

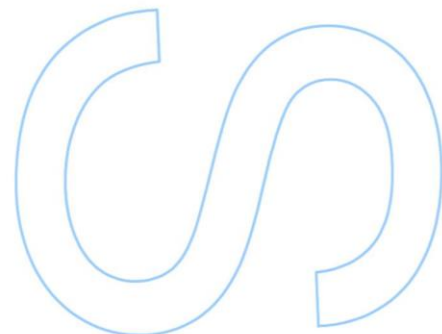
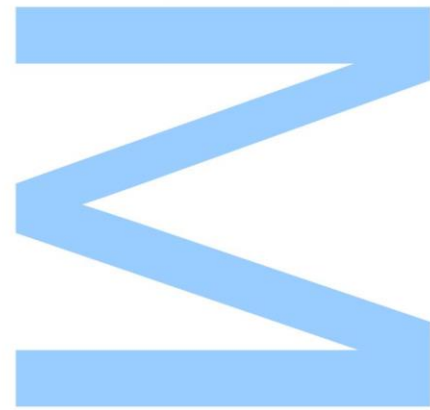


Validação do método de quantificação de micotoxinas por LC-MS/MS em farinhas de trigo, aveia e milho

Ana Sofia Fernandes Araújo
Mestrado em Tecnologia e Ciência Alimentar
Departamento de Química e Bioquímica
2017

Orientador
Victor Freitas, Professor Catedrático, FCUP

Coorientador
Rute Ventura, Responsável Técnica, SGS Portugal



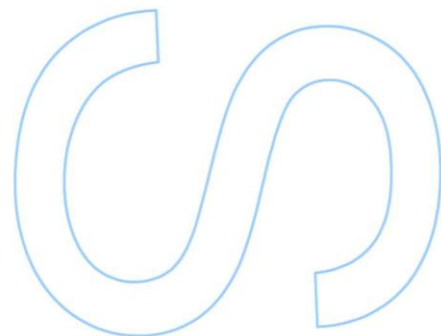
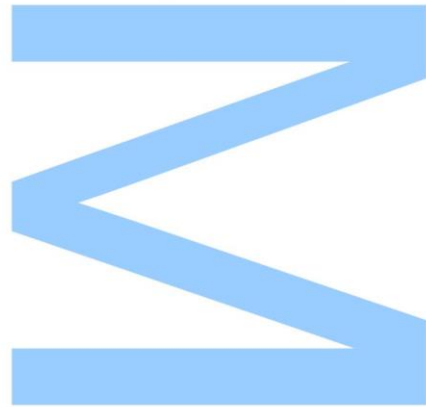


Universidade do Minho

Todas as correções determinadas pelo júri, e só essas, foram efetuadas.

O Presidente do Júri,

Porto, ____ / ____ / ____



Agradecimentos

Quero agradecer profundamente a todos aqueles que tornaram isto possível, de uma forma direta ou indireta, cooperaram na realização deste trabalho, disponibilizando meios materiais, sabedoria e encorajamento:

À Sociedade Geral de Superintendência, S.A. (SGS), à Eng.^a Ana Machado e Dra. Mónica, por me terem dado esta oportunidade de estagiar nesta empresa de grande prestígio.

Ao professor Victor Freitas, por ter aceitado ser meu orientador e disponibilizar-se e ter tornado esta dissertação possível.

À Eng.^a Rute Ventura, responsável técnica pelo Laboratório de Química da SGS Portugal, por todo o apoio e motivação dada e por todos os conhecimentos transmitida para a minha pessoa. Sem ela, nada disto seria possível.

À Beatriz Brasil, um especial obrigado por toda a ajuda e motivação, para além da boa disposição transmitida. Sempre disponível para ajudar no que fosse preciso.

A toda a equipa do laboratório de química pela amabilidade, e que de certo modo contribuíram para a realização deste trabalho e me integraram na empresa.

Um obrigado à minha família, que me apoiou em todos os momentos, mesmo estando longe. Um obrigado pela vossa preocupação, dedicação, suporte e paciência para a realização desta etapa. Obrigado ao meu pai, mãe e irmã.

Finalmente, um obrigado a todos os meus amigos, que estiveram de uma maneira ou outra estiveram presentes e me motivaram sempre. Um especial obrigado ao Luís Esteves, amigos de faculdade desde caloiros, sempre preocupado e disponível para ajudar. Foi uma fonte de apoio para a conclusão desta etapa.

Resumo

Estima-se que 25 % da produção mundial e 20 % da produção europeia de alimentos podem estar contaminadas com micotoxinas, originando graves consequências tanto a nível da segurança alimentar como a nível socioeconómico. As micotoxinas normalmente encontram-se nos cereais, frutos secos, cacau, café, vinhos e carne, especialmente se a atividade da água e a temperatura não forem devidamente controladas. Estas são um grupo de pequenas moléculas orgânicas, com reconhecida atividade tóxica, produzidas como metabolitos secundários por alguns fungos filamentosos. Por isso torna-se necessário o seu estudo.

Este trabalho centrou-se no desenvolvimento e na validação de uma metodologia analítica, por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa sequencial (LC-MS/MS), para a deteção e quantificação de aflatoxinas em farinhas de trigo e de aveia e da zearalenona em farinha de milho, de acordo com os critérios estabelecidos pela União Europeia, no laboratório de Química da SGS Portugal. Foi igualmente efetuado um estudo de estabilidade do composto, de forma a conhecer as condições em que ocorre a sua degradação e, a partir daí, caracterizar os principais produtos assim originados. De forma a garantir fiabilidade dos resultados analíticos obtidos foram avaliados parâmetros como a linearidade, os limites de deteção e quantificação, a repetibilidade, a precisão intermédia e a exatidão.

Obteve-se resultados que confirmam a linearidade da gama de trabalho e valores válidos de LQ e LD. Além disso, o método apresentou uma repetibilidade e precisão intermédia aceitáveis, uma vez que os respetivos coeficientes de variação foram inferiores a 5 %, exceto para a precisão intermédia da recuperação da aflatoxina B₂, na matriz do trigo. A exatidão do método foi aferida recorrendo a ensaios de recuperação, tendo-se obtido percentagens de recuperação entre 70-110% para as aflatoxinas nas farinhas de trigo e de aveia e 70 - 120 % para a zearalenona para a farinha de milho. Uma vez que estes parâmetros se apresentaram de acordo com os critérios estabelecidos para a validação de um método analítico, o objetivo proposto foi cumprido.

Os objetivos propostos foram concretizados, obtendo-se um método validado de acordo com os requisitos da União Europeia.

Palavras-chaves: micotoxinas, aflatoxinas, zearalenona, validação, LC-MS/MS

Abstract

It is estimated that 25% of world production and 20% of European food production may be contaminated with these toxins, resulting in serious safety and socioeconomic consequences. As mycotoxins usually in the cereals, nuts, cocoa, coffee, wine and meat, especially water activity and temperature are not properly controlled. These are a group of small organic molecules, with toxic medical activity, produced as secondary metabolites by some filamentous fungi. That is why it is necessary to study it.

This work focused on the development and validity of an analytical methodology, by liquid chromatography coupled to sequential mass spectrometry (LC-MS / MS), for the detection and quantification of aflatoxins in wheat and oat flours and zearalenone in maize flour, according to the criteria established by the European Union, without the chemical laboratory of SGS Portugal. A study of the stability of the compound was also carried out, in order to know the conditions in which its degradation occurs and, from there, to characterize the main products thus originated. In order to guarantee the reliability of the analytical results obtained as control as a linearity, the limits of detection and quantification, a repeatability, an intermediate precision and an accuracy.

Results were obtained which confirm a linearity of the working range and valid values of LQ and LD. In addition, the method has acceptable repeatability and intermediate accuracy, since the lower coefficients of variation are 5%, except for the intermediate accuracy of aflatoxin B2 recovery in the wheat matrix. The accuracy of the method was assessed using recovery assays, with recovery percentages ranging from 70-110% for aflatoxins in wheat and oat flour and 70-120% for zearalenone for corn flour. Once these parameters are established according to the established criteria for a validity of an analytical method, the proposed goal is met.

The proposed objectives were fulfilled, obtaining a validated method according to the requirements of the European Union.

Keywords: mycotoxins, aflatoxins, zearalenone, validation, LC-MS / MS

Índice

Agradecimentos.....	3
Resumo	4
Abstract	5
Índice de Tabelas	8
Índice de Figuras	11
1. Introdução.....	14
1.1 Enquadramento.....	14
2. A Empresa.....	17
2.1 SGS – Société Générale de Surveillance, S.A.....	17
2.1.1 Enquadramento histórico.....	18
2.1.2 Organiza�o administrativa	20
2.1.3 Competências/Setores de Atividade.....	20
3. Micotoxinas.....	23
3.1. Aflatoxinas.....	25
3.1.1 Origem das aflatoxinas	25
3.1.2. Ocorrência em alimentos	26
3.1.3. Toxicidade das aflatoxinas.....	28
3.2. Zearalenona	29
3.2.1. As origens da zearalenona	29
3.2.2. Ocorrência em alimentos	30
3.2.3. Toxicidade da zearalenona	30
4. Legisla�o	32
5. Métodos de determina�o para micotoxinas.....	35
5.1. Cromatografia Líquida Acoplada a Espectrometria de Massa Sequencial	36
6. Valida�o de métodos analíticos.....	40
6.1. Curva de Calibra�o.....	41
6.1.1. Gama de trabalho	41
6.1.2. Linearidade	43
6.2. Limiares analíticos.....	43
6.2.1. Limite de Detec�o	44
6.2.2. Limite de Quantifica�o.....	45
6.3. Sensibilidade.....	45
6.4. Precisa�o	46

6.4.1 Repetibilidade	46
6.4.2 Reprodutividade.....	46
6.4.3 Precisão intermédia	47
6.5 Exatidão	47
7. Metodologia Experimental.....	49
7.1 Amostras	49
7.2.1 Reagentes e preparação de soluções	49
7.2.1.1 Aflatoxinas B1, B2, G1 e G2	50
7.2.2 Zearalenona.....	51
7.3. Extração	51
7.3.1. Aflatoxinas B1, B2, G1 e G2	51
7.3.1. Zearalenona.....	52
7.4. Quantificação por LC-MS/MS	52
7.4.1. otimização das condições do LC-MS/MS	52
8. Resultados e discussão	55
8.1. Curva de Calibração.....	55
8.1.1 Gama de trabalho	55
8.2. Limiares analíticos.....	61
8.2.1. Limites de Detecção	61
8.2.2 Limite de quantificação	61
8.3 Precisão	62
8.3.1 Repetibilidade	62
8.3.2. Precisão intermédia	68
8.4. Exatidão	74
9. Conclusão e Perspetivas Futuras	81
Referências Bibliográficas	83

Índice de Tabelas

Tabela 1. Teores máximos ($\mu\text{g}/\text{Kg}$) estabelecidos pela União Europeia para diferentes produtos alimentares (Regulamento (CE) n.º 1881/2006), para as aflatoxinas	32
Tabela 2 Teores máximos ($\mu\text{g}/\text{Kg}$) estabelecidos pela União Europeia para diferentes produtos alimentares (Regulamento (CE) n.º 1881/2006) para a zearalenona.....	33
Tabela 3. Curva de calibração e respetivos volumes pipetados para as soluções-padrão das aflatoxinas totais.	50
Tabela 4. Curva de calibração e respetivos volumes pipetados para as soluções-padrão de ZEA.....	51
Tabela 5. Descrição das condições operatórias por LC/MS em que a água é o solvente A e o acetonitrilo, o solvente B.....	53
Tabela 6. Descrição das condições de aquisição de dados em LC-MS/MS	53
Tabela 7. Transições de MRM usando um método com polaridade negativa e positiva.	54
Tabela 8. Padrões da curva de calibração da AFB1 e o respetivo sinal cromatográfico	55
Tabela 9. Padrões da curva de calibração da AFG1 e o respetivo sinal cromatográfico	56
Tabela 10. Padrões da curva de calibração da AFB2 e o respetivo sinal cromatográfico	57
Tabela 11. Padrões da curva de calibração da AFG2 e o respetivo sinal cromatográfico.	57
Tabela 12. Padrões da curva de calibração da ZEA e o respetivo sinal cromatográfico.	58
Tabela 13. Concentração do padrão e respetivo sinal instrumental, razão entre o sinal analítico e a concentração do padrão e a percentagem de linearidade para cada ponto da reta e a média das razões: A- AFB1; B AF G1; C- AFB2; D- AFG2; E- ZEA	59
Tabela 14. Resultado da avaliação da repetibilidade da AFB1 para uma amostra de farinha de trigo.....	63
Tabela 15. Resultado da avaliação da repetibilidade da AFB1 para uma amostra de farinha de aveia.	63
Tabela 16 . Resultado da avaliação da repetibilidade da AFG1 para uma amostra de trigo e aveia.	64
Tabela 17. Resultado da avaliação da repetibilidade da AFG1 para uma amostra de farinha de aveia.	64

Tabela 18. Resultado da avaliação da repetibilidade da AFB2 para uma amostra de trigo e aveia.....	65
Tabela 19. Resultado da avaliação da repetibilidade da AFLB2 para uma amostra de farinha de aveia.	65
Tabela 20. Resultado da avaliação da repetibilidade da AFG2 para uma amostra de trigo e aveia.....	66
Tabela 21. Resultado da avaliação da repetibilidade da AFLG2 para uma amostra de farinha de aveia.	66
Tabela 22 . Resultado da avaliação da repetibilidade da ZEA para uma amostra de milho.....	67
Tabela 23. Resultados da avaliação da precisão intermédia para uma amostra de farinha de trigo, realizadas em datas diferentes pelo mesmo analista, para os ensaios de recuperação da AFB1.....	68
Tabela 24. Resultados da avaliação da precisão intermédia para uma amostra de farinha de aveia, realizadas em datas diferentes pelo mesmo analista, para os ensaios de recuperação da AFB1.....	69
Tabela 25. Resultados da avaliação da precisão intermédia para uma amostra de farinha de trigo, realizadas em datas diferentes pelo mesmo analista, para os ensaios de recuperação da AFG1.....	69
Tabela 26. Resultados da avaliação da precisão intermédia para uma amostra de farinha de aveia, realizadas em datas diferentes pelo mesmo analista, para os ensaios de recuperação da AFG1.....	70
Tabela 27 Resultados da avaliação da precisão intermédia para uma amostra de farinha de trigo, realizadas em datas diferentes pelo mesmo analista, para os ensaios de recuperação da AFB2.....	70
Tabela 28. Resultados da avaliação da precisão intermédia para uma amostra de farinha de aveia, realizadas em datas diferentes pelo mesmo analista, para os ensaios de recuperação da AFB2.....	71
Tabela 29 Resultados da avaliação da precisão intermédia para uma amostra de farinha de trigo, realizadas em datas diferentes pelo mesmo analista, para os ensaios de recuperação da AFG2.....	72
Tabela 30. Resultados da avaliação da precisão intermédia para uma amostra de farinha de aveia, realizadas em datas diferentes pelo mesmo analista, para os ensaios de recuperação da AFG2.....	72
Tabela 31. Resultados da avaliação da precisão intermédia para uma amostra milho, realizadas em datas diferentes pelo mesmo analista, para os ensaios de recuperação da ZEA.....	73

Tabela 32. Resultado da análise à exatidão do método para a amostra de trigo e aveia, para a determinação da AFB1.	74
Tabela 33. Resultado da análise à exatidão do método para a amostra de trigo e aveia, para a determinação da AFG1.	75
Tabela 34. Resultado da análise à exatidão do método para a amostra de trigo e aveia, para a determinação da AFB2.	76
Tabela 35. Resultado da análise à exatidão do método para a amostra de trigo e aveia, para a determinação da AFG2.	77
Tabela 36. Resultado da análise à exatidão do método para a amostra de farinhas de trigo e aveia, para a determinação do somatório das aflatoxinas (B1, G1, G2 e B2)...	78
Tabela 37. Resultado da análise à exatidão do método para a amostra de trigo e aveia, para a determinação da ZEA em farinha de milho.	80

Índice de Figuras

Figura 1. Logótipo do Grupo SGS.....	18
Figura 2. Diagrama representativo das fases de produção de alimentos até consumo humano. [26].....	24
Figura 3. Estruturas químicas das AFB1, AFB2, AFG1 e AFG2[37].....	26
Figura 4. Estrutura geral da contaminação de AFs em humanos e animais.....	27
Figura 5. Estrutura química da zearalenona [54].....	29
Figura 6. Aductos mais comuns encontrados nos modos de ionização positiva e negativa.....	38
Figura 7. Cromatograma de várias micotoxinas analisadas usando os modos de ionização positivo e negativo.	54
Figura 8. Curva de calibração da AFB1 na gama de concentração de 0,10 ng/mL a 4,00 ng/mL.	56
Figura 9. Curva de calibração da AFG1 na gama de concentração de 0,10 ng/mL a 4,00 ng/mL.	56
Figura 10. Curva de calibração da AFB2 na gama de concentração de 0,025 ng/mL a 1,00 ng/mL.....	57
Figura 11. Curva de calibração da AFG2 na gama de concentração de 0,025 ng/mL a 1,00 ng/mL.....	58
Figura 12. Curva de calibração da ZEA na gama de concentração de 15 ng/mL a 50,00 ng/mL.....	58
Figura 13. Teste de RIKILT para avaliar linearidade das aflatoxinas. A- AFB1; B - AFG1; C- AFB2; D - AFG2; E- ZEA.....	60

Lista de Abreviaturas

AF, aflatoxinas

AFB1, Aflatoxina B1

AFB2, aflatoxina B2

AFG1, aflatoxina G1

AFG2, aflatoxina G2

APCI, ionização química a pressão atmosférica

CV, coeficiente de variação

DON, deoxinivalenol

EFSA, European Food Safety Authority ELISA, Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay

EN, European Standard

ESI, "Electrospray"

FLD, Fluorescência

GC/MS, Cromatografia gasosa com espectrometria de massa

GFC, Cromatografia de filtração em gel

GPC, Cromatografia de permeação em gel

HPLC, Cromatografia líquida de alta eficiência

IAC, Colunas de imunoafinidade

IARC, International Agency for Research on Cancer

IPAC, Instituto Português de Acreditação

ISO, International Standard Organisation

LC-MS, Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massa

LD, limite de deteção

LQ, limite de quantificação

MS, Espectrometria de massa

MS/MS, Dois níveis de fragmentação recorrendo a espectrometria de

NP, Norma portuguesa

OGC, Oil, gas and chemical

OTA, ocratoxina A

SGS, Société Générale de Surveillance

TCTs, tricotecenos

UE, União Europeia AF,

UV, Ultravioleta

ZEA, zearalenona

1. Introdução

1.1 Enquadramento

As micotoxinas são um grupo de pequenas moléculas orgânicas, com reconhecida atividade tóxica, produzidas como metabolitos secundários por alguns fungos filamentosos. Em produtos agroalimentares podem ser consideradas de origem natural, sendo tóxicas para os seres humanos e animais quando ingeridas ou inaladas, mesmo que em pequenas quantidades.

As micotoxinas são uma fonte prevalente de risco para a saúde relacionada com alimentos em colheitas de campo. No entanto, são quase não reconhecidos publicamente. Consumo de alimentos contaminados com altos níveis podem ser fatais. A exposição a longo prazo pode, entre outras coisas, aumentar o risco de cancro e suprimir o sistema imunológico. [1]

A sua contaminação nos alimentos pode ocorrer no campo, durante o transporte e/ou no armazenamento do produto. É essencial a existência de planos de monitorização dos níveis de contaminação, de forma a serem tomadas medidas preventivas para reduzir o risco de contaminação.

