



DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO POR LC-MS/MS PARA MICOTOXINAS EM MACARRÃO INSTANTÂNEO

Adriana Palma de Almeida¹, Simone Alves da Silva¹, Ana Lucia Rosa de Faria¹, Lunalva de Oliveira¹, Janete Alaburda², Geni Rodrigues Sampaio³

¹Núcleo de Contaminantes Orgânicos, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, Brasil
(adriana.almeida@ial.sp.gov.br)

²Centro de Contaminantes, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, Brasil

³Departamento de Nutrição, Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil

Resumo: Foi desenvolvido e validado um método analítico por LC-MS/MS para determinação de micotoxinas em macarrão instantâneo, em conformidade com os parâmetros de validação. O método foi aplicado a amostras comerciais, nas quais o desoxinivalenol (DON) foi detectado em 47% das amostras, com concentrações entre <LQ e 386,16 µg/kg. Os resultados reforçam a relevância do monitoramento das micotoxinas em produtos a base de trigo ou massas alimentícias.

Palavras-chave: Micotoxinas; Macarrão instantâneo; Desoxinivalenol; Validação de metodologia; LC-MS/MS

INTRODUÇÃO

As micotoxinas são metabólitos secundários produzidos por fungos filamentosos, principalmente dos gêneros *Fusarium*, *Aspergillus* e *Penicillium*, que podem contaminar cereais e seus derivados ao longo da cadeia produtiva, desde o campo até o produto final. A presença dessas toxinas em alimentos representa um relevante problema de segurança alimentar e saúde pública, uma vez que a exposição crônica está associada a efeitos adversos como imunotoxicidade, hepatotoxicidade e potencial carcinogênico (Bennett e Klich, 2003; Pitt e Hocking, 2009; IARC, 2012; EFSA, 2017).

Entre as micotoxinas de maior importância em produtos à base de trigo destaca-se o desoxinivalenol (DON), um tricoteceno produzido principalmente por espécies de *Fusarium*, como *F. graminearum* e *F. culmorum*. Esse contaminante é frequentemente detectado em trigo, farinhas e massas alimentícias, sendo considerado um dos principais indicadores de contaminação fúngica em cereais (Desjardins, 2006; Khaneghah, 2018). O DON apresenta elevada estabilidade térmica, podendo persistir mesmo após etapas de processamento industrial, o que favorece sua ocorrência em alimentos processados, como o macarrão instantâneo (Bullerman; Bianchini, 2007; Van der Fels-Klerx, H. J. et al, 2022).

O macarrão instantâneo é um produto amplamente consumido no Brasil e no mundo, devido à praticidade, baixo custo e longa vida de prateleira. Por ser elaborada predominantemente a partir de farinha de trigo, essa matriz está potencialmente

sujeita à contaminação por micotoxinas já presentes na matéria-prima, o que reforça a necessidade de monitoramento sistemático desse tipo de alimento (Monteiro et al., 2019). No Brasil, os limites máximos tolerados para micotoxinas em alimentos, incluindo o DON em produtos à base de trigo, são estabelecidos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária por meio da RDC nº 722/2022 (BRASIL, 2022).

Nesse contexto, a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em tandem (LC-MS/MS) tem se consolidado como a técnica de escolha para a determinação multiresíduo de micotoxinas, em função de sua elevada sensibilidade, seletividade e capacidade de quantificação simultânea de múltiplos analitos em matrizes complexas (Malachová et al., 2018; Ouakhsase e Ait Addi, 2022). A aplicação de métodos validados é essencial para assegurar resultados confiáveis, subsidiar ações de vigilância sanitária e apoiar a avaliação da conformidade regulatória de alimentos comercializados.

Diante desse contexto, o presente trabalho teve como objetivos desenvolver e validar um método analítico por LC-MS/MS para a determinação de micotoxinas em macarrão instantâneo e aplicar o método a amostras comerciais adquiridas no comércio varejista, visando avaliar a ocorrência de desoxinivalenol (DON), aflatoxinas (AFs), fumonisinas, ocratoxina A (OTA) e zearalenona (ZEA), bem como contribuir para o monitoramento da segurança alimentar e a geração de dados nacionais sobre essa matriz amplamente consumida.



