BOLETIM DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO

27

ISSN 0101-630X
Dezembro / 2018

Método de Análise de Desoxinivalenol (DON) em Trigo

Embrapa

ISSN 0101-630X
Dezembro/2018

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Agroindústria de Alimentos
Ministério da Agricultura

BOLETIM DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO 27

Método de Análise de Desoxinivalenol (DON) em Trigo

Marianna Ramos dos Anjos
Maria de Lourdes Mendes de Souza
Alessandra Teixeira de Souza
Izabela Miranda de Castro

Embrapa Agroindústria de Alimentos
Rio de Janeiro, RJ
2018

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:
Embrapa Agroindústria de Alimentos
Avenida das Americas numero 29501 Guaratiba - CEP 23020-470, Rio de Janeiro , RJ
Fone: +55 (21) 3622-9600
Fax: +55 (21) 3622-9713
www.embrapa.br/agroindustria-de-alimentos
embrapa.br/fale-conosco/sac

Comitê Local de Publicações
da Unidade Responsável

Presidente
Virgínia Martins da Matta

Membros
André Luis do Nascimento Gomes, Celma Rivanda Machado de Araujo, Daniela De Grandi Castro Freitas de Sá, Elizabete Alves de Almeida Soares, Janine Passos Lima da Silva, Leda Maria Fortes Gottschalk, Marcos de Oliveira Moulin, Otniel Freitas Silva e Rogério Germani

Supervisão editorial
Virgínia Martins da Matta

Revisão de texto
Renata Valeriano Tonon

Normalização bibliográfica
Celma Rivanda Machado de Araujo

Tratamento das ilustrações
Marcos de Oliveira Moulin

Projeto gráfico da coleção
Carlos Eduardo Felice Barbeiro

Editoração eletrônica
Marcos de Oliveira Moulin

Foto da capa
Júlio Albrecht

1ª edição
Publicação digitalizada (2018)

Todos os direitos reservados.
A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Embrapa Agroindústria de Alimentos

Método de Análise de Desoxinivalenol (DON) em Trigo / Marianna Ramos dos Anjos... [et al.]. – Rio de Janeiro : Embrapa Agroindústria de Alimentos, 2018.
15 p. – (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Agroindústria de Alimentos, ISSN 0101-630X ; 27).

1. Cromatografia líquida. 2. Espectrometria de massas por captura de íons (LC--IT-MS/MS). 3. Micotoxinas. I. Anjos, Marianna Ramos dos. II. Souza, Maria de Lourdes Mendes de. III. Souza, Alessandra Teixeira de. IV. Castro, Izabela Miranda de. IV. Série.

CDD (23. ed.) 543.84

© Embrapa, 2018

Sumário

Resumo 5

Abstract 6

Introdução.....7

Material e Métodos 8

Resultados e Discussão 10

Conclusão.....14

Referências 14

Método de Análise de Desoxinivalenol (DON) em Trigo

Marianna Ramos dos Anjos[1]
Maria de Lourdes Mendes de Souza[2]
Alessandra Teixeira de Souza[3]
Izabela Miranda de Castro[4]

Resumo – O Desoxinivalenol (DON) é uma micotoxina produzida por algumas espécies de fungos do gênero Fusarium. Estes fungos infectam geralmente milho, trigo, aveia, cevada, arroz e outros grãos no campo ou durante o armazenamento em todo o mundo. Também conhecido como vomitoxina, o DON afeta a saúde humana e animal, causando desde náuseas agudas à hemorragia, além de mostrar efeitos imunossupressores em baixas concentrações. O objetivo deste trabalho foi implantar e validar um método para análise de DON em trigo por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas por captura de íons. O tempo de retenção do DON foi de 5,9 min., a transição de quantificação foi de 297→249 m/z e a de confirmação foi de 297→231 m/z. Os valores de recuperação estão dentro da faixa aceitável para concentrações acima de 10 $\mu g.kg^{-1}$(70 a 110%), segundo o Manual de Garantia da Qualidade Analítica do MAPA. O método implantado e validado para a análise de DON em trigo mostrou-se seletivo, exato e preciso dentro da faixa de trabalho avaliada, 50 a 1800 $\mu g.kg^{-1}$, com limites de detecção e quantificação muito inferiores ao limite máximo tolerado (LMT) para o DON em trigo, sendo adequado para atender à legislação brasileira vigente, e outras mais rigorosas.