A principal causa da contaminação dos alimentos, por micotoxinas, deve-se a fatores ambientais e biológicos. O período de 2002 a 2008 apresentou um aumento considerável de notificações relacionadas com micotoxinas, porém nos anos seguintes, o número de notificações diminuiu. Esta significativa melhoria resultou na redução da frequência de controle requerida na importação. Estudos da Comissão Europeia, datando de 2011, concluem ainda que as aflatoxinas foram as mais relatadas.[2], [3]

As micotoxinas são produzidas principalmente por espécies de fungos que pertencem aos géneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium* e ainda *Claviceps* e *Paelomyces*. [4], [5] Estes podem ser responsáveis pela deterioração de alimentos, e pela produção de micotoxinas, sendo importante, por isso, possuir métodos convenientes e confiáveis para medir o seu crescimento. Porém, o crescimento dos fungos é mais difícil de quantificar comparativamente com as bactérias e leveduras, já que estes não crescem como células individuais, mas sim como micélio (hifas filamentosas).[6] A contaminação de um alimento por parte dos fungos tem muitas variáveis, destacando-se entre elas a atividade de água, oxigénio, temperatura, tipo de substrato e pressão osmótica. Pode haver uma formação de micotoxinas antes ou depois da colheita, no armazenamento ou

no seu embalamento, e a identificação das micotoxinas e respetiva avaliação quantitativa requer a preparação das amostras, utilização de métodos de extração e técnicas de análise quantitativa.[7]

A toxicidade das micotoxinas variam em função das características destas, pois as micotoxinas exercem os seus efeitos de diferentes formas. Além disso, os seus efeitos no consumidor dependem de vários fatores, como a idade, o peso, a dose e via de exposição. Temos como exemplo as aflatoxinas e as ocratoxinas, as quais interferem com a formação de proteínas, mas cada uma de diferente forma[8].

Estas substâncias, para além de serem classificadas como cancerígenas, quando ingeridas em níveis elevados na alimentação podem levar a problemas agudos e até à morte. Além disso, podem surgir sinais de debilidade imunitária, atraso no crescimento e surgimento de lesões oncológicas, mutagénicas, teratogénicas, citotóxicas, neurotóxicas, nefrotóxicas e estrogénicas. Em termos de exposição e gravidade, as micotoxinas apresentam um risco elevado como a maior parte dos contaminantes, incluindo pesticidas e aditivos alimentares. Na sua ação de decomposição dos alimentos, quase todas são citotóxicas, provocando a rotura de membranas celulares e outras estruturas, ou interferindo na síntese proteica.[9]

De acordo com a Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação, cerca de 25% de todas as colheitas mundiais de cereais estão, de alguma forma, contaminadas. [10]

Nos últimos anos tem havido uma intensa investigação com o propósito de detetar e prevenir a existência destas substâncias nos alimentos. Sendo que apenas algumas micotoxinas são regularmente encontradas em alimentos e rações animais como grãos e sementes, leite, legumes e frutas.[11], [12] Por outro lado, os animais também podem estar sujeitos a contaminação, e a ingestão da carne e do leite destes animais levar à contaminação humana e pôr em causa a saúde pública. [13]

Entre os milhares de metabólitos secundários de fungos atualmente conhecidos, apenas alguns grupos de micotoxinas são importantes dos pontos de vista económicos e saúde, nomeadamente: as aflatoxinas (AF), produzidas principalmente por espécies de *Aspergillus*; ocratoxina A (OTA), produzida por espécies de *Aspergillus* e *Penicillium*, e zearalenona (ZEA), fumonisinas (FUM) e tricotecenos (TCTs) (especialmente deoxivalenol (DON)), produzidas principalmente por muitas espécies de *Fusarium*. [14]–[16]

Como apresentam uma grande estabilidade térmica, as micotoxinas não são destruídas pelo calor, sobrevivendo às principais etapas do processamento térmico alimentar [17]

Portanto, a distribuição de micotoxinas nos procedimentos de processamento de cereais é um tema de interesse mundial devido aos altos impactos económicos e na saúde e é uma ferramenta importante na gestão de riscos para estabelecer limites para garantir produtos alimentares seguros para uso alimentar.[18] Como os níveis destas toxinas nos alimentos podem não ser completamente removidos no fornecimento de alimentos, muitos países definiram regulamentos para os limites máximos toleráveis das mesmas.

Os resultados de uma validação servem para garantir a qualidade, fiabilidade e precisão dos resultados analíticos obtidos. Para a validação do método, o processo utilizado consistiu em confirmar se o procedimento analítico realizado era adequado para a finalidade pretendida. Segundo o Guia Relacre nº13, os requisitos mínimos a serem considerados para uma análise quantitativa são a curva de calibração (gama de trabalho e linearidade), os limiares analíticos (limite de deteção e limite de quantificação), a precisão (repetibilidade e precisão intermédia) e a exatidão através de ensaios de recuperação.

1.1.1. Objetivos

O presente trabalho de tese foi realizado com o objetivo de desenvolvimento e validação de um método analítico para a sua quantificação através de cromatografia líquida com espectrometria de massa em tandem (LC-MS/MS) de micotoxinas, na empresa SGS Portugal, nomeadamente das seguintes micotoxinas: AFB1, AFB2, AFG1 e AFG2 e da ZEA, em alimentos como trigo e aveia.

2. A Empresa

2.1 SGS – Société Générale de Surveillance, S.A

Estabelecida em 1878, a SGS transformou o comércio de grãos na Europa, oferecendo serviços inovadores de inspe o agrícola. A Empresa foi registrada em Genebra como Société Générale de Surveillance em 1919. As a es foram listadas pela primeira vez na Bolsa de Valores Su a (SWX) em 1985.

O Grupo SGS está estabelecido como um símbolo de referência na presta o de serviços de excelência e está associado a valores como a independência, a qualidade, a integridade, a confidencialidade e a inova o. De modo a garantir uma forma o consistente, eficaz e de alta qualidade aos colaboradores do Grupo assim como a outras empresas foi criado a SGS Academy., conseguindo uma cobertura multidisciplinar e mundial para qualquer tipo de produto: alimentares, cosméticos, químicos e petroquímicos, gases, materiais de constru o, máquinas, vestuário e têxteis-lar, cerâmicas, brinquedos, eletrodomésticos e outros aparelhos eletr nicos, surgindo assim o SGS MULTILAB. Neste Grupo está englobada a SGS Portugal que se encontra atualmente sediada no Pólo Tecnológico de Lisboa, e apresenta uma rede de escritórios de norte a sul do país como também nos arquipélagos dos Açores e da Madeira e labor rios em Lisboa, Trafaria e Sines. Inicialmente, afiliada com sede na baixa Lisboa, foi criada para se dedicar ao controlo de opera es de carga e descarga de cereais a granel, sendo posteriormente alargada a sua atividade para outros setores. A SGS Portugal det m diversas competências, inclusive na área da Gestão da Qualidade, assim por uma questão de maior eficiência estas foram agrupadas no SGS MULTILAB que   composto pelo Labor rio de Análises Físico-Químicas, Microbiológicas e Amostragem, atuando na área alimentar, cosmética, águas de consumo e resíduos; Labor rio de Ensaios de Ambiente e Segurança, Labor rio de Ensaios Não Destrutivos e Labor rios de OGC (oil, gas and chemical) [19].

Na Figura 1. Apresenta-se o logótipo atual do Grupo da SGS, estabelecidos em 2002.



Figura 1. Logótipo do Grupo SGS

2.1.1 Enquadramento histórico

A SGS surgiu em 1878 na cidade de Rouen em França, sob o nome “Goldstück e Hainze & C^a” e tinha como atividade inicial a inspeção e verificação da qualidade e quantidade do grão a granel que chegava ao porto de Rouen. Ao fim do primeiro ano a companhia já tinha aberto três escritórios nos maiores portos de França e em 1913 tornou-se líder no negócio de inspeção de grão a granel na Europa. Em 1919, já sediada em Genebra na Suíça, a empresa adotou o nome cuja sigla ostenta até hoje, SGS - Société Générale de Surveillance. A SGS Portugal foi fundada em 1922 fazendo-se representar pela mão de Ronald Garland Jayne, em nome da empresa Garland Laidley, ainda hoje uma referência na logística e navegação. Devido à instabilidade política que se fez sentir pela instauração da Ditadura Militar e fim da Primeira República Portuguesa, a gestão da empresa foi delegada a René Aberlé (1926) pela sua experiência de trabalho com transações de trigo. Em 1928, o Grupo SGS cresceu internacionalmente, com oficiais e afiliadas em 21 países ao redor do mundo. Em 1938, o primeiro português a ser contratado pela companhia Portuguesa foi Fernando Pereira, que se tornou numa figura marcante durante os seus 50 anos de serviço, por ser o responsável pela continuidade da SGS Portugal na liderança do mercado como também por ter sido o primeiro gerente português nomeado em 1960. Em 1939 a SGS expandiu-se para a inspeção e análise de matérias-primas, minerais e metais através da aquisição de laboratórios na Europa e inicia a sua atividade na América do Sul, com escritórios na Argentina e Brasil, prestando serviços de inspeção agrícola. Na década de 60 a SGS iniciou a supervisão a produtos petrolíferos ao adquirir empresas na Bélgica, já no final dos anos 60 obteve a Redwood, empresa com referência mundial no setor petroquímico, nascendo assim a área da supervisão de produtos petroquímicos também em Portugal. A partir daí a companhia Portuguesa começou a ter a sua própria identidade e deixou de ser simplesmente uma representação de Genebra. A SGS Portugal ao longo dos anos estabeleceu contratos governamentais que permitiram o crescimento da empresa e lhe impulsionaram diversas competências, passando a atuar não só na área da inspeção

como também na produção de produtos agroalimentares e têxteis. No início da década de 80 a empresa tomou a decisão de abrir uma filial no Porto, sendo nesta altura que a Garland a deixou de representar, ficando sob a chefia de Eugénio Costa, um inspetor com grande experiência em Angola e que pretendia fazer carreira em Portugal. Eugénio Costa chefiou as áreas da supervisão agroalimentar e minérios no norte, durante o resto da sua carreira. A importância da indústria têxtil no norte levou à expansão da filial levando não apenas à abertura de um laboratório, como à aquisição do entreposto de algodão em rama na Maia. O laboratório têxtil foi o primeiro em Portugal a ter implementado o Sistema de Gestão da Qualidade. Devido à dificuldade na capacidade de resposta dos laboratórios externos subcontratados a SGS decidiu, no final dos anos 80, abrir um laboratório agroalimentar em Lisboa pela mão de Joaquim Martinho, engenheiro químico que entrou na companhia em 1975, o único licenciado dos quadros, e que em 1992 se tornou no primeiro laboratório privado deste setor a ser acreditado. Nessa altura, a SGS tem 113 escritórios, 57 laboratórios e 9500 funcionários atuando em mais de 140 países.

A SGS conta já com mais de 200 colaboradores diretos em Portugal e uma extensa bolsa de especialistas externos com total cobertura geográfica nacional.

Em 1996, surgiu um serviço completamente inovador em Portugal: as peritagens automóveis. Face às necessidades de eficiência na resolução dos sinistros automóveis as seguradoras procuravam uma solução que oferecesse confiança aos consumidores, assim o Bernhard Paul, administrador da SGS Portugal desde 1995, lançou um desafio para o desenvolvimento de um serviço em outsourcing da gestão dos sinistros automóveis, serviço esse que já existia no Grupo na Bélgica e que nasceu oficialmente em Portugal no ano 1997. Com a ajuda financeira do Programa Estratégico de Dinamização da Indústria Portuguesa (PEDIP) foi possível um grande salto tecnológico, em 1997, transferindo-se a sede da SGS Portugal para o Cacém, após a construção de raiz de novas instalações e da aquisição de equipamentos mais modernos. Em 1998, a Certificação de Organizações adquiriu uma estrutura própria na SGS em Portugal (SGS ICS), sendo o primeiro a obter a acreditação para a Certificação de Sistemas de Gestão da Qualidade (ISO 9001), também nesse ano a companhia criou o organismo de Ensaios não destrutivos. Um ano depois foi lançado o serviço do cliente mistério – Mystery Shopping – com a aquisição da empresa Lodge service. No final da década de 90 e início do novo milénio a SGS Portugal chegou às ilhas sob a direção de Rui Cordeiro e em 2003 nasceu a SGS Academy, entidade formadora da SGS. A sede situada no Cacém foi transferida em 2005 para o Lumiar onde se encontra atualmente instalada e reúne todos os serviços (escritórios e SGS MULTILAB) Atualmente, a SGS

opera numa grande variedade de setores industriais empregando mais de 80000 pessoas em todos os seus escritórios e laboratórios existentes em quase todos os países do mundo. O Grupo tem crescido constantemente para se tornar o líder da indústria que é hoje, resultado da melhoria contínua na inovação, redução dos riscos, produtividade e eficiência das suas operações. [19]

2.1.2 Organização administrativa

Numa empresa, é fundamental haver uma combinação de esforços e responsabilidades entre indivíduos para ser possível alcançar objetivos a nível coletivo, que seriam inatingíveis caso se tratasse de uma só pessoa. O Conselho Operacional é composto por vários especialistas sendo que cada negócio é liderado por um vice-presidente executivo e cada região é liderada por um Chief Operating Officer. O grupo reúne-se regularmente ao longo do ano para determinar as estratégias e prioridades da empresa e analisar o seu desempenho. A SGS é liderada por um grupo dinâmico de pessoas com muitos anos de experiência nas respetivas áreas em que atuam. Deste modo, o modelo organizacional da SGS permite uma rentabilização máxima das metodologias de trabalho nas diferentes funções e regiões.[19]

2.1.3 Competências/Setores de Atividade

A SGS fornece serviços independentes em todo o mundo, que fazem a diferença nas vidas das pessoas. Os especialistas internacionais ajudam a operar de forma mais eficiente e sustentável, aprimorando processos, melhorando a qualidade e produtividade, reduzindo riscos, verificando conformidade e agilizando a chegada dos produtos ao mercado. As principais atividades de serviço abrangem todos os setores da indústria, incluindo os produtos e serviços que os consumidores confiam no dia-a-dia em qualquer parte do mundo. [19]

Setores

- Agricultura & Alimentação: soluções completas que asseguram que os produtos cumpram padrões internacionais e cheguem com segurança à mesa do consumidor. Se uma empresa opera uma unidade de

armazenamento ou produção de sementes, a SGS pode mitigar os riscos associados a doenças, infestações e resíduos.

- Automóvel: permite melhorar o desempenho e reduzir riscos, na conceção, construção e operação de soluções de inspeção de veículos em todo o mundo. Governos, indústrias, instituições financeiras e seguradoras, além dos consumidores, dependem destas soluções independentes, precisas e seguras para mitigar danos e aumentar a segurança de automóveis.
- Químico: Devido ao crescente uso de produtos químicos em bens de consumo, os perigos à saúde, principalmente nos itens infantis, são um importante foco do setor. Assim, a SGS ajuda a eliminar estas preocupações, oferecendo um portfólio de serviços de laboratório que testam a segurança de seus produtos e o ajudam a controlar a utilização de produtos químicos, de acordo com os níveis de tolerância empregados no setor.
- Construção: durante a fase de projeto de uma obra, a SGS pode ajudar a concretizar os planos, garantindo que os processos funcionem de forma eficaz, os canteiros de obra sejam seguros e os materiais utilizados sejam confiáveis.
- Bens de Consumo e Retalho: de tecidos a aparelhos, móveis, alimentos e eletroeletrônicos, o portfólio completo de serviços da SGS facilita a qualidade, conformidade e segurança de bens de consumo de todas as cadeias de suprimento globais, garantindo que nenhum detalhe importante seja ignorado no processo de um produto, da conceção à entrega ao mercado.
- Energia: Os serviços de energia concentram-se em dois elementos principais: atender às demandas do setor por energia e tecnologias renováveis, que permitam a captura e transferência de energia de fontes como vento, sol e marés, e a modernização de usinas de energia convencional e novas construções que observam rígidas regulamentações, ajudando em todos os aspetos, garantindo que as regulamentações sejam cumpridas, que a segurança seja levada em consideração em todos os estágios e que os impactos ambientais sejam minimizados.
- Finanças: Orientações independentes em várias áreas relacionadas a serviços de gestão financeira de projetos, para ajudar as organizações a terem certeza de que possuem as orientações corretas sobre empréstimos, gestão de riscos, comércio, auditorias e certificação, verificação e treinamento financeiro, a fim de apoiar suas decisões relacionadas à gestão financeira de projetos, focando a sustentabilidade, avaliação e gestão de risco ambiental e social.

- Industrial: apoio a integridade, segurança e confiabilidade de suas atividades, equipamentos e operações, com soluções técnicas criativas, fornecendo assessoria para o fabricante e comerciante da área industrial, visando seu crescimento estratégico e melhores práticas do mercado, baseados em serviços de testes e análises de conformidade, a fim de garantir que os processos e projetos atendam todos os requisitos de qualidade e desempenho, minimizando os impactos ambientais do setor.
- Ciências biológicas: testes analíticos, bioanalíticos e de ensaios clínicos, juntamente com a gestão de processos, permitindo que os produtos farmacêuticos cheguem rapidamente aos que necessitam, com custos mínimos e segurança máxima. Existem parcerias com setores farmacêuticos, biofarmaceuticos, de biotecnologia, de aparelhagem médica e de saúde para fornecer um amplo portfólio de serviços essenciais.
- Logística: soluções inovadoras para desenvolver e aumentar os negócios de clientes, encontrando maneiras de fazer com que processos funcionem melhor, com mais facilidade, rapidez ou lucratividade. Os especialistas examinam a operação de processos interconectados que possuem um papel vital na produção de produtos. Com utilização de várias ferramentas e tecnologias que ajudar a aprimorar as operações e aumentar a eficiência operacional, com o apoio de orientações logísticas especializadas.
- Mineração: A SGS tem um conhecimento especializado em locais de mineração, o que a coloca à frente da indústria, através de técnicas sobre processos de fabricação de aço, uma parceria estratégica no comércio de carvão e coque ou então informações sobre como reduzir riscos, maximizando os lucros ou aumentando as eficiências na mineração ou extração de pedras preciosas ou metais básicos.
- Petróleo & Gás: serviços em todos os setores primários e secundários enriquecem cada fase da cadeia de valor, desde o combustível de transporte e produtos de aquecimento, até plásticos, fertilizantes e produtos farmacêuticos. A rede global da empresa e crescente número de escritórios e laboratórios oferece um serviço independente, focado em responder às necessidades do cliente que deseja vantagem competitiva.
- Setor Público: O portfólio de serviços inovadores da SGS para governos, instituições internacionais e organizações de parceria nos setores públicos e privados abrangem uma variedade de verificação e soluções baseadas em tecnologias. A empresa avalia a conformidade de acordo com requisitos

regulamentares, aumentamos a receita governamental, facilitamos o comércio e ainda apoia a eficiência e promove práticas de boa gestão juntamente com um desenvolvimento sustentável.

