# DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA PARA DETERMINAÇÃO DE DESOXINIVALENOL EM ARROZ POR HPLC/DAD

**Gabriele Medeiros Almeida** [1]

**Tiago Andre Kaminski** [2]

**Adriane Lettnin Roll Feijó** [3]

**Resumo:**

O arroz é um dos cereais mais produzidos e consumidos mundialmente. Porém, como em outros cereais, pode sofrer contaminações de fungos produtores de micotoxinas no campo, na etapa de secagem ou no armazenamento dos grãos quando há condições favoráveis para o seu desenvolvimento. O desoxinivalenol (DON) é uma micotoxina produzida principalmente por fungos do gênero Fusarium e apresenta efeitos toxicológicos como diarreia, vômitos, efeitos teratogênicos e imunossupressores, além da recusa alimentar em animais. Na legislação brasileira está estabelecido o limite máximo de 750 µg.kg-1 para DON em arroz beneficiado e derivados, porém poucos trabalhos relataram sua determinação nessas matrizes. Dessa forma, faz-se necessário uma metodologia analítica capaz de detectar e quantificar DON, para posteriores análises do atendimento dos limites descritos na legislação. O trabalho teve por objetivo desenvolver e validar uma metodologia capaz de determinar a presença de DON em arroz integral parboilizado, através de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e detector de arranjo de diodos (DAD). Para o desenvolvimento da metodologia foi utilizado um cromatógrafo a 220 nm. A aquisição e análise de dados foi realizada pelo software Chromeleon versão 6.8. Foram testadas diferentes proporções da fase móvel, em modo isocrático, com fluxo de 1 mL.min-1 e volume de injeção 20 µL em temperatura ambiente. Para o preparo da solução estoque de DON foram utilizados 2,5 mg do padrão analítico com diluição em metanol. Avaliaram-se a seletividade, o limite de detecção e quantificação, a linearidade, a precisão, a exatidão (com extração modificada) e a robustez. A proporção de água:acetonitrila:metanol (90:5:5) foi a que apresentou melhor desempenho cromatográfico, com o pico do padrão em 21 minutos, sem interferentes da matriz. A linearidade da resposta do equipamento em relação a concentração do analito não teve desvio da linearidade e apresentou regressão linear significativa, em níveis de 5% de significância e coeficiente de correlação acima do preconizado pela legislação. A precisão esteve dentro dos limiteis aceitáveis, com desvio padrão menor que 2%. A extração utilizada foi eficiente, com recuperação próxima a 100%. O limite de detecção e quantificação foram de 0,069 µg.mL-1 e 0,23 µg.mL-1, respectivamente, demonstrando a sensibilidade do método. O método desenvolvido mostrou-se seletivo, linear, preciso, robusto e com limites de quantificação e detecção adequados, estando apto para ser utilizado para determinação de DON em arroz parboilizado

integral, atendendo a legislação vigente.

**Palavras-chave:** Fungos, micotoxinas, cromatografia, precisão, exatidão.

**Modalidade de Participação:** Iniciação Científica

## DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA PARA DETERMINAÇÃO DE DESOXINIVALENOL EM ARROZ POR HPLC/DAD

[1] Aluno de graduação. gabriele.ma@yahoo.com.br. Autor principal

[2] Docente. tiagokaminski@unipampa.edu.br. Orientador

[3] Técnico administrativo em educação. adriane.roll@gmail.com. Co-orientador

# DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA PARA DETERMINAÇÃO DE DESOXINIVALENOL EM ARROZ POR HPLC/DAD

## 1 INTRODUÇÃO

O arroz (*Oryza sativa* L.) é um dos cereais mais produzidos e consumidos mundialmente, representando cerca de 29% do total de grãos ingeridos pela população, sendo o Rio Grande do Sul o maior produtor nacional (SOSBAI, 2016). Porém, como em outros cereais, o arroz pode sofrer contaminações de fungos produtores de micotoxinas, que pode ocorrer no campo, na etapa de secagem ou no armazenamento dos grãos quando os fungos encontram condições favoráveis para o desenvolvimento (PRADO, 2014).