MATERIAL E MÉTODOS

As etapas de extração e purificação das micotoxinas foram fundamentadas no estudo de Kim et al. (2017), com adaptações para a matriz avaliada. Aproximadamente 5,0 g de macarrão instantâneo foram pesados em tubo Falcon de 50 mL, aos quais foram adicionados 20 mL de solução acetonitrila:água:ácido acético (79,5:20,0:0,5, v/v/v). As amostras foram agitadas em agitador horizontal a 320 rpm por 60 min, centrifugadas a $3000 \times g$ por 5 min e o sobrenadante foi filtrado em papel de filtro.

Uma alíquota de 2,5 mL do filtrado foi diluída com 37,5 mL de tampão fosfato, pH 7.4 (PBS), homogeneizada e filtrada em papel de microfibras. O extrato resultante foi então submetido à etapa de purificação.

A purificação foi realizada utilizando colunas de imunoafinidade Myco6in1® (VICAM), acopladas a um sistema automatizado de extração em fase sólida (Gilson GX-274 ASPEC® System). Um volume de 32 mL do extrato diluído foi aplicado na coluna, seguido de lavagem com 10 mL de PBS e 10 mL de água deionizada. Após secagem sob vácuo, as micotoxinas foram eluídas com 5 mL de metanol a 80% contendo 0,5% de ácido acético. O eluato foi evaporado até a secura sob fluxo de nitrogênio a 45 °C, e o resíduo foi reconstituído em 1000 µL de acetonitrila:ácido fórmico 0,1% (50:50, v/v). A solução final foi filtrada em filtro de membrana de PTFE de 0,22 µm, transferida para vials.

A quantificação das micotoxinas (DON, AFs, fumonisinas, OTA e ZEA) foi realizada por LC-MS/MS, com base nos trabalhos de Varga et al. (2012) e Miró-Abella et al. (2017). Os padrões analíticos e as amostras purificadas foram analisados em um cromatógrafo a líquido de ultra eficiência (modelo 1290, Agilent Technologies) acoplado a um espectrômetro de massas triplo quadrupolo (modelo 6495, Agilent Technologies), equipado com fonte de ionização por electrospray (ESI).

A validação do método foi conduzida de acordo com as diretrizes do Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO, 2020), abrangendo os parâmetros de seletividade, linearidade, exatidão (recuperação), precisão (repetibilidade) e limites de detecção (LD) e quantificação (LQ), avaliados em triplicata.

O efeito matriz (EM) foi determinado pela razão entre as inclinações das curvas analíticas preparadas em matriz e em solvente, sendo expresso como variação percentual do sinal analítico. A seletividade foi avaliada por meio da fortificação de padrões em diferentes níveis de concentração em solvente e em matriz, com posterior comparação das inclinações das curvas de calibração.

A linearidade foi investigada pela construção de curvas analíticas em pelo menos cinco níveis de concentração, preparadas em matriz ou em solvente, conforme aplicável. A exatidão e a precisão foram avaliadas por ensaios de fortificação de amostras em branco em três níveis de concentração, sendo avaliados as recuperações e os coeficientes de variação (CV).

Os LD e LQ foram estimados a partir dos desvios-padrão de seis réplicas das menores concentrações da curva de calibração, multiplicados por três e seis, respectivamente.