3. Micotoxinas

As micotoxinas são compostos químicos de baixo peso molecular, sendo agrupadas de acordo com o grau e tipo de toxicidade. São produzidas no final da fase exponencial de crescimento (fase caracterizada pelo elevado crescimento da população) ou início da fase estacionária (fase na qual o tamanho da população permanece constante) dos fungos filamentosos, constituindo parte dos metabolitos secundários. [20]

Estruturalmente estas toxinas são compostos policetônicos, produzidos aquando de uma redução incompleta dos grupos cetônicos na biossíntese dos ácidos gordos.[21]

Na natureza, são vários os fungos capazes de as produzir, sendo estas patogénicas para o Homem e os animais. [5] Uma micotoxina é definida como um metabolito secundário, que demonstram ser tóxicos quando ingeridos. [22] São produzidas pelo metabolismo secundário dos fungos e podem estar presentes num elevado número de produtos alimentares e ração animal. Ao contrário dos metabolitos primários, que são essenciais ao crescimento do fungo, estes metabolitos são formados durante o final da fase exponencial de crescimento e não possuem significância para o crescimento ou metabolismo do organismo produtor e são produzidos quando grandes quantidades de precursores de metabolitos primários são acumulados, dependendo da temperatura, pH e humidade. [23]

Como referido anteriormente, as micotoxinas podem ser formadas durante a pré-colheita, no período de pós-colheita, durante o armazenamento, processamento e distribuição. As culturas que permanecem mais tempo no campo são mais suscetíveis ao ataque fúngico e, por isso, podem apresentar maiores níveis de micotoxinas. [24], [25]

Na Figura 2, está representado um diagrama representativo das fases de produção de alimentos até consumo humano. [26]

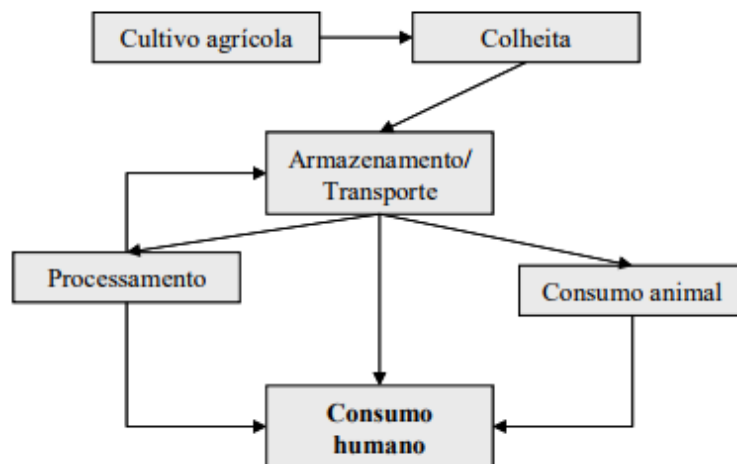


Figura 2. Diagrama representativo das fases de produção de alimentos até consumo humano. [26]

Os fungos são capazes de germinar, crescer e produzir toxinas numa grande variedade de produtos agrícolas, sendo necessário a existência de condições favoráveis, nas quais incluem os principais fatores como a humidade (mais precisamente, a atividade da água) e a temperatura do produto. Logo, os fungos não se conseguem desenvolver em alimentos devidamente secos. No caso dos cereais, grãos de café, frutos e sementes oleaginosas, após colheita as culturas devem ser secas imediatamente. Pois a secagem eficiente dos produtos e a sua conservação sem humidade é uma arma eficaz contra o crescimento de fungos e a produção de micotoxinas. A manutenção de alimentos com uma atividade da água abaixo de 0,7 é uma técnica eficaz usada mundialmente para controlar estragos provocados por fungos em alimentos. Condições apropriadas de armazenamento também são de grande importância.[23], [26]–[28]

Estima-se que 25 % da produção mundial e 20 % da produção europeia de alimentos podem estar contaminadas com estas toxinas, originando graves consequências tanto a nível da segurança alimentar como a nível socioeconómico.

As micotoxinas normalmente encontram-se nos cereais, frutos secos, cacau, café e carne, especialmente se a atividade da água e a temperatura não forem devidamente controladas [5], [10] Esses alimentos quando contaminados e ingeridos podem causar diversas doenças, agudas e crónicas, e em casos extremos a morte, tanto em pessoas como em animais, o que suscita uma preocupação por parte de diversas organizações internacionais. As intoxicações associadas à ingestão de alimentos ou rações contaminadas com estes metabolitos são chamadas de micotoxicoses. [20] As micotoxinas podem afetar principalmente o fígado e os rins e o sistema nervoso,

endócrino e imunitário, dependendo a gravidade dos seus efeitos da sua toxicidade, do grau e do tempo de exposição, da idade e do estado nutricional do indivíduo ou, até mesmo, de eventuais sinergias entre diversas micotoxinas que possam estar presentes em simultâneo nos alimentos. [5] Em termos de exposição e severidade de lesões crónicas, estima-se que as micotoxinas apresentem um risco maior que os contaminantes antropogénicos (pesticidas e aditivos), considerando como principal via de exposição a ingestão de alimentos contaminados, apesar de existirem casos esporádicos por inalação e por contacto com a pele. [9], [26].

Devido à sua elevada toxicidade, as micotoxinas são consideradas como um dos principais riscos alimentar na União Europeia (UE). O Comité de Peritos Conjuntos sobre Aditivos Alimentares (JECFA), um órgão consultivo científico da Organização Mundial da Saúde (OMS) e a Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO), avalia os riscos de micotoxinas. Nos Estados Unidos e na União Europeia, as autoridades reguladoras e recomendadas para as micotoxinas são emitidas pela United States Food and Drug Administration (FDA) e pela Comissão Europeia (CE), assessorado pela Autoridade Europeia de Segurança Alimentar (EFSA), respetivamente. Para proteger os consumidores de animais e humanos, esses regulamentos fixaram valores-limite regulatórios em alimentos e subprodutos de alimentos para garantir que não sejam prejudiciais e recomendaram boas práticas agrícolas. [9], [29]

3.1. Aflatoxinas

3.1.1 Origem das aflatoxinas

As aflatoxinas consistem num grupo de aproximadamente 20 substâncias que são metabolitos secundários de fungos toxigénicos e apresentam maior capacidade carcinogénica. [30] De entre todas as micotoxinas, as aflatoxinas são as mais estudadas mundialmente. Sabe-se que estas toxinas possuem a capacidade de se ligarem ao DNA das células, afetando a síntese proteica e provocando deficiências imunitárias. Nos seres humanos, o fígado é o principal órgão afetado. [31]

As AFs foram identificadas pela primeira vez em 1961 em rações animais contaminadas por *Aspergillus parasiticus*. Outras espécies produtoras conhecidas são: *A. flavus* e uma mais rara, *A. nomius*. Recentemente a espécie *A. nomius* também se tem mostrado produtora. [32] Os principais tipos são aflatoxina B1 (AFB1), aflatoxina B2

(AFB₂), aflatoxina G₁ (AFG₁) e aflatoxina G₂ (AFG₂). As AFs são derivados difuranocumarínicos e a classificação B e G deve-se à fluorescência que emitem quando submetidas a radiação UV (B-Blue e G-Green). Os números 1 e 2 refletem o índice de mobilidade das AFs durante a técnica de cromatografia em camada fina. [33]–[36] As AFs B₁ e B₂ são produzidas por *A. flavus*, enquanto que *A. parasiticus* produz aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂. As aflatoxinas B₁ e B₂ quando sofrem hidroxilação originam as aflatoxinas M₁ e M₂, respectivamente.[13], [17] A AFB₁ é o mais potente carcinogénico natural conhecido até à data e é a mais frequentemente encontrada nos alimentos. As outras AFs, geralmente não se encontram na ausência de B₁. Apesar da sua diversidade, as aflatoxinas frequentemente encontradas em alimentos são apenas de quatro tipos: B₁, B₂, G₁ e G₂. [17], [33]

As suas estruturas químicas estão representadas nas figura 3.

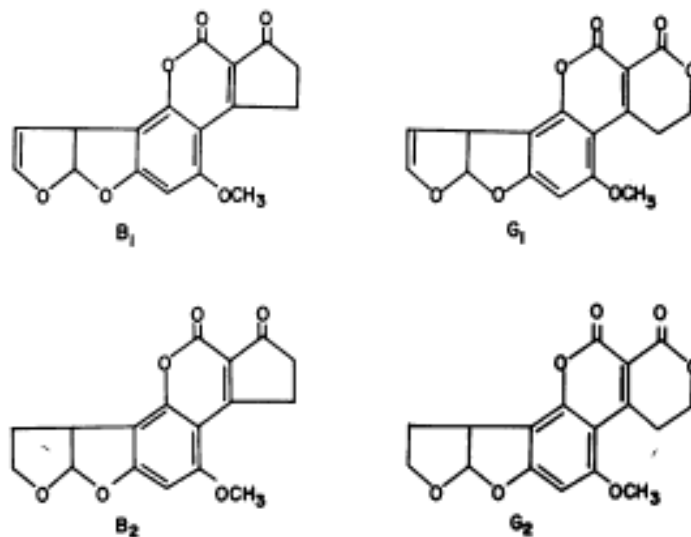


Figura 3. Estruturas químicas das AFB₁, AFB₂, AFG₁ e AFG₂[37]

3.1.2. Ocorrência em alimentos

As AFs podem ser encontradas em alimentos de regiões com temperatura e humidade elevadas, pois em condições de chuva e temperatura, a sua produção é rápida. Sendo que as alterações climáticas afetam a produção destas por diferentes fungos em diferentes alimentos. [38]

As aflatoxinas podem ser encontradas em vários cereais, oleaginosas, especiarias e nozes. [39], [40] Os *Aspergillus* colonizam entre si e produzem aflatoxinas, que contaminam grãos e cereais em vários passos durante a colheita ou armazenamento. A

contaminação por fungos pode ocorrer no campo, ou durante a colheita, transporte e armazenamento [17] A contaminação por AFs de trigo ou cevada ocorre geralmente pelo resultado de armazenamento inadequado. As AFs infectam os seres humanos após o consumo de alimentos contaminados, como ovos, carne e produtos à base de carne, leite e produtos lácteos. [41]

Em alimentos que contenham como substrato a glucose, sacarose e maltose a formação de aflatoxinas é mais elevada, pelo que estas toxinas se encontram sobretudo presentes em amendoins, milho, frutos secos, oleaginosas e cereais. De notar que, apesar da sua perigosidade, estas toxinas não alteram as propriedades organoléticas do produto alimentar. [42]

Na figura seguinte podemos ver como ocorre, de uma maneira geral, a contaminação de aflatoxinas nos humanos:

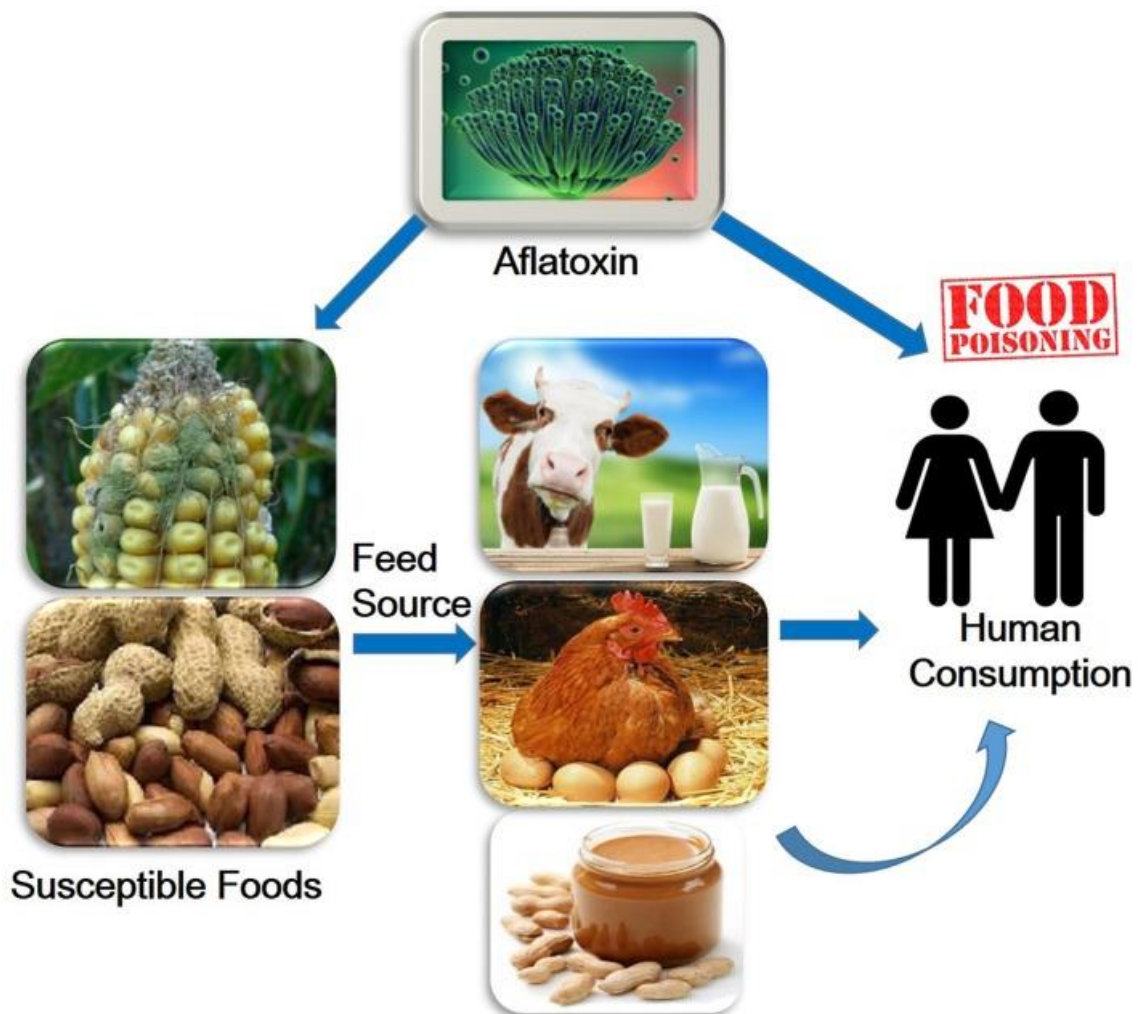


Figura 4. Estrutura geral da contaminação de AFs em humanos e animais

3.1.3. Toxicidade das aflatoxinas

A toxicidade das aflatoxinas G1, B2 e G2 é, respetivamente, 50%, 80% e 90% menor que a da B1. [17][43]

Quimicamente, as aflatoxinas são derivados de difuranocumarina em que um grupo de bifurano está ligado a um lado do núcleo de cumarina, enquanto um anel de pentanona está ligado ao outro lado no caso das séries AFs e AFs-B, ou um anel de lactona de 6-membros está ligado na série AFs-G.

A toxicidade das aflatoxinas é, então, devida a uma ligação dupla no seu anel, considerado o centro ativo da molécula, e responsável pela sua fluorescência. Ao nível do ser humano, a aflatoxina B1 (AFB1) é rapidamente absorvida pelo sistema gastrointestinal, o que facilita a sua circulação na corrente sanguínea. [44]

O fígado é o principal alvo das aflatoxinas. Os primeiros sintomas de hepatotoxicidade do fígado causados por aflatoxinas incluem febre, mal-estar e anorexia seguidas de dor abdominal, vômitos e hepatite; no entanto, casos de intoxicação aguda são excepcionais e raros.[45], [46] A toxicidade crónica por aflatoxinas compreende efeitos imunossupressores e cancerígenos. Além disso, foi observado que a AFB1 interrompe o processo de capacidade de apresentação de antígeno de células dendríticas porcinas, sugerindo talvez um mecanismo de imunotoxicidade por AFB1. [47]

As aflatoxinas causam redução da eficiência da imunização em crianças que levam a um maior risco de infeção. A hepatocarcinogenicidade das aflatoxinas deve-se principalmente à peroxidação lipídica e ao dano oxidativo ao DNA.[48] O AFTs-B1 no fígado é ativado por enzimas do citocromo p450, que são convertidas em AFTs-B1-8, 9-epóxido, que é responsável por efeitos cancerígenos no rim.[49]

Vários estudos mostraram os efeitos prejudiciais da exposição às aflatoxinas no fígado, epidídimo, testículos, rim e coração. Verificou-se que a presença de aflatoxinas no tecido cerebral pós-morte, o que sugeriu que as AFs têm a capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica.[33] AFs também causam anormalidades na estrutura e funcionamento do DNA mitocondrial e células cerebrais.[48]

A expressão da toxicidade da aflatoxina é regulada por fatores como idade, sexo, espécie e estado de nutrição de animais infetados. Os sintomas de aflatoxicose aguda incluem edema, necrose hemorrágica do fígado e letargia profunda, enquanto os efeitos crónicos são imunossupressão, retardo de crescimento e cancro. [33]

3.2. Zearalenona

3.2.1. As origens da zearalenona

A zearalenona (ZEA) é uma micotoxina estrogénica não esteróide produzida por diversas espécies de fungos do género *Fusarium* (*F.*), nomeadamente *F. graminearum* (*Gibberella zeae*), *F. culmorum*, *F. cerealis*, *F. equiseti*, *F. crookwellense* e *F. semitectum*. [50], [51]

O *F. graminearum* foi isolado pela primeira vez no solo de Buckinghamshire, na Inglaterra, sendo a descoberta descrita por Mirocha, Christensen e Nelson (1971).[52]

A denominação zearalenona provém do fungo “*Gibberella zeae*” (forma sexuada do *F. graminearum*), visto ser este o seu principal produtor, mas também pelas características da sua estrutura química. Assim, o seu nome resulta da combinação de *Gibberella zeae* (zea), de se tratar de uma lactona do ácido resorcílico (ral), da existência de uma dupla ligação entre o C-1' e o C-2' (eno) e da presença da cetona em C-6' (ona) . [53]

A ZEA tem uma estrutura em que quimicamente se trata de uma lactona do ácido 6-(10-hidroxi-6-oxo-trans-1-undecenil-)- β -resorcílico (Figura 5).

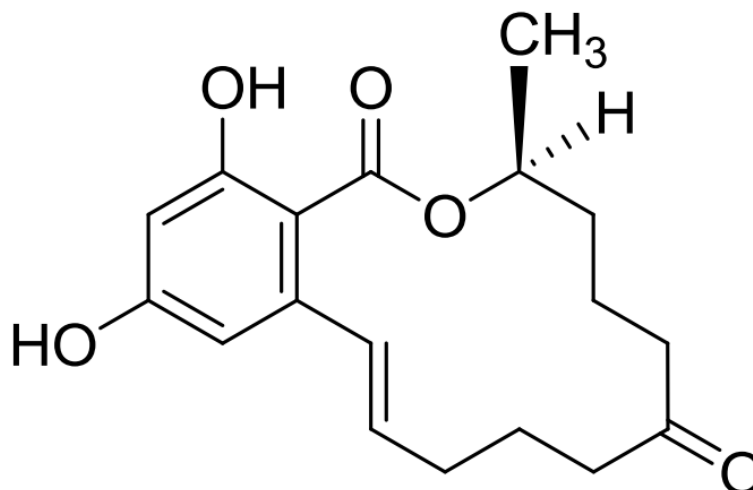


Figura 5. Estrutura química da zearalenona [54]

A estabilidade da ZEA é consideravelmente elevada, não se degrada a altas temperaturas, sendo considerada bastante persistente no ambiente. [55]

É uma substância branca e cristalizável, solúvel em metanol (MeOH) e outros álcoois,

éter dietílico, benzeno, acetonitrilo (ACN) e acetato de etilo. A zearalenona é um poliquétido e é sintetizada por condensação cabeça-cauda de 9 unidades de acetato, via acetatomalonil-coA. Em fungos, as enzimas responsáveis pela produção de poliquétidos são as PKSs (poliketide synthases). [56]

Apresenta-se com uma cor branca cristalina, exibindo uma fluorescência azul-verde quando excitado pelo comprimento de onda longo sob luz UV (360nm) e uma fluorescência verde mais intensa quando excitada a um comprimento de onda curto (260nm). [57]

3.2.2. Ocorrência em alimentos

Esta micotoxina predomina em culturas de cereais como grãos de milho, aveia, cevada, centeio, trigo e arroz, após exposição prolongada das culturas num ambiente húmido e aeróbio, em particular nas regiões temperadas e quentes do nosso planeta, quer no campo quer durante o armazenamento. [41]

Assim a ZEA é um composto estável tanto durante o armazenamento como no processamento do alimento não se degradando a altas temperaturas, pois já demonstrado que pode ser encontrado em qualquer continente em diversos alimentos, que podem estar expostos a uma humidade elevada durante o armazenamento.