O desoxinivalenol (DON), também conhecido como vomitoxina, é produzido principalmente por fungos do gênero *Fusarium* em grãos, como cevada, centeio, trigo, milho e arroz; sendo uma micotoxina pertencente ao grupo B dos tricotecenos, os quais são típicos do campo (PRADO, 2014). A detecção e quantificação do DON em matérias-primas e produtos alimentares são de grande importância, pois essa micotoxina apresenta efeitos toxicológicos como diarreia, vômitos, efeitos teratogênicos e imunossupressores, além da recusa alimentar em animais (HALLIER; CELETTE; DAVID, 2011).

Os teores máximos de micotoxinas nos alimentos estão estabelecidos pelo Ministério da Saúde, por meio da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, com limite máximo de 750 $\mu g.kg^{-1}$ para DON em arroz beneficiado e derivados (BRASIL, 2011).

O DON é solúvel em água e solventes polares, além de também ser estável quando submetido a altas temperaturas (PORETEDAL; MESHKANI, 2008). Por apresentar boa absorção na radiação ultravioleta, o DON também pode ser analisado por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e cromatografia em camada delgada (PORETEDAL; MESHKANI, 2008).

Os métodos cromatográficos são os mais populares na detecção e quantificação das micotoxinas, em particular a HPLC, que possui a capacidade de realizar separações e análises quantitativas de uma grande variedade de compostos presentes em diversos tipos de amostras, em escala de tempo de poucos minutos, com alta eficiência e detectabilidade. No caso do DON, são poucos os trabalhos que relatam sua determinação em arroz e derivados, como o de Heidtmann-Bemvenuti et al. (2012) e de Liao et al. (2014). Dessa forma, faz-se necessário uma metodologia analítica capaz de detectar e quantificar o contaminante em questão, para posteriores análises do atendimento dos limites descritos na legislação.

Nesse contexto, o trabalho teve por objetivo desenvolver e validar uma metodologia capaz de determinar a presença de desoxinivalenol em arroz integral parboilizado, através de cromatografia líquida de alta eficiência e detector de arranjo de diodos (DAD).

## 2 METODOLOGIA

Para o desenvolvimento da metodologia foi utilizado um cromatógrafo líquido de alta eficiência (Dionex, Thermo Scientific Ultimate 3000) constituído de bomba quaternária (LPG86 3400SD), amostrador automático (WPS-3000TSL), compartimento de coluna com controlador de temperatura (TCC-3000RS), coluna C18 (4,6 x 250 mm, 5 µm, Agela Technologies, Promosil) a temperatura ambiente e detector de arranjo de diodos (DAD-3000) a 220 nm. A aquisição e análise dos dados foi realizada pelo software Chromeleon versão 6.8 (Dionex, Thermo Fisher Scientific Inc.).

Para o desenvolvimento e otimização da metodologia foram testadas diferentes proporções da fase móvel, composta por água ultrapurificada, acetonitrila grau HPLC (Vetec, Química Fina) e metanol grau HPLC (Dinâmica Química Contemporânea Ltda), em modo

isocrático, com fluxo de 1 $mL.min^{-1}$ e volume de injeção 20 µL, em temperatura ambiente (SILVA et al. 2017).

Para o preparo da solução estoque de DON foram utilizados 2,5 mg do padrão analítico (ChemCruz) diluídos em metanol. A solução foi sonicada por 5 minutos e transferida para um balão de 10 mL, completado com metanol, sendo que a solução mãe apresentou concentração de 250 $\mu g.mL^{-1}$.

Para validação do método analítico foram avaliados os parâmetros de desempenho recomendados pelos guias do Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial e Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2010; BRASIL, 2003).

A seletividade foi avaliada comparando-se o sinal gerado pela injeção da matriz isenta da micotoxina DON e da adicionada de padrão. A matriz, arroz parboilizado integral, marca comercial Prato Fino, lote 01-10-2018 19:30 63 CYD, foi adquirida em comércio local.

O limite de detecção e o limite de quantificação do método foram determinados pela média do sinal do ruído vezes três e a média do ruído vezes 10, respectivamente. Sendo o ruído verificado através da linha de base.

A linearidade foi avaliada por curvas analíticas realizadas através da padronização externa com soluções preparadas em triplicata nas concentrações de 0,5; 0,75; 1; 2 e 4 $\mu g.mL^{-1}$ de DON, contemplando o limite máximo tolerado pela legislação brasileira. A comprovação da relação linear entre a concentração dos analitos e a resposta do equipamento foi realizada por meio do teste unilateral de análise de variância (ANOVA).