Para a aplicação do método validado, foram avaliadas 15 amostras de macarrão instantâneo adquiridas no comércio varejista do estado de São Paulo, de diferentes marcas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste trabalho, o preparo das amostras envolveu a extração das micotoxinas a partir de material previamente homogeneizado, empregando solventes orgânicos, seguida de etapa de limpeza para minimização de interferentes. A separação cromatográfica foi realizada em coluna de fase reversa, utilizando gradiente de fase móvel aquosa e orgânica, ambas contendo modificadores voláteis compatíveis com a ionização por ESI. A detecção foi conduzida em modo de monitoramento de reações múltiplas (MRM), possibilitando a determinação simultânea de diferentes classes de micotoxinas, incluindo DON, AFs, fumonisinas, OTA e ZEA. A Figura 1 apresenta um cromatograma das nove micotoxinas em padrão preparado em solvente detectadas por LC-MS/MS em modo MRM.

Um método multiresíduo por LC-MS/MS foi estabelecido e validado para a análise de micotoxinas em macarrão instantâneo, uma matriz de amplo consumo e suscetível à contaminação por fungos. O procedimento analítico foi ajustado para assegurar sensibilidade, seletividade e robustez, em conformidade com critérios de validação preconizados pelo INMETRO.

A validação do método compreendeu a avaliação de diferentes parâmetros, sendo a Tabela 1 um resumo dos principais resultados obtidos. No estudo da seletividade, foi observado efeito matriz (EM), com predominância de supressão de sinal; dessa forma, o estudo de linearidade e a quantificação foram realizados por meio de curvas analíticas preparadas em matriz branca de macarrão instantâneo.

As curvas analíticas apresentaram coeficientes de correlação (r^2) superiores a 0,99 para todos os analitos, indicando adequada linearidade. As recuperações médias variaram de 84,83 a 101,94%,

com coeficientes de variação (CV) inferiores a 11%, evidenciando boa exatidão e precisão do método.

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) demonstraram que o método apresenta elevada sensibilidade, sendo capaz de identificar e quantificar concentrações bem inferiores aos níveis máximos estabelecidos pela legislação brasileira vigente para micotoxinas em produtos à base de trigo.

O método validado foi aplicado à análise de amostras comerciais, e o DON foi a micotoxina mais frequentemente detectada, com 47% das amostras apresentando concentrações acima do LQ, variando de <LQ a 386,16 µg/kg e concentração média de 274,08 µg/kg. Nenhuma amostra apresentou concentrações acima do limite máximo permitido pela RDC nº 722/2022 para DON em produtos à base de trigo (1000,0 µg/kg). A distribuição das amostras por faixas de concentração de DON é apresentada na Tabela 1.

Em relação às demais micotoxinas investigadas, todas as amostras apresentaram valores de ZEA abaixo do LQ (60,0 µg/kg). Para as aflatoxinas, foram observados valores abaixo do LQ (2,0 µg/kg) em uma amostra para AFG1, três para AFG2 e uma para AFB1, sendo os demais resultados não detectados. Para OTA, três amostras apresentaram valores abaixo do LQ (4,0 µg/kg), e para fumonisina B2 (FB2), uma amostra apresentou concentração abaixo do LQ (40 µg/kg), sem detecção quantificável desses analitos nas demais amostras. A Figura 2 ilustra graficamente a ocorrência de DON nas amostras de macarrão instantâneo por faixas de concentração.

Os resultados indicam que o DON constitui o principal marcador de contaminação fúngica em macarrão instantâneo, perfil compatível com a origem da matéria-prima (trigo), com a associação predominante de espécies do gênero *Fusarium* à produção desse tricoteceno e com sua elevada estabilidade térmica durante o processamento industrial.

Esses resultados estão em consonância com dados da literatura brasileira, que relatam a ocorrência frequente de DON em produtos à base de trigo, como massas alimentícias, pães, cereais processados e macarrão instantâneo comercializado no Brasil, geralmente em concentrações inferiores aos limites regulatórios, porém com elevada frequência de detecção, podendo alcançar até 1720,0 µg/kg em algumas amostras (Almeida et al., 2016). Estudos conduzidos em mercados europeus e asiáticos também apontam o DON como a micotoxina predominante em massas e produtos instantâneos, enquanto AFs, fumonisinas, OTA e ZEA são detectadas esporadicamente ou em níveis inferiores ao LQ (Moazami; Jinap, 2009; Mishra et al., 2022).