3.2.3. Toxicidade da zearalenona

A zearalenona é uma lactona macrocíclica, com um forte efeito estrogénico, que tem sido associada a numerosas micotoxicoses em animais, especialmente em porcos, apresentando também propriedades hematotóxicas e genotóxicas. Esta micotoxina causa alterações no trato reprodutivo de animais de laboratório e domésticos, diminuição da fertilidade, alterações no peso das glândulas endócrinas e dos níveis das hormonas do soro, sendo que o efeito mais importante da zearalenona ocorre no sistema reprodutivo. Esta e alguns dos seus metabolitos ligam-se de forma competitiva aos recetores de estrógenos de vários órgãos (útero, glândula mamária, fígado e hipotálamo), podendo causar hiperestrogenismo, aborto, nados mortos, falso cio, prolapso rectal e da vagina, infertilidade, efeminização dos machos com desenvolvimento de mamas (ela atua como hormona feminina) etc. A ZEA e os seus derivados são uma importante classe de disruptores endócrinos, que podem causar efeitos estrogénicos e alterações no trato reprodutivo de animais de laboratório e

domésticos. [58], [59]

A destoxificação de grãos contaminados com ZEA é difícil de conseguir e presentemente não existe comercialmente nenhum tratamento prático que destrua com eficácia a ZEA. Uma aproximação à desintoxicação da micotoxina envolve a adição à dieta de materiais adsorventes não-nutritivos que se ligam firmemente à micotoxina no trato gastrointestinal. Esta ligação diminui a biodisponibilidade. A biodisponibilidade refere-se à fração de um nutriente ou metabolito presente em um dado alimento que fica de facto disponível para ser usado nas funções fisiológicas ou para ser armazenado. Ao diminuir a sua biodisponibilidade, a toxicidade associada também irá diminuir.[60]

4. Legislação

No Continente Europeu 39 países, que representam 99 % da população europeia, apresentam legislações para a regularização de micotoxinas em alimentos e rações. Comparada com outras regiões do mundo, a Europa dispõe da mais completa e detalhada legislação sobre micotoxinas em alimentos.[23] Contudo, existem sempre divergências entre os peritos de saúde sobre as quantidades de micotoxinas que possam revelar-se tóxicas Assim, surge uma necessidade para a elaboração das legislações nas quais é necessário ter em consideração vários fatores, como por exemplo os aspetos científicos, como a disponibilidade de informações toxicológicas, o conhecimento acerca da distribuição das micotoxinas nos alimentos, além da metodologia analítica e os aspetos políticos e económicos. [10]

Com o objetivo de controlar a exposição da sua população às micotoxinas e com o intuito adicional de harmonizar os diferentes limites legais estabelecidos pelos seus países membros, a União Europeia estabeleceu teores oficiais máximos de alguns contaminantes através do Regulamento (CE) n.º 1881/2006 de 19 de Dezembro tendo em conta o risco relacionado com o consumo dos alimentos. Nas tabelas 1 e 2 podemos observar os valores máximos para as aflatoxinas e para a zearalenona, respetivamente. Sendo que para as farinhas de trigo e de aveia é 4 µg/kg do somatório das aflatoxinas totais, sendo 2 µg/kg para a AFB1. Para a zearalenona, para uma amostra de milho, o valor é de 200 µg/kg.

Tabela 1. Teores máximos (µg/Kg) estabelecidos pela União Europeia para diferentes produtos alimentares para a as aflatoxinas adaptado do Regulamento (CE) n.º 1881/2006.

Produtos Alimentares	B1	Somatório de B1, B2, G1 e G2	M1
Amendoins destinados a serem submetidos a um tratamento de triagem ou a outro tratamento físico antes de consumo humano ou utilização como ingrediente de géneros alimentícios	8,0	15,0	-
Frutos de casca rija destinados a serem submetidos a um método de triagem ou a outro tratamento físico antes de consumo humano ou utilização como ingrediente de géneros alimentícios	5,0	10,0	-
Amendoins e frutos de casca rija e produtos derivados da sua transformação, destinados ao consumo humano directo ou como ingrediente de géneros alimentícios	2,0	4,0	-
Frutos secos destinados a serem submetidos a um método de triagem ou a outro tratamento físico antes de consumo humano ou utilização	5,0	10,0	-

como ingrediente de géneros alimentícios			
Frutos secos e produtos derivados da sua transformação, destinados ao consumo humano directo ou como ingrediente de géneros alimentícios	2,0	4,0	-
Todos os cereais e produtos derivados de cereais, incluindo produtos derivados da sua transformação	2,0	4,0	-
Milho destinado a ser submetido a um método de triagem ou a outro tratamento físico antes de consumo humano ou utilização como ingrediente de géneros alimentícios	5,0	10,0	-
Leite cru, leite tratado termicamente e leite para o fabrico de produtos lácteos	-	-	0,050
Especiarias das seguintes espécies: Capsicum spp. (o fruto seco, inteiro ou triturado, incluindo a malagueta, a malagueta em pó, a pimenta de caiena e o pimentão-doce) Piper spp. (o fruto, incluindo a pimenta branca e a pimenta preta) Myristica fragrans (noz-moscada) Zingiber officinale (gengibre) Curcuma longa (curcuma)	5,0	10,0	-
Alimentos à base de cereais transformados e alimentos para bebés destinados a lactentes e crianças jovens	0,10	-	-
Fórmulas para lactentes e fórmulas de transição, incluindo leite para bebés e leite de transição	-	-	0,025
Alimentos dietéticos destinados a fins medicinais específicos especificamente destinados a lactentes	0,10	-	0,025

Tabela 2 Teores máximos ($\mu\text{g}/\text{Kg}$) estabelecidos pela União Europeia para diferentes produtos alimentares para a zearalenona adaptado do Regulamento (CE) n.º 1881/2006.

Produtos Alimentares	
Cereais não transformados, com exceção do milho	100
Milho não transformado	200
Cereais destinados ao consumo humano directo, farinha de cereais, sêmola enquanto produto final comercializado para consumo humano directo e gérmen.	75
Milho destinado ao consumo humano directo, farinha de milho, sêmola de milho, grits, gérmen de milho e óleo de milho refinado	200
Pão (incluindo pequenos produtos de panificação), produtos de pastelaria, bolachas, refeições leves à base de cereais e cereais para pequeno-almoço, com exceção de refeições leves à base de milho e cereais para pequeno-almoço à base de milho	50
Refeições leves à base de milho e cereais para pequeno-almoço à base de milho	50
Alimentos à base de cereais transformados (com exceção de alimentos transformados à base de milho) e alimentos para bebés destinados a lactentes e crianças jovens	20

Alimentos transformados à base de milho destinados a lactentes e crianças jovens	20
--	----

5. Métodos de determinação para micotoxinas

As micotoxinas são frequentemente produzidas em concentrações vestigiais, pelo que a sensibilidade dos sistemas de deteção é essencial. Os métodos tradicionais de deteção e quantificação de micotoxinas contam com solventes para os passos de extração e limpeza, e com várias técnicas cromatográficas para quantificação. Mais recentemente, foram desenvolvidos ensaios imunogénicos que podem ser aplicados a amostras com pouca ou nenhuma purificação. [41]

Os métodos para análise de micotoxinas envolvem três procedimentos básicos nomeadamente a extração, a purificação/separação e a deteção. A maior parte dos métodos analíticos requer que as micotoxinas sejam extraídas para uma fase líquida composta por solventes orgânicos ou misturas destes solventes e água. [61] Normalmente os solventes utilizados podem ser o metanol, o acetonitrilo, a acetona, o clorofórmio, sendo que a eficiência do procedimento de extração pode ser influenciada pelas técnicas utilizadas na homogeneização da amostra com o líquido extrator.

Assume-se que a micotoxina extraída vai estar igualmente distribuída na fase líquida e excluída da fase sólida. A validade desta hipótese vai refletir-se nas taxas de recuperação do método. A forma física de misturar o solvente com o alimento e o tempo de contacto entre eles influencia a eficiência de extração. [26], [62]

Para separar as fases líquida e sólida são utilizadas técnicas de filtração e de centrifugação, que após a extração da matriz sólida, o extrato é purificado para se remover as interferências e para se isolar as toxinas antes, é de salientar que este procedimento pode não ser necessária para todos os métodos analíticos. [63]

Na purificação do extrato são utilizadas, geralmente, colunas de imunoafinidade (IAC). A característica mais importante exigida para os anticorpos a utilizar nas colunas de imunoafinidade, é a sua especificidade, afinidade, estabilidade face às condições de lavagem, e reversibilidade. É também essencial que o complexo micotoxina-anticorpo possa ser dissociado para libertar a micotoxina na fase de eluição. O imunoadsorvente é então transferido para uma coluna, à qual é aplicada a amostra ou o extrato aquoso a analisa. Por um processo de interação imunológico, as moléculas do analito vão ser fixadas aos anticorpos imobilizados, enquanto os componentes interferentes que não se ligam ao suporte, que possam encontrar-se na coluna, são eliminados por lavagem da coluna com uma solução salina de tampão fosfato. A utilização de IAC é uma técnica altamente sensível e seletiva que oferece a possibilidade de extrair/purificar com rigor

as amostras ou os seus extratos, antes da sua quantificação pelos métodos físico-químicos. [61][64]

A etapa final do processo envolve a determinação qualitativa e quantitativa da micotoxina. Têm sido desenvolvidos métodos analíticos para a determinação de micotoxinas que normalmente envolvem técnicas cromatográficas. A maior parte dos métodos utiliza a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Também podem ser utilizados outros métodos como a cromatografia gasosa (GC), a cromatografia em camada fina (TLC), entre outros. Métodos alternativos baseados em imunodeteção, como ELISA, também têm encontrado ampla aplicação em análise de micotoxinas. TLC e ELISA são talvez as técnicas mais simples e mais amplamente utilizadas para a monitorização qualitativa e semi-quantitativa de micotoxinas, e são úteis para a triagem e análise de rotina de um grande número de amostras. Apesar de não exigirem equipamentos caros ou manuseamento altamente treinado, são técnicas menos precisas e sensíveis. Embora os métodos ELISA sejam amplamente utilizados para o rápido rastreio qualitativo e semi-quantitativo de micotoxinas, não são úteis para proporcionar uma determinação quantitativa. Assim, os métodos analíticos para determinar micotoxinas, devem ser sensíveis, específicos, exatos e precisos e, são necessários para cumprimento de legislação e levantamentos com o objetivo de determinar a exposição às micotoxinas. [65]

A diversidade química das micotoxinas e os diversos substratos em que elas ocorrem representam desafios para a química analítica e tem surgido uma necessidade de desenvolvimento de métodos analíticos para identificação e quantificação de micotoxinas em alimentos e rações.

5.1. Cromatografia Líquida Acoplada a Espectrometria de Massa Sequencial

A Cromatografia Líquida Acoplada a Espectrometria de Massa (LC/MS) é uma técnica que combina a capacidade de separação do HPLC com o poder de deteção do espectrómetro de massa. Mesmo com um instrumento de deteção muito sofisticado, o HPLC é útil para remover as interferências da amostra que iam influenciar a ionização. O objetivo é gerar iões em fase gasosa e é eliminar o solvente mantendo o nível de vácuo adequado no espectrómetro de massa, em simultâneo. É necessária uma interface que elimina o solvente e gera iões em fase gasosa, sendo estes depois transferidos para o sistema do espectrómetro de massa.

A maioria dos instrumentos recorre a uma técnica de ionização a pressão atmosférica (API), em que a eliminação do solvente e as etapas de ionização ocorrem na fonte a pressão atmosférica.

O espectrómetro de massa é o instrumento destinado a separar os iões em fase gasosa atendendo à sua razão massa carga (m/z). Por sua vez, o analisador é a peça principal deste aparelho que utiliza os campos elétrico, ou magnético ou uma combinação de ambos para deslocar os iões da região em que são produzidos para o detetor, onde produzem um sinal que é ampliado. O analisador funciona sob vácuo, de modo a que os iões possam deslocar-se para o detetor com rendimento suficiente.

MS/MS é a combinação de duas ou mais experiências de MS. O objetivo pode ser obter informação acerca da estrutura fragmentando os iões isolados durante a primeira experiência e/ou conseguir uma maior seletividade e sensibilidade em análises quantitativas. Este pode ser efetuado recorrendo a sistemas de analisadores acoplados (do mesmo tipo ou de tipos diferentes) ou utilizando um “ion trap” e efetuando as várias experiências dentro da “trap”.

Com o desenvolvimento de interfaces de ionização a pressão atmosférica foram surgindo mais aplicações em LC/MS, de modo a permitir alargar a monitorização a uma gama mais alargada de compostos com propriedades mais polares. Atualmente o LC/MS é a técnica mais utilizada para a deteção e determinação de pesticidas, sendo muitas vezes necessário recorrer a LC/MS/MS para efetuar análises ambientais e evitar o aparecimento de falsos resultados positivos.

O espectro de massa resultante corresponde a um gráfico que apresenta a abundância relativa de cada um dos iões formados em função da sua relação massa/carga. Permite obter excelente sensibilidade, que é importante para a realização de análises de compostos que se encontrem em quantidades vestigiais.[66]

As interfaces de ionização mais utilizadas correspondem a fontes de ionização a pressão atmosférica por electrospray (ESI) e por ionização química (APCI), por sua vez os tipos de analisadores de massa utilizados dependem dos compostos em estudo.

Recorrendo a ionização por ESI e APCI (ionização suave) as moléculas são protonadas no modo de ionização positivo e desprotonadas no modo de ionização negativo, podendo ocorrer a formação de iões aductos que vão surgir no espectro de massa. A presença dos picos correspondentes aos iões aductos pode ser útil para determinar a massa molar correta das moléculas em estudo. Por sua vez, o uso simultâneo dos modos de ionização positivo e negativo pode também facilitar a identificação de compostos em estudo. Da ionização em modo positivo, resulta o aparecimento de uma

razão massa/ carga, orrespondente ao ião protonado $[M+ H]^+$ e da ionização em modo [67]negativo, resulta o aparecimento de uma razão massa carga do ião desprotonado $[M- H]^-$ para além de outros iões aductos que podem ou não surgir, dependendo das características da amostra e do tipo de ionização, como podemos observar na Figura 6. [67]

Common adducts ion observed under electrospray and APCI conditions			
Positive ions		Negative ions	
<i>protonated molecule</i>		<i>deprotonated molecule</i>	
$[M+H]^+$	M + 1	$[M-H]^-$	M - 1
$[M+nH]^{n+}$	(M + n) / n	$[M-nH]^{n-}$	(M - n) / n
<i>cationized /adduct</i>		<i>anionized /adduct</i>	
$[M+NH_4]^+$	M + 18	$[M+HCOO]^-$	M + 45
$[M+Na]^+$	M + 23	$[M+OAc]^-$	M + 59
$[M+CH_3OH+H]^+$	M + 33	$[M+TFA]^-$	M + 113
$[M+K]^+$	M + 39	$[M+Cl]^-$	M + 35 ^{iso 37}
$[M+CH_3CN+H]^+$	M + 42		
<i>preformed ion</i>		<i>preformed ion</i>	
$M^+; [M+H]^+$	M; M + 1	$M^-; [M-H]^-$	M; M - 1

Figura 6. Aductos mais comuns encontrados nos modos de ionização positiva e negativa

5.1.1. Mecanismos de ionização

Os mecanismos de nebulização em ionização a pressão atmosférica são diferentes quando se aplica ESI e APCI. A ionização na interface ESI é considerada uma técnica de ionização em fase líquida, na qual os iões formados em solução são dissolvidos ou evaporados para a fase gasosa e podem consequentemente ser analisados por espectrometria de massa. Por sua vez, a ionização em APCI é considerada como sendo baseada em reações na fase gasosa, estabelecidas entre as moléculas do analito e um gás reagente que deriva do solvente, o qual é gerado através de uma série de reações entre ião e a molécula, as quais são iniciadas por eletrões resultantes da descarga de uma agulha. [68]

O modelo de mecanismo de ESI é normalmente conhecido por “charge-residue model” ou “ion-evaporation”. Ambos os processos são iniciados com a nebulização de uma corrente líquida em pequenas gotas com carga positiva e negativa. No entanto, em electrospray apenas podem ser geradas gotas constituídas por iões com um tipo de polaridade, uma vez que as gotas de sinal contrário perdem a sua carga na superfície da agulha aquando da sua formação, como resultado da natureza electroquímica dos processos de electrospray. A carga gerada depende do tipo de electrospray realizado.

É nesta etapa final que os modelos “ion-evaporation” e o “charge-residue model” diferem. No caso do modelo “charge-residue” é assumido que as pequenas gotas contêm apenas moléculas de um analito, o qual é transferido para a fase vapor por evaporação da gota. Por outro lado, o modelo de “ion-evaporation” defende que podem ser gerados iões em fase gasosa. Estes resultam de gotas fortemente carregadas, nas quais a intensidade do campo é suficiente para permitir a emissão de iões em solução para a fase de vapor. [68]

Estes dois mecanismos podem ser considerados complementares, uma vez que as gotas que não são suficientemente carregadas para integrarem a fase de vapor levam à formação de uma fase de vapor-ião, no caso de processos suaves de nebulização.

As gotas carregadas passam por uma série de processos de preservação da carga, evaporação do solvente. Vai ocorrendo uma diminuição do tamanho das gotas, o qual é acompanhado por um aumento do campo elétrico à superfície das gotas. A determinada altura, as repulsões de Coulomb entre as cargas superficiais excedem as forças coesivas devido à tensão superficial e as gotas rebentam. [68]

Neste presente trabalho usou-se um equipamento de LC-MS/MS com o mecanismo ESI.

6. Validação de métodos analíticos

Um método de investigação é um processo que envolve manipulações suscetíveis de acumularem erros, sistemáticos e/ou aleatórios, podendo alterar de forma significativa o resultado final, ainda mais se o número de analistas a realizar o ensaio for elevado [69]. Portanto, torna-se necessário que veja a validação de um método analítico como um aspeto crucial da garantia da qualidade analítica, através da qual se pretende uniformizar os critérios utilizados para demonstrar a fiabilidade do método, nas condições em que é praticado, garantindo a obtenção de resultados com a qualidade exigida e de modo a que, em qualquer futuro ensaio de análise de rotina, se obtenha resultados muito próximos ao verdadeiro valor do teor do analito presente na amostra.[69]–[71]

O processo de validação garante a qualidade operacional e analítica pretendida, assim como as características necessárias para a obtenção de resultados credíveis, sendo este o primeiro passo do Sistema de Qualidade Laboratorial.[69], [72]

Os processos de validação implementados por laboratórios químicos em Portugal devem ter em consideração as condições indicadas no Guia RELACRE. A IPAC – Instituto português de acreditação também redigiu um guia para orientar laboratórios sobre a implementação dos requisitos da norma NP EN ISO/IEC 17025, que exhibe um item referente à validação de métodos analíticos.

