Validação de um método analítico para quantificação de micotoxinas legisladas e emergentes em malte e cerveja usando QuEChERS-LC-QToF- MS

Laura Oliveira Lago¹, Rafaela Diogo Siveira¹, Flávio Fonseca Veras¹, Tássia Henrique Nievierowski¹, Juliane Elisa Welke¹

Resumo

Uma ampla variedade de micotoxinas pode ocorrer em produtos à base de cereais, incluindo malte e cerveja. Métodos analíticos para a determinação simultânea confiável e precisa de multi-micotoxinas em diferentes matrizes são necessários. O objetivo deste estudo foi desenvolver um método analítico para determinar dezessete toxinas fúngicas em cevada maltada e cerveja, incluindo micotoxinas legisladas (aflatoxinas, ocratoxina A, desoxinivalenol, fumonisina B1, zearalanona, toxina T-2 e HT-2) e emergentes (eniáticas, beauvericina, moniliformina e esterigmatocistina) usando cromatografia líquida acoplada a detecção por espectrometria de massas com analisador híbrido quadruplo-tempo de voo (LC- QToF-MS). O desempenho do método foi satisfatório exibindo linearidade ($R^2 > 0,99$) e recuperação (71-102%) adequadas. Os menores valores (em $\mu\text{g kg}^{-1}$) de limite de detecção (LOD, 0,01) e limite de quantificação (LOQ, 0,05) foram encontrados para as eniáticas, enquanto os maiores valores de LOD (15) e LOQ (50) foram relatados para a fumonisina B1. A repetibilidade e a precisão intermediária do método foram avaliadas a partir do coeficiente de variação ($\text{CV} < 10\%$) de análises feitas em dias diferentes e no mesmo dia, respectivamente e mostraram-se adequadas de acordo com as diferentes diretrizes de validação do método.

Palavras-chave: cevada maltada; LC/MS; cromatografia líquida.

Introdução

As toxinas fúngicas apresentam efeitos nocivos à saúde humana e animal como hepatotoxicidade, nefrotoxicidade, problemas reprodutivos, imunossupressão e carcinogenicidade. As principais micotoxinas encontradas em produtos de cereais são aflatoxinas (AFs), ocratoxina A (OTA), tricotecenos [desoxinivalenol (DON), toxina T-2, toxina HT-2], fumonisinas e zearalenona (ZEA). Limites máximos têm sido estabelecidos para essas micotoxinas em cereais. Resumidamente, a legislação europeia estabelece um limite para a soma de AFs (B1, B2, G1 e G2: $4 \mu\text{g kg}^{-1}$) e OTA ($3 \mu\text{g kg}^{-1}$) em produtos à base de cereais (COMISSÃO EUROPEIA, 2006). No Brasil, as regulamentações são aplicadas aos produtos de cereais para AFs (soma de B1, B2, G1, G2), OTA, ZEA e DON com limites máximos de 5, 10, 100 e $750 \mu\text{g kg}^{-1}$, respectivamente (Brasil, 2011; Brasil, 2017). Esses limites incluem malte e cerveja, pois são produtos de cereais. Em relação à HT-2 e T-2, a soma dessas toxinas deve ser inferior a $200 \mu\text{g kg}^{-1}$ na cevada destinada à elaboração de malte de acordo com a Comissão Europeia (CE) (2013). Um limite máximo foi estabelecido para DON ($200 \mu\text{g kg}^{-1}$) e ZEA ($20 \mu\text{g kg}^{-1}$) em produtos à base de cereais processados (COMISSÃO EUROPEIA, 2006), que inclui qualquer cereal maltado usado na fabricação de cerveja. As fumonisinas são legisladas para alimentos à base de milho na Europa ($200 \mu\text{g kg}^{-1}$) (COMISSÃO EUROPEIA, 2007) e no Brasil ($1000 \mu\text{g kg}^{-1}$) (BRASIL, 2017), abrangendo o milho maltado que também pode ser usado na produção de cerveja.