Essa concordância reforça a representatividade dos dados obtidos e a relevância do monitoramento dessa matriz.

Os resultados obtidos também demonstram a aplicabilidade do método desenvolvido para a determinação multiresíduo de micotoxinas em macarrão instantâneo, evidenciando sua capacidade de detectar baixos níveis de diferentes classes de micotoxinas e sua aplicabilidade de uso em programas de monitoramento em conjunto com a vigilância sanitária.

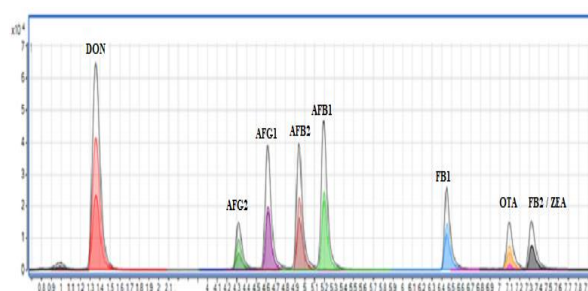


Figura 1. Cromatograma representativo das nove micotoxinas obtido por LC-MS/MS em modo MRM a partir de padrão preparado em solvente (2 µg/kg de aflatoxinas, 200 µg/kg de DON, 40 µg/kg de fumonisinas e 60 µg/kg de ZEA).

Tabela 1. Dados de validação por LC-MS/MS das micotoxinas em macarrão instantâneo

	EM (%)	r ²	LQ µg/kg	LD µg/kg	Rec Média (%)	CV (%)
DON	-36,4	0,9985	200,0	60,0	97,90	3,52
AFG2	-52,7	0,9965	2,0	0,6	101,94	10,01
AFG1	-53,4	0,9974	2,0	0,6	91,50	5,22
AFB2	-53,2	0,9962	2,0	0,6	85,05	9,74
AFB1	-53,8	0,9958	2,0	0,6	84,83	9,80
FB1	-61,8	0,9955	40,0	12,0	98,26	8,28
ZEA	-36,4	0,9999	60,0	18,0	94,63	4,39
OTA	-45,4	0,9977	4,0	1,2	90,77	7,15
FB2	-64,2	0,9970	40,0	12,0	99,09	4,34

EM: efeito matriz, R²: coeficiente de correlação, LQ: limite de quantificação, LD: limite de detecção, CV: coeficiente de variação.

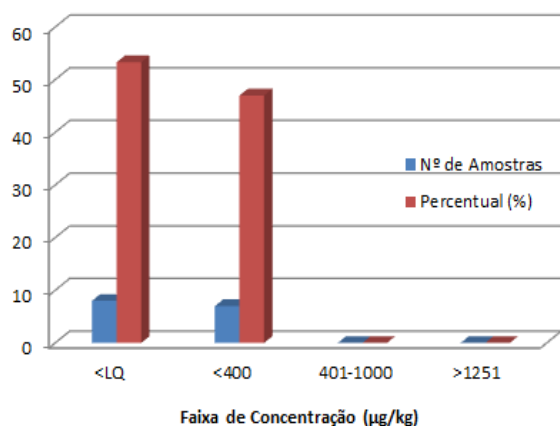


Figura 2 – Ocorrência de DON em amostras de macarrão instantâneo

CONCLUSÃO

O método multiresíduo desenvolvido por LC-MS/MS mostrou-se adequado para a determinação simultânea de micotoxinas em macarrão instantâneo, apresentando desempenho analítico satisfatório quanto à linearidade, sensibilidade, seletividade, exatidão, precisão e efeito matriz. A validação confirmou a robustez do procedimento, com limites de quantificação compatíveis com os níveis máximos estabelecidos pela legislação brasileira para micotoxinas em produtos à base de trigo. A aplicação do método a amostras comerciais revelou o DON como a micotoxina mais frequentemente detectada, presente em 47% das amostras, com concentrações inferiores ao limite máximo permitido pela RDC nº 722/2022 (1.000 µg/kg). A detecção recorrente de DON, ainda que em níveis inferiores aos limites regulatórios, evidencia a necessidade de monitoramento contínuo dessa matriz amplamente consumida, visando à proteção da saúde do consumidor e à prevenção de exposições crônicas a baixos níveis de micotoxinas.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Brasil, pelo apoio financeiro concedido a este estudo (Processo nº 2023/15185), ao Instituto Adolfo Lutz pelo suporte institucional e ao Departamento de Nutrição da Faculdade de Saúde Pública da USP pela parceria.