A validação de um método é um processo contínuo que envolve o planeamento e aplicação do método e, caso se verifiquem alterações num método já implementado no laboratório é necessário proceder à sua revalidação. Os ensaios de validação devem ser executados por pessoal competente e realizados em equipamentos e instrumentos dentro das especificações, e adequadamente calibrados.

Para além disso, nos documentos que permanecerão no laboratório também é necessário colocar o título do método, o código de identificação, a sua revisão, a data de entrada em vigor da análise, os responsáveis pela elaboração e aprovação do ensaio e o número de cada página. [69], [73]

Segundo o Guia RELACRE os requisitos mínimos necessários para o processo de validação são a curva de calibração (gama de trabalho e linearidade), os limiares analíticos (deteção e quantificação), a sensibilidade, a precisão e a exatidão. Mas, estes podem ter valores variados, dependendo do tipo de método, para uma análise

qualitativa. Isto é, não há necessidade de testar e validar, a linearidade do método, o limite de quantificação, a precisão e a exatidão, sendo os restantes parâmetros e a robustez os pontos mais importantes na validação. Pelo contrário uma análise quantitativa aplicada a analitos, em teores vestigiais, todos os requisitos acima citados são importantes. [69], [71], [73]

6.1. Curva de Calibração

A curva de calibração é um parâmetro bastante importante para um método quantitativo. Esta indica a relação entre o sinal do equipamento e a concentração conhecida do analito. Utilizando o método dos mínimos quadrados, a variável dependente (y) representa sempre a resposta instrumental do equipamento, no caso de se tratar de um método cromatográfico, y será a área do pico, e a variável independente (x) representa sempre as concentrações dos padrões. Assim, quando a curva de calibração representa uma função polinomial de primeiro grau (uma reta) pressupõe-se que existe homogeneidade de variâncias ao longo da reta. [69]

Este parâmetro deve ser avaliado no início da análise, de modo a verificar se os critérios de aceitação (linearidade e estabilidade entre calibrações) são respeitados para se dar seguimento à análise. Para a curva de calibração são recomendados dez pontos de concentração conhecida do padrão, não devendo ser nunca um número inferior a cinco, distribuindo-se equitativamente pela gama de trabalho. Esses pontos devem fazer-se acompanhar do branco, constituído por todos os reagentes com a exceção do analito a analisar, pois caso este gere um sinal diferente de zero irá anular o efeito de interferências na amostra. [69]

6.1.1. Gama de trabalho

Para qualquer método analítico, existe uma gama de concentrações no qual o analito pode ser determinado com precisão, exatidão e linearidade, definida com gama de trabalho ou aplicação, onde o limite inferior corresponde ao limite de quantificação e o limite superior dependerá do sistema de resposta de medição. [71], [74], [75]

Ao utilizar-se uma metodologia que envolve a realização de uma curva de calibração, a gama de trabalho pode ser avaliada através do teste de homogeneidade das variâncias, analisando 10 vezes o primeiro e o último padrão, uma vez que compara estatisticamente a variância do padrão (S₂) mais concentrado com o menos

concentrado da curva. Segundo o Guia RELACRE, para se calcular as variâncias associadas ao primeiro e último padrão utilizam-se as equações (1) e (2).

$$S^2_i = \frac{\sum_{i=1}^{10} (y_i - \bar{y}_i)^2}{n-1} \quad (1)$$

Sendo,

$$\bar{y} = \frac{\sum_{i=1}^{10} y_i}{n} \quad (2)$$

Em que i é o padrão, y_i são os valores do sinal instrumental e \bar{y} a média aritmética dos valores do sinal instrumental.

As variâncias calculadas são posteriormente avaliadas para se verificar se existem diferenças significativas entre elas. Por isso, é necessário calcular o valor experimental (PG). Segundo a expressão matemática (3), que é depois comparado com o valor tabelado da distribuição F de Snedecor/Fisher, para $n - 1$ graus de liberdade, com um intervalo de confiança de 99 %.

$$PG = \frac{S_i^2}{S_j^2} \quad (3)$$

Sendo que S_i^2 deverá ser o maior valor de variância calculada e S_j^2 o menor.

Se o valor de PG for \leq ao valor de F tabelado, a diferença de variâncias não é significativa, sendo a gama de trabalho ajustada. Pelo contrário, se o valor de PG for superior, a diferença entre as variâncias é significativa. Logo a gama de trabalho deverá ser ajustada até que as variâncias do primeiro e último padrão não sejam estatisticamente diferentes.

Para verificar se o sistema cromatográfico é adequado para o método a validar é calculado o coeficiente de variação (CV %), através da equação (4).

$$CV(\%) = \left(\frac{s}{\bar{x}}\right) \times 100 \quad (4)$$

Em que \bar{x} representa a média das medições e s o desvio padrão, sendo este último determinado pela seguinte expressão (5).

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \quad (5)$$

Onde, x_i representa os valores das áreas dos picos e dos tempos de retenção e n o número total de medições.

6.1.2. Linearidade

A linearidade refere-se à capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração do analito, enquadrados num intervalo analítico específico. A avaliação deste parâmetro pode ser por inspeção visual do gráfico através da reta de calibração e do valor do coeficiente de correlação linear (R^2) obtido, devendo este último ser superior a 0,995, e por avaliação estatística através do teste de RIKILT que analisa a linearidade de cada ponto da curva de calibração. [70], [76]

Para a avaliação estatística é determinada a razão entre o sinal instrumental (y_i) e a concentração do padrão (x_i) para cada ponto da reta e a média das razões obtidas $(y_i/x_i)_m$. Através da equação (6), é calculada a percentagem de linearidade para cada ponto:

$$\frac{(y_i/x_i)}{(y_i/x_i)_m} \times 100 \quad (6)$$

Para admitir a linearidade do método, considera-se o valor da média como sendo 100 %, indicando uma linearidade perfeita, devendo cada ponto da reta de calibração estar situado entre os 90 % e 110 % (100 ± 10 %). No entanto, se se verificarem valores que ultrapassem estes valores, estes devem ser rejeitados e o teste de RIKILT deverá ser novamente aplicado à gama reduzida, até que se verifiquem os requisitos instituídos. [69], [77]

6.2. Limiares analíticos

A determinação dos limiares analíticos é relevante quando se trabalha com uma faixa de concentrações relativamente baixa e os limites de deteção (LD) e de quantificação (LQ) são parâmetros importantes. LD corresponde à menor quantidade de analito que pode ser detetada numa amostra, mas não necessariamente quantificada. Por outro

lado, o LQ corresponde à menor concentração medida a partir da qual é possível quantificar a presença de analito, com uma dada precisão e exatidão.

Na prática trata-se do menor padrão de concentração da reta de calibração. Estatisticamente os limiares podem ser determinados pelas equações seguintes, sendo s o desvio-padrão de dez replicados do padrão de menor concentração da reta, em condições de precisão intermédia. Estes indicam a concentração a partir da qual é possível detetar ou quantificar o analito em análise, respetivamente, com uma determinada precisão e exatidão. [69][77]

Quando se trata de um método analítico que envolve a utilização de uma curva de calibração linear, os limites de deteção e quantificação são calculados através do declive da reta e do desvio padrão residual ($S_{y/x}$). [69]

6.2.1. Limite de Deteção

Neste parâmetro existe uma maior variedade de formulações, contudo todas as organizações oficiais consideram-no como sendo a menor quantidade de analito que pode ser detetado na amostra em estudo, não sendo necessariamente quantificado como um valor exato [69], [70], [72], [76]. Além disso, uma leitura inferior ao limite de deteção não significa a ausência do analito a medir, apenas se pode afirmar que, com uma probabilidade definida, a concentração do componente em causa é inferior a um determinado valor. [69]

Para uma correta definição deste parâmetro é necessário introduzir dois conceitos de estatística: erro do tipo I e do tipo II. O erro do tipo I (risco α) a probabilidade de concluir a presença do componente em análise, quando de facto não existe na amostra e o erro do tipo II (risco β) é a probabilidade de concluir a ausência do analito em estudo, quando de facto ele existe. De forma a analisar corretamente os limiares analíticos, estes dois erros devem ser minimizados, usando-se as recomendações da IUPAC $\alpha = \beta = 5\%$. [69]

Para um método que utiliza a calibração linear, a forma utilizada para calcular o limite de deteção baseia-se na equação (7),

$$LD = \frac{3,3 \times S_{y/x}}{b} \quad (7)$$

Sendo,

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N [y_i - (a + b \times x_i)]^2}{N-2}} \quad (8)$$

Em que, **b** é o declive da reta de calibração, **S_{y/x}** o desvio padrão residual da curva de calibração e **3,3** é o valor de K, um fator numérico para um nível de confiança de 99,7 %, sendo que, quanto maior este valor maior é o nível de confiança. Na equação (8) temos **y_i** que é substituído pelos valores do sinal analítico, **x_i** pela concentração dos padrões, **a** que é a ordenada na origem da curva de calibração e **N** o número de padrões utilizados. [69]

6.2.2. Limite de Quantificação

O limite de quantificação de um procedimento analítico é definido como a menor concentração medida a partir da qual é possível a quantificação do analito, sob as condições experimentais adotadas, sendo o valor deste sempre superior ao de deteção. [69], [70], [76]

Para um método que utiliza a calibração linear, a forma utilizada para calcular o limite de quantificação, baseia-se na equação (9),

$$LD = \frac{10 \times S_{y/x}}{b} \quad (9)$$

Onde **b** é o declive da reta de calibração, **S_{y/x}** o desvio padrão residual da curva de calibração e **10** é o valor de K, que significa que o desvio padrão relativo (RSD %) ou coeficiente de variação é de 10 %. [69], [78]

6.3. Sensibilidade

A sensibilidade avalia a capacidade de um método em distinguir pequenas diferenças de concentração de um analito, ou seja, é definida como sendo a derivada de primeira ordem da curva de calibração nessa zona de concentração. Quando a curva de calibração for um modelo linear, verifica-se que a sensibilidade é constante ao longo de toda a gama de trabalho e igual ao declive da mesma. [69]

6.4. Precisão

Considera-se a precisão como o grau de concordância de resultados obtidos entre ensaios independentes, repetidos sobre uma mesma amostra, em condições definidas e este parâmetro pode ser avaliado por diversas formas, sendo principalmente utilizadas a repetibilidade, a reprodutividade e precisão intermédia. Estas são geralmente expressas pelo desvio padrão e pelo coeficiente de variação. [69], [70], [74], [76]

6.4.1 Repetibilidade

A repetibilidade exprime a precisão de resultados obtidos por medições repetidas efetuadas sobre uma mesma amostra, sob as mesmas condições, como: a utilização do mesmo laboratório, analista, equipamento, os mesmos reagentes e curtos intervalos de tempo. [69], [71]

O limite de repetibilidade (r) é o valor abaixo do qual se deve situar, com uma probabilidade específica (normalmente 95 %), a diferença absoluta entre duas determinações (x_i, x_{i-1}) obtidas sob as condições acima referidas, ou seja, este é determinado a partir do desvio-padrão, associado aos resultados obtidos sob condições de repetibilidade, de modo a ser possível averiguar pelo analista se existem diferenças significativas entre as análises realizadas. Os resultados obtidos são aceites se a amplitude entre os dois ensaios sucessivos for inferior ao limite de repetibilidade, caso contrário dever ser feito uma análise crítica e, se necessário, recorrer à repetição dos ensaios. [69], [75] O limite de repetibilidade é dado pela equação:

$$r = 2,8 \times \sqrt{S_i^2} \quad (10)$$

6.4.2 Reprodutividade

A reprodutibilidade refere-se à precisão de um método efetuado em condições de ensaio diferentes, utilizando o mesmo método de ensaio, sobre uma mesma amostra, fazendo-se variar as condições de medição, tais como: diferentes laboratórios; diferentes operadores; diferentes equipamentos; e/ou épocas diferentes.

A reprodutibilidade de um método de análise é obtida a partir de ensaios interlaboratoriais. Assim, é enviada uma série de amostras aos laboratórios

participantes, os quais realizam ensaios sobre a mesma amostra.

6.4.3 Precisão intermédia

A precisão intermédia refere-se à precisão avaliada, sobre a mesma amostra, utilizando o mesmo método, no mesmo laboratório ou em laboratórios diferentes, mas definindo exatamente quais as condições a variar, como o analista, os equipamentos e/ou os dias das análises. Assim, permite verificar que, mesmo variando as condições da análise, o método fornecerá os mesmos resultados. Esta medida de precisão representa a variabilidade dos resultados num laboratório e, como tal, a mais aconselhável de usar. [69], [73]

6.5 Exatidão

A exatidão de um procedimento analítico define-se como o grau de concordância entre o resultado de um ensaio e o valor de referência aceite como verdadeiro, funcionando como um indicador da utilidade e aplicabilidade do método em amostras reais. É importante observar que um valor exato ou verdadeiro é o valor obtido por uma medição perfeita e este valor é indeterminado por natureza. [69], [73], [74] Este parâmetro é expresso como um erro sistemático percentual, inerente ao processo. O erro sistemático pode ocorrer devido a perdas do analito, à baixa recuperação da extração, medidas volumétricas imprecisas ou substâncias interferentes na amostra. [74], [76]

Os processos normalmente utilizados para avaliar a exatidão são geralmente o uso de materiais de referência, a participação em ensaios interlaboratoriais, a comparação com métodos de referência e a realização de ensaios de recuperação, sendo este último o mais aplicado. O número destes ensaios varia segundo a legislação ou diretriz adotada e também com as características da pesquisa, sendo que se recomenda pelo menos a realização de nove determinações juntamente com as percentagens de recuperação. [72], [73], [75]

O estudo da recuperação consiste na "fortificação" da amostra, ou seja, na adição de uma quantidade conhecida do analito de interesse, seguida da sua extração e quantificação de maneira a verificar a percentagem de recuperação. Assim, a recuperação está relacionada com a exatidão, pois reflete a quantidade de determinado analito recuperado no processo, em relação à quantidade real presente na amostra.

[73] Podem ser adicionadas às amostras uma quantidade de padrão em pelo menos três diferentes concentrações, por exemplo, próximo ao limite de deteção, próximo à concentração máxima admissível e numa concentração próxima à média da gama de trabalho. [75]

A percentagem de recuperação é calculada pela equação (6.11) (INMETRO, 2010),

$$\text{Recuperação (\%)} = \left(\frac{C_R - C_A}{C_P} \right) \times 100 \quad (11)$$

Em que C_R representa a concentração do analito na amostra fortificada, C_A a concentração do analito na amostra não fortificada e C_P a concentração do analito adicionada à amostra fortificada.

7. Metodologia Experimental

A realização da validação do método de quantificação das AFB1, AFG1, AFB2 e da AFG2 em farinhas de trigo e de aveia e da ZEA em farinha de milho, por HLC-MS/MS foi feita no Laboratório de Química da SGS Portugal, em Lisboa. A empresa proporcionou os meios necessários (equipamentos, materiais e reagentes) para a sua realização.

O método analítico utilizado para a determinação de micotoxinas foram compostos por 3 etapas fundamentais: a amostragem, a preparação da amostra (extração e limpeza) e a análise quantitativa.

O procedimento efetuado para cada amostra foi uma adaptação do documento nº 4700211-01 ABSCIEX- "The Quantitation of Mycotoxins in Cereals using a simple sample extraction and LC-MS with Fast Polarity Switching and the Scheduled MRM Algorithm", de modo a serem obtidas as condições mais adequadas para a validação do método.[79]

Neste capítulo são descritos os reagentes, materiais e equipamentos necessários para a metodologia experimental e a descrição do processo.

7.1 Amostras

Um dos alimentos mais susceptíveis da contaminação das AF e da ZEA são os cereais, por isso optou-se pela escolha de farinhas de trigo e de aveia para a quantificação da AF e da farinha de milho para a ZEA, neste procedimento. Estas amostras foram obtidas num estabelecimento comercial na cidade de Lisboa, Portugal.

7.2.1 Reagentes e preparação de soluções

Foi preparado um solvente para a extração de micotoxinas, usando uma mistura de acetonitrilo (ACN) para HPLC da Sigma - Aldrich e água ultrapura ou Mili-Q da Milipore, na proporção 80:20, respetivamente.

Preparou-se uma fase móvel, na qual num frasco de vidro, fez-se a Fase A, que consiste em água ultra-pura Mili-Q, 0,01% de ácido fórmico e 2mM de formato de amónio. Para a Fase B, colocou-se ACN e 0,01% de ácido fórmico.

A curva de calibração é um passo importante para o processo de quantificação por LC-MS/MS, uma vez que a reta obtida, a partir da concentração dos padrões e das áreas dos picos respetivos, irá originar uma equação que será usada para calcular o teor da micotoxina na amostra (ng/mL).

7.2.1. Aflatoxinas B1, B2, G1 e G2

Foi necessário preparar uma solução de padrão de stock de Aflatoxinas, que continha as Aflatoxinas B1, B2, G1 e G2, de 1ppm a partir do padrão comercial 5 µg/mL (Trilogy Analytical Laboratory) reconstituído com 10,0 mL de ACN para HPLC, medidos por micropipeta. As proporções da quantidade das aflatoxinas B1, B2, G1 e G2 foram de 4:1:4:1. Este padrão intermédio é feito de modo a economizar ao máximo o padrão comercial. Foram feitas duas soluções de trabalho. Para a solução de trabalho 1 (1µg/ml) pipetou-se 200µl da solução stock de 5ug/ml para vial de 1mL. Para a solução de trabalho 2 (25ng/mL), pipetou-se 25µ da solução de trabalho 1 para vial de 1mL. Assim, foram preparadas duas soluções-padrão de aflatoxinas, a partir da solução de trabalho 1 (1µg/ml) com as concentrações 2 e 4 ng/mL de AFB1 e AFG1 e 0,5 e 1 ng/mL de AFB2 e AFG2, para um vial de 1mL. A partir da solução de trabalho 2 (25ng/mL) foram preparadas três soluções-padrão com concentrações de 0,10; 0,20 e 0,40 ng/mL de AFB1 e AFG1 e 0,025; 0,05; e 0,10 ng/mL de AFB2 e AFG2. Estas soluções foram feitas em acetonitrilo onde foram adicionados diferentes volumes deste solvente para as diferentes concentrações. Na tabela 3, estão expostos os volumes usados para fazer soluções-padrões necessárias para a curva de calibração das aflatoxinas:

Tabela 3. Curva de calibração e respetivos volumes pipetados para as soluções-padrão das aflatoxinas totais.

	Volume (µL)	Padrão (ng/ml)			
		AFB1	AFG1	AFB2	AFG2
Solução de trabalho 2 (25ng/ml)	10	0,10	0,10	0,025	0,025
	20	0,20	0,20	0,05	0,05
	40	0,40	0,40	0,10	0,10
Solução de trabalho 1 (1µg/ml)	5	2,00	2,00	0,50	0,50
	10	4,00	4,00	1,00	1,00

7.2.2. Zearalenona

Foi necessário preparar uma solução de padrão de stock de Zearalenona, que continha de 1 mg/L a partir do padrão comercial 25 µg/mL (Trilogy Analytical Laboratory) reconstituído com 10,0 mL de ACN para HPLC, medidos por micropipeta. Este padrão intermédio é feito de modo a economizar ao máximo o padrão comercial. A partir da solução de 1mg/L foram preparadas 5 soluções-padrão, com as seguintes concentrações: 15; 18,75; 25; 37,5 e 50 ng/mL. Nestas soluções foram adicionados diferentes volumes de acetonitrilo de modo a obter concentrações pretendidas. Na tabela 4, estão expostos os volumes usados para fazer soluções-padrões necessárias para a curva de calibração das aflatoxinas:

Tabela 4. Curva de calibração e respetivos volumes pipetados para as soluções-padrão de ZEA.