A precisão do método foi avaliada pela repetibilidade e precisão intermediária. Para avaliação da repetibilidade seis amostras (n = 6), de concentração 0,75 $\mu g.mL^{-1}$ foram preparadas sob as mesmas condições, pelo mesmo analista, em um curto período de tempo. Na determinação da precisão intermediária seis amostras nas mesmas concentrações supracitadas foram preparadas sob as mesmas condições, durante três dias diferentes, por três diferentes analistas (n = 18).

A exatidão do método foi avaliada pelo método de adição e recuperação de padrão frente à matriz, em três níveis, 70%, 100% e 120%, do limite máximo tolerado da micotoxina para arroz beneficiado, cada um em triplicata (BRASIL, 2011).

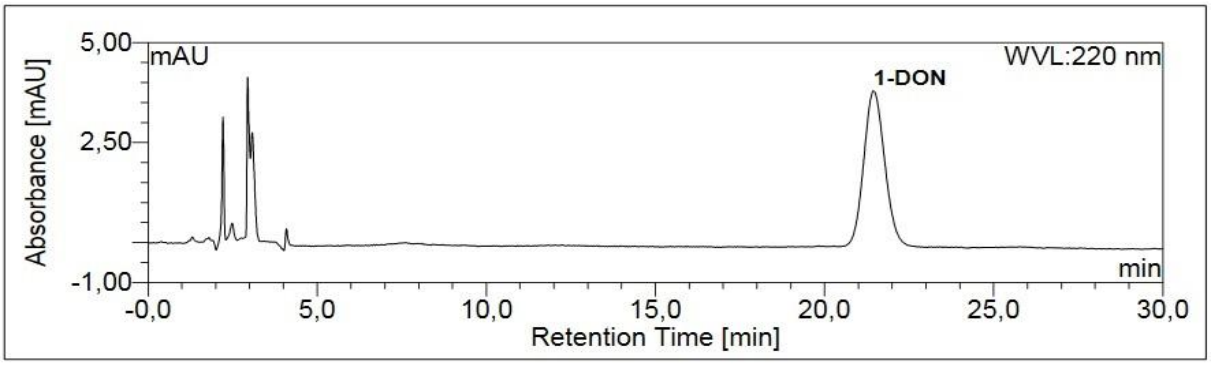
A extração foi realizada baseada na metodologia descrita por Liao et at. (2014), com modificações, na qual 5 g de amostra foram trituradas em micromoinho analítico e colocadas em tubo com tampa de rosca. Adicionou-se 10 mL do solvente de extração constituído de acetonitrila:água (85:15), agitou-se manualmente por 15 minutos e centrifugou-se por 5 minutos a 4500 g. Após, foram coletados 2 mL do sobrenadante e transferidos para *snap cap* para evaporação em banho-maria à 60 °C. O mesmo foi ressuspendido com água:acetonitrila:metanol (90:5:5), agitado em agitador vórtex por 1 minuto e filtrado com filtro de seringa (13 mm x 0,22 µm politetrafluoretileno). Quando fortificados, na etapa de ressuspensão, foi adicionado solução de trabalho de DON juntamente com água:acetonitrila:metanol (90:5:5) nas concentrações de fortificação.

A robustez foi avaliada a partir da determinação do DON mediante pequenas alterações nas condições cromatográficas nominais do método desenvolvido. Foram selecionados seis fatores e foram avaliados por delineamento fatorial de Plackett-Burman (n = 12). Calcularam-se o efeito de cada fator e o erro experimental estimado. Foram avaliadas alterações na vazão (± 0,05 unidades), proporção de acetonitrila na fase móvel (± 2%), proporção de metanol na fase móvel (± 2%), comprimento de onda (± 2 nm), temperatura de coluna (± 2 ºC) e marca de coluna.

## 3 RESULTADOS e DISCUSSÃO

A utilização de fase móvel em proporção de água:acetonitrila:metanol (86:7:7) não foi satisfatória para determinação de DON, pois não apresentou seletividade. A proporção de água:acetonitrila:metanol (90:5:5) apresentou melhor desempenho cromatográfico, com o pico do padrão em 21 minutos, sem interferentes da matriz. A verificação dos parâmetros de adequabilidade do sistema depois do desenvolvimento e otimização de um método analítico é preconizado na legislação brasileira, para que o mesmo possa ser validado. O desempenho do sistema cromatográfico foi mensurado mediante observações quanto ao número de pratos teóricos, resolução e fator de cauda, nos cromatogramas obtidos, sendo estes satisfatórios (BRASIL, 2017).

