cervejeira no Brasil tem crescido de forma exponencial nos últimos anos, como pode ser visto pelo número de novas cervejarias registradas no MAPA (Figura 1). Houve um acréscimo de 186 novas cervejarias em 2017, finalizando o ano com 679, e de 210 em 2018, totalizando 889 estabelecimentos. Já em 2019 o crescimento foi ainda maior, foram 320 novos registros, alcançando 1.209 cervejarias. A distribuição por unidade da federação permanece concentrada nas regiões Sul e Sudeste, com mais de 80% dos estabelecimentos. O estado que apresenta o maior número de cervejarias é São Paulo (241) que ultrapassou o Rio

Grande do Sul (236) do último levantamento para o atual, seguido por Minas Gerais (163), Santa Catarina (148), Paraná (131) e Rio de Janeiro (78) (MAPA, 2020). Esse aumento no número de novos estabelecimentos deve-se principalmente à abertura de pequenas cervejarias, também chamadas de microcervejarias, que se destacam pela produção de cervejas artesanais (MARCUSO; MULLER, 2019).



Fonte: MAPA (2020)

A Associação Brasileira de Cerveja Artesanal (ABRACERVA) define microcervejaria como a empresa com sede no Brasil, de capital predominantemente nacional (mais que 50%), detentora de registro de estabelecimento produtor junto ao MAPA, que produza as próprias marcas, ou marcas de terceiros sob encomenda, e que produz até 50 mil hectolitros de cerveja por ano (ABRACERVA, 2018). O grande diferencial das cervejas artesanais em relação às cervejas produzidas em larga escala é a matéria-prima. As grandes indústrias absorvem a cevada malteada (malte) nacional e as microcervejarias importam cerca de 90% do malte utilizado na sua produção. Para inovar, os produtores de cerveja artesanal priorizam a qualidade dos ingredientes e, além dos ingredientes obrigatórios definidos pela legislação, investem em outros itens que ajudam a dar sabor, aroma e característica específica à bebida, como frutas, café, cacau, especiarias, açaí, mel. Ademais, as microcervejarias não focam na produção de um único estilo da bebida como as

grandes empresas, oferecendo uma diversidade nunca vista no país (SEBRAE, 2016; LOPES *et al.*, 2020b).

As cervejas são classificadas de acordo com seu processo de fermentação em dois grandes grupos: *lager* (baixa fermentação) e *ale* (alta fermentação) (GASTONI, FILHO, 2005; FERREIRA *et al.*, 2010; MEGA, NEVES, ANDRADE, 2011). A cerveja *lager* é fermentada com *Saccharomyces pastorianus (carlsbergensis)* em temperaturas baixas (8-15 °C) por 7 a 10 dias, a qual flocula no fundo do fermentador. É a cerveja mais difundida em todo o mundo. Os principais estilos de cerveja *lager* incluem Pilsen, American Lager e Bock (FERREIRA *et al.*, 2010). A cerveja *Ale* é produzida por levedura de alta fermentação *Saccharomyces cerevisiae* em temperatura entre 16-25 °C durante 3 a 5 dias. No final do processo, a levedura situa-se na superfície do mosto. Os principais estilos de cerveja *ale* são Belgian Ale, Brown Ale, Pale Ale e India Pale Ale (IPA) (FERREIRA *et al.*, 2010; MEGA, NEVES, ANDRADE, 2011).

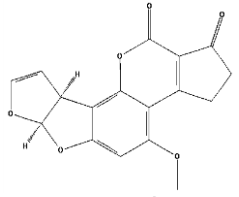
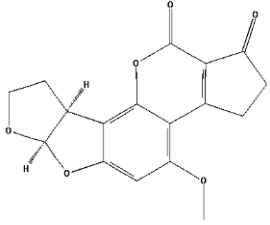
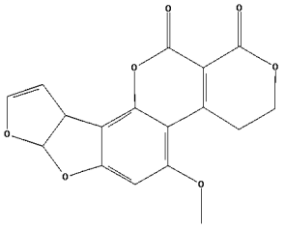
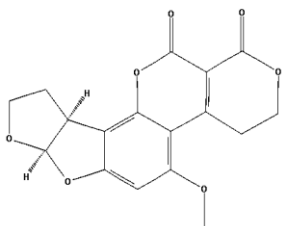
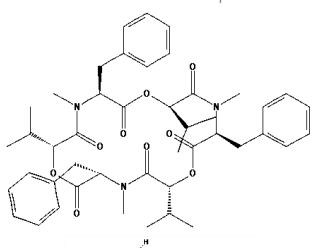
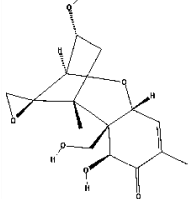
2.2 Micotoxinas

Os cereais utilizados para a produção da cerveja, incluindo a cevada, podem estar contaminados por fungos toxigênicos produtores de micotoxinas (MALACHOVA *et al.*, 2010; PASCARI *et al.*, 2018). As micotoxinas podem ser transferidas dos cereais para a cerveja (MASTANJEVIC *et al.*, 2018; PASCARI *et al.*, 2018). Os fatores que podem influenciar o crescimento de fungos e secundariamente a produção de micotoxinas são temperatura, atividade de água (a_w), pH, composição do substrato, concentração de inóculo, cepa do fungo (MILANI, 2013; FLEURAT-LESSARD, 2017).

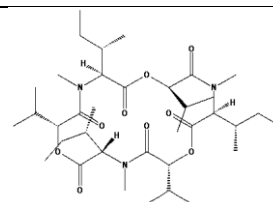
A Tabela 1 mostra a massa molecular (g mol^{-1}), coeficiente de partição (Log P), fórmula molecular e estrutura química das principais micotoxinas que podem ser encontradas em cereais, incluindo AFs (B1, B2, G1, G2), BEA, DON, ENs (A, A1, B, B1), FB1, MON, OTA, STG, T-2, HT-2 e ZEA. O Log P é definido como o coeficiente de partição de uma substância entre uma fase orgânica e uma fase aquosa. Quanto maior o valor de Log P, mais lipossolúvel será o composto. A micotoxina mais lipossolúvel é a BEA (5,25) e a mais hidrossolúvel é a FB1 (-0,81). Esta

característica é importante tanto analiticamente quanto do ponto de vista da metabolização desses compostos no organismo humano (ISAC-GARCÍA *et al.*, 2016).

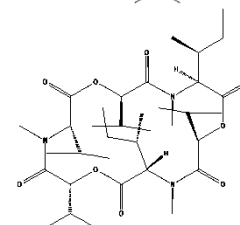
Tabela 1 - Massa molecular (g mol^{-1}), coeficiente de partição (Log P), fórmula molecular e estrutura química das micotoxinas

Micotoxina	Massa molecular (g mol^{-1})	Log P ^a	Fórmula molecular	Estrutura química
AFB1	312,277	1,73	$\text{C}_{17}\text{H}_{12}\text{O}_6$	
AFB2	314,293	1,63	$\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{O}_6$	
AFG1	328,276	1,81	$\text{C}_{17}\text{H}_{12}\text{O}_7$	
AFG2	330,292	1,59	$\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{O}_7$	
BEA	783,963	5,25	$\text{C}_{45}\text{H}_{57}\text{N}_3\text{O}_9$	
DON	296,319	-0,76	$\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{O}_6$	

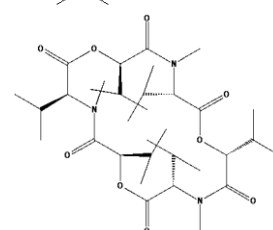
ENA	681,912	4,60	$C_{36}H_{63}N_3O_9$
-----	---------	------	----------------------



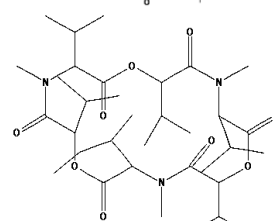
ENA1	667,885	4,39	$C_{35}H_{61}N_3O_9$
------	---------	------	----------------------



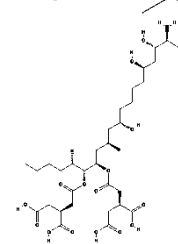
ENB	639,831	3,81	$C_{33}H_{57}N_3O_9$
-----	---------	------	----------------------



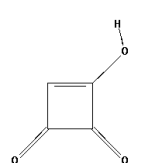
ENB1	653,858	4,06	$C_{34}H_{59}N_3O_9$
------	---------	------	----------------------



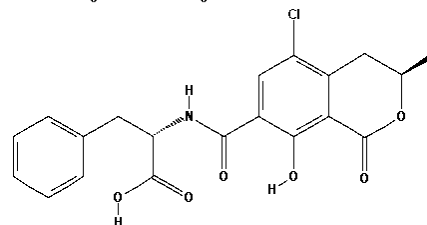
FB1	721,838	-0,81	$C_{34}H_{59}NO_{15}$
-----	---------	-------	-----------------------



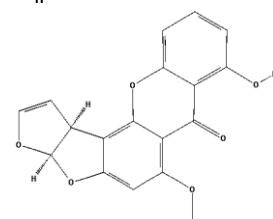
MON	98,057	-0,21	$C_4H_2O_3$
-----	--------	-------	-------------

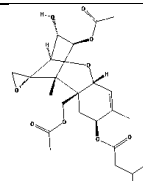
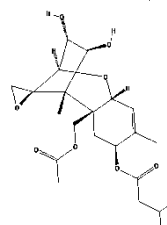
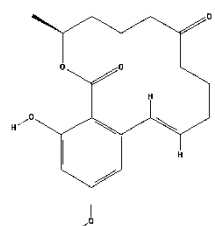


OTA	403,815	3,18	$C_{20}H_{18}ClNO_6$
-----	---------	------	----------------------



STG	324,288	2,73	$C_{18}H_{12}O_6$
-----	---------	------	-------------------



T-2	466,527	1,95	C ₂₄ H ₃₄ O ₉	
HT-2	424,49	1,32	C ₂₂ H ₃₂ O ₈	
ZEA	318,369	3,04	C ₁₈ H ₂₂ O ₅	

Fonte: Pubchem.

^a Os valores de Log P foram calculados usando o software online interativo ALOGPS 2.1.

2.2.1 Aflatoxinas (AFs)

As AFs são um grupo de micotoxinas estruturalmente relacionadas produzidas por espécies do gênero *Aspergillus*, como *A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. nomius*, *A. pseudocelatus*, *A. bombycis*, *A. ochraceoroseus* e *A. arachidicola* (IARC, 2012; ALSHANNAQ, YU, 2017). As aflatoxinas mais estudadas são AFB1, AFB2, AFG1 e AFG2, dentre as quais a AFB1 é a mais tóxica e a mais comumente encontrada em alimentos (IARC, 2012; KUMAR *et al.*, 2017; THEUMER *et al.*, 2018). As AFs são carcinogênicas, teratogênicas, hepatotóxicas, mutagênicas e imunossupressoras. As AFs são metabolizadas no fígado pelas enzimas do citocromo P450 (CYP, do inglês: *cytochrome P450*) e a AFB1 é biotransformada em AFB1-8,9-epóxido, o qual se liga covalentemente ao DNA, resultando na formação de adutos (IARC, 2012; ALSHANNAQ, YU, 2017; KUMAR *et al.*, 2017).

2.2.2 Beauvericina (BEA)

A BEA é um hexadepsipeptídeo cíclico produzido por várias espécies do gênero *Fusarium*, como *F. acuminatum*, *F. proliferatum*, *F. langsethiaec*, *F. sporotrichioides* e *F. poae* (FILIPPO, ANTONIO, TERENCEIO, 2020). Esta micotoxina

é um ionóforo capaz de promover o transporte de cátions mono- e divalentes (K^+ , Na^+ , Ca^{2+}) através da membrana plasmática e também pode ser incorporada na membrana formando um canal seletivo destes cátions, levando a distúrbios nas concentrações fisiológicas normais desses íons. Este fenômeno pode causar a ativação de endonucleases dependentes de cálcio que são responsáveis pela fragmentação do DNA. A BEA também se mostrou capaz de induzir estresse oxidativo e provocar apoptose em diferentes tipos de células, como células intestinais humanas da linhagem Caco-2, além de mostrar-se genotóxica em linfócitos humanos (EFSA, 2014).

2.2.3 Eniatinas (ENs)

Assim como a BEA, as ENs são hexadespsipeptídeos cíclicos produzidos por várias espécies do gênero *Fusarium*, como *F. acutatum*, *F. avenaceum*, *F. oxysporum*, *F. poae* e *F. tricinctum* (EFSA, 2014; FILIPPO, ANTONIO, TERENCEZIO, 2020). As variantes mais encontradas e pesquisadas são eniatina A (ENA), A1 (ENA1), B (ENB) e B1 (ENB1) (EFSA, 2014; FRAEYMAN *et al.*, 2017; STANCIU *et al.*, 2017). As ENs têm comportamento ionofórico similar a BEA, e também induzem apoptose e necrose *in vitro* (EFSA, 2014).

2.2.4 Esterigmatocistina (STG)

A STG é produzida por fungos dos gêneros *Aspergillus*, *Bipolaris*, *Emericella*, *Chaetomium*, *Farrowia*, *Fusarium*, *Botryotrichum*, *Monocillium* e *Humicola*. Os principais produtores são fungos do gênero *Aspergillus*, como *A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. nidulans*, e especialmente *A. versicolor* (FILIPPO, ANTONIO, TERENCEZIO, 2020). A STG é um intermediário na via biossintética das AFs. Ela é biotransformada em O-metil esterigmatocistina que é o precursor direto da AFB1 e AFG1 (EFSA, 2013). Seu efeito tóxico é mediado pela estrutura do anel de furofurano, que forma aduto com DNA após ativação metabólica a um epóxido reativo (FILIPPO, ANTONIO, TERENCEZIO, 2020). É genotóxica e carcinogênica, induzindo tumores no fígado, pulmão, rim e pele em várias espécies de animais, como ratos, camundongos, macacos e peixes (NIETO *et al.*, 2018).

2.2.5 Fumonisina B1 (FB1)

As fumonisinas são micotoxinas hidrofílicas produzidas por várias espécies de *Fusarium*, notavelmente *F. verticillioides*, *F. proliferatum*, *F. anthophilum*, *F. nygamai* (ALSHANNAQ, YU, 2017). As fumonisinas mais comuns são FB1, FB2 e FB3, sendo a FB1 a mais relevante em termos de toxicidade e ocorrência em alimentos (BRAUN, WINK, 2018). Fumonisinias causam diversos efeitos tóxicos em animais, como neurotoxicidade, hepatotoxicidade, nefrotoxicidade, imunotoxicidade, leucoencefalomalácia equina e edema pulmonar suíno (EFSA, 2018). Os mecanismos envolvidos na toxicidade do FB1 incluem a interrupção do metabolismo de esfingolipídios (esfingolipídios: classe de lipídios que compõem membranas celulares) e a indução de estresse oxidativo, os quais levam à ativação de estresse no retículo endoplasmático e de proteínas quinases ativadas por mitógenos (mitógenos: estímulos extracelulares) (MAPKs, do inglês: *mitogen-activated protein kinases*), modulação da autofagia e alteração da metilação do DNA (LIU *et al.*, 2019).

2.2.6 Moniliformina (MON)

A MON é uma pequena molécula hidrossolúvel que geralmente ocorre na natureza como o sal de sódio ou potássio de 3-hidroxi-3-ciclobuteno-1,2-diona, também conhecido como ácido semisquárico (EFSA, 2018; FILIPPO, ANTONIO, TERENCEIO, 2020). É produzida por uma grande variedade de espécies de *Fusarium*, como *F. proliferatum*, *F. subglutinans*, *F. avenaceum*, *F. tricinctum*, *F. fujikuroi*, *F. nygamai*, *F. temperatum*, *F. thapsinum* (FRAEYMAN *et al.*, 2017; EFSA, 2018). A MON exerce seu efeito tóxico por meio da inativação de enzimas dependentes de pirofosfato de tiamina, incluindo a piruvato desidrogenase, que compromete o ciclo do ácido tricarbóxico (ciclo de Krebs) e, assim, afeta o suprimento de energia celular (FRAEYMAN *et al.*, 2017; FILIPPO, ANTONIO, TERENCEIO, 2020). Esta toxina mostrou-se mutagênica em linfócitos humanos, induzindo danos cromossômicos (CELIK *et al.*, 2009; EFSA, 2018). O principal órgão alvo é o coração, causando insuficiência cardíaca aguda, necrose e fibrose em animais experimentais. Além disso, também foi observado fraqueza muscular,

desconforto respiratório, ganho de peso e comprometimento da imunidade em aves (FRAEYMAN *et al.*, 2017; EFSA, 2018; FILIPPO, ANTONIO, TERENCE, 2020).

2.2.7 Ocratoxina A (OTA)

As ocratoxinas são micotoxinas produzidas por dois gêneros de fungos: *Penicillium* e *Aspergillus*. A OTA é a mais prevalente e tóxica (HEUSSNER, BINGLE, 2015) cuja estrutura consiste de uma porção para-clorofenólica contendo um grupo di-hidroisocumarina ligado a uma L-fenilalanina. O principal órgão alvo desta toxina são os rins, agindo principalmente no túbulo proximal. Uma possível explicação para a vulnerabilidade dos rins pode estar relacionada ao sistema de transporte de ânions orgânicos (OAT, do inglês: *organic anion transport*), responsável pela excreção de OTA na urina. O OAT4, localizado na membrana apical das células tubulares proximais, pode estar envolvido na reabsorção urinária de OTA, resultando em sua acumulação nas células renais tubulares (EFSA, 2006; ANZAI, JUTABHA, ENDOU, 2010). A exposição à OTA através da dieta é potencialmente associada à nefropatia endêmica dos Balcãs que é caracterizada por atrofia progressiva dos rins e esclerose (EFSA, 2006; STIBOROVÁ, ARLT, SCHMEISER, 2016). Além disso, a OTA mostrou ser neurotóxica, imunotóxica e teratogênica para animais de laboratório (EFSA, 2006).

2.2.8 Tricotecenos

Os tricotecenos são um grupo de micotoxinas constituídas por um sistema de anéis sesquiterpenoides, sendo produzidos principalmente por fungos do gênero *Fusarium*. Eles são divididos em quatro grupos (tipos A, B, C e D) de acordo com variações nas posições em torno da estrutura central. O tipo A é representado pelas toxinas HT-2 (HT-2) e T-2 (T-2) e produzidos pelas espécies *F. armeniacum*, *F. langsethiae*, *F. poae*, *F. sambucinum*, *F. sporotrichioides* e *F. venenatum*; o tipo B é mais frequentemente representado pelo desoxinivalenol (DON), sendo as espécies produtoras mais importantes: *F. graminearum sensu lato*, *F. culmorum*, *F. crookwellense* e *F. pseudograminearum*. Os tipos C e D incluem alguns tricotecenos de menor importância (MARIN *et al.*, 2013).