	Volume (µL)	Padrão (ng/ml)
Solução stock 1mg/L	15	0,10
	18,75	0,20
	25	0,40
	37,5	2,00
	50	4,00

7.3. Extração

7.3.1. Aflatoxinas B1, B2, G1 e G2

As amostras de farinhas de trigo e aveia foram pesadas, direta e separadamente, para um tubo de Falcon de 50mL numa balança analítica Metiler Toledo (d=0,0001g). Pesaram-se 2g de cada amostra. De seguida, adicionou-se 8 ml da mistura acetonitrilo/água ultra pura (80/20) e agitou-se durante 1 minuto manualmente. Colou-se num agitador rotativo durante 20 minutos na velocidade máxima. Após a agitação, numa Centrífuga Hermle Tipo Z 206 A, centrifugou-se a amostra durante 10min a 3500rpm, de modo a separar as fases sólida e líquida. Filtrou-se a parte líquida para um tubo de 15mL através de uma seringa com um filtro de 25mm, 0,45 µm. Transferiu-se um 1mL para um vial e injetou-se 5 µL no equipamento de LC-MS/MS (Bomba UHPLC Advance Sistema de LC Triple Quad MS EVOC CUBE Bruker LC-MS)

7.3.1. Zearalenona

A amostra de farinha de milho foi pesada diretamente para um tubo de Falcon de 50mL numa balança analítica Metiler Toledo ($d=0,0001g$). Pesaram-se 2g da amostra. De seguida, adicionou-se 5 ml da mistura acetone/água ultrapura (80/20) e agitou-se durante 1 minuto manualmente. Colou-se num agitador rotativo durante 10 minutos na velocidade máxima. Após a agitação, transferiram-se 3mL de água ultrapura e colou-se novamente no agitador durante 10 minutos à velocidade máxima. Agitou-se manualmente durante 1 minuto e centrifugou-se na Centrífuga Hermle Tipo Z 206 A, durante 15min a 5000rpm, de modo a separar as fases sólida e líquida. Filtrou-se a parte líquida para um tubo de 15mL através de uma seringa com um filtro de 25mm, 0,45 μm . Transferiu-se um 1mL para um vial e injetou-se 5 μL no equipamento de LC-MS/MS (Bomba UHPLC Advance Sistema de LC Triple Quad MS EVOC CUBE Bruker LC-MS).

Para os ensaios de recuperação foi necessário fortificar a amostra de modo a garantir que possíveis interferências da matriz não influenciavam a deteção do analito. Assim, segundo o Regulamento (UE) N° 519/2014 de 16 de maio de 2014 um ensaio apenas é considerado válido se a amostra fortificada apresentar uma percentagem de recuperação entre os 70 e 110% para as aflatoxinas e 70 e 120 % para a zearalenona.

As amostras farinha de trigo e aveia foram fortificadas com uma concentração de aflatoxinas totais (B1, B2, G1 e G2) de 2,5 $\mu g/kg$. As amostras de milho foram fortificadas com uma concentração de 75 $\mu g/kg$.

7.4. Quantificação por LC-MS/MS

7.4.1. otimização das condições-MS/MS

O sistema de análise utilizado na realização do presente trabalho consistiu num equipamento de HPLC acoplado a um espectrómetro de massa sequencial (MS/MS) equipado com uma sonda de ESI.

Começou-se por otimizar as condições de espectrometria de massa recorrendo para tal à infusão de padrões individuais padrões s em estudo, com uma concentração de aproximadamente 1 mg/L. Seguidamente para umas condições iniciais de voltagem de cone, energia de ionização e modo de ionização (positivo ou negativo), efetuou-se o MS

Scan (aquisição em Full Scan), com o objetivo de obter o sinal correspondente ao ião precursor. Este procedimento foi efetuado para cada composto individualmente, com a lavagem do capilar com ACN entre as diferentes infusões. O processo de otimização das condições MS/MS consistiu em fazer os ajustes ou alterações necessárias para obter-se o maior sinal (mais intenso) para o ião precursor com o menor ruído da linha de base.

Após reunidas as condições ótimas para o espectrómetro de massas, procedeu-se à otimização das condições cromatográficas (fase móvel, coluna cromatográfica, temperatura da coluna e fluxo). É então necessário realizar a purga dos canais de cada uma das bombas e depois de ser definido o programa de eluição realizar os ensaios. É normalmente necessário realizar pequenos ajustes dos parâmetros de modo a obter melhores resultados. Para tal, procedeu-se à injeção de 5 µL de soluções padrão individuais de 1 mg/L, bombeadas a um fluxo de 0,4 mL/min, sendo as condições apresentadas na tabela 5. Por sua vez, as condições operatórias otimizadas para cada um dos compostos encontram-se na tabela 6.

Tabela 5. Descrição das condições operatórias por LC/MS em que a água é o solvente A e o acetonitrilo, o solvente B.

Tempo (min)	Fluxo (µL/min)	A(%)	B(%)
0,00	400	98	2
0,40	400	98	2
0,50	400	65	35
7,00	400	2	98
11,00	400	2	98
11,10	400	98	2
15,00	400	98	2

Tabela 6. Descrição das condições de aquisição de dados em LC-MS/MS

Parâmetros MS/MS	AFB1	AFB2	AFG1	AFG2	ZEA
Modo de Ionização	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	negativo
Gás de Nebulização (psi)	60	60	60	60	60
Temperatura do Cone (°C)	250	250	250	250	250
Fluxo do gás do cone (psi)	25	25	25	25	25
Temperatura da sonda (°C)	400	400	400	400	400
Fluxo do gás da Sonda (psi)	50	50	50	50	50
Modo gás de exaustão	On	On	On	On	On

IS (polaridade negativa)	4800 V	4800 V	4800 V	4800 V	4800 V
(IS polaridade positiva)	4200 V	4200 V	4200 V	4200 V	4200 V

Para cada composto foi estabelecida uma transição de quantificação (MRM1) e uma transição de qualificação (MRM2) com o objectivo de aumentar a selectividade, bem como a sensibilidade na quantificação destes compostos em concentrações vestigiais nas amostras (Tabela 7).

Tabela 7. Transições de MRM usando um método com polaridade negativa e positiva.

	Polaridade	Ião precursor	MRM 1	MRM 2
AFB1	positiva	[M+H] ⁺	313/285	313/128
AFB2	positiva	[M+H] ⁺	315/287	315/259
AFG1	positiva	[M+H] ⁺	329/243	329/200
AFG2	positiva	[M+H] ⁺	331/313	331/245
ZEA	negativa	[M-H] ⁻	317/131	317/175

Na figura 7, podemos observar um exemplo de um cromatograma obtido pelo método LC-MS/MS de várias micotoxinas usando os modos de ionização positiva e negativa em simultâneo, onde os picos das diversas micotoxinas apresentam diferentes tempos de retenção.

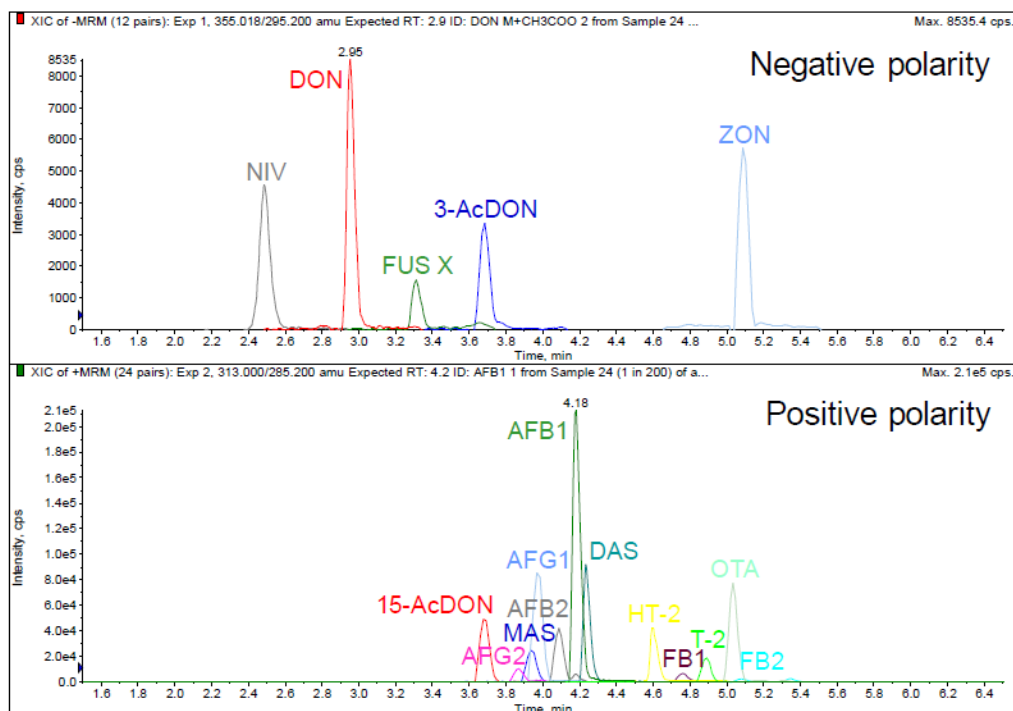


Figura 7. Cromatograma de várias micotoxinas analisadas usando os modos de ionização positivo e negativo.

8. Resultados e discussão

Visto o método a validar se tratar de uma análise quantitativa e uma determinação de concentrações residuais das Aflatoxinas B1 B2, G1 e G2, foram considerados todos os requisitos analíticos para o processo de validação, mencionados no Guia RELACRE nº13.

Uma vez que o método de quantificação foi efetuado em amostras distintas, trigo e aveia, e as condições cromatográficas serem idênticas, foi necessário realizar uma curva de calibração que abrangesse ambos os produtos alimentares, permitindo analisar as amostras em simultâneo.

8.1. Curva de Calibração

8.1.1 Gama de trabalho

Definiu-se como gama de trabalho mais adequada para o método de quantificação das aflatoxinas B1 e G1 as seguintes concentrações: 0,10 ng/mL, 0,20 ng/mL, 0,40 ng/mL, 2,00 ng/mL e 4,0 ng/mL. Para as aflatoxinas B2 e G2, considerou-se as seguintes concentrações: 0,025 ng/mL, 0,05 ng/mL, 0,10 ng/mL, 0,5 ng/mL e 1,0 ng/mL. Para a gama de trabalho da ZEA:

Na tabela 8 estão apresentados os valores das concentrações e os respetivos sinais cromatográficos, referentes à área do pico, que deram origem à reta de calibração ilustrada na Figura 8, da AFB1.

Tabela 8. Padrões da curva de calibração da AFB1 e o respetivo sinal cromatográfico

Concentração (ng/mL)	Área do pico cromatográfico
0,10	2853
0,20	6009
0,40	10544
2,00	59153
4,00	123065

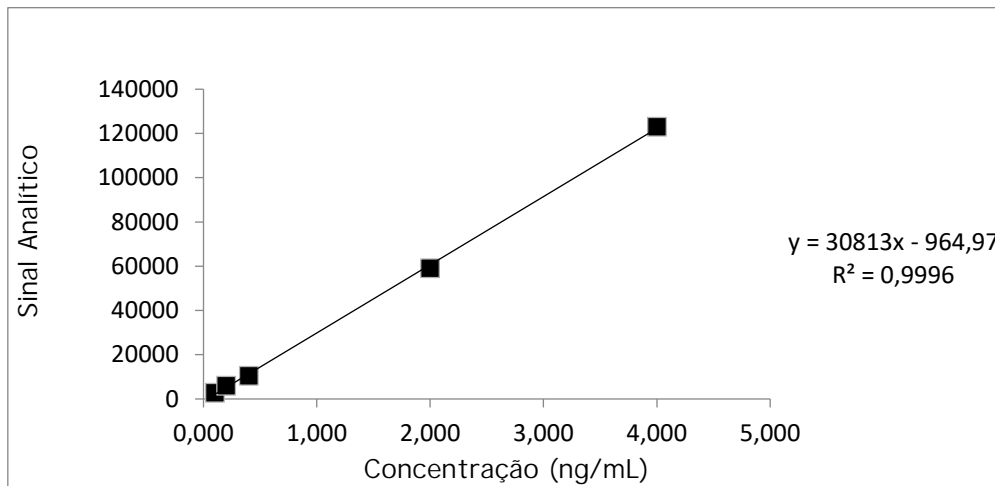


Figura 8. Curva de calibração da AFB1 na gama de concentração de 0,10 ng/mL a 4,00 ng/mL.

Relativamente à aflatoxina G1, os valores das concentrações e os respetivos sinais cromatográficos, referentes à área do pico, que deram origem à reta de calibração ilustrada na Figura 9, estão representados na Tabela 9.

Tabela 9. Padrões da curva de calibração da AFG1 e o respetivo sinal cromatográfico

Concentração (ng/mL)	Área do pico cromatográfico
0,10	1561
0,20	3508
0,40	7072
2,00	39950
4,00	88625

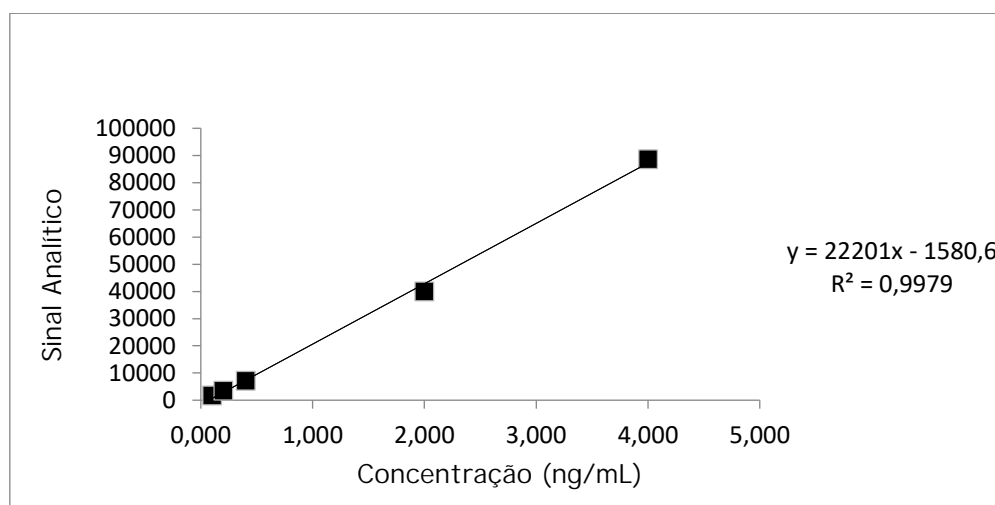


Figura 9. Curva de calibração da AFG1 na gama de concentração de 0,10 ng/mL a 4,00 ng/mL.

Na Tabela 10 estão apresentados os valores das concentrações e os respetivos sinais cromatográficos, referentes à área do pico, que deram origem à reta de calibração ilustrada na Figura 10, da aflatoxina B2

Tabela 10. Padrões da curva de calibração da AFB2 e o respetivo sinal cromatográfico

Concentração (ng/mL)	Área do pico cromatográfico
0,05	886
0,10	1802
0,50	9048
1,00	19740

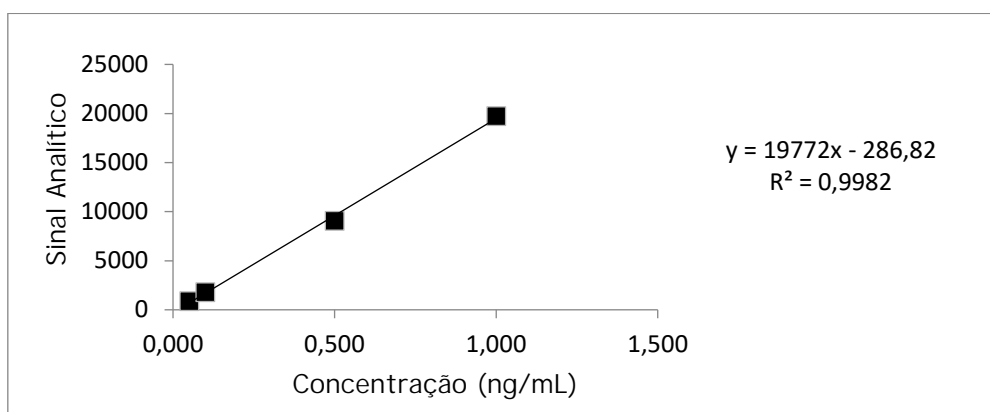


Figura 10. Curva de calibração da AFB2 na gama de concentração de 0,025 ng/mL a 1,00 ng/mL.

Os valores referentes à AFG2 estão representados na tabela 11 e a reta de calibração ilustrada na Figura 11.

Tabela 11. Padrões da curva de calibração da AFG2 e o respetivo sinal cromatográfico.

Concentração (ng/mL)	Área do pico cromatográfico
0,05	508
0,10	941
0,50	4951
1,00	10407

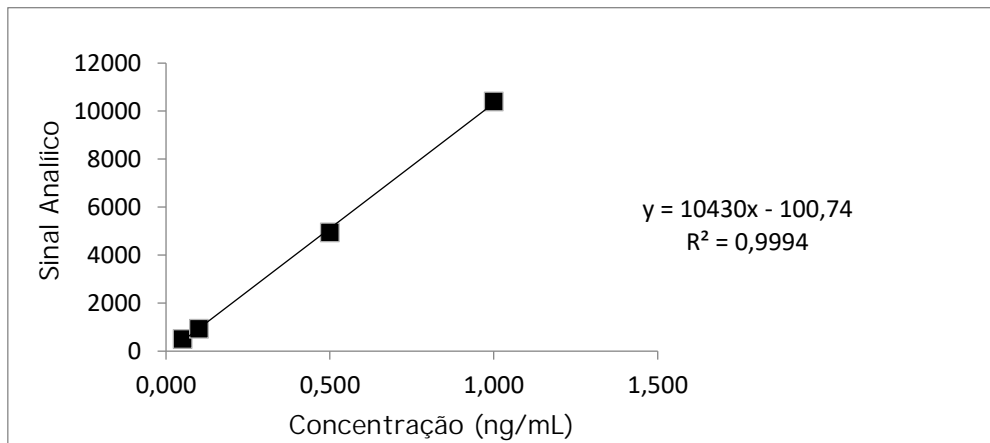


Figura 11. Curva de calibração da AFG2 na gama de concentração de 0,025 ng/mL a 1,00 ng/mL.

Na tabela 12 estão apresentados os valores das concentrações e os respetivos sinais cromatográficos, referentes à área do pico, que deram origem à reta de calibração ilustrada na Figura 12, da zearalenona.

Tabela 12. Padrões da curva de calibração da ZEA e o respetivo sinal cromatográfico.