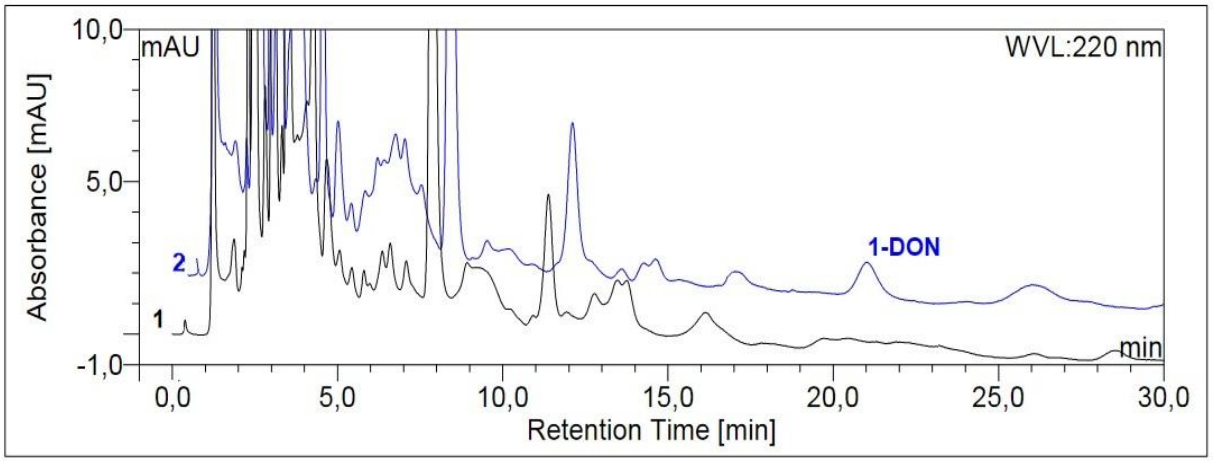
Figura 1 - Cromatograma de 4 µg.mL$^{-1}$ de desoxinivalenol




Fonte: do autor, 2018.

Nestas condições cromatográficas foi possível observar que não houve interferentes na matriz que comprometessem a identificação da micotoxina, como pode ser visualizado na Figura 2, demonstrando seletividade satisfatória.

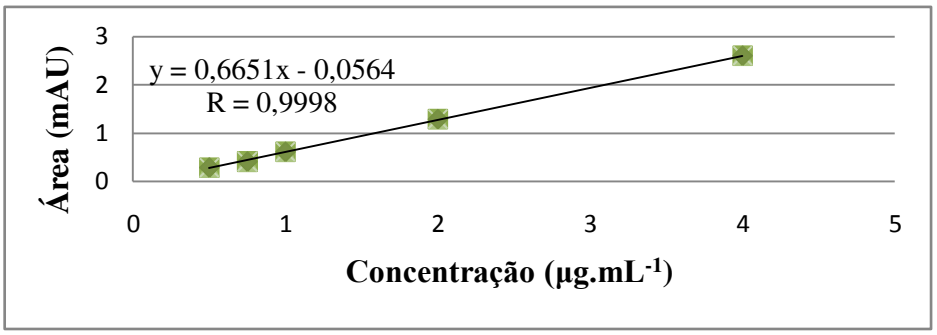
Figura 2 - Cromatogramas sobrepostos (com deslocamento de 2%) da matriz arroz integral parboilizado isenta de desoxinivalenol (1) e fortificado à 750 µg.kg$^{-1}$ (2)




Fonte: do autor, 2018.

Através da representação gráfica da Figura 3 é possível verificar a linearidade da resposta do equipamento em relação a concentração do analito, sem desvio da linearidade e com regressão linear significativa, em níveis de 5% de confiança, com coeficiente de correlação acima do preconizado pela legislação de 0,990 (BRASIL, 2017).

Figura 3 - Curva analítica da micotoxina desoxinivalenol




Fonte: do autor, 2018.

A precisão e a exatidão estão apresentadas na Tabela 1. Os resultados obtidos comprovam que a precisão do método desenvolvido se encontra dentro dos limites aceitáveis, pois apresentou desvio padrão relativo inferior a 2% tanto nas análises de repetibilidade quanto na precisão intermediária (RIBANI et al., 2004). Em relação aos percentuais de recuperação, é possível afirmar que utilizando a extração adaptada de Liao et al. (2013) foi observada uma boa recuperação com teores próximos a 100%.