Como as demais micotoxinas do grupo dos tricotecenos, a toxina T-2 inibe a síntese de proteínas, RNA e DNA. Também induz a apoptose em várias células,

como células hepáticas humanas, bem como a peroxidação lipídica, afetando a integridade da membrana celular (ADHIKARI *et al.*, 2017; EFSA, 2017). Em humanos, a exposição aguda à T-2 é associada à doença conhecida como aleucia tóxica alimentar (ATA, do inglês: *alimentary toxic aleukia*). Surtos dessa doença ocorreram durante as décadas de 1930 e 1940 na Rússia e na Ásia Central, caracterizados por sintomas frequentemente fatais que incluíam náusea, êmese, diarreia, inflamação da pele, erupções cutâneas, contagem reduzida de glóbulos brancos e necrose na cavidade oral, nariz, boca (WEIDENBÖRNER, 2015). A toxicidade da HT-2 é menos investigada, no entanto, devido ao fato da T-2 ser rapidamente metabolizado em HT-2 *in vivo*, é amplamente aceito que a toxicidade de T-2 *in vivo* é semelhante a do HT-2 (EFSA, 2011).

O DON é também conhecido como “vomitoxina” por causar êmese em suínos (PESTKA, 2010; MARIN *et al.*, 2013; WANG *et al.*, 2014). Em nível molecular e celular, o DON pode se ligar aos ribossomos e inibir a síntese de proteínas, RNA, DNA, além de induzir apoptose em células hematopoiéticas, intestinais, macrófagos, monócitos e hepatócitos e produzir imunossupressão (WANG *et al.*, 2014; PAYROS *et al.*, 2016). Os efeitos causados pela exposição aguda ao DON em humanos e animais são dor abdominal, salivação aumentada, diarreia e êmese (PAYROS *et al.*, 2016).

2.2.9 Zearalenona (ZEA)

A ZEA é uma micotoxina estrogênica produzida por várias espécies do gênero *Fusarium*, como *F. crookwellense*, *F. graminearum*, *F. pseudograminearum*, *F. semitectum* (METZLER, PFEIFFER, HILDEBRAND, 2010; PISTOL *et al.*, 2014). Essa micotoxina é uma lactona macrocíclica do ácido β -resorcílico encontrada predominantemente em grãos de cereais e alimentos para consumo animal e humano (METZLER, PFEIFFER, HILDEBRAND, 2010; VENKATARAMANA *et al.*, 2014). A ZEA possui atividade estrogênica devido à semelhança estrutural desta micotoxina com o hormônio estrogênio (METZLER, PFEIFFER, HILDEBRAND, 2010; PISTOL *et al.*, 2014). Alguns efeitos estrogênicos da ZEA são hiperestrogenismo, infertilidade, feminização de machos, baixa produção de leite, atrofia testicular (ZINEDINE *et al.*, 2007). Além disso, estudos *in vitro* e *in vivo* demonstraram que a ZEA causa efeitos como imunotoxicidade, genotoxicidade,

hepatotoxicidade e neurotoxicidade (VENKATARAMANA *et al.*, 2014; MUTHULAKSHMI *et al.*, 2018).

2.3 Determinação de micotoxinas em alimentos

2.3.1 Preparação da amostra: extração e limpeza

As amostras líquidas, como a cerveja, são frequentemente submetidas à extração líquido-líquido (LLE, do inglês: *liquid-liquid extraction*) para separar as micotoxinas. A extração sólido-líquido (SLE, do inglês: *solid-liquid extraction*) é usada para a extração de grãos de cereais e outros materiais sólidos (PEREIRA, FERNANDES, CUNHA, 2014). A maioria das micotoxinas é altamente solúvel em solventes orgânicos, como metanol, acetonitrila, acetona, clorofórmio, diclorometano, mas dificilmente solúvel em água. Assim, uma mistura de solvente orgânico com água ou solução ácida é frequentemente usada para extrair as micotoxinas. A água pode auxiliar na penetração do solvente na matriz alimentar e uma solução ácida pode ajudar a extração quebrando as interações entre as toxinas e outros constituintes da amostra, como proteínas ou açúcares (RAHMANI, JINAP, SOLEIMANY, 2009; TURNER, SUBRAHMANYAM, PILETSKY, 2009; PEREIRA, FERNANDES, CUNHA, 2014). Os métodos instrumentais de extração automática por solventes também podem ser utilizados, incluindo extração com fluido supercrítico (SFE, do inglês: *supercritical fluid extraction*), extração acelerada de solvente (ASE, do inglês: *accelerated solvent extraction*) e extração assistida por micro-ondas (MAE, do inglês: *microwave-assisted extraction*). Esses métodos aceleram a extração de micotoxinas, exigem volumes menores de solvente, no entanto, tem custo elevado (PEREIRA, FERNANDES, CUNHA, 2014).

A purificação do extrato é um processo importante para eliminar as substâncias que podem interferir na detecção. Ao purificar o extrato, a especificidade e a sensibilidade podem ser aprimoradas, resultando em exatidão e precisão também melhoradas (TURNER; SUBRAHMANYAM; PILETSKY, 2009). Exemplos de métodos de limpeza incluem partição líquido-líquido, extração em fase sólida (SPE, do inglês: *solid phase extraction*), colunas de imunoafinidade (IAC, do inglês: *immunoaffinity columns*), coluna cromatográfica e colunas de troca iônica.

Os métodos mais comumente utilizados para a limpeza de micotoxinas são SPE e IAC (RAHMANI, JINAP, SOLEIMANY, 2009; BENESOVÁ *et al.*, 2012; PEREIRA, FERNANDES, CUNHA, 2014; PIACENTINI *et al.*, 2015; KSIENIEWICZ-WOZNIAK *et al.*, 2019). SPE é uma técnica baseada na afinidade do analito dissolvido no extrato (fase móvel) por uma fase estacionária (cartucho) composta por um sorbente sólido por onde a amostra passa e onde as micotoxinas são absorvidas e posteriormente eluídas com um solvente orgânico. IAC são embalados com fase sólida ativada ligada a um anticorpo específico para uma determinada micotoxina. Quando o extrato passa pela coluna, a micotoxina se liga seletivamente ao anticorpo, enquanto o outro componente da matriz é removido por uma etapa de lavagem. A micotoxina é então eluída com um solvente miscível. No entanto, esses procedimentos apresentam algumas desvantagens, como a incapacidade de extrair seletivamente os analitos alvo da matriz da amostra, a suscetibilidade dos anticorpos nos sorbentes a solventes orgânicos e a possibilidade de interações não específicas devido a reatividades cruzadas com outras micotoxinas. Além disso, os cartuchos de SPE e as colunas de imunoafinidade só podem ser usados uma vez e oneram o custo da análise (ALSHANNAQ, YU, 2017).

O método de preparação de amostras denominado QuEChERS foi desenvolvido inicialmente para análise de agrotóxicos em frutas e vegetais. A técnica envolve duas etapas: (1) extração com solvente (acetoneitrila ou metanol) na presença de sais (sulfato de magnésio e cloreto de sódio) e (2) extração em fase sólida dispersiva (d-SPE, do inglês: *dispersive-solid phase extraction*) que envolve a purificação do extrato usando sorbentes e sais (sulfato de magnésio) para remover interferentes na matriz. O sulfato de magnésio ($MgSO_4$) é usado para remover a água da fase orgânica da amostra e o cloreto de sódio (NaCl) para reduzir a quantidade de interferências polares. Para a etapa de purificação, os sorbentes mais usados, em conjunto ou separadamente, são amina secundária primária (PSA, do inglês: *primary secondary amine*) e octadecil (C18). Estes sorbentes removem ácidos graxos, açúcares, ácidos orgânicos, lipídios e alguns pigmentos da amostra (ALSHANNAQ, YU, 2017; PERESTRELO *et al.*, 2019). QuEChERS é um método rápido, barato e simples que usa quantidades mínimas de solvente em comparação com outros métodos e expandiu sua aplicação para a extração de diferentes

analitos, como acrilamida, compostos fenólicos, aminas e micotoxinas, em diferentes matrizes (PEREIRA, FERNANDES, CUNHA, 2014). Na análise de micotoxinas, C18 é empregado, uma vez que alguns compostos têm alta afinidade com PSA, levando à perda de analitos (PERESTRELO *et al.*, 2019).

2.3.2 Métodos instrumentais

Para a análise de micotoxinas, os métodos cromatográficos utilizados incluem a cromatografia líquida (LC, do inglês: *liquid chromatography*) acoplada a detectores de ultravioleta (UV, do inglês: *ultraviolet*), arranjo de diodos (DAD, do inglês: *diode array detector*), fluorescência (FLD, do inglês: *fluorescence detector*) e também à espectrometria de massas (MS, do inglês: *mass spectrometry*) (RAHMANI, JINAP, SOLEIMANY, 2009; PEREIRA, FERNANDES, CUNHA, 2014).

Métodos analíticos baseados em LC tornaram-se a principal ferramenta analítica para a determinação de micotoxinas, especialmente quando acoplado com a espectrometria de massas sequencial (MS/MS, do inglês: *tandem mass spectrometry*) (SHEPHARD, 2016). A MS oferece maior sensibilidade e seletividade para a análise de multi-micotoxinas comparada aos detectores UV, DAD e FLD, além de informações estruturais químicas por meio da identidade molecular do analito com base na razão massa/carga (m/z) (ALSHANNAQ, YU, 2017).

No passado, métodos analíticos eram desenvolvidos para a análise de uma única micotoxina ou de um grupo de micotoxinas estruturalmente relacionadas (ALSHANNAQ, YU, 2017; MALACHOVÁ *et al.*, 2018). Entretanto, a ocorrência de mais de uma micotoxina em uma única amostra é muito comum em cereais e produtos derivados, uma vez que a maioria dos fungos é capaz de produzir várias toxinas concomitantemente e os alimentos podem ser contaminados por vários fungos simultaneamente ou em sucessão (MALACHOVÁ *et al.*, 2018). As tendências atuais na análise de micotoxinas em alimentos estão focadas na aplicação de tecnologias robustas com alta sensibilidade e seletividade que possam detectar e quantificar múltiplas micotoxinas em uma variedade de alimentos em uma única corrida cromatográfica (ALSHANNAQ, YU, 2017; MALACHOVÁ *et al.*, 2018).

2.3.3 Métodos multi-micotoxinas

Não existe um procedimento padrão perfeito para detectar todas as micotoxinas, pois elas possuem estruturas químicas diferentes e ocorrem em níveis de concentração diferentes. Métodos baseados em cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas sequencial (LC-MS/MS, do inglês: *liquid chromatography tandem mass spectrometry*) ganharam crescente relevância, pois permitem a detecção rápida e a quantificação de múltiplas micotoxinas em alimentos e bebidas (DE BOEVRE *et al.*, 2012; BECCARI *et al.*, 2016; HABLER, RYCHLIK, 2016; JUAN *et al.*, 2017; PASCARI *et al.*, 2018; GONZÁLEZ-JARTÍN *et al.*, 2019; WALL-MARTÍNEZ *et al.*, 2019; RAUSCH, BROCKMEYER, SCHWERDTLE, 2020).

Dentre os analisadores de massas utilizados na determinação de micotoxinas, estão o triplo quadrupolo, quadrupolo, Orbitrap e tempo de voo (ToF, do inglês: *time-of-flight*) (SOLEIMANY *et al.*, 2012; LIU *et al.*, 2014; ALSHANNAQ, YU, 2017; PASCARI *et al.*, 2018; GONZÁLEZ-JARTÍN *et al.*, 2019). O triplo quadrupolo desempenha 3 funções importantes. O primeiro quadrupolo atua “grosseiramente” como um filtro de íons. Os íons selecionados por sua relação massa/carga passam para a célula de colisão, onde são fragmentados. Finalmente, os fragmentos selecionados passam pelo terceiro quadrupolo e chegam ao detector (RAHMANI, JINAP, SOLEIMANY, 2009).

Nos últimos anos ocorreu um aumento na utilização de analisadores de alta resolução na determinação de micotoxinas, tais como o ToF (KSIENIEWICZ-WOZNIAK *et al.*, 2019; SILVA *et al.*, 2019; LOPES *et al.*, 2020a), quadrupolo-tempo de voo (Q-ToF, do inglês: *quadrupole-time-of-flight*) (PÉREZ-ORTEGA *et al.*, 2017; ROMERA *et al.*, 2018; FACORRO, LLOMPART, DAGNAC, 2020) e Orbitrap (MAO *et al.*, 2018; CASTALDO *et al.*, 2019; NARVÁEZ *et al.*, 2020). No ToF, os íons são acelerados por uma força eletromagnética em direção a um tubo de voo. Íons mais leves voarão mais rápido e serão recebidos mais rapidamente pelo detector. Ao sair da região de aceleração, eles entram em uma região livre de campo, onde são separados de acordo com suas velocidades, antes de chegar ao detector posicionado na outra extremidade do tubo de voo. A relação massa/carga é determinada de acordo com o tempo que os íons levam para se mover através de

uma região livre de campo entre a fonte e o detector (RAHMANI, JINAP, SOLEIMANY, 2009).

Analisadores do tipo ToF podem ser configurados sozinhos ou em sistema híbrido em série, como o Q-ToF, em que o terceiro quadrupolo (Q3) de um triplo quadrupolo é substituído por um ToF. A grande vantagem desse analisador em comparação ao triplo quadrupolo está no fato de que ele mede a massa acurada tanto do íon precursor quanto dos seus fragmentos. A vantagem de medir a massa de um composto com elevada acurácia está relacionada à possibilidade de determinar diretamente a sua composição elementar ou, ao menos, reduzir as possíveis combinações. Além disso, possui maior resolução e maior velocidade de varredura (HAAG, 2016).

O principal problema enfrentado pelos métodos multi-micotoxinas é o efeito de matriz, que causa uma modificação na eficiência de ionização na MS de um composto devido à presença de compostos co-eluentes com o analito alvo, levando a uma supressão (diminuição) ou intensificação (aumento) do sinal. Em consequência, isso afetará a precisão e a sensibilidade do método baseado no uso da MS, comprometendo a quantificação e confirmação precisa (ZACHARIASOVA *et al.*, 2010; FABREGAT-CABELLO *et al.*, 2015). Duas abordagens principais são propostas para avaliar a supressão/intensificação do sinal (SSE, do inglês: *signal suppression/enhancement*): (i) infusão pós-coluna e (ii) adição pós-extração. No caso da infusão pós-coluna, o composto alvo é adicionado ao eluente após passar pela coluna de LC. O sinal do composto alvo é monitorado após a injeção de um extrato de amostra em branco. As flutuações de resposta do composto alvo refletem o efeito de matriz. A adição pós-extração é baseada na comparação entre a área de pico do padrão do analito preparado em solvente (A_{solvente}) e a área obtida após a contaminação de um extrato de amostra em branco com o analito (A_{amostra}) na mesma concentração. O SSE é calculado de acordo com a seguinte equação: $\text{SSE} = 100 \times (A_{\text{amostra}}/A_{\text{solvente}})$, em que um valor de SSE de 100% indica que não há efeito, menos de 100% indica supressão e mais de 100% indica intensificação do sinal (FABREGAT-CABELLO *et al.*, 2015; KRUIVE *et al.*, 2015b).

As estratégias geralmente empregadas para minimizar o efeito de matriz incluem a MMC e o uso do padrão interno. A MMC baseia-se na preparação das

soluções contendo os padrões analíticos usando extratos das matrizes. As curvas analíticas são feitas usando essas soluções. Este procedimento pode ser trabalhoso quando muitas matrizes diferentes estão sendo estudadas, pois cada uma precisa de sua própria curva. No caso do uso de padrão interno, estes compostos são adicionados em todas as amostras que serão analisadas, bem como são inseridos nas soluções dos compostos padrão usados nas curvas analíticas. A razão entre a área do analito e do padrão interno é usada para fins de quantificação. Compostos que podem ser utilizados como padrão interno incluem substâncias com uma estrutura química análoga ao analito, como deepoxi-desoxinivalenol (DOM-1, do inglês: *deepoxy-deoxynivalenol*), um derivado de DON, e padrões internos marcados com isótopos (ILIS, do inglês: *isotope labelled internal standards*), como [¹³C]₁₅-DON e DONd1. No entanto, o uso de padrão interno pode ser desafiador uma vez que os analitos análogos e ILISs podem não estar disponíveis comercialmente para uma ampla variedade de micotoxinas; além disso, alguns desses padrões são muito caros, limitando a aplicabilidade nas análises de rotina (FABREGAT-CABELLO *et al.*, 2015; LI *et al.*, 2019). Há a possibilidade de sintetizar ILISs em laboratório, porém, requer tempo, pessoal treinado e protocolos validados, pois exige cuidado na rota sintética para evitar a perda de isotópologos estáveis, o que resultaria na sobreposição espectral entre o padrão e o analito, afetando a análise cromatográfica. Desta forma, a MMC fornece uma alternativa para superar os efeitos de matriz para as análises multi-micotoxinas de rotina (FABREGAT-CABELLO *et al.*, 2015; LI *et al.*, 2019).

Sirhan, Tan e Wong (2012) desenvolveram um método para determinar oito tricotecenos (tipo A e B) em cereais e produtos a base de cereais (trigo, macarrão à base de trigo, arroz, macarrão à base de arroz, milho) baseado na MMC e QuEChERS seguido de LC-QToF-MS. Linearidade (coeficiente de correlação maior do que 0,97 para todos os analitos), recuperação (valores variaram de 61,9% a 116,8%), repetibilidade (entre 1,1% e 6,7%) e reprodutibilidade (entre 4,8% e 14,3%) aceitáveis foram alcançadas, indicando a adequação do método proposto para a determinação de tricotecenos em cereais (SIRHAN, TAN, WONG, 2012).

O estudo de Sirhan, Tan e Wong (2012) foi focado em apenas um grupo de micotoxinas (tricotecenos), esta abordagem foi também utilizada por Saito-Shida et

al. (2016) para avaliar diferentes agrotóxicos. Saito-Shida et al. (2016) demonstrou o uso da MMC e LC-QToF-MS na análise quantitativa de 149 resíduos de agrotóxicos em 4 amostras de vegetais e frutas (maçã, batata, repolho, espinafre). O método foi validado em termos de linearidade, recuperação e precisão. Para avaliar o efeito de matriz, 2 tipos de curvas de calibração foram construídas e comparadas entre si: uma com mix de padrões a $0,01 \text{ mg kg}^{-1}$ preparado em extratos de cada uma das matrizes livre de contaminantes e outra com mix de padrões preparado em metanol a $0,01 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ (SAITO-SHIDA *et al.*, 2016). Para a maioria dos agrotóxicos testados, linearidade satisfatória das curvas de calibração foi obtida com coeficientes de correlação maiores do que 0,995 na faixa de concentração de 0,002-0,1 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Dos 149 agrotóxicos analisados, 147 em maçã, 145 em batata, 141 em repolho e 131 em espinafre tiveram recuperações de 70-120%, repetibilidade de menos de 25% e precisão intermediária de menos de 30%, os quais atenderam aos critérios da diretriz para a validação de métodos analíticos para resíduos químicos agrícolas em alimentos do Ministério da Saúde, Trabalho e Bem-Estar do Japão em uma concentração de $0,01 \text{ mg kg}^{-1}$ (MHLW, 2010; SAITO-SHIDA *et al.*, 2016). Nas amostras de maçã, batata e repolho, os efeitos de matriz para todos os agrotóxicos estavam na faixa de 70-120%, indicando que não havia efeitos de matriz consideráveis. No entanto, para a amostra de espinafre, os efeitos de matriz de 10 dos 149 agrotóxicos foram abaixo de 70%, sugerindo que a baixa recuperação no espinafre em comparação com as outras amostras foi devido à supressão de sinal. O método LC-QToF-MS desenvolvido provou ser sensível e seletivo o suficiente para a determinação confiável de resíduos de agrotóxicos em vegetais e frutas (SAITO-SHIDA *et al.*, 2016).