Além das micotoxinas regulamentadas, existem micotoxinas emergentes como a beauvericina (BEA), eniáticas (ENs), moniliformina (MON) e esterigmatocistina (STG). Embora esses compostos não sejam regulamentados, eles têm alta ocorrência e podem ser encontrados em produtos à base de cereais em níveis elevados (ROSSI; GALLO; BERTUZZI, 2020).

No passado, os métodos analíticos eram desenvolvidos para uma única micotoxina (por exemplo, aflatoxina B1) ou grupos de micotoxinas estruturalmente relacionadas (por exemplo, AFB1, B2, G1, G2). Os métodos atuais estão focados na aplicação de tecnologias robustas com alta sensibilidade e seletividade que podem detectar e quantificar múltiplas micotoxinas em uma única corrida cromatográfica. A determinação simultânea desses contaminantes requer menos tempo e trabalho por amostra/analito em comparação com métodos que realizam análises individuais de micotoxinas. Além disso, a coocorrência de micotoxinas é geralmente relatada em produtos à base de cereais, uma vez que os fungos são capazes de produzir vários metabólitos secundários simultaneamente e diferentes fungos podem contaminar os cereais simultaneamente (MALACHOVÁ *et al.*, 2018).

Uma ampla variedade de micotoxinas pode ocorrer em produtos à base de cereais e, portanto, são necessários métodos analíticos para a determinação simultânea, confiável e precisa de micotoxinas em diferentes matrizes. Métodos analíticos baseados em cromatografia líquida com detecção de espectrometria de massa (LC/MS) são indicados para avaliar múltiplas micotoxinas

¹Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos (ICTA), Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Avenida Bento Gonçalves 9500, CEP: 91501-970, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. juliane.welke@ufrgs.br

(BECCARI *et al.*, 2016; GONZÁLEZ-JARTÍN *et al.*, 2019; WALL-MARTÍNEZ *et al.*, 2019). O objetivo deste estudo foi validar um método para a determinação simultânea de dezessete toxinas fúngicas em cevada maltada e cerveja usando LC-QToF-MS. Essas micotoxinas são legisladas pela Comissão Europeia e/ou Brasil (AFB1, AFB2, AFG1 e AFG2, OTA, DON, ZEA, fumonisina B1, toxina T-2 e HT-2) ou são micotoxinas emergentes (BEA, MON, STG, eniatinas A, B, A1 e B1).

Material e Métodos

Extração de micotoxinas usando o procedimento QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe)

Para o malte, 5 g da amostra foram colocados em um tubo cônico de 50 mL e 15 mL do solvente de extração composto por acetonitrila/água (75:25, v/v) foram adicionados. A mistura foi manualmente agitada por 1 min e 2 g de sulfato de magnésio hepta-hidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) (Panreac Quimica S.A., Barcelona, Spain), 1 g de cloreto de sódio (NaCl) (Panreac Quimica S.A., Barcelona, Spain), foi adicionado. A agitação no vórtex ocorreu por 1 min e a mistura foi sonicada por 3 min, seguida por centrifugação por 6 min a 3000 rpm.

Para a cerveja, foram adicionados 5 mL de cerveja desgaseificada e 5 mL de acetonitrila (J. T. Baker, Phillipsburg, New Jersey, USA) a um tubo de 15 mL, o qual foi agitado manualmente por 1 min. $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (2 g) e NaCl (1 g) foram adicionados ao tubo e a mistura foi agitada no vórtex durante 1 min, seguida de sonicação durante 3 min e centrifugação durante 5 min a 3000 rpm.

Determinação de micotoxinas usando LC-QToF-MS

As análises foram realizadas utilizando um cromatógrafo líquido acoplado a um espectrômetro de massas do tipo quadrupolo tempo de voo (LC-QToF-MS). As micotoxinas foram separadas em uma coluna C18 a vazão de 0,4 mL min⁻¹ usando água ultrapura (Millipore Milli-Q Plus system, Molsheim, France) e acetonitrila como fase móvel. Ambas as fases continham 0,1% de ácido acético e 4 mM de acetato de amônio e foram usadas 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 depois a 40:60 em 19 minutos de fases móveis orgânica e aquosa, respectivamente.