REFERÊNCIAS

Almeida, A. P. et al. Occurrence of deoxynivalenol in wheat flour, instant noodle and biscuits commercialised in Brazil. Food Additives &

Contaminants: Part B, v. 9, n. 4, p. 251-255, 2016.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada – RDC nº 722, de 1º de julho de 2022. Dispõe sobre os limites máximos tolerados de micotoxinas em alimentos. Diário Oficial da União, Brasília, 2022.

Bennett, J. W.; Klich, M. Mycotoxins. Clinical microbiology reviews, v. 16, n. 3, p. 497-516, 2003.

Bullerman, L. B.; Bianchini, A. Stability of mycotoxins during food processing. International Journal of Food Microbiology, v. 119, n. 1-2, p. 140-146, 2007.

Desjardins, A. E. *Fusarium* mycotoxins: chemistry, genetics, and biology. St. Paul: APS Press, 2006.

EFSA. European Food Safety Authority. Risks to human and animal health related to the presence of deoxynivalenol and its modified forms in food and feed. EFSA Journal, v. 15, n. 9, e04718, 2017.

IARC. International Agency for Research on Cancer. Chemical agents and related occupations. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, v. 100F. Lyon: IARC, 2012.

INMETRO. Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia. Orientação sobre validação de métodos analíticos. DOQ-CGCRE-008, Revisão 09. Rio de Janeiro: INMETRO, 2020.

Khaneghah, A. M. et al. Deoxynivalenol and its masked forms: Characteristics, incidence, control and fate during wheat and wheat based products processing-A review. Trends in Food Science & Technology, v. 71, p. 13-24, 2018.

Kim, D. H. et al. Simultaneous determination of multi-mycotoxins in cereal grains collected from South Korea by LC/MS/MS. Toxins, v. 9, n. 3, p. 106, 2017.

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

Miró-Abella, E. et al. Determination of mycotoxins in plant-based beverages using QuEChERS and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Food Chemistry, v. 229, p. 366-372, 2017.

Mishra, S. et al. Global occurrence of deoxynivalenol in food commodities and exposure risk



- assessment in humans in the last decade: A survey. Critical reviews in food science and nutrition, v. 60, n. 8, p. 1346-1374, 2022.
- Moazami, E. F.; Jinap, S. Natural occurrence of deoxynivalenol (DON) in wheat based noodles consumed in Malaysia. Microchemical Journal, v. 93, n. 1, p. 25-28, 2009.
- Monteiro, C. A. et al. Ultra-processed foods, diet quality, and health using the NOVA classification system. Rome: FAO, v. 48, 2019.
- Ouakhssase, A.; Ait Addi, E. Mycotoxins in food: a review on liquid chromatographic methods coupled to mass spectrometry and their experimental designs. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, v. 62, n. 10, p. 2606-2626, 2022.
- Pitt, J. I.; Hocking, A. D. Fungi and food spoilage. 3. ed. New York: Springer, 2009.
- Van der Fels-Klerx, H. J. et al. Decision support system for integrated management of mycotoxins in feed and food supply chains. World Mycotoxin Journal, v. 15, n. 2, p. 119-134, 2022.
- Varga, E. et al. Stable isotope dilution assay for the accurate determination of mycotoxins in maize by UHPLC-MS/MS. Analytical and Bioanalytical Chemistry, v. 402, n. 9, p. 2675-2686, 2012.