2.3.4 Validação de método

Quando um laboratório pretende desenvolver um novo método de análise, uma das etapas mais importantes é a sua validação. A Organização Internacional para Padronização (ISO, do inglês: *International Organization for Standardization*) define validação como a confirmação através de experimentos e fornecimento de evidências de que o método analítico produz resultados confiáveis e é adequado à finalidade a que se destina (ISO, 2019).

A validação deve ser verificada de acordo com diretrizes e regulamentos publicados por organizações ou instituições internacionais e agências reguladoras que estabelecem procedimentos, parâmetros e estratégias de validação (RAPOSO; IBELLI-BIANCO, 2020). Alguns exemplos de órgãos/agências incluem: Associação de Químicos Analíticos Oficiais (AOAC, do inglês: *Association of Official Analytical Chemists*), Comissão Europeia, Administração de Alimentos e Medicamentos (FDA, do inglês: *Food and Drug Administration*) dos Estados Unidos, Conferência Internacional de Harmonização (ICH, do inglês: *International Conference on Harmonization*), Direção Geral de Saúde e Segurança Alimentar da Comissão Europeia (SANTE, do inglês: *European Commission's Directorate-General for Health and Food Safety*), Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO) (ICH, 2005; EUROPEAN COMMISSION, 2014; AOAC, 2016; INMETRO, 2018; FDA, 2019; SANTE, 2020).

Existe uma variação entre os documentos publicados por esses órgãos no que diz respeito à aplicação, terminologia, objetivos, técnica analítica, parâmetros de validação, procedimentos experimentais e critérios de aceitação. As áreas de aplicação mais frequentes são análises farmacêuticas, ambientais, toxicológicas e de alimentos. Em geral, a maioria é direcionada à análise quantitativa e pode ser usada para qualquer técnica analítica, embora alguns sejam específicos para cromatográfica (RAPOSO; IBELLI-BIANCO, 2020). Os parâmetros clássicos de desempenho de métodos analíticos são exatidão, precisão, linearidade, faixa linear, limite de detecção (LOD, do inglês: *limit of detection*), limite de quantificação (LOQ, do inglês: *limit of quantification*), especificidade e robustez (ICH, 2005; KRUIVE *et al.*, 2015b; RAPOSO; IBELLI-BIANCO, 2020), conforme definido a seguir:

- **Exatidão:** representa o grau de concordância entre um valor encontrado em um procedimento analítico e um valor de referência aceito como verdadeiro. Refere-se à capacidade do método de fornecer resultados precisos. Também é conhecido como “veracidade”. Deve ser avaliada através da determinação da recuperação, que é calculada como a porcentagem da quantidade medida do analito em relação à quantidade adicionada na matriz em um determinado número de ensaios (ICH, 2005).

- Precisão: representa o grau de dispersão entre os resultados de ensaios independentes obtidos a partir de múltiplas amostragens da mesma amostra homogênea sob condições específicas. A precisão em validação de método é considerada em três níveis diferentes: repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade. Geralmente é avaliada através da estimativa do desvio padrão relativo (RSD, do inglês: *relative standard deviation*) de uma série de medições. A repetibilidade expressa a concordância entre os resultados de medições sucessivas de um mesmo método, efetuadas sob as mesmas condições de medição (mesmo procedimento, analista, instrumento, local) em um curto intervalo de tempo. A precisão intermediária expressa o efeito de variações dentro de um laboratório, como diferentes dias, analistas, equipamentos, por um longo período de tempo. O objetivo é verificar que no mesmo laboratório o método fornecerá os mesmos resultados. A reprodutibilidade expressa a precisão entre os resultados de medições efetuadas em uma mesma amostra obtidos em diferentes laboratórios. Deve ser considerada para avaliar estudos colaborativos entre laboratórios, no caso de padronização de procedimentos analíticos a serem incluídos, por exemplo, em farmacopéias (ICH, 2005).
- Linearidade: capacidade de um método analítico em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração de analito na amostra, dentro de uma determinada faixa linear de interesse. Deve ser avaliada por inspeção visual do gráfico da relação entre a concentração do analito e o sinal medido. No caso de linearidade, os resultados devem ser avaliados por métodos estatísticos apropriados, como o cálculo de uma regressão linear usando o método dos mínimos quadrados. Para o estabelecimento da linearidade, um mínimo de 5 concentrações é recomendado (ICH, 2005).
- Faixa linear: corresponde ao intervalo entre a concentração inferior e superior do composto na amostra para o qual foi demonstrado que o procedimento analítico obteve precisão, exatidão e linearidade aceitáveis (ICH, 2005).
- Limite de detecção (LOD): representa a menor concentração de analito em uma amostra que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada como um valor exato (ICH, 2005).

- Limite de quantificação (LOQ): representa a menor concentração de analito em uma amostra que pode ser quantificada com precisão e exatidão aceitáveis (ICH, 2005).
- Especificidade: capacidade de avaliar, de forma inequívoca, o analito alvo na presença de substâncias, como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz (carboidratos, proteínas, pigmentos), que podem interferir na sua determinação em uma amostra complexa. Essas substâncias podem afetar a determinação ao atuar como o analito de interesse, produzindo um sinal indistinguível do sinal do analito, ou ao co-eluir com o analito, levando à supressão (diminuição) ou intensificação (aumento) do sinal. Portanto, a identidade de um sinal presumivelmente pertencente ao analito deve ser confirmada. A identidade pode ser confirmada comparando os resultados de amostras isentas do composto de interesse e os resultados de amostras contendo esse composto, sendo que, nesse caso, nenhum interferente deve eluir no tempo de retenção do composto de interesse, que deve estar bem separado dos demais compostos presentes na amostra (ICH, 2005).
- Robustez: capacidade de um procedimento analítico de permanecer inalterado por variações pequenas e deliberadas nas condições analíticas do método (pH, taxa de fluxo e composição da fase móvel, tempo de extração, idade e temperatura da coluna), fornecendo uma indicação de sua confiabilidade durante o uso normal. Essas condições devem ser controladas para garantir que a validade do método seja mantido sempre que usado (ICH, 2005).

Muitas diretrizes tentam harmonizar as definições necessárias para as características de validação e seus requisitos básicos, como o guia ICH (ICH, 2005), mas fornecem apenas uma base para a discussão geral dos parâmetros de validação, suas definições, cálculo e interpretação, e não se destinam a fornecer orientação sobre como realizar a validação (RAPOSO; IBELLI-BIANCO, 2020).

O Regulamento da Comissão da União Europeia (EU) No 519/2014 fornece critérios de aceitação específicos de métodos quantitativos para micotoxinas

reguladas (EUROPEAN COMMISSION, 2014). Nos Estados Unidos, critérios de desempenho de métodos analíticos para a detecção de contaminantes de alimentos (incluindo, mas não limitado a micotoxinas) são estabelecidos pelo FDA (FDA, 2019).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Reagentes e produtos químicos

A água foi purificada em um sistema Millipore Milli-Q Plus (Molsheim, França). A acetonitrila (ACN) grau LC foi adquirida da J.T.Baker (Phillipsburg, New Jersey, EUA). O acetato de amônio grau LC foi adquirido da Sigma-Aldrich (Alemanha) e o ácido acético, o sulfato de magnésio hepta-hidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) e o cloreto de sódio (NaCl) foram fornecidos pela Panreac Quimica S.A. (Barcelona, Espanha). O sorbente octadecil (C18) era da Macherey-Nagel (Duren, Alemanha). Os padrões analíticos foram adquiridos da Sigma-Aldrich (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha). Soluções estoque de cada micotoxina foram preparadas em ACN nas seguintes concentrações: AFB1 ($1 \mu\text{g mL}^{-1}$), AFB2 ($0.3 \mu\text{g mL}^{-1}$), AFG1 ($1 \mu\text{g mL}^{-1}$), AFG2 ($0.3 \mu\text{g mL}^{-1}$), BEA ($500 \mu\text{g mL}^{-1}$), DON ($200 \mu\text{g mL}^{-1}$), ENA ($200 \mu\text{g mL}^{-1}$), ENA1 ($200 \mu\text{g mL}^{-1}$), ENB ($200 \mu\text{g mL}^{-1}$), ENB1 ($200 \mu\text{g mL}^{-1}$), FB1 ($200 \mu\text{g mL}^{-1}$), HT-2 toxin ($500 \mu\text{g mL}^{-1}$), T-2 toxin ($200 \mu\text{g mL}^{-1}$), MON ($200 \mu\text{g mL}^{-1}$), OTA ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$), STG ($200 \mu\text{g mL}^{-1}$), ZEA ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$).

3.2 Amostras

As amostras foram coletadas entre fevereiro e junho de 2018. O malte de cevada Pilsen proveniente da Alemanha moído foi adquirido em uma loja de suprimentos de cerveja artesanal na cidade de Porto Alegre, Brasil. O malte foi utilizado para a produção de cerveja artesanal Ale no Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos (ICTA) da UFRGS. Tanto o malte quanto a cerveja produzida foram utilizados para a construção das curvas por MMC. Foram analisadas também 44 amostras de cerveja comerciais de diferentes marcas, lotes e estilos, conforme descrito na Tabela 2, obtidas em supermercados locais ou doadas pelos fabricantes.

Tabela 2 - Amostras de cerveja artesanal analisadas pelo método QuEChERS-LC-QToF-MS quanto à ocorrência de 17 micotoxinas legisladas (AFB1, AFB2, AFG1, AFG2, OTA, DON, ZEA, FB1, T-2 e HT-2) e micotoxinas emergentes (BEA, MON, STG, ENA, ENB, ENA1 e ENB1).

Marca	Quantidade (lotes diferentes)	Álcool (%)	Ingredientes
Pilsen			
A	6 garrafas (600 mL)	4,5	Água, malte, lúpulo e levedura
B	2 garrafas (600 mL)	5,0	Água, malte, lúpulo e levedura
C	1 garrafa (600 mL)	5,0	Água, malte e lúpulo
Weiss			
A	6 garrafas (600 mL)	4,8	Água, malte de cevada, malte de trigo, lúpulo e levedura
B	2 garrafas (600 mL)	5,0	Água, malte, lúpulo e levedura
Kolsch			
D	2 garrafas (500 mL)	4,7	Água, malte, lúpulo e levedura
American Lager			
D	2 garrafas (500 mL)	5,1	Água, malte, lúpulo e levedura
E	1 lata (350 mL)	5,0	Água, malte, cereais não maltados e lúpulo
F	2 garrafas (500 mL)	5,1	Água, malte, lúpulo e levedura
Pale Ale			
D	2 garrafas (500 mL)	5,4	Água, malte, lúpulo e levedura
G	2 garrafas (500 mL)	5,4	Água, malte, lúpulo e levedura
Hop Raughbier			
D	2 garrafas (500 mL)	7,0	Água, malte, lúpulo e levedura
IPA			
D	2 garrafas (500 mL)	7,2	Água, malte, lúpulo e levedura
C	2 garrafas (500 mL)	7,2	Água, malte, lúpulo e levedura
Red Ale			
D	2 garrafas (500 mL)	4,2	Água, malte, lúpulo e levedura
Helles			
B	2 garrafas (600 mL)	4,7	Água, malte, lúpulo e levedura
American IPA			
B	2 garrafas (600 mL)	5,5	Água, malte, lúpulo e levedura
Bock			
B	2 garrafas (600 mL)	6,0	Água, malte, lúpulo e levedura
Brown Ale			
F	1 garrafa (500 mL)	6,5	Água, malte, cereais não maltados, lúpulo e levedura
Lager Premium			
G	1 lata (350 mL)	5,0	Água, malte e lúpulo

3.3 Extração das micotoxinas do malte e cerveja

O procedimento seguido na extração das amostras foi adaptado de Habler e Rychlik (2016) e Juan et al. (2017).

Para o malte, 5 g de amostra foram pesados e colocados em um tubo falcon de 50 mL contendo 2 g de MgSO₄.7H₂O e 1 g de NaCl. Foram adicionados 15 mL de solvente de extração composto por acetonitrila/água Milli-Q (75:25, v/v). A mistura foi

agitada por 1 min e sonicada por 3 min seguido por centrifugação por 6 min a 3000 g. O sobrenadante foi submetido à d-SPE em um tubo contendo 450 mg de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e 150 mg de C18, agitado por 1 min e centrifugado por 5 min a 3000 g.

Para cerveja, 5 mL de cerveja Ale desgaseificada e 5 mL de acetonitrila foram adicionados a um tubo de 15 mL contendo 2 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e 1 g de NaCl. A mistura foi agitada por 1 min e sonicada por 3 min antes de sua centrifugação por 5 min a 3000 g. Em seguida, o sobrenadante foi coletado e submetido à d-SPE com 450 mg de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e 150 mg de C18, agitado por 1 min e centrifugado novamente por 5 min a 3000 g. Finalmente, os extratos orgânicos foram evaporados até a secura em um rotaevaporador a 40 °C, reconstituídos com 250 μL de fase móvel e filtrados através de um filtro de seringa de politetrafluoroetileno (PTFE, do inglês: *polytetrafluoroethylene*) de 13 mm/0,22 μm (Cobetter Filtration, Hangzhou, China).

3.4 Determinação das micotoxinas usando LC-QToF-MS

As análises foram realizadas usando um cromatógrafo líquido (Shimadzu, Kyoto, Japão) acoplado a um espectrômetro de massas contendo uma fonte de ionização electrospray (ESI) e um analisador de massas do tipo quadrupolo-tempo de voo (Bruker Daltonics, modelo micrOTOF-Q III, Bremen, Alemanha). As micotoxinas foram separadas usando coluna C18 de 100 \times 2,1 mm de diâmetro interno (Kinetex Core-Shell Technology 2.6 μm F5 100 A, EUA) a 35 °C, taxa de fluxo de 0,4 mL min^{-1} usando água ultrapura (fase A) e acetonitrila (fase B) como fase móvel. Ambas as fases continham ácido acético 0,1% e acetato de amônio 4 mM em um gradiente linear de 60:40 a 44,6:55,4 em 4 minutos, a 63:37 em 9 minutos, a 80:20 em 14 minutos e a 40:60 em 19 minutos das fases móveis orgânica e aquosa, respectivamente. O tempo total de corrida foi de 20 minutos.

O espectrômetro de massas foi operado no modo de monitoramento de reação múltipla (MRM, do inglês: *multiple reaction-monitoring*) e modo de varredura completa para a identificação e quantificação das micotoxinas, respectivamente. Em MS, a voltagem capilar foi de 3,5 kV, a temperatura da fonte foi 120 °C e a temperatura de dessolvatação foi 400 °C. As soluções padrão das micotoxinas foram avaliadas no modo ESI positivo e negativo.

3.5 Avaliação do efeito de matriz

As curvas de calibração para cada analito foram preparadas em fase móvel (A e B, 50:50, v/v) e utilizando a MMC (branco das amostras de malte e cerveja). Uma injeção prévia do branco das amostras de malte e cerveja a serem usadas para construir as curvas de MMC foi feita para garantir que elas não tivessem nenhum dos compostos estudados. As curvas foram construídas em cinco níveis de concentração para cada micotoxina.

A supressão/intensificação do sinal (SSE) causada pelo efeito de matriz foi calculada de acordo com a equação:

$$\text{SSE} = 100 \times \frac{A}{B}$$

em que, A: declive da curva analítica feita na matriz (malte ou cerveja) e B: declive da curva feita na fase móvel.

3.6 Validação do método

Os parâmetros de validação do método, incluindo linearidade, recuperação, precisão intermediária, repetibilidade, limites de quantificação (LOQ) e detecção (LOD), foram avaliados de acordo com a Conferência Internacional de Harmonização (ICH) (ICH, 2005). A linearidade foi avaliada por meio do coeficiente de determinação (R^2) das curvas analíticas. O limite de detecção (LOD) e o limite de quantificação (LOQ) foram determinados comparando os sinais cromatográficos das amostras contendo baixas concentrações conhecidas dos analitos com as de amostras em branco e estabelecendo a concentração mínima na qual o analito pode ser detectado e quantificado com segurança, respectivamente. Uma relação sinal-ruído de 3:1 e 10:1 foi considerada para obter LOD e LOQ, respectivamente. As concentrações mais baixa, intermediária e mais alta da curva analítica de cada composto foram usadas para determinar a recuperação, repetibilidade e precisão intermediária. A precisão intermediária e a repetibilidade foram calculadas como o desvio padrão relativo (RSD) de quatro análises realizadas em quatro dias diferentes ($n=16$) e quatro análises realizadas no mesmo dia ($n=4$), respectivamente.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados apresentados a seguir foram publicados no periódico *Food Chemistry* com classificação Qualis A1 (Ciência de Alimentos) (LAGO *et al.*, 2021).

4.1 Desempenho do método QuEChERS-LC-QToF-MS

A Tabela 3 apresenta a fórmula molecular, Log P, tempo de retenção, razão massa/carga (m/z) dos íons precursores e produtos das micotoxinas analisadas por LC-QToF-MS.

Tabela 3 - Fórmula molecular, Log P, tempo de retenção, razão massa/carga (m/z) dos íons precursores e produtos das micotoxinas analisadas por LC-QToF-MS

Micotoxina	Fórmula molecular	Log P ^a	Tempo de retenção (min) ^b	Íon precursor m/z e modo	Íons produtos m/z
MON	C ₄ H ₂ O ₃	-0,21	0,8	96,9925 [M-H] ⁻	ND ^c
DON	C ₁₅ H ₂₀ O ₆	-0,76	1,0	355,1392 [M+C ₂ H ₃ O ₂] ⁻	295; 265
FB1	C ₃₄ H ₅₉ NO ₁₅	-0,81	1,1	722,3962 [M+H] ⁺	352; 334
AFG2	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	1,59	1,4	331,0817 [M+H] ⁺	311
AFB2	C ₁₇ H ₁₄ O ₆	1,63	1,5	315,0868 [M+H] ⁺	287
HT-2	C ₂₂ H ₃₂ O ₈	1,32	1,5	442,2440 [M+NH ₄] ⁺	263; 215
AFG1	C ₁₇ H ₁₂ O ₇	1,81	1,6	329,0661 [M+H] ⁺	311
AFB1	C ₁₇ H ₁₂ O ₆	1,73	1,7	313,0712 [M+H] ⁺	285
OTA	C ₂₀ H ₁₈ ClNO ₆	3,18	2,3	404,0900 [M+H] ⁺	257; 239
T-2	C ₂₄ H ₃₄ O ₉	1,95	2,7	484,2546 [M+NH ₄] ⁺	305; 215
ZEA	C ₁₈ H ₂₂ O ₅	3,04	4,0	317,1389 [M-H] ⁻	175; 131
STG	C ₁₈ H ₁₂ O ₆	2,73	5,2	325,0712 [M+H] ⁺	310; 281
ENB	C ₃₃ H ₅₇ N ₃ O ₉	3,81	10,5	657,4438 [M+NH ₄] ⁺	214; 196
ENB1	C ₃₄ H ₅₉ N ₃ O ₉	4,06	11,1	671,4595 [M+NH ₄] ⁺	214; 196
ENA1	C ₃₅ H ₆₁ N ₃ O ₉	4,39	11,6	685,4751 [M+NH ₄] ⁺	328; 210
BEA	C ₄₅ H ₅₇ N ₃ O ₉	5,25	12,1	801,4438 [M+NH ₄] ⁺	244; 134
ENA	C ₃₆ H ₆₃ N ₃ O ₉	4,60	12,3	699,4908 [M+NH ₄] ⁺	328; 210

^a Log P é definido como a razão entre a concentração de um composto na fase de octanol e sua concentração na fase aquosa de um sistema octanol/água de duas fases e é usado para prever a lipofilicidade ou hidrofobicidade dos compostos. Os valores de Log P foram calculados usando o software online interativo ALOGPS 2.1. ^b Tempo de eluição em coluna C18 e solvente: gradiente de água e acetonitrila com 0,1% de ácido acético e 4 mM de acetato de amônio. ^c ND: não detectado.