Validação do método

Os parâmetros de validação do método, incluindo linearidade, recuperação, precisão intermediária (reprodutibilidade), repetibilidade, limites de quantificação (LOQ) e detecção (LOD), foram avaliados de acordo com a Conferência Internacional de Harmonização (ICH, 2005). A linearidade foi verificada por meio do coeficiente de determinação (R^2) das curvas de calibração preparadas usando calibração combinada à matriz. 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 repetibilidade e a precisão intermediária foram calculadas como o coeficiente de variação (CV) de 4 análises realizadas em 4 dias diferentes ($n = 16$) e 4 análises realizadas no mesmo dia ($n = 4$), respectivamente.

Resultados e Discussão

O desempenho do método LC-QToF-MS é apresentado na Tabela 1. As curvas analíticas apresentaram linearidade adequada ($R^2 > 0,99$). Os valores de LOD e LOQ mostraram que o método é suficientemente sensível para determinar as 17 micotoxinas nestas matrizes. Os valores de LOD e LOQ foram entre 8 e 67 vezes menores que o valor estabelecido como limite máximo permitido pela legislação para as diferentes micotoxinas. Por exemplo, o LOQ (0,25 $\mu\text{g kg}^{-1}$) verificado para AFB1 foi 8 vezes menor que o limite máximo permitido para esta micotoxina nos produtos de cereais (2 $\mu\text{g kg}^{-1}$) (COMISSÃO EUROPEIA, 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).

Em relação às micotoxinas emergentes, os valores obtidos como LOD e LOQ também foram comparados com outros métodos da literatura. Sobre o malte, LOD e LOQ, respectivamente, para MON e STG foram inferiores aos relatados por Beccari *et al.* (2016) usando LC-HRMS. BEA e ENs apresentaram LOD e LOQ inferiores aos encontrados por Habler *et al.* (2017) que empregou LC- QTrapMS. 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 MON e BEA. Por fim, os valores de LOD e LOQ do método em estudo foram semelhantes aos relatados para STG por Wall-Martínez *et al.* (2019) e para ENs por González-Jartín *et al.* (2019). Porcentagens de recuperação adequadas foram obtidas para todas as micotoxinas variando de 72 a 102% (malte) e de 73% a 100% (cerveja) para MON e BEA, respectivamente.

Conclusões

O método LC-QToF-MS apresentou bom desempenho analítico, adequada linearidade, precisão, exatidão e sensibilidade para quantificar as 17 micotoxinas em malte e cerveja. A avaliação das micotoxinas legisladas permite verificar a adequação aos parâmetros regulatórios. Além disso, a avaliação de micotoxinas emergentes pode ser uma importante fonte de dados para apoiar o futuro estabelecimento de legislação para esses compostos, a fim de proteger a população dos riscos à saúde.

Tabela 1: Desempenho do método LC-QToF-MS usado para determinar as dezessete micotoxinas (legisladas e emergentes) em malte e cerveja