Termos para indexação: fibra alimentar, goma carragena, goma arábica, vida útil.

[1] Licenciada em Química, M. Sc. em Ciência de Alimentos, analista da Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro, RJ.

[2] Farmacêutica, D. Sc. em Química de Produtos Naturais, analista da Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro, RJ.

[3] Engenheira de Alimentos, M. Sc. em Ciência e Tecnologia de Alimentos, técnica da Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro, RJ.

[4] Bacharel em Química, Ph. D. em Geoquímica Orgânica Molecular, pesquisadora da Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro, RJ.

Method of Analysis of Deoxynivalenol (DON) in Wheat

Abstract – Deoxynivalenol (DON) is a mycotoxin produced by some fungi species of the Fusarium genus. Fusarium generally infects corn, wheat, oats, barley, rice and other grains in the field or during storage around the world. Also known as vomitoxin, DON affects human and animal health, causing from acute nausea to hemorrhage, and shows immunosuppressive effects at low concentrations. The objective of this work was to implement and validate a method for DON analysis in wheat by liquid chromatography coupled to ion-trap mass spectrometry. The DON retention time was 5.9 min, the quantification transition was 297→249 m/z and the confirmatory transition was 297→231 m/z. Recovery values are within the range acceptable for concentrations above 10 $\mu g.kg^{-1}$ (70 to 110%) according to Analytical Quality Assurance Manual from the Brazilian Ministry of Agriculture. The implanted and validated method for DON analysis in wheat was selective, accurate and precise within the working range evaluated, from 50 to 1800 $\mu g.kg^{-1}$, with limits of detection and quantification much lower than the LMT established for DON in wheat, being adequate to meet current Brazilian legislation, and more stringent ones.

Index terms: mycotoxins, liquid chromatography, ion trap mass spectrometry (LC-IT-MS/MS).

Introdução

O Desoxinivalenol (DON) faz parte de um grupo de micotoxinas classificado como tricotecenos tipo B, que têm em comum um sistema de anéis tetracíclicos sesquiterpenoides 12, 13-epoxitricotec-9-eno (Figura 1) e são produzidas por algumas espécies de fungos do gênero *Fusarium*, principalmente por *Fusarium graminearum*. Estes fungos infectam geralmente milho, trigo, aveia, cevada, arroz e outros grãos no campo ou durante o armazenamento em todo o mundo (Zöllner e Mayer-Helm, 2006).

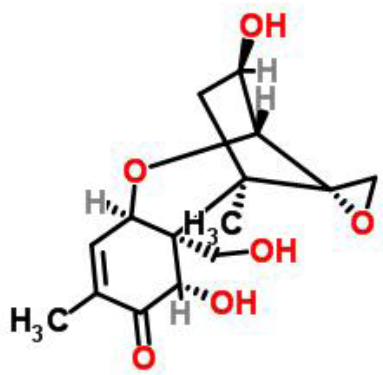

Figura 1. Estrutura química do Desoxinivalenol.

O DON afeta a saúde humana e animal, causando náuseas agudas, vômitos, diarreia, dor abdominal, dor de cabeça, tontura e febre, podendo causar hemorragia e recusa à alimentação. Também inibe a síntese de proteínas e a função mitocondrial, além de mostrar efeitos imunossupressores em baixas concentrações, sendo também conhecido como vomitoxina devido aos seus fortes efeitos eméticos após o consumo (Dall'Asta et al., 2004). Esta micotoxina é uma substância muito solúvel em água e sua propriedade físico-química mais importante é a capacidade de resistir a altas temperaturas, sendo este um dos riscos da sua ocorrência em alimentos (Sobrova et al., 2010).