AFB1, AFB2, AFG1, AFG2, BEA, ENA, ENA1, ENB, ENB1, FB1, toxina HT-2, toxina T-2, OTA e STG foram detectadas no modo ESI positivo, enquanto MON, DON e ZEA foram avaliados no modo ESI negativo. BEA, ENA, ENA1, ENB, ENB1, HT-2 e T-2 formaram aduto com o íon amônio [M+NH₄]⁺, enquanto DON foi

encontrado ligado ao íon acetato $[M+C_2H_3O_2]^-$. As outras micotoxinas foram detectadas na forma protonada $[M+H]^+$ ou desprotonada $[M-H]^-$. O apêndice A apresenta o padrão de fragmentação das micotoxinas analisadas em LC-QToF-MS.

O desempenho analítico do método multi-micotoxinas é apresentado na Tabela 4.

Tabela 4 - Desempenho do método baseado na calibração por superposição de matriz (MMC) e cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas com analisador quadrupolo-tempo de voo (LC-QToF-MS) usado para determinar dezessete micotoxinas (legisladas e emergentes) em malte e cerveja.

Analito	Faixa de conc. ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Matriz	Equação de regressão	R^{2a}	SSE (%) ^b	LOD ($\mu\text{g kg}^{-1}$) ^c	LOQ ($\mu\text{g kg}^{-1}$) ^d	Conc. ($\mu\text{g kg}^{-1}$) ^e	Rec. (%) ^f	Repe. – RSD (%) ^g	Prec. inter – RSD (%) ^h				
MON	15 - 3000	Malte	$y = 14x + 28709$	0,99189	29	5	15	15	72	5,4	6,6				
								1000	78	1,6	4,5				
	3000	79	1,0	5,0	15	5	15	15	73	9,0	9,9				
								1000	80	1,0	6,0				
2500	83	1,1	5,5	10				76	6,5	8,0					
500	73	1,5	2,8												
DON	10 - 1000	Malte	$y = 250x + 904$	0,99795	32	2,5	10	1000	79	1,2	4,0				
								5	73	6,0	9,8				
	5 - 1000	Cerveja	$y = 42x + 39798$	0,99665	15	1,0	5	500	75	3,3	8,2				
								1000	81	1,3	5,2				
FB1	50 - 500	Malte	$y = 252x - 59079$	0,99048	79	15	50	50	79	6,8	9,5				
								200	75	2,0	2,5				
	500	79	5,5	9,0	50	15	50	50	78	6,0	8,7				
								200	74	5,4	9,0				
AFG2	0,25 - 50	Malte	$y = 6914x - 4118,40$	0,99935	79	0,05	0,25	500	79	4,5	5,9				
								0,25	90	6,9	9,0				
	10	91	6,4	8,0	0,25	0,05	0,25	50	93	5,0	6,6				
								0,25	92	6,9	8,0				
AFB2	0,25 - 50	Malte	$y = 8281x + 37425$	0,99471	90	0,05	0,25	10	90	5,5	8,6				
								50	95	6,0	7,5				
	0,25	95	7,1	8,2	0,25	0,05	0,25	10	98	5,0	6,6				
								50	95	5,9	5,5				
0,25 - 50	Cerveja	$y = 9709x + 18126$	0,99892	77	0,05	0,25	0,25	96	2,4	3,9					
							10	95	1,5	8,1					
50	96	4,5	9,2	AFG1	0,25 - 50	Malte	$y = 7000x + 31$	0,99357	68	0,05	0,25	0,25	93	8,0	8,1

								12,5	97	5,5	7,0
								50	95	5,3	7,2
	0,25 - 50	Cerveja	$y = 5659x + 5533$	0,99874	66	0,05	0,25	0,25	95	5,0	7,0
								12,5	93	2,5	7,7
								50	96	4,5	4,5
AFB1	0,25 - 100	Malte	$y = 10856x - 7347$	0,99922	73	0,15	0,25	0,25	93	5,4	4,2
								25	98	3,3	5
								100	95	6,8	5,3
	0,25 - 100	Cerveja	$y = 9865x - 6899$	0,99918	69	0,15	0,25	0,25	96	6,0	4,5
								25	96	3,6	9,6
								100	97	6,5	7,8
OTA	0,125 - 20	Malte	$y = 95114x + 3331$	0,99602	85	0,05	0,125	0,125	95	7,0	5,9
								2,5	99	4,5	9
								20	97	4,0	6,5
	0,25 - 20	Cerveja	$y = 79882x - 20105$	0,99527	80	0,10	0,25	0,25	95	6,2	8,5
								5	92	6,5	8,1
								20	96	6,0	7,9
HT-2	50 - 2000	Malte	$y = 679x - 108888$	0,98771	95	2,0	5	50	90	6,8	6,2
								1250	89	2,1	5,2
								2000	93	2,0	4,4
	50 - 2000	Cerveja	$y = 724x - 121430$	0,98607	94	2,5	5	50	92	8,1	8,9
								1250	90	3,8	6,3
								2000	95	1,3	5,1
T-2	50 - 1500	Malte	$y = 8372x - 944800$	0,99254	98	1,5	5	50	90	8,5	8,0
								625	91	1,2	3,8
								1500	95	2,4	5,0
	50 - 1500	Cerveja	$y = 10865x - 1387991$	0,99003	94	1,5	5	50	90	5,7	7,0
								625	90	1,3	5,7
								1500	95	2,6	3,1
ZEA	0,25 - 250	Malte	$y = 19480x + 486932$	0,99786	165	0,10	0,25	0,25	90	2,3	6,0
								25	91	6,2	7,5
								250	90	5,5	5,0
	0,125 - 375	Cerveja	$y = 21093x + 113257$	0,99933	120	0,05	0,125	0,125	92	4,5	5,5
								50	90	3,2	9,7
								375	90	2,5	3,0
STG	12,5 - 1800	Malte	$y = 6665x - 135409$	0,99750	86	5,0	12,5	12,5	91	6,0	5,4
								125	90	6,5	6,6

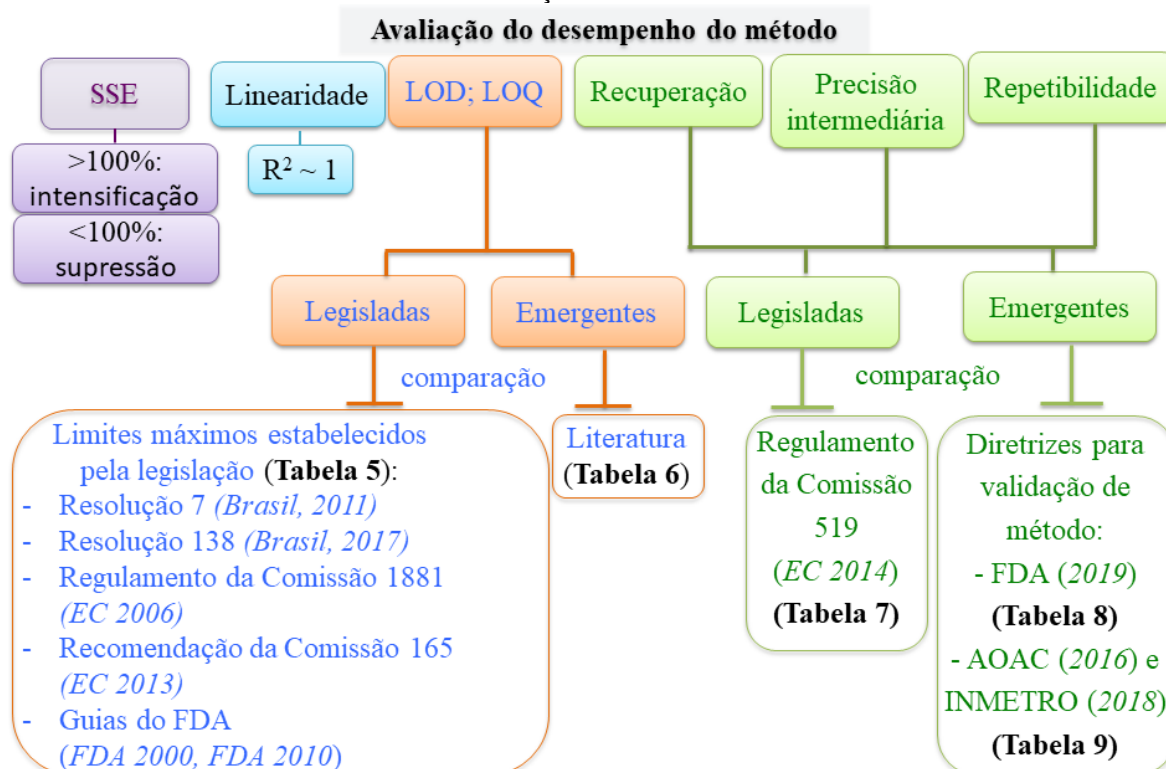
								1800	96	2,8	6,3
								25	95	6,0	6,8
	25 -2000	Cerveja	$y = 5551x - 211365$	0,99840	82	5	12,5	1000	96	4,2	5,2
								2000	97	1,5	4,4
								2,5	96	3,0	5,2
	2,5 - 250	Malte	$y = 88687x + 27435$	0,99506	70	0,5	2,5	62,5	95	2,8	3,3
								250	92	3,6	5,2
ENB								0,05	96	4,2	3,5
	2,5 - 250	Cerveja	$y = 74274x + 86235$	0,99153	66	0,01	0,05	62,5	97	5,5	6,4
								250	98	5,3	6,8
								0,05	95	6,3	6,6
	0,05 - 250	Malte	$y = 90074x + 104628$	0,99072	96	0,01	0,05	62,5	93	3,3	3,5
								250	99	2,6	2,9
ENB1								0,05	99	3,0	7,0
	0,1 - 250	Cerveja	$y = 69492x + 59126$	0,99845	56	0,01	0,05	62,5	96	6,0	7,5
								250	91	5,8	6,6
								0,125	98	3,2	5,1
	0,125 - 100	Malte	$y = 54527x + 20653$	0,99917	105	0,025	0,125	5	102	2,8	6,0
								100	99	1,0	5,5
BEA								0,125	98	2,0	3,5
	0,125 - 100	Cerveja	$y = 51054x + 65683$	0,9921	105	0,025	0,125	5	100	1,2	9,1
								100	99	5,8	2,5
								1,25	95	6,8	8,2
	1,25 - 250	Malte	$y = 61795x - 597829$	0,99418	87	0,5	1,25	25	99	5,2	9,5
								250	96	5,0	9,1
ENA1								0,05	90	5,5	9,2
	1,25 - 250	Cerveja	$y = 61103x - 526397$	0,99898	71	0,01	0,05	25	92	4,5	6,6
								250	98	9,2	9,0
								0,05	99	7,0	5,5
	0,05 - 250	Malte	$y = 32570x + 85502$	0,99959	88	0,01	0,05	50	96	7,8	9,0
								250	90	5,4	6,7
ENA								0,05	92	5,4	6,7
	0,05 - 250	Cerveja	$y = 39228x + 99096$	0,99879	80	0,01	0,05	50	97	5,0	5,5
								250	95	6,8	7,0

^a Coeficiente de determinação; ^b SSE: supressão/intensificação do sinal; ^c LOD: limite de detecção; ^d LOQ: limite de quantificação; ^e Concentração; ^f Porcentagem de recuperação; ^g Repetibilidade: quatro análises realizadas no mesmo dia, n=4; ^h Precisão intermediária: quatro análises realizadas em quatro dias diferentes, n=16.

De acordo com a Tabela 4, BEA (SSE: 105% para malte e cerveja) e ZEA (SSE: 165 e 120% para malte e cerveja, respectivamente) foram as únicas micotoxinas que exibiram intensificação do sinal na análise por MS. Os sinais de micotoxinas polares como DON (SSE de 32 e 15% para malte e cerveja, respectivamente) e MON (SSE de 29 e 15% para malte e cerveja, respectivamente) foram altamente suprimidos. Para as outras micotoxinas, a supressão do sinal variou de 68 a 98% e 64 a 94% para malte e cerveja, respectivamente. Portanto, o uso da MMC é importante para evitar a quantificação imprecisa dos analitos. As curvas analíticas obtidas com MMC apresentaram linearidade aceitável com coeficientes de determinação (R^2) superiores a 0,99 para malte e cerveja. Porcentagens de recuperação aceitáveis foram obtidas para todas as micotoxinas variando de 72% a 102% para o malte e de 73% a 100% para a cerveja (Tabela 4), refletindo a exatidão do método proposto. Os valores de LOD e LOQ mostraram que o método é suficientemente sensível para determinar as 17 micotoxinas nessas matrizes (Tabela 4).

Os critérios usados para avaliar o método proposto foram resumidos na Figura 2, considerando diferentes legislações, dados da literatura e guias para validação do método.

Figura 2 - Visão geral dos critérios usados para avaliar o método proposto em relação às micotoxinas legisladas e emergentes, considerando diferentes legislações, dados da literatura e guias para validação do método



A Tabela 5 mostra a comparação do LOD e LOQ obtidos no método LC-QToF-MS aqui proposto com os limites máximos estabelecidos pela legislação para micotoxinas em produtos de cereais (FDA, 2000; EUROPEAN COMMISSION, 2006; EUROPEAN COMMISSION, 2007; FDA, 2010; BRASIL, 2011; EUROPEAN COMMISSION, 2013; BRASIL, 2017).

Tabela 5 - Legislação estabelecida para micotoxinas em produtos de cereais para consumo humano pela Comissão Europeia, Brasil e FDA, em que malte e/ou cerveja podem ser enquadrados e os limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) obtidos no método LC-QToF-MS proposto.

Micotoxina	Legislação	Descrição	Enquadramento de malte ou cerveja nos parâmetros da legislação	Nível máximo estabelecido pela legislação ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	LOD e LOQ ($\mu\text{g kg}^{-1}$) do método LC-QToF-MS proposto
Aflatoxinas	European Commission (2006)	Todos os cereais e todos os produtos derivados de cereais, incluindo produtos processados de cereais	malte (de qualquer cereal) e cerveja	AFB1: 2 Soma de B1, B2, G1 e G2: 4	Malte LOD: AFB1: 0,15 AFB2, AFG1, AFG2: 0,05 LOQ
	European Commission (2006)	Milho que sera submetido à triagem ou outro tratamento físico antes do consumo humano ou usado como ingrediente em alimentos	milho maltado	AFB1: 5 Soma de B1, B2, G1 e G2: 10	AFB1, AFB2, AFG1, AFG2: 0,25 Cerveja LOD
	Brasil (2011)	Cereais e produtos de cereais (incluindo cevada maltada)	malte (de qualquer cereal) e cerveja	Soma de B1, B2, G1 e G2: 5	AFB1: 0,15 AFB2, AFG1, AFG2: 0,05 LOQ
	FDA (2000)	Todos os alimentos destinados ao consumo humano, exceto leite	malte (de qualquer cereal)	Soma de B1, B2, G1 e G2: 20	AFB1, AFB2, AFG1, AFG2: 0,25
Ocratoxina A (OTA)	European Commission (2006)	Todos os produtos derivados de cereais não processados, incluindo produtos de cereais processados e cereais destinados ao consumo humano direto	malte (de qualquer cereal) e cerveja	3	Malte LOD: 0,05 LOQ: 0,125 Cerveja LOD: 0,10 LOQ: 0,25
	Brasil (2011)	Cereais e produtos de cereais (incluindo cevada maltada)	malte (de qualquer cereal) e cerveja	10	
Desoxinivalenol (DON)	European Commission (2006)	Alimentos processados à base de cereais	malte (de qualquer cereal)	200	Malte LOD: 2,5 LOQ: 10
	Brasil (2017)	Cereais e produtos de cereais (incluindo cevada maltada)	malte (de qualquer cereal) e cerveja	750	Cerveja LOD: 1,0 LOQ: 5,0
	Brasil (2017)	Trigo e derivados	trigo maltado	1000	
	FDA (2010)	Bagaço de malte	malte (de qualquer cereal)	30000	
Zearalenona (ZEA)	European Commission (2006)	Alimentos processados à base de cereais	malte (de qualquer cereal)	20	Malte LOD: 0,10 LOQ: 0,25

	Brasil (2017)	Cereais e produtos de cereais (incluindo cevada maltada)	malte (de qualquer cereal) e cerveja	100	Cerveja LOD: 0,05
	Brasil (2017)	Trigo e derivados	trigo maltado	200	LOQ: 0,125
Fumonisinas (FMs)	Brasil (2017)	Produtos de milho	milho maltado e cerveja	Soma de B1 e B2: 1000	Malte LOD: 15 LOQ: 50
	European Commission (2007)	Alimentos processados à base de milho	milho maltado	Soma de B1 e B2: 200	Cerveja LOD: 15 LOQ: 50
Toxinas HT-2 e T-2	European Commission (2013)	Cevada (incluindo cevada para malte) e milho	cevada para malte	Soma de HT-2 e T-2: 200	Malte LOD HT-2: 2,0 LOD T-2: 1,5 LOQ HT-2 e T-2: 5,0
					Cerveja LOD HT-2: 2,5 LOD T-2: 1,5 LOQ HT-2 e T-2: 5,0

Fonte: FDA (2000); European Commission (2006); European Commission (2007); FDA (2010); Brasil (2011); European Commission (2013); Brasil (2017).

Os valores de LOD ou LOQ ficaram entre 8 e 67 vezes menores do que o valor estabelecido como limite máximo permitido pela legislação para as diferentes micotoxinas (Tabela 5). Por exemplo, o LOQ ($0,25 \mu\text{g kg}^{-1}$) obtido para AFB1 foi 8 vezes menor do que o valor estabelecido como limite máximo permitido para esta micotoxina nos produtos de cereais ($2 \mu\text{g kg}^{-1}$) (EUROPEAN COMMISSION, 2006; BRASIL, 2011). O LOD obtido para FB1 ($15 \mu\text{g kg}^{-1}$) foi 67 vezes inferior ao limite máximo estabelecido pela legislação ($1000 \mu\text{g kg}^{-1}$) (BRASIL, 2017).

É importante mencionar ainda que o LOQ para T-2 e HT-2 individualmente não deve ser superior a $5 \mu\text{g kg}^{-1}$ conforme estabelecido pela Comissão Europeia (EUROPEAN COMMISSION, 2013). Essa especificação foi alcançada com o método proposto, no qual foi obtido LOQ de $5 \mu\text{g kg}^{-1}$ para essas toxinas tanto no malte quanto na cerveja.

A Tabela 6 apresenta a comparação detalhada entre o método proposto no presente trabalho com outros métodos relatados na literatura para a determinação de micotoxinas em malte (listadas na primeira parte) e cerveja (na segunda parte da Tabela 6).