Analito	Intervalo ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Matriz	Equação de regressão	LOD/LOQ ($\mu\text{g kg}^{-1}$) ^b	Conc. ($\mu\text{g kg}^{-1}$) ^c	Rec. (%) ^d	Repe. – CV (%) ^e	Prec. inter. – CV (%) ^f
MON	15 - 3000	Malte	$y = 14x + 28709$ $R^{2a}: 0,99189$	5/ 15	15	72	5,4	6,6
					1000	78	1,6	4,5
					3000	79	1,0	5,0
	15 - 2500	Cerveja	$y = 11x + 29171$ $R^{2a}: 0,99382$	5/ 15	15	73	9,0	9,9
					1000	80	1,0	6,0
					2500	83	1,1	5,5
DON	10 - 1000	Malte	$y = 250x + 904$ $R^{2a}: 0,99795$	2,5/ 10	10	76	6,5	8,0
					500	73	1,5	2,8
					1000	79	1,2	4,0
	5 - 1000	Cerveja	$y = 42x + 39798$ $R^{2a}: 0,99665$	1,0/ 5	5	73	6,0	9,8
					500	75	3,3	8,2
					1000	81	1,3	5,2
FB1	50 - 500	Malte	$y = 252x - 59079$ $R^{2a}: 0,99048$	15/ 50	50	79	6,8	9,5
					200	75	2,0	2,5
					500	79	5,5	9,0
	50 - 500	Cerveja	$y = 197x - 43330$ $R^{2a}: 0,99422$	15/ 50	50	78	6,0	8,7
					200	74	5,4	9,0
					500	79	4,5	5,9
AFG2	0,25 - 50	Malte	$y = 6914x - 4118,40$ $R^{2a}: 0,99935$	0,05/ 0,25	0,25	90	6,9	9,0
					10	91	6,4	8,0
					50	93	5,0	6,6
	0,25 - 50	Cerveja	$y = 6266x - 794$ $R^{2a}: 0,99956$	0,05/ 0,25	0,25	92	6,9	8,0
					10	90	5,5	8,6
					50	95	6,0	7,5
AFB2	0,25 - 50	Malte	$y = 8281x + 37425$ $R^{2a}: 0,99471$	0,05/ 0,25	0,25	95	7,1	8,2
					10	98	5,0	6,6
					50	95	5,9	5,5
	0,25 - 50	Cerveja	$y = 9709x + 18126$ $R^{2a}: 0,99892$	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	$y = 7000x + 31$ $R^{2a}: 0,99357$	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	$y = 5659x + 5533$ $R^{2a}: 0,99874$	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	$y = 10856x - 7347$ $R^{2a}: 0,99922$	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	$y = 9865x - 6899$ $R^{2a}: 0,99918$	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	$y = 95114x + 3331$ $R^{2a}: 0,99602$	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	$y = 79882x - 20105$ $R^{2a}: 0,99527$	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		2,0/	50	90	6,8	6,2

T-2	50 - 2000	Cerveja	$y = 679x - 108888$ $R^{2a}: 0,98771$	5	1250 2000	89 93	2,1 2,0	5,2 4,4
			$y = 724x - 121430$ $R^{2a}: 0,98607$	2,5/ 5	50 1250 2000	92 90 95	8,1 3,8 1,3	8,9 6,3 5,1
	50 - 1500	Malte	$y = 8372x - 944800$ $R^{2a}: 0,99254$	1,5/ 5	50 625 1500	90 91 95	8,5 1,2 2,4	8,0 3,8 5,0
			$y = 10865x - 1387991$ $R^{2a}: 0,99003$	1,5/ 5	50 625 1500	90 90 95	5,7 1,3 2,6	7,0 5,7 3,1
	0,25 - 250	Malte	$y = 19480x + 486932$ $R^{2a}: 0,99786$	0,10/ 0,25	0,25 25 250	90 91 90	2,3 6,2 5,5	6,0 7,5 5,0
			$y = 21093x + 113257$ $R^{2a}: 0,99933$	0,05/ 0,125	0,125 50 375	92 90 90	4,5 3,2 2,5	5,5 9,7 3,0
	12,5 - 1800	Malte	$y = 6665x - 135409$ $R^{2a}: 0,99750$	5,0/ 12,5	12,5 125 1800	91 90 96	6,0 6,5 2,8	5,4 6,6 6,3
			$y = 5551x - 211365$ $R^{2a}: 0,99840$	5/ 12,5	25 1000 2000	95 96 97	6,0 4,2 1,5	6,8 5,2 4,4
	2,5 - 250	Malte	$y = 88687x + 27435$ $R^{2a}: 0,99506$	0,5/ 2,5	2,5 62,5 250	96 95 92	3,0 2,8 3,6	5,2 3,3 5,2
			$y = 74274x + 86235$ $R^{2a}: 0,99153$	0,01/ 0,05	0,05 62,5 250	96 97 98	4,2 5,5 5,3	3,5 6,4 6,8
	0,05 - 250	Cerveja	$y = 90074x + 104628$ $R^{2a}: 0,99072$	0,01/ 0,05	0,05 62,5 250	95 93 99	6,3 3,3 2,6	6,6 3,5 2,9
			$y = 69492x + 59126$ $R^{2a}: 0,99845$	0,01/ 0,05	0,05 62,5 250	99 96 91	3,0 6,0 5,8	7,0 7,5 6,6
	0,125 - 100	Malte	$y = 54527x + 20653$ $R^{2a}: 0,99917$	0,025/ 0,125	0,125 5 100	98 102 99	3,2 2,8 1,0	5,1 6,0 5,5
			$y = 51054x + 65683$ $R^{2a}: 0,9921$	0,025/ 0,125	0,125 5 100	98 100 99	2,0 1,2 5,8	3,5 9,1 2,5
	1,25 - 250	Malte	$y = 61795x - 597829$ $R^{2a}: 0,99418$	0,5/ 1,25	1,25 25 250	95 99 96	6,8 5,2 5,0	8,2 9,5 9,1
			$y = 61103x - 526397$ $R^{2a}: 0,99898$	0,01/ 0,05	0,05 25 250	90 92 98	5,5 4,5 9,2	9,2 6,6 9,0
	0,05 - 250	Malte	$y = 32570x + 85502$ $R^{2a}: 0,99959$	0,01/ 0,05	0,05 50 250	99 96 90	7,0 7,8 5,4	5,5 9,0 6,7
			$y = 39228x + 99096$ $R^{2a}: 0,99879$	0,01/ 0,05	0,05 50 250	92 97 95	5,4 5,0 6,8	6,7 5,5 7,0