Embora a Agência Internacional de Pesquisa sobre Câncer (IARC) tenha classificado o DON no grupo 3 como "Não é classificável quanto à carcinogenicidade para os seres humanos" (IARC, 1993), muitos países já estabeleceram limites máximo tolerados (LMT) para esta micotoxina. No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) estabeleceu que o LMT de DON em grãos de trigo e farinha de trigo integral seria de 1500 $\mu g.kg^{-1}$ a partir de janeiro de 2014, diminuindo para 1000 $\mu g.kg^{-1}$ a partir de janeiro de 2016, enquanto para a farinha de trigo refinada os níveis seriam

de 1250 µg.kg^{-1} a partir de 2014, e de 750 µg.kg^{-1} a partir de 2016 (Agência, 2011). Estes últimos prazos foram prorrogados até 1º de janeiro de 2017 para adequação dos produtores e da indústria (Agência, 2013). Porém em fevereiro de 2017, a ANVISA alterou a resolução de 2011 e estabeleceu o limite de 3000 µg.kg^{-1} para o DON em grãos de trigo e milho para posterior processamento (Agência, 2017).

Apesar de várias técnicas de determinação rápidas como a cromatografia em camada delgada (CCD), o ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA), a cromatografia em fase gasosa (CG) e a cromatografia líquida (CL) apresentarem bons resultados, recentemente a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (CL-EM) tem provado ser a ferramenta analítica mais adequada para a detecção e quantificação deste analito (Krska et al., 2005).

O objetivo deste trabalho foi desenvolver um método para análise de DON em trigo com detecção e quantificação por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas por captura de íons.

Material e Métodos

Preparo do Padrão

Para o preparo da solução de DON, foram adicionados 5 mL de acetonitrila ao frasco contendo 5 mg do padrão seco de DON. Foram retirados 0,2 mL desta solução e levados ao volume de 10 mL com acetonitrila. Após leitura em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 219 nm, foi calculada a concentração da solução igual a 17,79 µg.mL^{-1}. A partir desta solução, foi preparada uma solução de trabalho com concentração igual a 1 µg.mL^{-1}.

Método de Extração

Cinco gramas (5g) da amostra de trigo finamente moída foram pesados em tubo de centrífuga de 50 mL, adicionou-se 20 mL da solução de extração acetonitrila:água (84:16 v/v) e agitou-se em vórtex por 30 s e em agitador mecânico por 1 h. Em seguida, centrifugou-se a 5000 rpm por 5 min à temperatura ambiente. Foram retirados 2 mL do sobrenadante para frasco de vidro âmbar e evaporados à secura sob nitrogênio. Adicionou-se 1 mL

da fase móvel, agitou-se em vórtex por 30 s e transferiu-se para o vial do cromatógrafo Shimadzu LC 20A®.

Condições Cromatográficas e Parâmetros do Espectrômetro de Massas

A escolha da fase móvel foi feita de acordo com dados da literatura e da solubilidade do DON (Sifuentes dos Santos et al., 2011). A fase móvel A foi composta de metanol: água: solução aquosa de formiato de amônio 5 mM (11:9:80, v/v/v) e a fase B foi metanol. Utilizou-se a vazão de 0,5 $mL.min^{-1}$ com 95% da fase móvel A. Foi utilizada a coluna X Terra® RP18 (5 µm, 4,6×150 mm), com temperatura do forno de 40 ºC. O espectrômetro de Massas AmaZon X® foi operado com fonte de ionização por eletronebulização (ESI) em modo positivo. Através da infusão da solução de trabalho de DON com concentração igual a 1 $µg.mL^{-1}$ foram estabelecidas as transições de quantificação e confirmação.