Tabela 6 - Visão geral dos métodos da literatura usados para análise de micotoxinas em malte e cerveja, a fim de comparar com o método QuEChERS-LC-QToF-MS proposto (destacado em fonte azul) validado para 17 micotoxinas usando calibração por superposição de matriz (MMC) e com tempo de análise instrumental de 20 min (média de 1,2 min para cada micotoxina). Uma abrangente revisão da literatura foi realizada considerando dados de 2010 a 2020 utilizando Google Scholar, Scopus e PubMed e as seguintes palavras-chave: "malted", "malt", "beer", "multi-mycotoxin", "multiple mycotoxin", "simultaneous analysis".

Analito	Método ^a	Preparação da amostra ^b	Número de micotoxinas e abordagem [Referência] ^c	Estratégia usada para corrigir o efeito da matriz ^d	Tempo (min) de análise instrumental; para cada toxina ^e	LOD; LOQ ($\mu\text{g kg}^{-1}$) ^f
MALTE						
Legisladas						
DON	LC-HRMS cevada para malte	QuEChERS	34 (toxinas de <i>Fusarium</i> + alternariol, alternariol metil éter + OTA + STG + ácido micofenólico + alcaloides de ergot) [Beccari et al., 2016]	MMC e IS (¹³ C-padrão marcado)	37,5; 1,1	2; 6,7
	LC-QTrapMS	SPE	14 (toxinas de <i>Fusarium</i>) [Habler e Rychlik, 2016]	IS (¹³ C-padrão marcado)	35; 2,5	0,9; 2,6
	LC-ToFMS	IAC	5 (tricotecenos) [Ksieniewicz-Wozniak et al., 2019]	MMC	28; 5,6	5; 17
	LC-QTrapMS	IAC	18 tricotecenos [Barthel et al., 2012]	IS (¹³ C-padrões marcados de apenas 3 toxinas)	35; 2,0	0,092; 0,31 2,5; 10
FB1	LC-HRMS cevada para malte	QuEChERS	34 (toxinas de <i>Fusarium</i> + alternariol, alternariol metil éter + OTA + STG + ácido micofenólico + alcaloides de ergot) [Beccari et al., 2016]	MMC e IS (¹³ C-padrão marcado)	37,5; 1,1	30; 100 15; 50
AFG2 AFB2 AFG1 AFB1	LC-ITMS	IAC	4 (AFB1, B2, G1 e G2) [Benesová et al., 2012]	MMC	NI	0,12; 0,39 0,08; 0,26 0,08; 0,25 0,04; 0,13 0,15; 0,25 (para todas as AFs)
OTA	LC-HRMS cevada para malte	QuEChERS	34 (toxinas de <i>Fusarium</i> + alternariol, alternariol metil éter + OTA + STG + ácido micofenólico + alcaloides de ergot) [Beccari et al., 2016]	MMC e IS (¹³ C-padrão marcado)	37,5; 1,1	4; 13 0,05; 0,125
HT-2	LC-HRMS	QuEChERS	34 (toxinas de <i>Fusarium</i> + alternariol,	MMC e IS (¹³ C-	37,5; 1,1	2,0; 6,7

	cevada para malte		alternariol metil éter + OTA + STG + ácido micofenólico + alcaloides de ergot) [Beccari et al., 2016]	micotoxinas marcadas)		
	LC-QTrapMS	SPE	14 (toxinas de <i>Fusarium</i>) [Habler e Rychlik, 2016]	IS (¹³ C-padrão marcado)	35; 2,5	0,1; 0,2
	LC-QMS	IAC	18 tricotecenos [Barthel et al., 2012]	IS (¹³ C-padrões marcados de apenas 3 toxinas)	35; 2,0	0,32; 1,1 2,0; 5,0
	LC-HRMS cevada para malte	QuEChERS	34 (toxinas de <i>Fusarium</i> + alternariol, alternariol metil éter + OTA + STG + ácido micofenólico + alcaloides de ergot) [Beccari et al., 2016]	MMC e IS (¹³ C-padrão marcado)	37,5; 1,1	4,0; 13
T-2	LC-QTrapMS	SPE	14 (toxinas de <i>Fusarium</i>) [Habler e Rychlik, 2016]	IS (¹³ C-padrão marcado)	35; 2,5	0,2; 0,5
	LC-QMS	IAC	18 tricotecenos [Barthel et al., 2012]	IS (¹³ C-padrões marcados de apenas 3 toxinas)	35; 2,0	0,20; 0,66 1,5; 5,0
ZEA	LC-HRMS cevada para malte	QuEChERS	34 (toxinas de <i>Fusarium</i> + alternariol, alternariol metil éter + OTA + STG + ácido micofenólico + alcaloides de ergot) [Beccari et al., 2016]	MMC e IS (¹³ C-micotoxinas marcadas)	37,5; 1,1	0,8; 2,7
	LC-QTrapMS	SPE	14 (toxinas de <i>Fusarium</i>) [Habler e Rychlik, 2016]	MMC (amido de batata)	27; 2,0	0,5; 1,5 0,10; 0,25
Emergentes						
MON	LC-HRMS cevada para malte	QuEChERS	34 (toxinas de <i>Fusarium</i> + alternariol, alternariol metil éter + OTA + STG + ácido micofenólico + alcaloides de ergot) [Beccari et al., 2016]	MMC	37,5; 1,1	30; 100 5; 15
STG	LC-HRMS cevada para malte	QuEChERS	34 (toxinas de <i>Fusarium</i> + alternariol, alternariol metil éter + OTA + STG + ácido micofenólico + alcaloides de ergot) [Beccari et al., 2016]	MMC	37,5; 1,1	8; 27 5,0; 12,5
ENB	LC-HRMS cevada para malte	QuEChERS	34 (toxinas de <i>Fusarium</i> + alternariol, alternariol metil éter + OTA + STG + ácido micofenólico + alcaloides de ergot) [Beccari et al., 2016]	MMC	37,5; 1,1	8; 27
	LC-QTrapMS	SPE	14 (toxinas de <i>Fusarium</i>) [Habler e Rychlik, 2016]	IS (¹⁵ N-padrão marcado)	35; 2,5	0,7; 2,1 0,5; 2,5

ENB1	LC-HRMS cevada para malte	QuEChERS	34 (toxinas de <i>Fusarium</i> + alternariol, alternariol metil éter + OTA + STG + ácido micofenólico + alcaloides de ergot) [Beccari et al., 2016]	MMC	37,5; 1,1	10; 33
	LC-QTrap MS	SPE	14 (toxinas de <i>Fusarium</i>) [Habler e Rychlik, 2016]	IS (¹⁵ N-padrão marcado)	35; 2,5	1,3; 3,9 0,01; 0,05
BEA	LC-HRMS cevada para malte	QuEChERS	34 (toxinas de <i>Fusarium</i> + alternariol, alternariol metil éter + OTA + STG + ácido micofenólico + alcaloides de ergot) [Beccari et al., 2016]	MMC	37,5; 1,1	10; 33
	LC- QTrapMS	SPE	14 (toxinas de <i>Fusarium</i>) [Habler e Rychlik, 2016]	IS (¹⁵ N-padrão marcado)	35; 2,5	0,3; 0,7 0,025; 0,125
ENA1	LC-HRMS cevada para malte	QuEChERS	34 (toxinas de <i>Fusarium</i> + alternariol, alternariol metil éter + OTA + STG + ácido micofenólico + alcaloides de ergot) [Beccari et al., 2016]	MMC	37,5; 1,1	8; 27
	LC- QTrapMS	SPE	14 (toxinas de <i>Fusarium</i>) [Habler e Rychlik, 2016]	IS (¹⁵ N-padrão marcado)	35; 2,5	1,4; 4,1 0,5; 1,25
ENA	LC-HRMS cevada para malte	QuEChERS	34 (toxinas de <i>Fusarium</i> + alternariol, alternariol metil éter + OTA + STG + ácido micofenólico + alcaloides de ergot) [Beccari et al., 2016]	MMC	37,5; 1,1	8; 27
	LC- QTrapMS	SPE	14 (toxinas de <i>Fusarium</i>) [Habler e Rychlik, 2016]	IS (¹⁵ N-padrão marcado)	35; 2,5	1,1; 3,1 0,01; 0,05
CERVEJA						
Legisladas						
DON	LC-QMS	QuEChERS	22 (legisladas: DON, ZEA, FB1, AFs, OTA, T-2 e HT-2 + zearalenol + emergentes: ENs, MON, neosolaniol, formas modificadas de DON) [González-Jartín et al., 2019]	MMC	13; 0,6	1,48; 4,89
	LC- QTrapMS	SPE	8 (toxinas de <i>Fusarium</i>) [Habler et al., 2017]	IS (¹³ C- e ¹⁵ N-padrão marcado)	35; 4,4	3,0; 8,9
	GC-QMS	QuEChERS	14 (<i>Fusarium</i> toxins) [Rodríguez-Carrasco et al., 2015]	MMC	25; 1,8	0,05; 0,10
	LC-ToFMS	IAC	5 (tricotecenos) [Ksieniewicz-Wozniak et al., 2019]	MMC	28; 5,6	0,6; 2,1
	LC-ToFMS	QuEChERS	9 (legisladas: AFB1, OTA, HT-2, T-2, DON, ZEA, FB1 e FB2 + STG) [Bogdanova et al.,	MMC	14; 1,5	2,50; 8,33

2018]						
	LC-tandem quadropolo MS	MgSO ₄ e NaCl + centrifugação	23 (legisladas: AFB1, FB2, AFG1, AFG2, FB1, FB2, FB3, OTA, T2, HT-2, ZEA, DON + STG + roquefortina C + alternariol + alternariol monometil éter + neosolaniol + diacetoxiscirpenol + formas modificadas de DON [Wall-Martínez et al., 2019])	MMC	27,8; 1,2	51,76; 103,53
	LC-ToFMS	SPE	12 (legisladas: AFB1, OTA, DON, HT-2, T-2 e ZEA + BEA + ENA + ENA1 + ENB + ENB1 + STG [Rozentale, Bogdanova e Bartkevics, 2018])	MMC	13; 1,1	0,30; 0,99
	LC-tandem quadropolo MS	QuEChERS	15 (legisladas: AFB1, FFB2, AFG1, AFG2, DON, HT-2, T-2, ZEA, FB1, FB2, FB3 e OTA + AFM1 + PAT + NIV) [Tamura et al., 2011]	MMC	6,5; 0,43	NI; 5,0
					20; 1,2	1,0; 5
	LC-QMS	QuEChERS	22 (legisladas: DON, ZEA, FB1, AFs, OTA, T-2 e HT-2 + zearalenol + emergentes: ENs, MON, neosolaniol, formas modificadas de DON) [González-Jartín et al., 2019]	MMC	13; 0,6	1,36; 4,50
	LC-ToFMS	QuEChERS	9 (legisladas: AFB1, OTA, HT-2, T-2, DON, ZEA, FB1 e FB2 + STG) [Bogdanova et al., 2018]	MMC	14; 1,5	1,67; 5,56
FB1	LC-tandem quadropolo MS	MgSO ₄ e NaCl + centrifugação	23 (legisladas: AFB1, FB2, AFG1, AFG2, FB1, FB2, FB3, OTA, T2, HT-2, ZEA, DON + STG + roquefortina C + alternariol + alternariol monometil éter + neosolaniol + diacetoxiscirpenol + formas modificadas de DON [Wall-Martínez et al., 2019])	MMC	NI	42,77; 85,54
	LC-tandem quadropolo MS	QuEChERS	15 (legisladas: AFB1, FFB2, AFG1, AFG2, DON, HT-2, T-2, ZEA, FB1, FB2, FB3 e OTA + AFM1 + PAT + NIV) [Tamura et al., 2011]	MMC	6,5; 0,43	NI; 5,0
					20; 1,2	15; 50
	LC-QMS	QuEChERS	22 (legisladas: DON, ZEA, FB1, AFs, OTA, T-2 e HT-2 + zearalenol + emergentes: ENs, MON, neosolaniol, formas modificadas de DON) [González-Jartín et al., 2019]	MMC	13; 0,6	0,017; 0,058
AFG2	LC-tandem quadropolo MS	MgSO ₄ e NaCl + centrifugação	23 (legisladas: AFB1, FB2, AFG1, AFG2, FB1, FB2, FB3, OTA, T2, HT-2, ZEA, DON + STG + roquefortina C + alternariol + alternariol	MMC	NI	1,16; 2,23

			monometil éter + neosolaniol + diacetoxiscirpenol + formas modificadas de DON [Wall-Martínez et al., 2019]			
	LC-tandem quadrupolo MS	QuEChERS	15 (legisladas: AFB1, FFB2, AFG1, AFG2, DON, HT-2, T-2, ZEA, FB1, FB2, FB3 e OTA + AFM1 + PAT + NIV) [Tamura, Uyama e Mochizuki, 2011]	MMC	6,5; 0,43	NI; 0,25
	LC-ITMS	IAC	4 (AFB1, B2, G1 e G2) [Benesová et al., 2012]	MMC	NI	0,0047; 0,0152 0,05; 0,25
	LC-QMS	QuEChERS	22 (legisladas: DON, ZEA, FB1, AFs, OTA, T-2 e HT-2 + zearalenol + emergentes: ENs, MON, neosolaniol, formas modificadas de DON) [González-Jartín et al., 2019]	MMC	13; 0,6	0,013; 0,043
AFB2	LC-tandem quadrupolo MS	MgSO ₄ e NaCl + centrifugação	23 (legisladas: AFB1, FB2, AFG1, AFG2, FB1, FB2, FB3, OTA, T2, HT-2, ZEA, DON + STG + roquefortina C + alternariol + alternariol monometil éter + neosolaniol + diacetoxiscirpenol + formas modificadas de DON [Wall-Martínez et al., 2019]	MMC	NI	2,29; 4,57
	LC-tandem quadrupolo MS	QuEChERS	15 (legisladas: AFB1, FFB2, AFG1, AFG2, DON, HT-2, T-2, ZEA, FB1, FB2, FB3 e OTA + AFM1 + PAT + NIV) [Tamura, Uyama e Mochizuki, 2011]	MMC	6,5; 0,43	NI; 0,25
	LC-ITMS	IAC	4 (AFB1, B2, G1 e G2) [Benesová et al., 2012]	MMC	NI	0,0031; 0,0103 0,05; 0,25
	LC-QMS	QuEChERS	22 (legisladas: DON, ZEA, FB1, AFs, OTA, T-2 e HT-2 + zearalenol + emergentes: ENs, MON, neosolaniol, formas modificadas de DON) [González-Jartín et al., 2019]	MMC	13; 0,6	0,011; 0,037
AFG1	LC-tandem quadrupolo MS	MgSO ₄ e NaCl + centrifugação	23 (legisladas: AFB1, FB2, AFG1, AFG2, FB1, FB2, FB3, OTA, T2, HT-2, ZEA, DON + STG + roquefortina C + alternariol + alternariol monometil éter + neosolaniol + diacetoxiscirpenol + formas modificadas de DON [Wall-Martínez et al., 2019]	MMC	NI	2,10; 4,20
	LC-tandem quadrupolo MS	QuEChERS	15 (legisladas: AFB1, FFB2, AFG1, AFG2, DON, HT-2, T-2, ZEA, FB1, FB2, FB3 e OTA + AFM1 + PAT + NIV) [Tamura, Uyama e	MMC	6,5; 0,43	NI; 1,0

Mochizuki, 2011]						
AFB1	LC-ITMS	IAC	4 (AFB1, B2, G1 e G2) [Benesová et al., 2012]	MMC	NI	0,0031; 0,0102 0,05; 0,25
	LC-QMS	QuEChERS	22 (legisladas: DON, ZEA, FB1, AFs, OTA, T-2 e HT-2 + zearalenol + emergentes: ENs, MON, neosolaniol, formas modificadas de DON) [González-Jartín et al., 2019]	MMC	13; 0,6	0,012; 0,038
	HPLC-ToF-MS	QuEChERS	9 (legisladas: AFB1, OTA, HT-2, T-2, DON, ZEA, FB1 e FB2 + STG) [Bogdanova et al., 2018]	MMC	14; 1,5	0,03; 0,09
	LC-tandem quadrupolo MS	MgSO ₄ e NaCl + centrifugação	23 (legisladas: AFB1, FB2, AFG1, AFG2, FB1, FB2, FB3, OTA, T2, HT-2, ZEA, DON + STG + roquefortina C + alternariol + alternariol monometil éter + neosolaniol + diacetoxiscirpenol + formas modificadas de DON [Wall-Martínez et al., 2019]	MMC	NI	3,22; 6,43
	LC-tandem quadrupolo MS	QuEChERS	15 (legisladas: AFB1, FFB2, AFG1, AFG2, DON, HT-2, T-2, ZEA, FB1, FB2, FB3 e OTA + AFM1 + PAT + NIV) [Tamura, Uyama e Mochizuki, 2011]	MMC	6,5; 0,43	NI; 1,0
	LC-ToFMS	SPE	12 (legisladas: AFB1, OTA, DON, HT-2, T-2 e ZEA + BEA + ENA + ENA1 + ENB + ENB1 + STG [Rozentale, Bogdanova and Bartkevics, 2018]	MMC	13; 1,1	0,021; 0,068
	LC-ITMS	IAC	4 (AFB1, B2, G1 e G2) [Benesová et al., 2012]	MMC	NI	0,0015; 0,0051 0,15; 0,25
OTA	LC-QMS	QuEChERS	22 (legisladas: DON, ZEA, FB1, AFs, OTA, T-2 e HT-2 + zearalenol + emergentes: ENs, MON, neosolaniol, formas modificadas de DON) [González-Jartín et al., 2019]	MMC	13; 0,6	0,15; 0,50
	HPLC-ToF-MS	QuEChERS	9 (legisladas: AFB1, OTA, HT-2, T-2, DON, ZEA, FB1 e FB2 + STG) [Bogdanova et al., 2018]	MMC	14; 1,5	0,14; 0,45
	LC-tandem quadrupolo MS	MgSO ₄ e NaCl + centrifugação	23 (legisladas: AFB1, FB2, AFG1, AFG2, FB1, FB2, FB3, OTA, T2, HT-2, ZEA, DON + STG + roquefortina C + alternariol + alternariol monometil éter + neosolaniol + diacetoxiscirpenol + formas modificadas de	MMC	NI	4,04; 8,08