Tabela 1 - Precisão do método e recuperação das amostras fortificadas com concentrações baixas (70%), médias (100%) e altas (120%) de desoxinivalenol

| **Precisão** | | | |
|---|---|---|---|
| | **Dia 1** | **Dia 2** | **Dia 3** |
| **Média (µg.mL$^{-1}$) n=6** | 0,77 | 0,76 | 0,74 |
| **DPR (%)** | 0,01 | 0,01 | 0,01 |
| **Média n=18 (µg.mL$^{-1}$)** | | 0,75 | |
| **DPR (%)** | | 0,014 | |
| **CV (%)** | | 1,85 | |
| **Exatidão** | | | |
| **Concentração teórica (µg.mL$^{-1}$)** | 0,53 | 0,75 | 0,90 |
| **Concentração (µg.mL$^{-1}$)** | 0,52 | 0,79 | 0,93 |
| **Recuperação média (%)** | 98,11 | 105,33 | 103,33 |
| **Desvio Padrão (%)** | 0,08 | 0,04 | 0,07 |

Legenda: DPR = desvio padrão relativo e CV = coeficiente de variação.
Fonte: do autor, 2018.

O limite de detecção e quantificação foram de 0,069 µg.mL$^{-1}$ e 0,23 µg.mL$^{-1}$, respectivamente, demonstrando a sensibilidade do método desenvolvido.

Após as modificações nas condições nominais foi possível identificar e quantificar o analito de interesse, com garantia dos parâmetros de adequabilidade do sistema, e os resultados encontrados demonstram que não existe diferença estatística significativa utilizando o teste T de *Student* para p = 0,05 (t crítico = 2,57).

## 4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O método desenvolvido mostrou-se seletivo, linear, preciso, robusto, com limites de quantificação e detecção adequados. Dessa forma, conclui-se que é adequado para

determinação de desoxinivalenol em arroz integral parboilizado, em atendimento à legislação vigente.

## REFERÊNCIAS


BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução - RDC nº 166 de 24 de julho de 2017. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 25 julho 2017.

BRASIL. **Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO)**; Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaios Químicos, DOQ CGCRE-008. Revisão: 03, 2010. Disponível em: <http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos CGCRE/DOQ/DOQ-CGCRE-8_03.pdf>. Acesso em: 6 set. 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução – RDC n° 7, de 18 de fevereiro de 2011. Dispõe sobre limites máximos tolerados para micotoxinas em alimentos. **Diário Oficial [da] União**, Brasília, DF, 9 março 2011.

HALLIER, A.; CELETTE, F.; DAVID, C. Effects of sampling and extraction on deoxynivalenol quantification. **Food Chemistry**, v. 127, n. 1, p. 303-307, jul. 2011.

HEIDTMANN-BEMVENUTI, R. et al, Determinação de deoxinivalenol e zearalenona em arroz natural e parboilizado e suas frações utilizando QuEChERS e HPLC/UV-FL. **Química Nova**, São Paulo , v. 35, n. 6, p. 1244-1249 , jan. 2012.

LIAO, C. D. et al. Multi-mycotoxin analysis of finished grain and nut products using high-performance liquid chromatography-triple-quadrupole mass spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 20, p. 4771-4782, mai. 2013.

POURETEDAL, Z.; MESHKANI, A. Comparing determination of deoxynivalenol in cereals by HPLC using two different clean-up methods. **Research Journal of Biological Sciences**, v. 3, n. 9, p. 968-972, 2008.

PRADO G. Contaminação de alimentos por micotoxinas no Brasil e no mundo. **Journal of Public Health**, Minas Gerais, v. 2, n. 2, p. 11-24, 2014.

RIBANI, M. et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, São Paulo, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

SILVA, M. V. et al. Occurrence and risk assessment of population exposed to deoxynivalenol in foods derived from wheat flour in Brazil. **Food Additives & Contaminants: Part A**, v. 35, n. 3, p. 546-554, dez. 2017.

SOSBAI. Arroz irrigado: recomendações técnicas da pesquisa para o sul do Brasil. **XXXI reunião técnica da cultura do arroz irrigado**, Sociedade Sul-Brasileira de Arroz Irrigado, Brasil, 2016. Disponível em: <http://www.sosbai.com.br/docs/Boletim_RT_2016.pdf>. Acesso em : 10 set. 2018.