Validação do Método

Para a validação do método foram avaliados os seguintes parâmetros: seletividade, linearidade, efeito de matriz, exatidão (recuperação), precisão (repetitividade) e os limites de detecção e quantificação, de acordo com o Manual de Garantia da Qualidade Analítica do MAPA (Brasil, 2011). Os cálculos foram feitos pelos *softwares* HyStar® e Microsot Excel®.

Seletividade: Para esta avaliação foram injetadas no sistema Shimadzu-Amazon X®, seis replicatas do extrato de uma amostra de trigo isenta de DON.

Linearidade: A linearidade do método foi avaliada através de curva analítica com sete pontos. A curva analítica foi preparada a partir de diluições da solução de trabalho em fase móvel, de modo a se obter as seguintes concentrações: 0, 50, 100, 200, 300, 600 e 900 $ng.mL^{-1}$. Cada ponto da curva foi injetado em sextuplicata no sistema cromatográfico. Foram calculados o desvio padrão e a variância para cada nível de concentração e aplicado o teste de Cochran para a avaliação da homogeneidade das variâncias.

Efeito de matriz: Para a avaliação do efeito de matriz foram comparados os resultados de seis replicatas no nível de concentração de 600 $ng.mL^{-1}$

de DON em fase móvel, com os resultados de seis replicatas em extrato de matriz, no mesmo nível de concentração. A comparação dos resultados foi feita através do teste F (Fisher-Snedecor) e do teste t de Student.

Exatidão (recuperação): A exatidão do método foi avaliada através do ensaio de recuperação. A recuperação foi feita através da fortificação de amostra de trigo isento de DON em três níveis: 325 $\mu g.kg^{-1}$ (0,5×LMT), 750 $\mu g.kg^{-1}$ (1,0×LMT) e 1500 $\mu g.kg^{-1}$ (2× LMT), com seis replicatas para cada nível. Foi considerado o LMT de 750 $\mu g.kg^{-1}$, que deveria ter sido atingido em 2016. Foram calculados as porcentagens de recuperação médias e os coeficientes de variação (CV) para cada nível.

Precisão (repetibilidade): A precisão do método foi avalida a partir da análise dos coeficientes de variação (CV) obtidos no ensaio de recuperação.

Limites de Detecção (LD) e Quantificação (LQ): Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram estabelecidos a partir de diluições sucessivas do segundo ponto da curva analítica (50 $ng.mL^{-1}$). O LD foi estabelecido como a menor concentração visualizada no sistema Shimadzu-Amazon X®. E o LQ como a menor concentração quantificada no mesmo sistema. Para confirmação do LQ, foi feita uma fortificação em amostra de trigo isenta de DON em triplicata.

Resultados e Discussão

Condições Cromatográficas e Ajustes dos Parâmetros do Espectrômetro de Massas

Através da infusão da solução de trabalho de DON foi estabelecido o íon precursor [M + H] + de *m/z* igual a 297 e as transições de quantificação (297→249) e de confirmação (297→231), com amplitude de 25%. O tempo de retenção do DON foi de 5,9 min.

Validação do Método

Seletividade: Não foram encontrados interferentes com mesmo tempo de retenção do DON e *m/z* nos extratos de trigo isentos, demonstrando a

seletividade do método. A avaliação da seletividade é necessária, uma vez que a eletronebulização (ESI) é um método de ionização muito suave, com pouca fragmentação dos íons moleculares formados, sendo susceptível a efeitos de interferentes que porventura estejam presentes no extrato da amostra. Um dos principais efeitos que pode ocorrer é a supressão do sinal do analito provocada pela concorrência de carga entre eletrólitos (Paes, 2012).

Linearidade: O valor de C (Cochran) calculado para a curva analítica de DON foi de 0,2506. O valor crítico de C para sete determinações (k), com seis repetições (n) e nível de confiança de 95% (α) é igual a 0,3974. Portanto, o valor de C calculado foi menor do que o de C crítico, demonstrando que as variâncias obtidas para cada concentração são homogêneas e que a curva analítica possui um perfil de distribuição homocedástico, podendo ser avaliada por regressão linear utilizando o método dos mínimos quadrados ordinários (MMQO).