DON [Wall-Martínez et al. 2019]						
	UHPLC-Tandem quadrupole	QuEChERS	15 (legisladas: AFB1, FFB2, AFG1, AFG2, DON, HT-2, T-2, ZEA, FB1, FB2, FB3 e OTA + AFM1 + PAT + NIV) [Tamura, Uyama e Mochizuki, 2011]	MMC	6,5; 0,43	NI; 1,0
	LC-ToFMS	SPE	12 (legisladas: AFB1, OTA, DON, HT-2, T-2 e ZEA + BEA + ENA + ENA1 + ENB + ENB1 + STG [Rozentale, Bogdanova e Bartkevics, 2018])	MMC	13; 1,1	0,015; 0,05 0,10; 0,25
	LC-QMS	QuEChERS	22 (legisladas: DON, ZEA, FB1, AFs, OTA, T-2 e HT-2 + zearalenol + emergentes: ENs, MON, neosolaniol, formas modificadas de DON) [González-Jartín et al., 2019]	MMC	13; 0,6	0,50; 1,66
	LC-QTrapMS	SPE	8 (toxinas de <i>Fusarium</i>) [Habler et al., 2017]	IS (¹³ C- e ¹⁵ N-padrão marcado)	NI	1,3; 3,8
	GC-Triple quadrupolo	QuEChERS	14 (toxinas de <i>Fusarium</i>) [Rodríguez-Carrasco et al., 2015]	MMC	NI	2,0; 4,0
	LC-ToFMS	QuEChERS	9 (legisladas: AFB1, OTA, HT-2, T-2, DON, ZEA, FB1 e FB2 + STG) [Bogdanova et al., 2018]	MMC	14; 1,5	0,06; 0,21
HT-2	LC-tandem quadrupolo MS	MgSO ₄ e NaCl + centrifugação	23 (legisladas: AFB1, FB2, AFG1, AFG2, FB1, FB2, FB3, OTA, T2, HT-2, ZEA, DON + STG + roquefortina C + alternariol + alternariol monometil éter + neosolaniol + diacetoxiscirpenol + formas modificadas de DON [Wall-Martínez et al., 2019])	MMC	NI	6,39; 12,79
	LC-ToFMS	SPE	12 (legisladas: AFB1, OTA, DON, HT-2, T-2 e ZEA + BEA + ENA + ENA1 + ENB + ENB1 + STG [Rozentale, Bogdanova e Bartkevics, 2018])	MMC	13; 1,1	0,25; 0,83
	LC-tandem quadrupolo MS	QuEChERS	15 (legisladas: AFB1, FFB2, AFG1, AFG2, DON, HT-2, T-2, ZEA, FB1, FB2, FB3 e OTA + AFM1 + PAT + NIV) [Tamura, Uyama e Mochizuki, 2011]	MMC	6,5; 0,43	NI; 1,0 2,5; 5,0
T-2	LC-QMS	QuEChERS	22 (legisladas: DON, ZEA, FB1, AFs, OTA, T-2 e HT-2 + zearalenol + emergentes: ENs, MON, neosolaniol, formas modificadas de DON) [González-Jartín et al., 2019]	MMC	13; 0,6	0,20; 0,66

	LC-QTrap MS	SPE	8 (toxinas de <i>Fusarium</i>) [Habler et al., 2017]	IS (¹³ C- e ¹⁵ N-padrão marcado)	NI	1,2; 3,5
	GC-Triple quadrupolo MS	QuEChERS	14 (toxinas de <i>Fusarium</i>) [Rodríguez-Carrasco et al., 2015]	MMC	NI	4,0; 8,0
	LC-ToFMS	QuEChERS	9 (legisladas: AFB1, OTA, HT-2, T-2, DON, ZEA, FB1 e FB2 + STG) [Bogdanova et al., 2018]	MMC	14; 1,5	0,08; 0,27
	LC-tandem quadrupolo MS	MgSO ₄ e NaCl + centrifugação	23 (legisladas: AFB1, FB2, AFG1, AFG2, FB1, FB2, FB3, OTA, T2, HT-2, ZEA, DON + STG + roquefortina C + alternariol + alternariol monometil éter + neosolaniol + diacetoxiscirpenol + formas modificadas de DON [Wall-Martínez et al., 2019]	MMC	NI	8,23; 16,46
	LC-ToFMS	SPE	12 (legisladas: AFB1, OTA, DON, HT-2, T-2 e ZEA + BEA + ENA + ENA1 + ENB + ENB1 + STG [Rozentale, Bogdanova e Bartkevics, 2018]	MMC	13; 1,1	0,28; 0,91
	LC-tandem quadrupolo MS	QuEChERS	15 (legisladas: AFB1, FFB2, AFG1, AFG2, DON, HT-2, T-2, ZEA, FB1, FB2, FB3 e OTA + AFM1 + PAT + NIV) [Tamura et al., 2011]	MMC	6,5; 0,43	NI; 1,0 1,5; 5,0
	LC-QMS	QuEChERS	22 (legisladas: DON, ZEA, FB1, AFs, OTA, T-2 e HT-2 + zearalenol + emergentes: ENs, MON, neosolaniol, formas modificadas de DON) [González-Jartín et al., 2019]	MMC	13; 0,6	0,71; 2,36
ZEA	LC-QTrapMS	SPE	8 (toxinas de <i>Fusarium</i>) [Habler et al., 2017]	IS (¹³ C- e ¹⁵ N-padrão marcado)	NI	1,4; 4,0
	GC-Triple quadrupolo	QuEChERS	14 (toxinas de <i>Fusarium</i>) [Rodríguez-Carrasco et al., 2015]	MMC	NI	8; 16
	LC-ToFMS	QuEChERS	9 (legisladas: AFB1, OTA, HT-2, T-2, DON, ZEA, FB1 e FB2 + STG) [Bogdanova et al., 2018]	MMC	14; 1,5	0,09; 0,30
	LC-tandem quadrupolo MS	MgSO ₄ e NaCl + centrifugação	23 (legisladas: AFB1, FB2, AFG1, AFG2, FB1, FB2, FB3, OTA, T2, HT-2, ZEA, DON + STG + roquefortina C + alternariol + alternariol monometil éter + neosolaniol + diacetoxiscirpenol + formas modificadas de DON [Wall-Martínez et al., 2019]	MMC	NI	14,12; 28,23

	LC-ToFMS	SPE	12 (legisladas: AFB1, OTA, DON, HT-2, T-2 e ZEA + BEA + ENA + ENA1 + ENB + ENB1 + STG [Rozentale, Bogdanova e Bartkevics, 2018])	MMC	13; 1,1	0,29; 0,95
	LC-tandem quadrupolo MS	QuEChERS	15 (legisladas: AFB1, FFB2, AFG1, AFG2, DON, HT-2, T-2, ZEA, FB1, FB2, FB3 e OTA + AFM1 + PAT + NIV) [Tamura et al., 2011]	MMC	6,5; 0,43	NI; 1,0 0,05; 0,125
Emergentes						
MON	LC-QMS	QuEChERS	22 (legisladas: DON, ZEA, FB1, AFs, OTA, T-2 e HT-2 + zearalenol + emergentes: ENs, MON, neosolaniol, formas modificadas de DON) [González-Jartín et al., 2019]	MMC	13; 0,6	0,80; 2,64 5; 15
	UHPLC-Triple quadrupolo	MgSO ₄ e NaCl + centrifugação	23 (legisladas: AFB1, FB2, AFG1, AFG2, FB1, FB2, FB3, OTA, T2, HT-2, ZEA, DON + STG + roquefortina C + alternariol + alternariol monometil éter + neosolaniol + diacetoxiscirpenol + formas modificadas de DON [Wall-Martínez et al., 2019])	MMC	NI	5,27; 10,54
STG	LC-ToFMS	QuEChERS	9 (legisladas: AFB1, OTA, HT-2, T-2, DON, ZEA, FB1 e FB2 + STG) [Bogdanova et al., 2018]	MMC	14; 1,5	0,02; 0,07
	LC-ToFMS	SPE	12 (legisladas: AFB1, OTA, DON, HT-2, T-2 e ZEA + BEA + ENA + ENA1 + ENB + ENB1 + STG [Rozentale, Bogdanova e Bartkevics, 2018])	MMC	13; 1,1	0,027; 0,090 5; 12,5
	LC-QMS	QuEChERS	22 (legisladas: DON, ZEA, FB1, AFs, OTA, T-2 e HT-2 + zearalenol + emergentes: ENs, MON, neosolaniol, formas modificadas de DON) [González-Jartín et al., 2019]	MMC	13; 0,6	0,01; 0,05
ENB	LC-QTrapMS	SPE	8 (toxinas de <i>Fusarium</i>) [Habler et al., 2017]	IS (¹³ C- e ¹⁵ N-padrão marcado)	NI	0,05; 0,15
	LC-ToFMS	SPE	12 (legisladas: AFB1, OTA, DON, HT-2, T-2 e ZEA + BEA + ENA + ENA1 + ENB + ENB1 + STG [Rozentale, Bogdanova e Bartkevics, 2018])	MMC	13; 1,1	0,013; 0,043 0,01; 0,05
ENB1	LC-QMS	QuEChERS	22 (legisladas: DON, ZEA, FB1, AFs, OTA, T-2 e HT-2 + zearalenol + emergentes: ENs, MON,	MMC	13; 0,6	0,01; 0,04

			neosolaniol, formas modificadas de DON) [González-Jartín et al., 2019]			
	LC-ToFMS	SPE	12 (legisladas: AFB1, OTA, DON, HT-2, T-2 e ZEA + BEA + ENA + ENA1 + ENB + ENB1 + STG [Rozentale, Bogdanova e Bartkevics, 2018])	MMC	13; 1,1	0,016; 0,052 0,01; 0,05
BEA	LC-QMS	QuEChERS	22 (legisladas: DON, ZEA, FB1, AFs, OTA, T-2 e HT-2 + zearalenol + emergentes: ENs, MON, neosolaniol, formas modificadas de DON) [González-Jartín et al., 2019]	MMC	13; 0,6	0,49; 1,61
	LC-ToFMS	SPE	12 (legisladas: AFB1, OTA, DON, HT-2, T-2 e ZEA + BEA + ENA + ENA1 + ENB + ENB1 + STG [Rozentale, Bogdanova e Bartkevics, 2018])	MMC	13; 1,1	0,018; 0,058 0,025; 0,125
ENA1	LC-QMS	QuEChERS	22 (legisladas: DON, ZEA, FB1, AFs, OTA, T-2 e HT-2 + zearalenol + emergentes: ENs, MON, neosolaniol, formas modificadas de DON) [González-Jartín et al., 2019]	MMC	13; 0,6	0,01; 0,03
	LC-ToFMS	SPE	12 (legisladas: AFB1, OTA, DON, HT-2, T-2 e ZEA + BEA + ENA + ENA1 + ENB + ENB1 + STG [Rozentale, Bogdanova e Bartkevics, 2018])	MMC	13; 1,1	0,015; 0,050 0,01; 0,05
ENA	LC-QMS	QuEChERS	22 (legisladas: DON, ZEA, FB1, AFs, OTA, T-2 e HT-2 + zearalenol + emergentes: ENs, MON, neosolaniol, formas modificadas de DON) [González-Jartín et al., 2019]	MMC	13; 0,6	0,01; 0,04
	LC-ToFMS	SPE	12 (legisladas: AFB1, OTA, DON, HT-2, T-2 e ZEA + BEA + ENA + ENA1 + ENB + ENB1 + STG [Rozentale, Bogdanova e Bartkevics, 2018])	MMC	13; 1,1	0,019; 0,062 0,01; 0,05

^a Método; cromatografia líquida com QTRAPMS: detecção por espectrometria de massa de captura de íons linear/triplo quadrupolo; HRMS: espectrômetro de massa de alta resolução; QMS: detecção por espectrometria de massa triplo quadrupolo; FLD: detecção por fluorescência; ITMS: detecção por espectrometria de massa de armadilha de íons; ToFMS: detecção por espectrometria de massa de tempo de voo

^b Preparação da amostra; QuEChERS: Rápido, Fácil, Barato, Eficaz, Robusto e Seguro; SPE: extração em fase sólida; IAC: coluna de imunoafinidade

^c Número de micotoxinas avaliadas simultaneamente

^d Estratégia usada para corrigir o efeito de matriz; MMC: calibração por superposição de matriz; IS: padrão interno

^e Tempo (min) da análise instrumental; tempo de análise para cada micotoxina; NI: não informado

^f LOD: limite de detecção; LOQ: limite de quantificação

LOD e LOQ, respectivamente, encontrados para DON (2,5 e 10 $\mu\text{g kg}^{-1}$) e HT-2 (2,5 e 5 $\mu\text{g kg}^{-1}$) em cevada maltada foram semelhantes aos relatados por Beccari et al. (2016) que usou cromatografia líquida acoplada a um espectrômetro de massas de alta resolução (LC-HRMS, do inglês: *liquid chromatography-high-resolution mass spectrometry*) para analisar micotoxinas em cevada destinada à produção de malte (2,0 e 6,7 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para DON e HT-2). Os valores de LOD e LOQ para outras micotoxinas legisladas, como OTA, T-2, ZEA e FB1 foram pelo menos 2 vezes menores do que os apresentados por Beccari et al. (2016) (Tabela 6). AFs não foram validadas por Beccari et al. (2016) e os valores de LOD e LOQ encontrados no método proposto foram semelhantes aos relatados usando cromatografia líquida acoplada a detecção por espectrometria de massas com analisador armadilha de íons (LC-ITMS, do inglês: *liquid chromatography coupled to ion trap mass spectrometry detection*) (BENESOVÁ et al., 2012).

Em relação às micotoxinas emergentes, os valores obtidos de LOD e LOQ também foram comparados com outros métodos da literatura de acordo com a Tabela 6. Com relação ao malte, LOD e LOQ, respectivamente, para MON e STG foram menores do que os relatados por Beccari et al. (2016) usando LC-HRMS. BEA e ENs apresentaram LOD e LOQ inferiores aos encontrados por Habler e Rychlik (2016) que empregou cromatografia líquida acoplada à detecção por espectrometria de massas com analisador de captura de íons linear/tríplo quadrupolo (LC-QTrapMS, do inglês: *liquid chromatography coupled to triple quadrupole/linear ion trap mass spectrometry detection*). Da mesma forma, para a cerveja o método proposto resultou em valores de LOD e LOQ mais baixos do que os encontrados por González-Jartín et al. (2019) na análise de BEA. LOD e LOQ de STG foram semelhantes à Wall-Martínez et al. (2019), enquanto para ENs foram semelhantes aos relatados por González-Jartín et al. (2019).

A Tabela 7 mostra a comparação dos resultados do método QuEChERS-LC-QToF-MS com os critérios de desempenho de métodos analíticos para micotoxinas definidos pela Comissão Europeia (EUROPEAN COMMISSION, 2014).

Tabela 7 - Comparação dos resultados do método QuEChERS-LC-QToF-MS com os critérios de desempenho para métodos de micotoxinas definidos pelo Regulamento da Comissão da União Europeia (EU) No 519/2014.

Regulamento da Comissão (EU) No 519/2014				Resultados do método QuEChERS-LC-QToF-MS proposto ^a		
Micotoxina	Concentração ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Faixa de recuperação (%)	RSD ^b (%)	Concentração avaliada ($\mu\text{g kg}^{-1}$) ^c	Recuperação (%)	Prec. inter. RSD ^b (%)
AFB1, AFB2, AFG1 e AFG2	$< 10^3$	50-120	-	0,25; 10; 50	90 – 98	3,9 – 9,6
	10^3 - 10^4	70-110				
	$>10^4$	80-110				
OTA	<1	50-120	≤ 40	0,125; 0,25	95	5,9 – 8,5
	≥ 1	70-110	≤ 20	2,5; 5; 20	92 – 99	6,5 – 9,0
DON	>100 - ≤ 500	60-110	≤ 20	5; 10; 500	73 – 76	2,8 – 9,8
	>500	70-120	≤ 20	1000	79 – 81	4,0 – 5,2
ZEA	≤ 50	60-120	≤ 40	0,25; 25; 50	90 – 92	5,5 – 9,7
	>50	70-120	≤ 25	250; 375	90	3,0 – 5,0
FB1	≤ 500	60-120	≤ 30	50; 200, 500	74 – 79	2,5 – 9,5
	>500	70-110	≤ 20			
T-2 e HT-2	15-250	60-130	≤ 30	50	90 – 92	6,2 – 8,9
	>250	60-130	≤ 25	625; 1250; 1500; 2000	89 – 95	3,1 – 6,3

^a As concentrações mais baixa, intermediária e mais alta da curva analítica de cada composto para cada matriz (malte e cerveja) foram utilizadas para determinar a recuperação e a precisão intermediária; ^b RSD: desvio padrão relativo obtido nos ensaios de precisão intermediária; ^c Concentrações avaliadas no ensaio de recuperação.
Fonte: EUROPEAN COMMISSION (2014).

A porcentagem de recuperação encontrada no método proposto foi listada na Tabela 7 de acordo com a faixa de concentração de cada micotoxina para verificar a adequação aos parâmetros da Comissão Europeia. Para todas as micotoxinas legisladas (AFs, OTA, DON, ZEA, FB1, T-2 e HT-2), a recuperação (73 - 99%) e a precisão intermediária ($\text{RSD} \leq 9,8\%$) estão de acordo com os regulamentos da Tabela 7. Micotoxinas emergentes não estão incluídas nas orientações da Comissão Europeia (EUROPEAN COMMISSION, 2014).

Recuperação, repetibilidade e precisão intermediária obtidos para as micotoxinas emergentes foram comparadas com os critérios de validação estabelecidos pela Administração de Alimentos e Medicamentos (FDA) dos Estados Unidos (FDA, 2019) na Tabela 8 e pela Associação de Químicos Analíticos Oficiais (AOAC) (AOAC, 2016) na Tabela 9, que também foi seguido pelo

Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO) do Brasil (INMETRO, 2018).

Tabela 8 - Critérios de validação para métodos analíticos focados em contaminantes de alimentos (incluindo, mas não limitado a micotoxinas) estabelecidos pela Administração de Alimentos e Medicamentos (FDA) dos Estados Unidos para comparar com os dados obtidos para as micotoxinas emergentes no método QuEChERS-LC-QToF-MS

Diretrizes para a validação de métodos de acordo com FDA					Resultados do método QuEChERS-LC-QToF-MS proposto ^a				
ML ^b ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Faixa mínima aplicável ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Recuperação (%)	Repe. RSD ^c (\leq %)	Prec. inter. RSD ^d (\leq %)	Micotoxina	Concentrações avaliadas ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Recuperação (%)	Repe. RSD ^c (\leq %)	Prec. inter. RSD ^d
1	0,6-1,4	40-120	22	44	ENs	0,05; 2,5; 1,25	90 – 99	3,0 – 7,0	3,5 – 9,2
					BEA	0,125 - 5	98 – 102	1,2 – 3,2	3,5 – 9,1
10	6-14	60-115	22	44	STG	12,5; 25	91 – 95	6,0	5,4 – 6,8
					MON	15	72 – 73	5,4 – 9,0	6,6 – 9,9
					ENs	25	92 – 99	4,5 – 5,2	6,6 – 9,5
10 ²	30-170	80-110	11	44	ENs	50; 62,5; 250	90 – 99	2,6 – 9,2	2,9 – 9,1
					STG	125	90	6,5	6,6
10 ³	520-1480	80-110	8	32	MON	1000; 2500; 3000	78 – 83	1,0 – 1,6	4,5 – 6,0
					STG	1000; 1800; 2000	96 – 97	1,5 – 4,2	4,4 – 6,3

^a As concentrações mais baixa, intermediária e mais alta da curva analítica de cada composto para cada matriz (malte e cerveja) foram utilizadas nos ensaios de recuperação, repetibilidade e precisão intermediária; ^b ML: nível do método, pode ser definido para a combinação de analito(s)/matriz(es) da amostra como um nível máximo, nível mínimo, nível normativo ou faixa de concentração dependendo do uso pretendido do método; ^c RSD: desvio padrão relativo obtido em ensaios de repetibilidade; ^d desvio padrão relativo obtido no ensaio de precisão intermediária
Fonte: FDA (2019).