^a Coeficiente de determinação; ^b LOD: Limite de detecção; ^c LOQ: Limite de quantificação; ^d Concentração; ^e Porcentagem de recuperação; ^f Repetibilidade: 4 análises realizadas no mesmo dia, n = 4; ^g Precisão intermediária: 4 análises realizadas em 4 dias diferentes, n = 16.

Referências

- BECCARI, G; CAPRONI, L; TINI, F; UHLIG, S; COVARELLI, L. 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, n. 21, p. 4390–4399, 2016.
- Brasil (2011). Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Regulamento Técnico sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos. RDC nº 07, 18 de fevereiro de 2011. RDC nº 138, 8 de fevereiro de 2017.
- Brasil (2017). Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Regulamento Técnico sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos. RDC nº 138, 8 de fevereiro de 2017.
- Comissão Europeia (2006). Commission Regulation (EC) No 1881/2006 Maximum levels for certain contaminants in food. *Official Journal of the European Union*, 5-24.
- Comissão Europeia (2007). 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*, 14- 17.
- Comissão Europeia (2013). 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*, 12-15.
- GONZÁLEZ-JARTÍN, J.M.; ALFONSO, A; RODRÍGUEZ, ; SAINZ, M. J.; VIEYTES, M. R.; BOTANA, L. M. A QuEChERS based extraction procedure coupled to UPLC-MS/MS detection for mycotoxins analysis in beer. *Food Chemistry*, v. 275, p. 703–710, 2019.
- ICH - International Conference on Harmonization. 2005. Validation of analytical procedures: Text and Methodology, Q2(R1). ICH Harmonised Tripartite Guideline, London. <https://database.ich.org/sites/default/files/Q2%28R1%29%20Guideline.pdf>.
- MALACHOVÁ, A; STRÁNSKÁ, M; VÁCLAVÍKOVÁ, ; ELLIOTT, C. T.; BLACK, C; MENEELY, J; HAJŠLOVÁ, J; EZEKIEL, C. N.; SCHUHMACHER, R; KRSKA, R. 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, n. 3, p. 801–825, 2018.
- ROSSI, ; GALLO, A BERTUZZI, T. Emerging mycotoxins in the food chain. *Mediterranean Journal of Nutrition and Metabolism*, v. 13, n. 1, p. 7–27, 2020.
- WALL-MARTÍNEZ, H. A.; PASCARI, X; RAMOS, A. J.; MARÍN, S; SANCHIS, V. Frequency and levels of mycotoxins in beer from the Mexican market and exposure estimate for deoxynivalenol mycotoxins. *Mycotoxin Research*, v. 1, n. class 1, 2019.