A curva analítica e a equação obtida pelo ajuste linear encontram-se na Figura 2. O coeficiente de correlação de Pearson (R múltiplo) obtido foi de 0,9992 e o coeficiente de determinação (R^2) foi igual a 0,9983. Sabe-se que quanto mais próximos estes valores forem da unidade, maior será a correlação entre a concentração do analito e a resposta instrumental. A equação da curva encontra-se no gráfico.

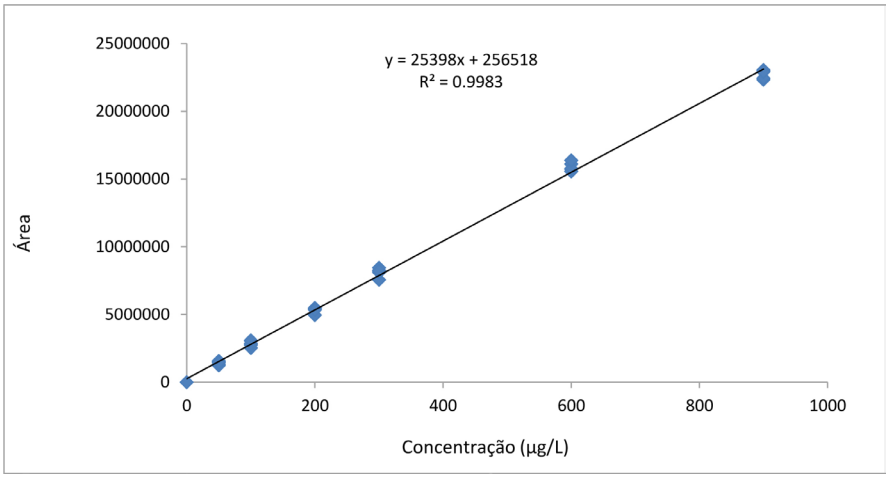

Figura 2. Curva analítica obtida para o DON

Efeito de matriz: Os resultados obtidos para o teor de DON em fase móvel e em extrato da matriz estão na Tabela 1.

Tabela 1. Resultados das replicatas de DON em fase móvel e em extrato de matriz

Replicata	Conc. de DON ($ng.mL^{-1}$) em fase móvel	Conc. de DON ($ng.mL^{-1}$) em extrato de matriz
1	639,84	711,89
2	569,67	634,83
3	611,54	631,25
4	645,46	571,92
5	683,30	631,33
6	621,36	557,65
Média	628,52	623,15
Desvio padrão	38	55
Variância	1443	3012
F calculado/F crítico	0,439/5,050	
t calculado/ t crítico	0,850/2,2281	

O valor de F tabelado para 5 graus de liberdade (n1=n2=6) com nível de confiança de 95% é igual a 5,050. O valor de F calculado (0,439) foi menor do que o tabelado, portanto as variâncias dos dois grupos são homogêneas, e o teste t de Student tem que ser calculado considerando esta condição. O valor de t calculado (0,850) foi menor do que o tabelado (2,2281), portanto não há diferença significativa entre a média obtida para as replicatas em fase móvel e a média obtida para as replicatas em extrato de matriz. Ou seja, não há efeito de matriz e as amostras devem ser quantificadas usando a curva analítica em solvente (fase móvel).

Exatidão e Precisão: Na Tabela 2 encontram-se os resultados obtidos para os valores médios de recuperação nos três níveis de fortificação e seus respectivos coeficientes de variação (CV).

Tabela 2. Valores obtidos para a recuperação e coeficientes de variação.