Tabela 9 - Recuperação e repetibilidade aceitáveis dependendo da concentração do analito estabelecida pela Associação de Químicos Analíticos Oficiais (AOAC) e seguida pelo Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO) do Brasil para comparar com os dados obtidos no método QuEChERS-LC-QToF-MS para as micotoxinas emergentes

Diretrizes para a validação de métodos de acordo com AOAC e INMETRO			Resultados do método QuEChERS-LC-QToF-MS proposto ^a			
Concentração de analito ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Recuperação (%)	RSD ^b (\leq %)	Micotoxinas	Concentrações avaliadas ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Recuperação (%)	Repe RSD ^b (\leq %)
1	40-120	30	ENs	0,05; 2,5; 1,25	90 – 99	3,0 – 7,0
			BEA	0,125; 5	98 – 102	1,2 – 3,2
10	60-115	21	STG	12,5; 25	91 – 95	6,0
			MON	15	72 – 73	5,4 – 9,0
			ENs	25; 62,5; 50	92 – 97	2,8 – 7,8
10 ²	80-110	15	BEA	100	99	1,0 – 5,8
			ENs	250	91 – 99	3,6 – 9,2
			STG	125	90	6,5
10 ³	80-110	11	MON	1000; 2500; 3000	78 – 83	1,0 – 1,6
			STG	1000; 1800; 2000	96 – 97	1,5 – 4,2

^a As concentrações mais baixa, intermediária e mais alta da curva analítica de cada composto para cada matriz (malte e cerveja) foram utilizadas nos ensaios de recuperação, repetibilidade e precisão intermediária; ^b RSD: desvio padrão relativo obtido em ensaios de repetibilidade.
Fonte: AOAC (2016) e INMETRO (2018).

Nas diretrizes da FDA, AOAC e INMETRO, a faixa de recuperação aceitável e RSD são fixados de acordo com a concentração do analito. Para todas as micotoxinas emergentes (avaliadas em malte e cerveja nas concentrações mais baixas, intermediárias e mais altas das curvas analíticas), os valores de recuperação (72 - 102%), repetibilidade ($RSD \leq 9,2\%$) e precisão intermediária ($RSD \leq 9,9\%$) estão de acordo com os parâmetros do FDA (Tabela 8), AOAC e INMETRO (Tabela 9).

O método QuEChERS-LC-QToF-MS proposto também apresentou recuperação, repetibilidade e precisão intermediária de acordo com os parâmetros estabelecidos pela Direção Geral de Saúde e Segurança Alimentar da Comissão Europeia (SANTE) (SANTE, 2020). Apesar de serem especificamente elaboradas para análise de agrotóxicos, as diretrizes da SANTE tem sido usadas para avaliar métodos de quantificação de micotoxinas em alimentos como purê de maçã, avelã, milho, pimenta verde (MALACHOVA *et al.*, 2014), produtos de nozes (CUNHA; SÁ; FERNANDES, 2018) e café (BESSAIRE *et al.*, 2019). Independentemente da concentração do analito, SANTE estabelece recuperação variando de 70 a 120% e RSD inferior a 20% como parâmetros aceitáveis (SANTE, 2020).

Além dos adequados parâmetros de validação fornecidos pelo presente método, outra vantagem foi o rendimento aprimorado, exigindo menos tempo e trabalho por amostra/analito (20 min; 1,2 min de análise para cada analito). O tempo de análise instrumental relatado na literatura para métodos de malte ou cerveja (Tabela 6) varia de 6,5 (TAMURA; UYAMA; MOCHIZUKI; 2011) a 37,5 min (BECCARI *et al.*, 2016) quando 15 e 34 micotoxinas foram avaliadas, respectivamente. Tamura, Uyama e Mochizuki (2011) avaliaram as mesmas micotoxinas legisladas que foram consideradas no presente estudo, além de aflatoxina M1 (AFM1), patulina e nivalenol, resultando em um tempo médio de 0,43 min para cada micotoxina analisada por cromatografia líquida acoplada a espectrômetro de massas quadrupolo tandem (LC-tandem quadrupolo MS, do inglês: *liquid chromatography coupled with tandem quadrupole mass spectrometer*). É importante notar que AFM1 é o produto do metabolismo da AFB1 no fígado de animais que consumiram alimentos contaminados, podendo ser encontrada no leite,

urina e suor. Portanto, a AFM1 não é um contaminante de produtos de cereais. Patulina é uma micotoxina legislada mundialmente apenas para suco de maçã e raramente foi relatada em produtos à base de cereais. Beccari et al. (2016) avaliaram 34 toxinas, incluindo compostos legislados e emergentes, na cevada destinada a produção de malte por LC-HRMS. No entanto, as aflatoxinas (B1, B2, G1 e G2) não foram incluídas. A determinação de AFs em cereais por métodos multi-micotoxina é essencial, pois essas toxinas são as únicas classificadas no grupo 1 da IARC como cancerígenas para humanos (IARC, 2020).

4.2 Aplicação do método validado QuEChERS-LC-QToF-MS para análise de cerveja

Para verificar sua aplicabilidade, o método validado foi usado para a análise de amostras de cerveja artesanal (Tabela 2). Nenhuma das amostras de cerveja artesanal exibiu níveis detectáveis de qualquer uma das 17 micotoxinas.

Toxinas produzidas por fungos do gênero *Fusarium* como DON, ZEA, T-2, HT-2 e FB1 têm sido relatadas como as micotoxinas mais estudadas em produtos de cereais, incluindo malte e cerveja (BARTHEL *et al.*, 2012; BECCARI *et al.*, 2016; HABLER *et al.*, 2017; BOGDANOVA *et al.*, 2018; KSIENIEWICZ-WOZNIAK *et al.*, 2019; MASTANJEVIC *et al.*, 2019). Em relação à cevada para malte (o nível médio encontrado para cada micotoxina é mencionado entre parênteses), 100% das amostras provenientes da Alemanha estavam contaminadas com T-2 (16 $\mu\text{g kg}^{-1}$), HT-2 (34 $\mu\text{g kg}^{-1}$) e DON (19 $\mu\text{g kg}^{-1}$) (BARTHEL *et al.*, 2012), enquanto a DON (53 $\mu\text{g kg}^{-1}$) foi encontrada em 90% das amostras de cevada maltada da Polônia (KSIENIEWICZ-WOZNIAK *et al.*, 2019). Beccari et al. (2016) encontraram DON (39,2 $\mu\text{g kg}^{-1}$), ZEA (1,8 $\mu\text{g kg}^{-1}$), T-2 (27,5 $\mu\text{g kg}^{-1}$), HT-2 (36,1 $\mu\text{g kg}^{-1}$) e FB1 (156,3 $\mu\text{g kg}^{-1}$) em 7, 12, 40, 65 e 2%, respectivamente, das amostras de cevada destinada à elaboração de malte da Itália. Algumas dessas micotoxinas também foram relatadas em cervejas comercializadas na Letônia, em que DON (73,2 $\mu\text{g kg}^{-1}$), T-2 (1,9 $\mu\text{g kg}^{-1}$), HT-2 (2,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$), FB1 (22,6 $\mu\text{g kg}^{-1}$), AFB1 (0,14 $\mu\text{g kg}^{-1}$) e STG (0,15 $\mu\text{g kg}^{-1}$) foram detectadas em 51, 38, 52, 24, 8 e 7% das amostras de cerveja, respectivamente (BOGDANOVA *et al.*, 2018). DON foi encontrada em 97% de

amostras de cerveja na Polônia ($12,3 \mu\text{g kg}^{-1}$) (KSIENIEWICZ-WOZNIAK *et al.*, 2019) e em 36% de amostras de cerveja analisadas na Alemanha ($7,1 \mu\text{g kg}^{-1}$), onde ENB ($0,32 \mu\text{g kg}^{-1}$) também foi detectada em 59% das amostras (HABLER *et al.*, 2017).

No entanto, a ocorrência desses compostos não foi observada em vários estudos que avaliaram cerveja (RODRÍGUEZ-CARRASCO *et al.*, 2015; ROZENTALE, BOGDANOVA, BARTKEVICS, 2018; WALL-MARTÍNEZ *et al.*, 2019). ZEA e T-2 não foram encontrados em cervejas da Espanha, Alemanha, Irlanda, Portugal, Bélgica, Dinamarca, Holanda, República Tcheca, Grã-Bretanha, Estados Unidos da América, França, México e Argentina (RODRÍGUEZ-CARRASCO *et al.*, 2015). Na avaliação de cervejas do México, EUA, Bélgica, Alemanha, Espanha, Holanda, Argentina e Guatemala, AFB1, AFB2, AFG1, AFG2, OTA, HT-2, T-2 e ZEA não foram detectados por Wall-Martínez *et al.* (2019). Com relação às micotoxinas emergentes, Rozentale, Bogdanova e Bartkevics (2018) relataram que as cervejas da Letônia eram isentas de BEA, ENA, ENA1 e STG.

A contaminação fúngica dos cereais ocorre no campo e é altamente dependente das práticas agrícolas (manejo de pragas, cuidados na colheita, transporte e armazenamento) e condições climáticas (o calor e a umidade favorecem a ocorrência de fungos e micotoxinas) (WEIDENBÖRNER, 2017). Como essas condições podem variar de acordo com a safra, o monitoramento rotineiro dos níveis de micotoxinas em cereais é de suma importância para proteger a população do risco de exposição a esses compostos.

5 CONCLUSÃO

O método multi-micotoxinas baseado em QuEChERS-LC-QToF-MS com o uso da MMC para corrigir o efeito da matriz mostrou bom desempenho analítico, apresentando linearidade, precisão adequada, alta exatidão e sensibilidade suficiente para determinar micotoxinas de acordo com a legislação e diferentes diretrizes de validação de método. Outra vantagem foi o rendimento aprimorado, exigindo 1,2 min de corrida cromatográfica para cada analito. O método permite avaliar as micotoxinas legisladas para verificar a adequação aos parâmetros regulatórios. Além disso, as micotoxinas emergentes podem ser analisadas simultaneamente, sendo uma importante fonte de dados para apoiar o futuro estabelecimento de legislação para esses compostos para proteger a população dos riscos à saúde que podem estar relacionados a esses compostos.

6 PERSPECTIVAS

A partir deste trabalho, espera-se:

- Avaliar os efeitos das etapas de elaboração de malte e cerveja nos níveis de micotoxinas.
- Validar métodos para outras matrizes que são amplamente contaminadas com micotoxinas e possuem limites máximos fixados na legislação, como café, cacau, nozes, frutas secas, milho, leite e derivados, entre outros.
- Incluir micotoxinas modificadas no método multi-micotoxinas proposto. Micotoxinas modificadas co-ocorrem com suas formas livres, mas não são detectadas na análise de rotina, resultando em uma subestimação do conteúdo total de micotoxinas nos alimentos.
- Integrar a análise simultânea de micotoxinas e agrotóxicos em malte e cerveja.

REFERÊNCIAS

- ABRACERVA. **Associação Brasileira de Cerveja Artesanal**. Estatuto. 2018. Disponível em: <<https://abracerva.com.br/sobre/estatuto/>>. Acesso em: 12 maio 2020.
- ADHIKARI, M. *et al.* T-2 mycotoxin: toxicological effects and decontamination strategies. **Oncotarget**, v. 8, issue 20, p. 33933-33952, 2017.
- AGRIOPOULOU, S.; STAMATELOPOULOU, E.; VARZAKAS, T. Advances in Occurrence, Importance, and Mycotoxin Control Strategies: Prevention and Detoxification in Foods. **Foods**, v. 9, issue 2, p. 1-50, 2020.
- ALI, B. H. *et al.* Mycotoxins, Detection and Prevention, A Review. **International Journal of Pharmaceutical Research**, v. 12, issue 1, 2020.
- ALSHANNAQ, A.; YU, J. H. Occurrence, Toxicity and Analysis of Major Mycotoxins in Food. **International Journal of Environmental Research and Public Health**. V. 14, issue 6, p. 1-20, 2017.
- ANZAI, N.; JUTABHA, P.; ENDOU, H. Molecular mechanism of Ochratoxin A transport in the kidney. **Toxins**, v. 2, issue 6, p. 1381-1398, 2010.
- AOAC International. **Appendix F: Guidelines for Standard Method Performance Requirements**, 2016. Disponível em: <http://www.eoma.aoac.org/app_f.pdf>. Acesso em: 4 abril 2020
- BAIK, B.-K.; ULLRICH, S. E. Barley for food: Characteristics, improvement, and renewed interest. **Journal of Cereal Science**, v. 48, issue 2, p. 233-242, 2008.
- BARTHEL, J. *et al.* Occurrence of type A, B and D trichothecenes in barley and barley products from the Bavarian Market. **Mycotoxin Research**, v. 28, p. 97-106, 2012.
- BECCARI, G. *et al.* Presence of Fusarium Species and Other Toxigenic Fungi in Malting Barley and Multi-Mycotoxin Analysis by Liquid Chromatography-High-Resolution Mass Spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 64, issue 21, p. 4390-9, 2016.
- BENESOVÁ, K. *et al.* Monitoring of selected aflatoxins in brewing materials and beer by liquid chromatography/mass spectrometry. **Food Control**, v. 25, issue 2, p. 626-630, 2012.
- BESSAIRE, T. *et al.* Mycotoxins in green coffee: Occurrence and risk assessment. **Food Control**, v. 96, p. 59-67, 2019.

BOGDANOVA, E. *et al.* Occurrence and risk assessment of mycotoxins, acrylamide, and furan in Latvian beer. **Food Additives and Contaminants: Part B**, v.11, issue 2, p. 126-137, 2018.

BOLECHOVÁ, M. *et al.* Determination of seventeen mycotoxins in barley and malt in the Czech Republic. **Food Control**, v. 47, p. 108-113, 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução nº 07, de 18 de fevereiro de 2011**. Dispõe sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos. 2011. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2968262/RDC_07_2011_COMP.pdf/>. Acesso em: 10 setembro 2020.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução nº 138, de 8 de fevereiro de 2017**. Altera a RSD nº 07 de 18 de fevereiro de 2011 que dispõe sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos. 2017. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/3219534/RDC_138_2017_.pdf/b36e60b0-5112-43dc-9142-932f502fc46b?version>. Acesso em: 10 setembro 2020.

BRAUN, M. S.; WINK, M. Exposure, Occurrence, and Chemistry of Fumonisin and their Cryptic Derivatives. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 17, issue 3, p. 769-791, 2018.

CASTALDO, L. *et al.* Target Analysis and Retrospective Screening of Multiple Mycotoxins in Pet Food Using UHPLC-Q-Orbitrap HRMS. **Toxins**, v. 11, issue 8, p. 1-16, 2019.

CELIK, M. *et al.* Evaluation of the Genotoxicity of Fusarium Mycotoxin Moniliformin in Human Peripheral Blood Lymphocytes. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 50, issue 5, p. 431-434, 2009.

CUNHA, S. C.; SÁ, S. V. M.; FERNANDES, J. O. Multiple mycotoxin analysis in nut products: Occurrence and risk characterization. **Food and Chemical Toxicology**, v. 114, p. 260-269, 2018.

DE BOEVRE, M. *et al.* Development and validation of an LC-MS/MS method for the simultaneous determination of deoxynivalenol, zearalenone, T-2-toxin and some masked metabolites in different cereals and cereal-derived food. **Food Additives and Contaminants**, v. 29, issue 5, p. 819-835, 2012.

DESMARCHELIER, A. *et al.* Combining the quick, easy, cheap, effective, rugged and safe approach and clean-up by immunoaffinity column for the analysis of 15 mycotoxins by isotope dilution liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1337, p. 75-84, 2014.

EFSA. Opinion of the Scientific Panel on contaminants in the food chain on a request from the commission related to ochratoxin A in food. **European Food Safety Authority Journal**, v. 4, issue 6, p. 1-56, 2006.

EFSA. Scientific Opinion on the risks for animal and public health related to the presence of T-2 and HT-2 toxin in food and feed. **European Food Safety Authority Journal**, v. 9, issue 12, p. 1-187, 2011.

EFSA. Scientific Opinion on the risk for public and animal health related to the presence of sterigmatocystin in food and feed. **European Food Safety Authority Journal**, v. 11, issue 6, p. 1-81, 2013.

EFSA. Scientific Opinion on the risks to human and animal health related to the presence of beauvericin and enniatins in food and feed. **European Food Safety Authority Journal**, v. 12, issue 8, p. 1-174, 2014.

EFSA. Human and animal dietary exposure to T-2 and HT-2 toxin. **European Food Safety Authority Journal**, v. 15, issue 8, p. 1-57, 2017.

EFSA. Risks to human and animal health related to the presence of moniliformin in food and feed. **European Food Safety Authority Journal**, v. 16, issue 3, p. 1-95, 2018.

EFSA. Risks for animal health related to the presence of fumonisins, their modified forms and hidden forms in feed. **European Food Safety Authority Journal**, v. 16, issue 5, p. 1-144, 2018.

EUROPEAN COMMISSION. Commission Regulation (EC) No 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. **Official Journal of the European Union**, p. 5-24, 2006. Disponível em: <<https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32006R1881&from=EN>>. Acesso em: 12 abril 2020.

EUROPEAN COMMISSION. Commission Regulation (EC) No 1126/2007 of 28 September 2007 amending Regulation (EC) No 1881/2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs as regards *Fusarium* toxins in maize and maize products. **Official Journal of the European Union**, p. 14-17, 2007. Disponível em: <<https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32007R1126&from=EN>>. Acesso em: 12 abril 2020.

EUROPEAN COMMISSION. Commission recommendation of 27 March 2013 on the presence of T-2 and HT-2 toxin in cereals and cereal products. **Official Journal of the European Union**, p. 12-15, 2013. Disponível em: <<https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2013:091:0012:0015:EN:PDF>>. Acesso em: 12 abril 2020.

EUROPEAN COMMISSION. Commission Regulation (EC) No 519/2014 of 16 May 2014 amending Regulation (EC) No 401/2006 as regards methods of sampling of large lots, spices and food supplements, performance criteria for T-2, HT-2 toxin and citrinin and screening methods of analysis. **Official Journal of the European Union**, p. 29-43, 2014. Disponível em: <<https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32014R0519&from=EN>>. Acesso em: 12 abril 2020.

FABREGAT-CABELLO, N. *et al.* Comparison of approaches to deal with matrix effects in LC-MS/MS based determinations of mycotoxins in food and feed. **World Mycotoxin Journal**, v. 9, issue 2, p. 149-161, 2015.

FACORRO, R.; LLOMPART, M.; DAGNAC, T. Combined (d)SPE-QuEChERS Extraction of Mycotoxins in Mixed Feed Rations and Analysis by High Performance Liquid Chromatography-High-Resolution Mass Spectrometry. **Toxins**, v. 12, issue 3, p. 1-20, 2020.

FDA. **Guidance for Industry: Action Levels for Poisonous or Deleterious Substances in Human Food and Animal Feed**, 2000. 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>>. Acesso em: 20 março 2020

FDA. **Guidance for Industry and FDA: Advisory Levels for Deoxynivalenol (DON) in Finished Wheat Products for Human Consumption and Grains and Grain By-Products used for Animal Feed**, 2010. Disponível em: <<https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/guidance-industry-and-fda-advisory-levels-deoxynivalenol-don-finished-wheat-products-human>>. Acesso em: 20 março 2020

FDA. **Guidelines for the Validation of Chemical Methods in Food, Feed, Cosmetics, and Veterinary Products**. 3rd Edition, 2019. Disponível em: <<https://www.fda.gov/media/81810/download>>. Acesso em: 1 abril 2020

FERREIRA, I. M. P. L. V. O. *et al.* Brewer's *Saccharomyces* yeast biomass: characteristics and potential applications. **Trends in Food Science & Technology**, v. 21, issue 2, p. 77-84, 2010.