Concentração (ng/mL)	Área do pico cromatográfico
15,000	61584
18,750	75809
25,000	107502
37,500	157825
50,000	225698

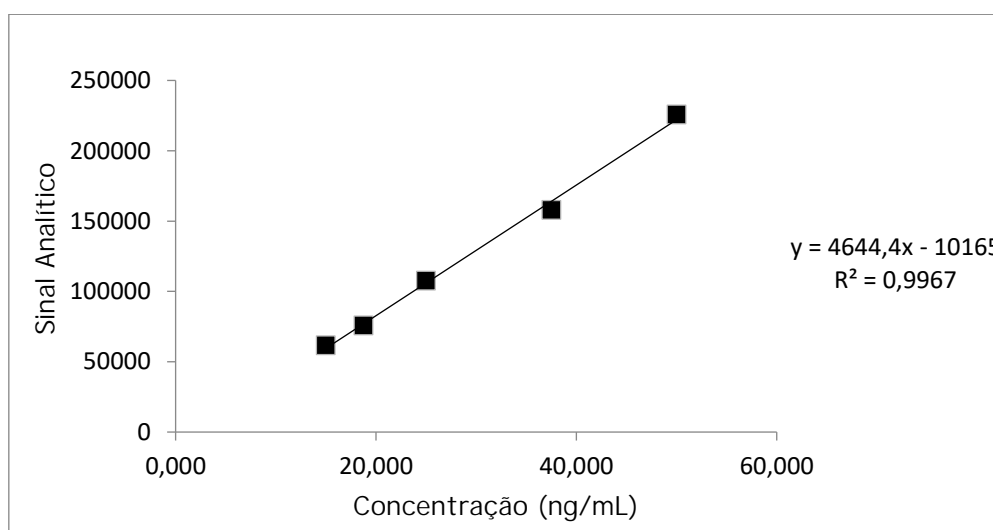


Figura 12. Curva de calibração da ZEA na gama de concentração de 15 ng/mL a 50,00 ng/mL

Através da avaliação gráfica e do coeficiente de correlação (superior a 0,995), conclui-se que todas as curvas de calibração são lineares, para todas as micotoxinas, como podemos observar pelos gráficos e respetivos dados acima expostos.

8.1.2. Linearidade

Foi avaliada a linearidade das curvas de calibração das aflatoxinas B1, B2, G1 e G2. Através da análise gráfica constatou-se que a curva de calibração é linear, uma vez que o coeficiente de correlação é próximo da unidade. Para comprovar a nível estatístico foi realizado o teste de RIKILT, onde foram utilizadas as equações apresentadas na secção 6.1.2, obtendo-se os resultados apresentados na Tabela 13.

Tabela 13. Concentração do padrão e respetivo sinal instrumental, razão entre o sinal analítico e a concentração do padrão e a percentagem de linearidade para cada ponto da reta e a média das razões: A- AFB1; B AF G1; C- AFB2; D- AFG2; E- ZEA

A.

n	X _i	Y _i	y _i /x _i	y _i /x _i (%)
1	0,10	2853	28530	98
2	0,20	6009	30045	103
3	0,40	10544	26360	91
4	2,00	59153	29576	102
5	4,00	123065	30766	106
Média (y_i/x_i)m			28021	

B.

n	X _i	Y _i	y _i /x _i	y _i /x _i (%)
1	0,10	1691	16910	90
2	0,20	3508	17540	93
3	0,40	7072	17680	94
4	2,00	39950	19975	106
5	4,00	88625	22156	109
Média (y_i/x_i)m			18852	

C.

n	X _i	Y _i	y _i /x _i	y _i /x _i (%)
1	0,05	886	1772	92
2	0,10	1802	18020	93
3	0,50	9048	18096	94
4	1,00	19740	19740	102
Média (y_i/x_i)m			16123	

D.

n	X _i	Y _i	y _i /x _i	y _i /x _i (%)
1	0,05	508	10160	102
2	0,10	941	9410	94
3	0,50	4951	9902	99
4	1,00	10407	10407	104
Média (y_i/x_i)m			9970	

E.

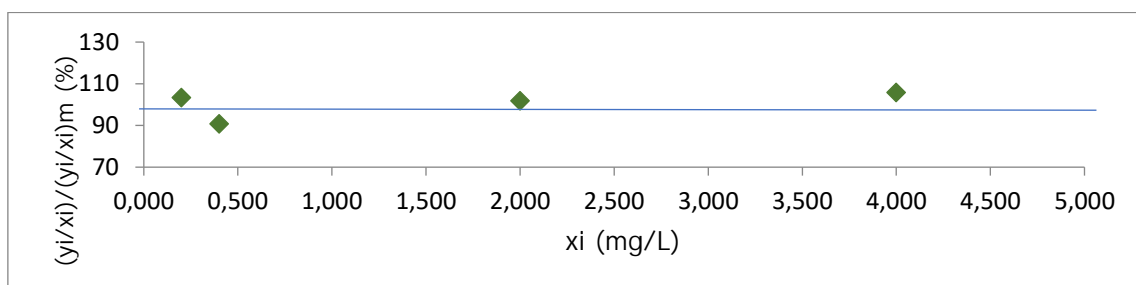
n	X _i	Y _i	y _i /x _i	y _i /x _i (%)
1	15,00	61584	4106	97
2	18,75	75809	4043	95
3	25,00	107502	4300	102
4	37,50	157825	4209	99
5	50,00	225698	4514	107
Média (y_i/x_i)m			4234	

Com os valores obtidos na Tabela 13, foram criados gráficos, nos quais o eixo das abcissas representa as concentrações do analito e o eixo das ordenadas os valores das percentagens calculadas.

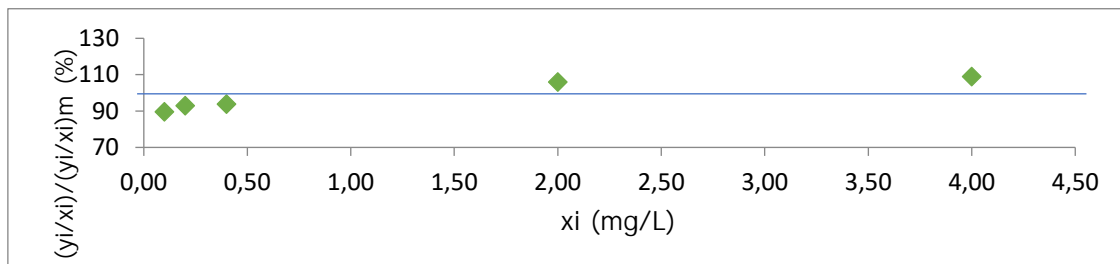
Analisando as tabelas acima e a Figura 13, averiguou-se que os pontos da reta de calibração estão situados entre os 90% e os 110%, respeitando as condições do teste RIKILT e comprovando que a função é linear para a AFB1, AFB2, AFG1, AFG2 e ZEA.

Figura 13. Teste de RIKILT para avaliar linearidade das aflatoxinas. A- AFB1; B - AFG1; C- AFB2; D - AFG2; E- ZEA

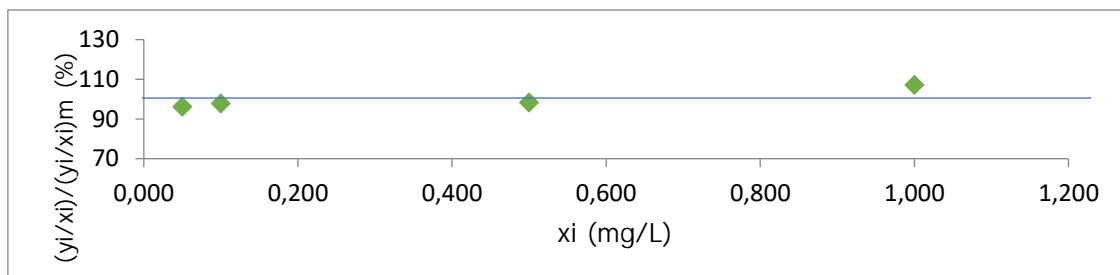
A.



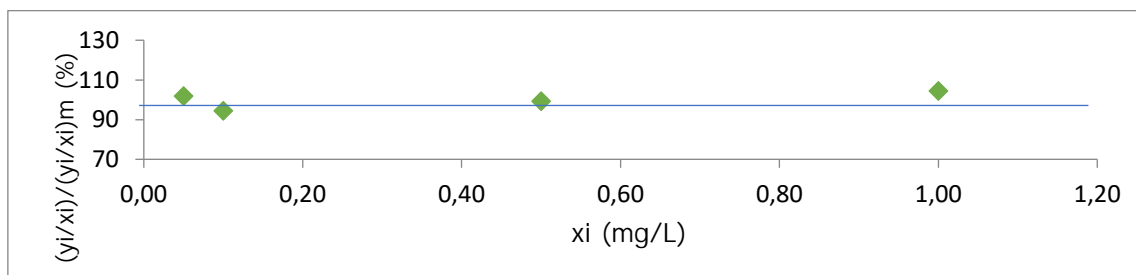
B.



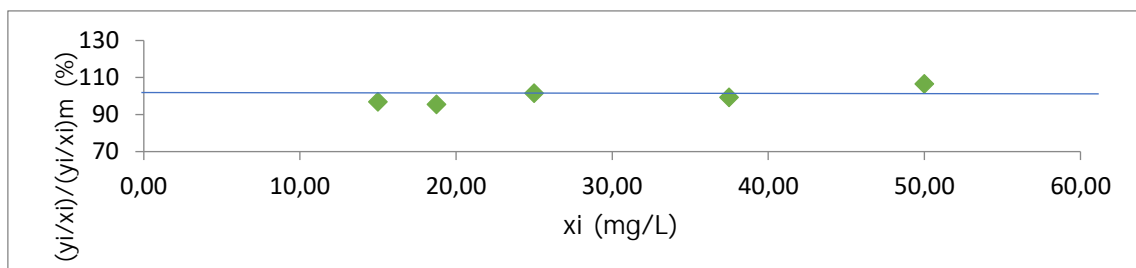
C.



D.



E.



8.2. Limiares analíticos

8.2.1. Limites de Detecção

O Limite de Detecção corresponde ao teor mínimo do analito que pode ser testado e distinguido do branco (amostra de igual matriz com ausência do analito), com uma certeza estatística razoável, mas não necessariamente quantificado como valor exato. No entanto, uma leitura inferior não implica a ausência do analito.

A empresa calculou o valor de LD para a primeira curva de calibração das AFs e para a ZEA. Estes resultados foram obtidos pela empresa e foram considerados válidos.

8.2.2 Limite de quantificação

O LQ representa a menor concentração do analito que pode ser quantificada com precisão e exatidão aceitáveis. Para as curvas de calibração efetuadas no este processo de validação, os valores de LQ foram calculados pela empresa e foram considerados válidos para as aflatoxinas B1, G1, B2 e G2 e para a ZEA.

Os valores dos limiares analíticos podem variar ligeiramente, uma vez que são preparadas diariamente novas curvas de calibração para a mesma gama de trabalho, havendo possivelmente oscilações na estabilidade dos padrões até o momento da sua injeção no equipamento, assim como nos volumes pipetados na preparação dos padrões devido à incerteza associada ao material.

8.3 Precisão

Para a validação da metodologia em questão foram avaliadas a repetibilidade e a precisão intermédia. Segundo o Guia RELACRE, para estudar a repetibilidade são necessárias pelo menos 10 medições, sobre a mesma amostra, e no mínimo 15 para a precisão intermédia.

8.3.1 Repetibilidade

De modo a estudar a repetibilidade do método, para as amostras de trigo e de aveia em estudo, foram realizadas 10 determinações de cada matriz e calculada a concentração de analito presente, assim como o respetivo valor médio, desvio padrão, limite de repetibilidade, repetibilidade (%) e coeficiente de variação. Devido ao facto de nas amostras de trigo e aveia não terem sido detetadas a presença de aflatoxinas, foi necessário fortificar as 10 alíquotas analisadas com 2,5 ng/mL de padrão de aflatoxinas, onde contém 0,25ng/mL de AFB2 e G2 e 1ng/mL de AFB1 e G1, de modo a ser possível avaliar a repetibilidade. Nas amostra de milho, também não foi detetada a presença da zearalenona. Fortificaram-se 10 amostras co 18,75 ng/mL de padrão de zearalenona. Posto isto, os resultados obtidos podem ser observados nas Tabelas 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 e 22.

Tabela 14. Resultado da avaliação da repetibilidade da AFB1 para uma amostra de farinha de trigo.

Tipo de amostra	Concentração (ng/L)
Trigo	0,83
	0,86
	0,83
	0,83
	0,86
	0,83
	0,73
	0,85
	0,85
	0,86
Média	0,83
Desvio Padrão	0,039
Nº de medições	10
Limite de Repetibilidade	0,11
CV (%)	4,64

Tabela 15. Resultado da avaliação da repetibilidade da AFB1 para uma amostra de farinha de aveia.

Tipo de amostra	Aveia
Média (ng/L)	0,76
Desvio Padrão	0,036
Nº de medições	10
Limite de Repetibilidade	0,10
CV (%)	4,66

Tabela 16 . Resultado da avaliação da repetibilidade da AFG1 para uma amostra de trigo e aveia.

Tipo de amostra	Concentração (ng/L)
Trigo	0,89
	0,86
	0,89
	0,94
	0,82
	0,90
	0,87
	0,81
	0,94
	0,89
Média	0,88
Desvio Padrão	0,043
Nº de medições	10
Limite de Repetibilidade	0,12
CV (%)	4,89

Tabela 17. Resultado da avaliação da repetibilidade da AFG1 para uma amostra de farinha de aveia.

Tipo de amostra	Aveia
Média (ng/L)	0,90
Desvio Padrão	0,029
Nº de medições	10
Limite de Repetibilidade	0,081
CV (%)	3,20

Tabela 18. Resultado da avaliação da repetibilidade da AFB2 para uma amostra de trigo e aveia.

Tipo de amostra	Concentração (ng/L)
Trigo	0,29
	0,29
	0,29
	0,29
	0,27
	0,27
	0,27
	0,29
	0,29
	0,27
Média	0,28
Desvio Padrão	0,0096
Nº de medições	10
Limite de Repetibilidade	0,027
CV (%)	3,44

Tabela 19. Resultado da avaliação da repetibilidade da AFLB2 para uma amostra de farinha de aveia.

Tipo de amostra	Aveia
Média (ng/L)	0,20
Desvio Padrão	0,010
Nº de medições	10
Limite de Repetibilidade	0,027
CV (%)	4,865

Tabela 20. Resultado da avaliação da repetibilidade da AFG2 para uma amostra de trigo e aveia.

Tipo de amostra	Concentração (ng/L)
Trigo	0,24
	0,24
	0,26
	0,27
	0,25
	0,24
	0,26
	0,25
	0,23
	0,25
Média	0,25
Desvio Padrão	0,012
Nº de medições	10
Limite de Repetibilidade	0,034
CV (%)	4,90

Tabela 21. Resultado da avaliação da repetibilidade da AFLG2 para uma amostra de farinha de aveia.

Tipo de amostra	Aveia
Média (ng/L)	0,23
Desvio Padrão	0,011
Nº de medições	10
Limite de Repetibilidade	0,030
CV (%)	4,67

Tabela 22 . Resultado da avaliação da repetibilidade da ZEA para uma amostra de milho.

Tipo de amostra	Concentração (ng/L)
Milho	18,76
	18,55
	18,39
	18,28
	18,03
	17,86
	17,85
	17,80
	17,63
	17,23
Média	18,04
Desvio Padrão	0,46
Nº de medições	10
Limite de Repetibilidade	1,29
CV (%)	2,6

Analisando os resultados obtidos, pode-se constatar que se obteve um limite de repetibilidade de 0,11 e 0,10 da AFB1 para as mostras de trigo e aveia, respetivamente, com um nível de confiança de 95 %. Ou seja, a diferença absoluta entre dois resultados de ensaio, obtidos em condições de repetibilidade, não deverá exceder os valores de 0,11 para o trigo e 0,10 para a aveia. Relativamente à repetibilidade dos ensaios da fortificação com AFG1, obteve-se um limite de repetibilidade 0,12 (trigo) e 0,081 (aveia), com um nível de confiança de 95%. Nos ensaios de recuperação da AFB2, obteve-se um limite de repetibilidade de 0,027 para ambas as matrizes, com um nível de confiança 95%. Nos ensaios de recuperação da AFG2, obteve-se um limite de repetibilidade de 0,034 e 0,030 para as amostras de trigo e aveia, respetivamente, com um nível de confiança de 95%.

Pela Tabela 22, verificou-se que um limite de repetibilidade para a ZEA de 1,29, com um nível de confiança de 95%.

Para validar o método em termos de repetibilidade, o CV (%) deve ser inferior a 5,0%, o que se pode verificar pelos dados da tabela, para todas as matrizes e para todos os ensaios de recuperação de todas as micotoxinas, onde este critério foi atingido.

8.3.2. Precisão intermédia

Para determinar a precisão intermédia de um método foram aproveitadas as 10 medições da repetibilidade, de cada matriz, realizadas no mesmo dia e, num dia posterior repetiu-se o ensaio, com o mesmo analista, realizando, no mínimo, mais 5 ensaios de recuperação. A condição que variou neste parâmetro foi o dia da análise. Estes novos ensaios foram feitos num dia diferente das restantes e foi necessário preparar novas curvas de calibração: $y = 3,681e+4x - 880,643$, para a Aflatoxina B1; $y = 2,3359e+4x - 624,162$, para a Aflatoxina G1; $y = 2,3349e+4x - 332,388$, para a Aflatoxina B2; e $y = 1,0400e+4x - 113,580$, para a Aflatoxina G2. Para a ZEA, a nova reta de calibração foi $y = 6,1235e4x + 6240,88$.

Os resultados da avaliação da precisão intermédia podem ser observados nas seguintes tabelas:

Tabela 23. Resultados da avaliação da precisão intermédia para uma amostra de farinha de trigo, realizadas em datas diferentes pelo mesmo analista, para os ensaios de recuperação da AFB1.

Tipo de amostra	Concentração (ng/L)
Trigo1ºDIA	0,83
	0,86
	0,83
	0,83
	0,86
	0,83
	0,73
	0,85
	0,85
	0,86
Trigo2ºDIA	0,77
	0,84
	0,83

	0,81
	0,83
Desvio padrão	0,035
Média	0,83
N	15
Precisão Intermédia	0,098
Precisão Intermédia %	11,91
CV (%)	4,3

Tabela 24. Resultados da avaliação da precisão intermédia para uma amostra de farinha de aveia, realizadas em datas diferentes pelo mesmo analista, para os ensaios de recuperação da AFB1.

Tipo de amostra	Aveia
Desvio padrão	0,037
Média (ng/L)	0,76
N	15
Precisão Intermédia	0,10
Precisão Intermédia %	13,39
CV (%)	4,8

A precisão intermédia válida se o coeficiente de variação for inferior a 5,0 %. Observando os resultados obtidos na Tabelas 23 e 24, verificou-se que tanto o CV (%) para o trigo como para a aveia foram inferiores ao critério exigido, sendo de 4,3 % e 4,8 %, respetivamente. Este parâmetro aprovado foi cumprido, para os ensaios de recuperação da AFB1.

Tabela 25. Resultados da avaliação da precisão intermédia para uma amostra de farinha de trigo, realizadas em datas diferentes pelo mesmo analista, para os ensaios de recuperação da AFG1.

Tipo de amostra	Concentração (ng/L)
Trigo1ºDIA	0,89
	0,86
	0,89
	0,94
	0,82
	0,90
	0,87

	0,81
	0,94
	0,89
Trigo2ºDIA	0,87
	0,91
	0,92
	0,92
	0,95
Desvio padrão	0,0414
Média	0,89
N	15
Precisão Intermédia	0,12
Precisão Intermédia %	13,00
CV (%)	4,64

Tabela 26. Resultados da avaliação da precisão intermédia para uma amostra de farinha de aveia, realizadas em datas diferentes pelo mesmo analista, para os ensaios de recuperação da AFG1

Tipo de amostra	Aveia
Desvio padrão	0,03
Média (ng/L)	0,89
N	15,00
Precisão Intermédia	0,08
Precisão Intermédia %	8,87
CV (%)	3,17

Na tabela 26, verificou-se que tanto o CV (%) para o trigo como para a aveia é foram inferiores ao critério exigido, com os valores de 4,64 % e 3,17 %, respetivamente. Este parâmetro aprovado foi cumprido, para os ensaios de recuperação da AFG1.