Nível	Fortificação ($\mu g.kg^{-1}$)	% Recuperação	CV (%)
1	325	79	8
2	750	80	14
3	1500	97	10

Os valores de recuperação estão dentro da faixa aceitável para concentrações acima de 10 $\mu g.kg^{-1}$, de 70 a 110%, segundo o Manual de Garantia da Qualidade Analítica do MAPA (Brasil, 2011) e a decisão 657/2002 da Comissão Europeia (CE, 2002), demonstrando a exatidão do método. Os resultados obtidos também estão compatíveis com os dados encontrados na literatura. Moazami e Jinap (2009) encontram valores (para três níveis de fortificação, 100, 500 e 1000 $\mu g.kg^{-1}$) que variaram de 40%, usando extração com acetonitrila e água e limpeza com colunas de imunoafinidade, até 102%, para a mesma extração e limpeza com Mycosep, e 55% utilizando os cartuchos Oasis® para limpeza. Em todos os casos, a detecção e a quantificação foram feitas por CLAE-DAD. Sifuentes dos Santos et al. (2011) encontraram valores de 85% (para três níveis de fortificação, 160, 2000 e 4000 $\mu g.kg^{-1}$) usando extração com água e acetonitrila e detecção e quantificação por LC/MS. Bryla et al. (2014) encontram valores de 96% para dois níveis de fortificação (250 e 500 $\mu g.kg^{-1}$) utilizando extração com água e acetonitrila e detecção e quantificação por LC-ITMS.

Os valores obtidos para os CVs também estão dentro do recomendado para concentrações acima de 100 $\mu g.kg^{-1}$, menor ou igual a 15%, segundo as mesmas normas citadas acima, o que demonstra que o método tem repetibilidade.

Limites de Detecção (LD) e quantificação (LQ): A menor concentração visualizada no sistema Shimadzu-Amazon X® foi de 10 $ng.mL^{-1}$ o que corresponde a 20 $\mu g.kg^{-1}$, sendo este o LD do método. A menor quantidade quantificável no mesmo sistema foi de 25 $ng.mL^{-1}$, o que corresponde a 50 $\mu g.kg^{-1}$. A porcentagem de recuperação no nível do LQ foi de 83% com coeficiente de variação de 39%. Provavelmente a variação esteja alta neste nível de concentração por estar próxima à faixa de ruído do equipamento. Portanto o LD do método foi estabelecido como 20 $\mu g.kg^{-1}$, e o LQ como 50 $\mu g.kg^{-1}$. Estes valores de LD e LQ estão bem abaixo do valor estabelecido pela legislação atualmente (3000 $\mu g.kg^{-1}$ para grãos de trigo para posterior processamento), uma vez que o método foi desenvolvido para atender a legislação que estabelecia o LMT em 1000 $\mu g.kg^{-1}$. O resultado alcançado demonstra que o método já está adequado para atender a uma legislação mais rigorosa.

Conclusão

O método implantado e validado para a análise de DON em trigo se mostrou seletivo, exato e preciso dentro da faixa de trabalho avaliada, 50 a 1800 $\mu g.kg^{-1}$, com limites de detecção e quantificação muito inferiores ao limite máximo tolerado estabelecido para o DON em trigo, sendo adequado para atender à legislação brasileira vigente, bem como outras mais rigorosas.