FILIPPO, R.; ANTONIO, G.; TERENCEIO, B. Emerging mycotoxins in the food chain. **Mediterranean Journal of Nutrition and Metabolism**, v. 13, issue 1, p. 7-27, 2020.

FLEURAT-LESSARD, F. Integrated management of the risks of stored grain spoilage by seedborne fungi and contamination by storage mould mycotoxins - An update. **Journal of Stored Products Research**, v. 71, p. 22-40, 2017.

FRAEYMAN, S. *et al.* Emerging Fusarium and Alternaria Mycotoxins: Occurrence, Toxicity and Toxicokinetics. **Toxins**, v. 9, issue 7, n. 228, p. 1-26, 2017.

GASTONI, W.; FILHO, V. **Tecnologia de Bebidas** – Matéria-prima, processamento, BPF/APPCC, Legislação, Mercado. 1º ed., São Paulo, Editora Edgard Blucher, 2005.

GONZÁLEZ-JARTÍN, J. M. *et al.* A QuEChERS based extraction procedure coupled to UPLC-MS/MS detection for mycotoxins analysis in beer. **Food Chemistry**, v. 275, p. 703-710, 2019.

HAAG, A. M. Mass Analyzers and Mass Spectrometers. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 919, p. 157-169, 2016.

HABLER, K.; RYCHLIK, M. Multi-mycotoxin stable isotope dilution LC-MS/MS method for *Fusarium* toxins in cereals. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 408, issue 1, p. 307-317, 2016.

HABLER, K. *et al.* Multi-mycotoxin stable isotope dilution LC-MS/MS method for *Fusarium* toxins in beer. **Food Chemistry**, v. 218, p. 447-454, 2017.

HEUSSNER, A. H.; BINGLE, L. E. H. Comparative Ochratoxin Toxicity: A Review of the Available Data. **Toxins**, v. 7, issue 10, p. 4253-4282, 2015.

IARC. International Agency for Research on Cancer. **Aflatoxins**. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, v. 100F, 2012. Disponível em: <<http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol100F/mono100F.pdf>>. Acesso em: 27 julho 2020.

IARC. International Agency for Research on Cancer. **Preamble to the IARC Monographs**. Lyon, France, Jan. 2019. Disponível em: <<https://monographs.iarc.fr/wp-content/uploads/2019/07/Preamble-2019.pdf>>. Acesso em: 29 setembro 2020.

IARC. International Agency for Research on Cancer. **Agents Classified by the IARC Monographs, Volumes 1-127**. 2020. Disponível em: <<https://monographs.iarc.fr/list-of-classifications>>. Acesso em: 24 agosto 2020.

ICH. International Conference on Harmonisation. **Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1)**. 2005. Disponível em: <<https://database.ich.org/sites/default/files/Q2%28R1%29%20Guideline.pdf>>. Acesso em: 4 setembro 2020.

INMETRO. Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia. **Orientação sobre Validação de Métodos Analíticos**. DOQ-CGCRE-008, Revisão 07, 2018. Disponível em: <http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/CGCRE/DOQ/DOQ-CGCRE-8_07.pdf>. Acesso em: 23 setembro 2020

ISAC-GARCÍA, J. *et al.* Determining Physical and Spectroscopic Properties. **Experimental Organic Chemistry - Laboratory Manual**, p. 145-175, 2016.

ISO. International Organization for Standardization. **ISO/IEC Guide 17029: Conformity assessment - General principles and requirements for validation and verification bodies**. ISO Committee on Conformity Assessment, 2019. Disponível em: <<https://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:iso-iec:17029:ed-1:v1:en>>. Acesso em: 3 novembro 2020.

JUAN, C. *et al.* 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.

KHANEGHAHA, A. M. *et al.* Mycotoxins in cereal-based products during 24 years (1983-2017): A global systematic review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 91, p. 95-105, 2019.

KIRIN HOLDINGS. **Kirin Beer University report: Global beer consumption by country in 2018. 2019.** Disponível em: <https://www.kirinholdings.co.jp/english/news/2019/1224_01.html>. Acesso em: 14 maio 2020.

KRUBE, A. *et al.* Tutorial review on validation of liquid chromatography-mass spectrometry methods: Part II. **Analytica Chimica Acta**, v. 870, p. 8-28, 2015b.

KSINIOWICZ-WOZNIAK, E. *et al.* Selected Trichothecenes in Barley Malt and Beer from Poland and an Assessment of Dietary Risks Associated with their Consumption. **Toxins**, v. 11, issue 12, 2019.

KUMAR, P. *et al.* Aflatoxins: A Global Concern for Food Safety, Human Health and Their Management. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, 2017.

LAGO, L. O. *et al.* QuEChERS-LC-QTOFMS for the simultaneous determination of legislated and emerging mycotoxins in malted barley and beer using matrix-matched calibration as a solution to the commercial unavailability of internal standards for some mycotoxins. **Food Chemistry**, v. 345, 2021.

LI, D. *et al.* Quantitation of Mycotoxins in Four Food Matrices Comparing Stable Isotope Dilution Assay (SIDA) with Matrix-Matched Calibration Methods by LC-MS/MS. **Journal of Association of Official Agricultural Chemists International**, v. 102, issue 6, p. 1673-1680, 2019.

LIU, Y. *et al.* Modified QuEChERS method combined with ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry for the simultaneous determination of 26 mycotoxins in sesame butter. **Journal of Chromatography B**, v. 970, p. 68-76, 2014.

LIU, X. *et al.* Molecular mechanisms of fumonisin B1-induced toxicities and its applications in the mechanism-based interventions. **Toxicon**, v. 167, p. 1-5, 2019.

LOPES, M. *et al.* Evaluation of the mycotoxins content of *Salicornia* spp .: a gourmet plant alternative to salt. **Food Additives & Contaminants: Part B**, v. 13, issue 3, p. 162-170, 2020a.

LOPES, P. R. M. *et al.* Agroindustrial technology in brazilian awakening to craft beers. **International Journal of Development Research**, v. 10, issue 3, p. 34154-34161, 2020b.

MALACHOVA, A. *et al.* *Fusarium* mycotoxins in various barley cultivars and their transfer into malt. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 90, issue 14, p. 2495-2505, 2010.

MALACHOVA, A. *et al.* Optimization and validation of a quantitative liquid chromatography-tandem mass spectrometric method covering 295 bacterial and fungal metabolites including all regulated mycotoxins in four model food matrices. **Journal of Chromatography A**, v. 1362, p. 145-156, 2014.

MALACHOVÁ, A. *et al.* Advanced LC-MS-based methods to study the co-occurrence and metabolization of multiple mycotoxins in cereals and cereal-based food. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 410, issue 3, p. 801-825, 2018.

MAO, J. *et al.* 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.

MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº 65, de 10 de dezembro de 2019**. Estabelece os padrões de identidade e qualidade para os produtos de cervejaria. Diário Oficial da União, edição 239, seção 1, p. 31, 11 dez. 2019. Disponível em: <<http://www.in.gov.br/en/web/dou/-/instrucao-normativa-n-65-de-10-de-dezembro-de-2019-232666262>>. Acesso em: 9 maio 2020.

MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Anuário da cerveja 2019**. 2020. Disponível em: <http://www.cervbrasil.org.br/novo_site/wp-content/uploads/2020/03/anuario-cerveja-WEB.pdf>. Acesso em: 9 maio 2020.

MARCUSSO, E. F.; MULLER, C. V. **Anuário da cerveja no Brasil 2018: Crescimento e Inovação**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2019.

MARIN, S. *et al.* Mycotoxins: Occurrence, toxicology, and exposure assessment. **Food and Chemical Toxicology**, v. 60, p. 218-237, 2013.

MASTANJEVIC, K. *et al.* From malt to wheat beer: A comprehensive multi-toxin screening, transfer assessment and its influence on basic fermentation parameters. **Food Chemistry**, v. 254, p. 115-121, 2018.

MASTANJEVIC, K. *et al.* Multi-(myco)toxins in Malting and Brewing By-Products. **Toxins**, v. 11, p. 1-15, 2019.

MATOS, R. A. G. **Cerveja**: panorama do mercado, produção artesanal e avaliação de aceitação e preferência. 2011. TCC (Trabalho de Conclusão de Curso). Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Curso de Agronomia, Florianópolis, 2011. Disponível em: <<https://repositorio.ufsc.br/bitstream/handle/123456789/25472/ragr250.pdf?sequence=1&isAllowed=y>>. Acesso em: 14 maio 2020.

MEGA, J. F.; NEVES, E.; ANDRADE, C. J.; A produção da cerveja no Brasil. **Citino**, v. 1, n. 1, p. 34-42, 2011.

METZLER, M.; PFEIFFER, E.; HILDEBRAND, A. A. Zearalenone and its metabolites as endocrine disrupting chemicals. **World Mycotoxin Journal**, v. 3, n. 4, p. 385-401, 2010.

MHLW. Ministry of Health, Labour and Welfare. **Guideline for the validation of analytical methods for agricultural chemical residues in food**. Tokyo, Japan, 2010. Disponível em: <https://www.mhlw.go.jp/english/topics/foodsafety/positivelist060228/dl/181130_21.pdf>. Acesso em: 28 outubro 2020.

MILANI, J. M. Ecological conditions affecting mycotoxin production in cereals: a review. **Veterinarni Medicina**, v. 58, issue 8, p. 405-411, 2013.

MORETTI, A.; LOGRIECO, A. F.; SUSCA, A. Mycotoxins: An Underhand Food Problem. In: MORETTI, A.; SUSCA, A. **Mycotoxigenic Fungi: Methods and Protocols**, Methods in Molecular Biology. vol 1542. New York: Humana Press, 2017, chap. 1, p. 3-12.

MUTHULAKSHMI, S. *et al.* Zearalenone induced embryo and neurotoxicity in zebrafish model (*Danio rerio*): Role of oxidative stress revealed by a multi biomarker study. **Chemosphere**, v. 198, p. 111-121, 2018.

NARVÁEZ, A. *et al.* Ultra-High-Performance Liquid Chromatography Coupled with Quadrupole Orbitrap High-Resolution Mass Spectrometry for Multi-Residue Analysis of Mycotoxins and Pesticides in Botanical Nutraceuticals. **Toxins**, v. 12, issue 2, p. 1-16, 2020.

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

PASCARI, X. *et al.* Survey of mycotoxins in beer and exposure assessment through the consumption of commercially available beer in Lleida, Spain. **LWT - Food Science and Technology**, v. 92, p. 87-91, 2018.

PAYROS, D. *et al.* Toxicology of deoxynivalenol and its acetylated and modified forms. **Archives of Toxicology**, v. 90, issue 12, p. 2931-2957, 2016.

PEREIRA, V. L.; FERNANDES, J. O.; CUNHA, S. C. Mycotoxins in cereals and related foodstuffs: A review on occurrence and recent methods of analysis. **Trends in Food Science & Technology**, v. 36, p. 96-136, 2014.

PERESTRELO, R. *et al.* QuEChERS - Fundamentals, relevant improvements, applications and future trends. **Analytica Chimica Acta**, v. 1070, p. 1-28, 2019.

PÉREZ-ORTEGA, P. *et al.* Screening of Over 600 Pesticides, Veterinary Drugs, Food-Packaging Contaminants, Mycotoxins, and Other Chemicals in Food by Ultra-High Performance Liquid Chromatography Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry (UHPLC-QTOFMS). **Food Analytical Methods**, v. 10, issue 5, p. 1216-1244, 2017.

PERNICA, M. *et al.* Analytical techniques for determination of mycotoxins in barley, malt and beer: A review. **Kvasny prumysl**, v. 65, issue 2, p. 46-57, 2019.

PESTKA, J. J. Deoxynivalenol: mechanisms of action, human exposure, and toxicological relevance. **Archives of Toxicology**, v. 84, issue 9, p. 663-679, 2010.

PIACENTINI, K. C. *et al.* Fungi and the natural occurrence of deoxynivalenol and fumonisins in malting barley (*Hordeum vulgare* L.). **Food Chemistry**, v. 187, p. 204-209, 2015.

PISTOL, G. C. *et al.* Natural feed contaminant zearalenone decreases the expressions of importante pro- and anti-inflammatory mediators and mitogen-activated protein kinase/NF- κ B signalling molecules in pigs. **British Journal of Nutrition**, v. 11, issue 3, p. 452-464, 2014.

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

RAPOSO, F.; IBELLI-BIANCO, C. Performance parameters for analytical method validation: Controversies and discrepancies among numerous guidelines. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 129, p. 1-12, 2020.

RAUSCH, A.; BROCKMEYER, R.; SCHWERDTLE, T. Development and Validation of a QuEChERS-Based Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry Multi-Method for the Determination of 38 Native and Modified Mycotoxins in Cereals. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 68, p. 4657-4669, 2020.

RODRÍGUEZ-CARRASCO, Y. *et al.* Occurrence of *Fusarium* mycotoxins and their dietary intake through beer consumption by the European population. **Food Chemistry**, v. 178, p. 149-155, 2015.

ROMERA, D. *et al.* Determination of multiple mycotoxins in feedstuffs by combined use of UPLC-MS/MS and UPLC-QTOF-MS. **Food Chemistry**, v. 267, p. 140-148, 2018.

ROSENTRATER, K. A.; EVERS, A. D. Malting, brewing, fermentation and distilling. In:_____. **Kent's Technology of Cereals: An Introduction for Students of Food Science and Agriculture**. 5th ed. Woodhead Publishing, 2018, chap. 12, p. 729-784.

ROZENTALE, I.; BOGDANOVA, E.; BARTKEVICS, V. A rapid and sensitive method for the control of selected regulated and emerging mycotoxins in beer. **World Mycotoxin Journal**, v. 11, issue 4, p. 1-16, 2018.

SAITO-SHIDA, S. *et al.* Quantitative analysis of pesticide residues in vegetables and fruits by liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry. **Food Additives & Contaminants: Part A**, v. 33, issue 1, p. 119-127, 2016.

SANTE. **Method Validation and Quality Control Procedures for Pesticide Residues Analysis in Food and Feed**, SANTE/12682/2019, 2020. Disponível em: <https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/plant/docs/pesticides_mrl_guidelines_wrkdoc_2019-12682.pdf>. Acesso em: 12 abril 2020

SEBRAE. **Microcervejarias no Brasil**. p. 1-20, 2016. Disponível em: <[http://www.bibliotecas.sebrae.com.br/chronus/ARQUIVOS_CHRONUS/bds/bds.nsf/8818d2954be64fcda8628defef1f70f8/\\$File/7503.pdf](http://www.bibliotecas.sebrae.com.br/chronus/ARQUIVOS_CHRONUS/bds/bds.nsf/8818d2954be64fcda8628defef1f70f8/$File/7503.pdf)>. Acesso em: 14 maio 2020.

SHEPHARD, G. S. Current Status of Mycotoxin Analysis: A Critical Review. **Journal AOAC International**, v. 99, issue 4, p. 842-848, 2016.

SILVA, A. S. *et al.* UHPLC-ToF-MS method for determination of multi-mycotoxins in maize: Development and validation. **Current Research in Food Science**, v. 1, p. 1-7, 2019.

SIRHAN, A. Y.; TAN, G. H.; WONG, R. C. S. Simultaneous detection of type A and type B trichothecenes in cereals by liquid chromatography coupled with electrospray ionization quadrupole time of flight mass spectrometry (LC-ESI-QTOF-MS/MS). **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 35, issue 14, p. 1945-1957, 2012.

SOLEIMANY, F. *et al.* A UPLC-MS/MS for simultaneous determination of aflatoxins, ochratoxin A, zearalenone, DON, fumonisins, T-2 toxin and HT-2 toxin, in cereals. **Food Control**, v. 25, issue 2, p. 647-653, 2012.

STANCIU, O. *et al.* Analysis of enniatins and beauvericin by LC-MS/MS in wheat-based products. **CyTA - Journal of Food**, v. 15, issue 3, 2017.

STIBOROVÁ, M.; ARLT, V. M.; SCHMEISER, H. H. Balkan endemic nephropathy: an update on its aetiology. **Archives of Toxicology**, v. 90, issue 11, p. 2595-2615, 2016.

SUN, J. *et al.* QuEChERS purification combined with ultrahigh-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry for simultaneous quantification of 25 mycotoxins in cereals. **Toxins**, v. 8, issue 12, 2016.

TAMURA, M.; UYAMA, A.; MOCHIZUKI, N. Development of a Multi-mycotoxin Analysis in Beer-based Drinks by a Modified QuEChERS Method and Ultra-High-Performance Liquid Chromatography Coupled with Tandem Mass Spectrometry. **Analytical Sciences**, v. 27, issue 6, p. 629-635, 2011.

THEUMER, M. G. *et al.* Genotoxicity of aflatoxins and their precursors in human cells. **Toxicology Letters**, v. 287, p. 100-107, 2018.

TITTEMIER, S. A. *et al.* Developments in mycotoxin analysis: an update for 2018-19. **World Mycotoxin Journal**, v. 13, issue 1, p. 3-24, 2020.

TRICASE, C. *et al.* Economic analysis of the barley market and related uses. In: TADELE, Z. **Grasses as Food and Feed**. London: IntechOpen Limited, 2018, chap. 2, p. 25-46. Disponível em: <<https://www.intechopen.com/books/grasses-as-food-and-feed/economic-analysis-of-the-barley-market-and-related-uses>>. Acesso em: 26 agosto 2020.

TURNER, N. W.; SUBRAHMANYAM, S.; PILETSKY, S. A. Analytical methods for determination of mycotoxins: A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 632, issue 2, p. 1168-180, 2009.

VENKATARAMANA, M. *et al.* Zearalenone induced toxicity in SHSY-5Y cells: the role of oxidative stress evidenced by N-acetyl cysteine. **Food and Chemical Toxicology**, v. 65, p. 335-342, 2014.

VERSTEGEN, H. *et al.* The World Importance of Barley and Challenges to Further Improvements. In: KUMLEHN, J.; STEIN, N. **Biotechnological Approaches to Barley Improvement**. 1st ed. Berlin: Springer, 2014, chap. 1, part 1, p. 3-19.

WALL-MARTÍNEZ, H. A. *et al.* Frequency and levels of mycotoxins in beer from the Mexican market and exposure estimate for deoxynivalenol mycotoxins. **Mycotoxin Research**, v. 35, issue 2, p. 207-216, 2019.

WANG, Z. *et al.* Deoxynivalenol: signaling pathways and human exposure risk assessment - an update. **Archives of Toxicology**, v. 88, issue 11, p. 1915-1928, 2014.

WEIDENBÖRNER, M. **Natural Mycotoxin Contamination in Humans and Animals**. 1st ed. Springer, 2015, p. 1-300.

WEIDENBÖRNER, M. Mycotoxin Contamination of Cereals and Cereal Products. In:_____. **Mycotoxins in Plants and Plant Products: Cereals and Cereal Products**. 1st ed. Springer, 2017, chap. 1, p. 1-715.

ZACHARIASOVA, M. *et al.* Analysis of multiple mycotoxins in beer employing (ultra)-high-resolution mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 24, p. 3357-3367, 2010.

ZINEDINE, A. *et al.* Review on the toxicity, occurrence, metabolism, detoxification, regulations and intake of zearalenone: an oestrogenic mycotoxin. **Food and Chemical Toxicology**, v. 45, issue 1, p. 1-18, 2007.

APÊNDICE A

Espectros de massa mostrando o padrão de fragmentação das dezessete micotoxinas analisadas com LC-QToF-MS. O diamante azul (♦) representa o íon precursor (m/z)