Referências

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Manual de garantia da qualidade analítica**. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília, DF: MAPA/ACS, 2011. 227 p.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Brasil). Resolução RDC no. 7, de 18 de fevereiro de 2011. Dispõe sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos. **Diário Oficial da União**: seção 1, Brasília, DF, ano 148, n. 37, p. 72, 22 fevereiro 2011. Republicado em DOU n. 46, 9 março 2011 por ter saído com incorreção.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Brasil). Resolução RDC no. 59, de 26 de dezembro de 2013. Dispõe sobre a prorrogação dos prazos estabelecidos nos artigos 11 e 12 e respectivos anexos III e IV da Resolução da Diretoria Colegiada RDC n. 7, de 18 de fevereiro de 2011 que dispõe limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos. **Diário Oficial da União**: seção 1, Brasília, DF, ano 150, n. 252, p. x, 30 dezembro 2013.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Brasil). Resolução RDC no. 138, de 08 de fevereiro de 2017. Altera a Resolução da Diretoria Colegiada RDC n. 7, de 18 de fevereiro de 2011 que dispõe limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos, para alterar os LMT da micotoxina desoxinivalenol (DON) em trigo e produtos de trigo prontos para oferta ao consumidos e os prazos para sua aplicação. **Diário Oficial da União**: seção 1. Brasília, DF, ano 154, n. 29, p. 45, 9 fevereiro 2017. Disponível em: http://pesquisa.in.gov.br/imprensa/jsp/visualiza/index.jsp?jornal=1&data=09/02/2017&pagina=45.

BRYLA, M.; JEDRZEJCZAK, R.; SZYMCZYK, K.; ROSZKO, M. OBIEDZIŃSKI, M.W. An LC-IT-MS/MS based method to determine trichothecenes in grain products. **Food Analytical Methods**, v. 7, p. 1056-1065, 2014.

COMISSÃO EUROPEIA. Decisão da Comissão 657/2002 / CE de 12 de agosto de 2002. Dá execução ao disposto na Diretiva 96/23 /CE relativa ao desempenho de métodos analíticos e à interpretação de resultados. **Jornal Oficial da Comunidade Europeia**, L 221/8, 2002.

DALL'ASTA, C.; SFORZA, S.; GALAVERNA, G.; DOSSENA, A.; MARCHELLI, R. Simultaneous detection of type A and type B trichothecenes in cereals by liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometry using NaCl as cationization agente. **Journal of Chromatography A**, v.1054, p. 389-395, 2004.

SIFUENTES DOS SANTOS , J.; TAKABAYASHIA, C. R.; ONO, E. Y. S.; ITANO, E. N.; MALLMANN, C. A.; KAWAMURA, O.; HIROOKA, E.Y. Immunoassay based on monoclonal antibodies versus LC-MS: deoxynivalenol in wheat and flour in Southern Brazil. **Food Additives and Contaminants**, v.28, n. 8, p.1083-1090, 2011.

IARC - International agency for research on cancer. WHO - World Health Organization. Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, some naturally occurring substances, food items and constituents. **Heterocyclic aromatic amines and mycotoxins**. v. 56, p. 397-444, 1993.

KRSKA, R; SCHOTHORST, R. C; VAN EGMOND, H. P.; JOSEPHS, R. D.; LEPSCHY, J.; PETTERSSON, H. ; CHAN, D.; BERTHILLER, F.; SCHUHMACHER, R.; KANDLER, W.; PARICH, A.; WELZIG, E. Processing and purity assessment of standards for the analysis of type-B trichothecene mycotoxins. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 382, p.1848-1858, 2005.

MOAZAMI, E.F.; JINAP, S. Optimization of the determination of deoxynivalenol in wheat flour by HPLC and a comparison of four clean-up procedures. **Food Additives and Contaminants**, v. 26, n. 9, p. 1290-1297, 2009.

PAES, C. M. D. **Desenvolvimento de método LC/MS/MS para análise multirresíduo de agrotóxicos em café**. 2012. 98 f. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) - Departamento de Química, Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

SOBROVA, P.; VOJTECH A.; VASATKOVA, A.; BEKLOVA, M.; ZEMAN, L.; KIZEK, R.; Deoxynivalenol and its toxicity. **Interdisciplinary Toxicology**, v. 3, n. 3, p. 94-99, 2010.

ZÖLLNER, P.; MAYER-HELM, B. Trace mycotoxin analysis in complex biological and food matrices by liquid chromatography–atmospheric pressure ionisation mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1136, p.123-169, 2006.

Embrapa

Agroindústria de Alimentos

Embrapa MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO BRASIL GOVERNO FEDERAL

CGPE 15056