Tabela 27 Resultados da avaliação da precisão intermédia para uma amostra de farinha de trigo, realizadas em datas diferentes pelo mesmo analista, para os ensaios de recuperação da AFB2.

Tipo de amostra	Concentração
Trigo1ºDIA	0,29
	0,29

	0,29
	0,29
	0,27
	0,27
	0,27
	0,29
	0,29
	0,27
Trigo2ºDIA	0,21
	0,21
	0,22
	0,23
	0,23
Desvio padrão	0,030
Média	0,26
N	15
Precisão Intermédia	0,084
Precisão Intermédia %	32,42
CV (%)	11,58

Tabela 28. Resultados da avaliação da precisão intermédia para uma amostra de farinha de aveia, realizadas em datas diferentes pelo mesmo analista, para os ensaios de recuperação da AFB2

Tipo de amostra	Aveia
Desvio padrão	0,0099
Média (ng/L)	0,20
N	15
Precisão Intermédia	0,028
Precisão Intermédia %	13,95
CV (%)	4,98

Na tabela 28, verificou-se que tanto o CV (%) para a aveia é inferior ao critério exigido, com sendo de 4,98 %. Este parâmetro aprovado foi cumprido, para os ensaios de recuperação da AFB2, na aveia. No entanto, o mesmo não se verificou para o trigo pois obteve-se um CV (%) de 11,58 (Tabela 27), o que é superior ao critério. Este facto pode dever-se à instabilidade da própria Aflatoxina e da própria matriz.

Tabela 29 Resultados da avaliação da precisão intermédia para uma amostra de farinha de trigo, realizadas em datas diferentes pelo mesmo analista, para os ensaios de recuperação da AFG2.

Tipo de amostra	Concentração
Trigo1ºDIA	0,24
	0,24
	0,26
	0,27
	0,25
	0,24
	0,26
	0,25
	0,23
	0,25
Trigo2ºDIA	0,24
	0,24
	0,24
	0,24
	0,245
Desvio padrão	0,010
Média	0,25
N	15
Precisão Intermédia	0,029
Precisão Intermédia %	11,70
CV (%)	4,2

Tabela 30. Resultados da avaliação da precisão intermédia para uma amostra de farinha de aveia, realizadas em datas diferentes pelo mesmo analista, para os ensaios de recuperação da AFG2

Tipo de amostra	Aveia
Desvio padrão	0,0097
Média (ng/L)	0,23
N	15
Precisão Intermédia	0,027
Precisão Intermédia %	12,02
CV (%)	4,3

Na Tabelas 29 e 30, verificamos que o critério para a validação da precisão intermédia para os ensaios de recuperação da AFG2 foi atingido para as farinhas de trigo e aveia, uma vez que se obteve valores de CV (%) de 4,2 e 4,3, respetivamente.

Tabela 31. Resultados da avaliação da precisão intermédia para uma amostra milho, realizadas em datas diferentes pelo mesmo analista, para os ensaios de recuperação da ZEA.

Tipo de amostra	Concentração (ng/L)
Milho 1ºDIA	75,33
	73,75
	73,05
	71,57
	70,37
	72,72
	71,93
	70,42
	70,07
	73,57
Milho 2ºDIA	73,12
	72,12
	71,44
	71,38
	71,21
Desvio padrão	1,45
Média	72,14
N	15,00
Precisão Intermédia	4,07
Precisão Intermédia %	5,64
CV (%)	2,00

Relativamente aos ensaios de recuperação da Zearalenona para a precisão intermédia, podemos observar que foram válidos, pois obteve-se um CV inferior a 5%, tal como é exigido no Guia Relacre 2003.

8.4. Exatidão

Neste trabalho, foram realizados doze ensaios de recuperação para cada amostra, de modo a avaliar a exatidão do método.

Tabela 32. Resultado da análise à exatidão do método para a amostra de trigo e aveia, para a determinação da AFB1.

Amostras	Concentração amostra não fortificada	Concentração amostra fortificada	Concentração adicionada	Recuperação (%)
Trigo	0	0,83	1	82,5
		0,86		85,5
		0,83		82,7
		0,83		83,2
		0,86		86,1
		0,83		82,5
		0,73		73,0
		0,85		85,1
		0,85		84,5
		0,86		86,3
		0,77		77,0
		0,84		84,0
Média				82,70
Desvio padrão				3,93
CV (%)				4,75
Aveia	0	0,83	1	77,8
		0,86		76,3
		0,83		81,0
		0,83		83,4
		0,86		72,9
		0,83		74,0
		0,73		73,0
		0,85		76,7
		0,85		73,9
		0,86		74,0
		0,77		83,4
		0,84		76,9

Média	76,94
Desvio padrão	3,81
CV (%)	4,95

Ao analisar os resultados indicados na Tabela 32, verifica-se uma média de recuperação de 82,70% para a amostra de trigo e de 76,94 % para amostra de aveia estando estes valores acima de 70% de recuperação e com valores de CV(%) abaixo de 5%. A exatidão da determinação da AFB1 é válida para o trigo e para a aveia.

Tabela 33. Resultado da análise à exatidão do método para a amostra de trigo e aveia, para a determinação da AFG1.

Amostras	Concentração amostra não fortificada	Concentração amostra fortificada	Concentração adicionada	Recuperação (%)
Trigo	0	88,5	1	88,5
		85,6		85,6
		88,6		88,6
		94,0		94,0
		81,8		81,8
		90,0		90,0
		86,8		86,8
		81,2		81,2
		93,7		93,7
		89,2		89,2
		87,0		87,0
		91,0	91,0	
Média				88,12
Desvio padrão				4,00
CV (%)				4,54
Aveia	0	98,4	1	90,2
		90,2		88,8
		88,8		95,7
		95,7		88,5
		88,5		89,5
		89,5		94,8
		94,8		87,6
		87,6		90,1

		90,1		86,9
		86,9		89,5
		89,5		86,1
		86,1		86,1
Média				89,48
Desvio padrão				3,05
CV (%)				3,41

Na Tabela 33, podemos observar que a média de recuperação da AFG1 nos ensaios foi de 88,12% para o trigo e 89,48% para a aveia, com níveis de CV(%) inferiores a 5%, sendo a exatidão da determinação da AFG1 considerada válida para ambas as matrizes.

Tabela 34. Resultado da análise à exatidão do método para a amostra de trigo e aveia, para a determinação da AFB2.

Amostras	Concentração amostra não fortificada	Concentração amostra fortificada	Concentração adicionada	Recuperação (%)
Trigo	0	0,29	0,25	115,2
		0,29		115,2
		0,29		115,2
		0,29		114,4
		0,27		106,8
		0,27		108,0
		0,27		107,2
		0,29		114,0
		0,29		114,0
		0,27		107,2
		0,21		82,8
		0,21		85,2
Média				107,10
Desvio padrão				11,35
CV (%)				10,60
Aveia	0	0,20	0,25	81,2
		0,20		79,2
		0,18		72,4
		0,19		76,0
		0,21		82,0
		0,21		82,0

		0,19		76,0
		0,20		80,4
		0,21		83,2
		0,18		73,6
		0,21		83,2
		0,21		82,0
Média				79,27
Desvio padrão				3,80
CV (%)				4,80

Relativamente aos ensaios de recuperação da AFB₂, obtivemos uma média de 107,10% para o trigo e 79,27% para a aveia, com valores de CV (%) de 10,60 e 4,80, respetivamente. No trigo, obteve-se valores mais discrepantes. Isto pode ser explicado devido a uma negligência do uso da solução stock de aflatoxinas, podendo esta ter sido exposta demasiado à temperatura ambiente. A AFB₂ é conhecida por ter menos estabilidade térmica comparativamente com as restantes aflatoxinas, podendo este fator ter influenciado. A exatidão da determinação da AFB₂ é considerada válida para a amostra da aveia.

Tabela 35. Resultado da análise à exatidão do método para a amostra de trigo e aveia, para a determinação da AFG₂.

Amostras	Concentração amostra não fortificada	Concentração amostra fortificada	Concentração adicionada	Recuperação (%)
Trigo	0	0,24	0,25	94,4
		0,24		94,8
		0,26		104,0
		0,27		106,4
		0,25		100,8
		0,24		94,4
		0,26		104,0
		0,25		101,6
		0,23		92,8
		0,25		98,8
		0,239		95,6
		0,241		96,4

Média				98,7
Desvio padrão				4,6
CV (%)				4,6
Aveia	0	0,25	0,25	98,8
		0,25		98,0
		0,23		91,6
		0,22		88,4
		0,23		92,0
		0,22		88,0
		0,23		93,6
		0,23		90,4
		0,22		86,4
		0,22		87,6
		0,22		86,4
		0,22		87,6
Média				90,7
Desvio padrão				4,2
CV (%)				4,6

Ao analisar os resultados indicados na Tabelas 35, verifica-se uma média de recuperação de 98,7 % para a amostra de trigo e de 90,7% para amostra de aveia, com níveis de CV(%) inferior a 5, sendo a exatidão da determinação da AFG2 considerada válida.

Tabela 36. Resultado da análise à exatidão do método para a amostra de farinhas de trigo e aveia, para a determinação do somatório das aflatoxinas (B1, G1, G2 e B2)

Amostras	Concentração amostra não fortificada	Concentração amostra fortificada	Concentração adicionada	Recuperação (%)
Trigo	0	2,23	2,5	94,4
		2,24		94,8
		2,26		104,0
		2,32		106,4
		2,20		100,8
		2,23		94,4

		2,13		104,0
		2,20		101,6
		2,30		92,8
		2,27		98,8
		2,09		95,6
		2,20		96,4
Média				88,9
Desvio padrão				2,7
CV (%)				3,0
Aveia	0	2,13	2,5	85,2
		2,09		83,8
		2,18		87,1
		2,13		85,2
		2,06		82,4
		2,11		84,5
		2,03		81,2
		2,10		83,8
		2,03		81,3
		2,04		81,5
		2,12		84,8
		2,05		82,2
Média				83,6
Desvio padrão				1,9
CV (%)				2,2

Na Tabela 36, temos os ensaios de recuperação do somatório das 4 aflatoxinas (B1, G1, B2 e G2) onde se obteve uma média de 88,9% e 83,6% para o trigo e para a aveia, respetivamente. Em ambas as matrizes se observou um valor de CV abaixo de 5%. Podemos dizer que a exatidão do método da determinação do somatório das aflatoxinas é válido, pois estes valores estão dentro do intervalo de aceitação (70-110%) dado pelo Regulamento (UE) Nº 519/2014 de 16 de maio de 2014, para as Aflatoxinas.

Tabela 37. Resultado da análise à exatidão do método para a amostra de trigo e aveia, para a determinação da ZEA em farinha de milho.

Amostras	Concentração amostra não fortificada	Concentração amostra fortificada	Concentração adicionada	Recuperação (%)
Milho	0	18,26	18,75	97,4
		18,44		98,3
		18,83		100,4
		18,89		100,8
		18,98		101,2
		19,15		102,2
		18,76		100,0
		18,55		98,9
		18,39		98,1
		18,28		97,5
		18,03		96,2
		17,86		95,3
Média				98,9
Desvio padrão				2,1
CV (%)				2,1

Na Tabela 37, verificou-se uma média de recuperação da AFG1 nos ensaios foi de 98,9% para a farinha de milho, com níveis de CV(%) de 2,1, sendo a exatidão da determinação da ZEA considerada válida, pois este valor está dentro do intervalo de aceitação (70-120%) dado pelo Regulamento (UE) N° 519/2014 de 16 de maio de 2014, para a zearalenona.

9. Conclusão e Perspetivas Futuras

Este trabalho surgiu com o objetivo de realizar e validar o método de quantificação de micotoxinas em farinhas de trigo, de aveia e de milho por LC-MS/MS, mais concretamente das aflatoxinas B1, B2, G1 e G2 no trigo e aveia e da zearalenona no milho, uma vez que a SGS tinha apenas como alternativa para esta análise o método imunológico Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA).

A validação é um processo dinâmico constante, que começa nas fases de seleção, desenvolvimento e otimização do método e na qualificação dos equipamentos, materiais e da mão-de-obra, continuando no decorrer da fase experimental.

No presente trabalho foram então considerados os parâmetros de linearidade, limites de deteção e de quantificação, repetibilidade, precisão intermédia e exatidão, para a validação da metodologia.

Relativamente ao primeiro parâmetro, esta foi verificada na reta de calibração com as concentrações entre os 0,1ng/mL e 4ng/mL para as aflotoxins B1 e G1; 0,05 e 1ng/mL para as aflatoxinas B2 e G2. Para a zearalenona foi verificada a linearidade da reta de calibração com as concentrações entre 15 e 50ng/mL. Foi verificada um coeficiente de correlação (R^2) superior a 0,995 em todas as retas, comprovando assim a sua linearidade.

Quanto aos limites de deteção e o limite de quantificação, este foram obtidos pela empresa e considerados válidos. Sendo que o LQ que corresponde ao primeiro ponto da curva de calibração tem de ser confirmado diariamente, pois existem vários fatores que podem surgir na preparação da curva de calibração.

Na repetibilidade e precisão intermédia do método, para todas as matrizes nos ensaios de recuperação das aflatoxinas e da zearalenona, a metodologia também foi validada pois apresentaram um coeficiente de variação inferior a 5%, exceto para a AFB2 na amostra de farinha de trigo, que foi superior. Este facto pode ser explicado devido à instabilidade desta aflatoxina, pois esta é mais instável a temperaturas mais elevadas e pode ter ficado demasiado tempo exposta à temperatura ambiente, durante o manuseamento da solução stock. Estes ensaios terão de ser repetidos para serem considerados válidos.

A exatidão do método foi realizada à realização de ensaios de recuperação para ambas as amostras em estudo. Onde se obtiveram resultados validos, pois estes

apresentaram-se dentro do critério de aceitação (70-110 % para as aflatoxinas e 70-120% para a zearalenona) assinalado no Regulamento (UE) N° 519/2014 de 16 de maio de 2014.

Uma consideração deste método é que é confiável para a determinação das aflatoxinas e das micotoxinas, pois apesar de terem pontos cromatográficos diferentes (tempos de retenção diferentes), durante o processo de validação foi possível verificar que o método validado teve capacidade de analisar os dois tipos de micotoxinas em diferentes amostras.

Deste modo, pode-se concluir que o método proposto para a quantificação de micotoxinas em farinhas de trigo, de aveia e de milho, mais concretamente das aflatoxinas, em trigo e aveia, e da zearalenona, em milho, apresentou resultados confiáveis para poder ser utilizado regularmente para essa finalidade, apenas se tem de repetir os ensaios de recuperação da AFB2 no trigo para validar totalmente a precisão intermédia. Assim, este método pode passar a fazer parte da ampla gama de análises a produtos que a SGS Portugal executa. Concluindo-se também que o processo de validação é uma etapa indispensável para garantir a qualidade e credibilidade dos resultados obtidos por um método validado.

Relativamente ao método analítico utilizado, podemos referir que este é bastante rápido e preciso. Permite obter valores de resíduos de contaminantes bastante baixos. Atualmente, tem-se apostado neste método devido à sua rapidez.

Neste método após validado e otimizado, podem ser feitas mais ações que permitem a sua continuidade e com resultados confiáveis. Pode-se começar por uma avaliação da estabilidade das soluções amostra e padrão, ao longo do tempo, enquanto se encontram na bancada de trabalho e também quando se encontram nos vials antes de serem injetados, mantendo estes vials a temperaturas baixas. Alargar a tipologia das amostras, isto é, experimentar este método em outro tipo de cereais para além do milho, aveia e trigo. Participar em ensaios interlaboratoriais ou utilizar materiais de referência certificados como outra forma de avaliar a exatidão.

Referências Bibliográficas

- [1] A. Venâncio e R. Paterson, «The Challenge of Mycotoxins», em *Food Safety: A Practical and Case Study Approach*, A. McElhatton e R. J. Marshall, Eds. Boston, MA: Springer US, 2007, pp. 26–49.
- [2] «European Comission. European Comission. Annual report», 2011.
- [3] A. Pfohl-Leszkowicz, «Définition et origins des mycotoxines. In: PfohlLeszkowicz A., coordonnatrice. Conseil supérieur d'hygiène publique de France, Section de l'alimentation et de la nutrition, Les Mycotoxines dans l'alimentation - Évaluation et gestion du risque», pp. 3-16, 1999.
- [4] G. Neil e R. Coker, «Metabolism and Toxicology of Mycotoxins», *Food Safety Proceedings Book*. 2000.
- [5] S. Nogueira e M. B. P. P. Oliveira, «Prevalência de ocratoxina A em alimentos e consequentes problemas de segurança alimentar.», *Aliment. Humana*, vol. 12, n. 2, pp. 39–45, 2006.
- [6] J. . Pitt, «The significance of potentially toxigenic fungi in foods.», *Food Technol. Aust*, 1984.
- [7] L. C. Guimarães, A. P. Fernandes, S. M. Chalfoun, e L. R. Batista, «Methods to preserve potentially toxigenic fungi», *Brazilian J. Microbiol.*, vol. 45, n. 1, pp. 43–47, Mai. 2014.
- [8] M. Zaki, S. A. El-Midany, e H. Shaheen, *Mycotoxins in animals: Occurrence, effects, prevention and management. A review.*, vol. 4, pp. 13-28, 2012.
- [9] M.C. Smith, S. Madec, E. Coton, e N. Hymery, «Natural Co-Occurrence of Mycotoxins in Foods and Feeds and Their in vitro Combined Toxicological Effects», *Toxins (Basel)*, vol. 8, n. 4, p. 94, Abr. 2016.
- [10] V. L. Pereira, J. O. Fernandes, e S. C. Cunha, «Micotoxinas em Portugal: Ocorrência e Toxicidade», 2012.
- [11] W. L. Bryden, «Mycotoxin contamination of the feed supply chain: Implications for animal productivity and feed security», *Anim. Feed Sci. Technol.*, vol. 173, n. 1, pp. 134–158, 2012.
- [12] S. Marin, A. J. Ramos, G. Cano-Sancho, e V. Sanchis, «Mycotoxins: Occurrence, toxicology, and exposure assessment», *Food Chem. Toxicol.*, vol. 60, n.

- Supplement C, pp. 218–237, 2013.
- [13] A. Kwiatkowski, A. P. de Faria Alves, «Importância da Detecção e do Controle de Aflatoxinas em Alimentos », *SaBios-Revista Saúde e Biol.* v. 2, n. 2 , Dez. 2007.
- [14] R. Clarke, L. Connolly, C. Frizzell, e C. T. Elliott, «Cytotoxic assessment of the regulated, co-existing mycotoxins aflatoxin B1, fumonisin B1 and ochratoxin, in single, binary and tertiary mixtures», *Toxicon*, vol. 90, n. Supplement C, pp. 70–81, 2014.
- [15] E. Streit, K. Naehrer, I. Rodrigues, e G. Schatzmayr, «Mycotoxin occurrence in feed and feed raw materials worldwide: long-term analysis with special focus on Europe and Asia», *J. Sci. Food Agric.*, vol. 93, n. 12, pp. 2892–2899, 2013.
- [16] M. Jestoi, «Emerging Fusarium -Mycotoxins Fusaproliferin, Beauvericin, Enniatins, And Moniliformin—A Review», *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, vol. 48, n. 1, pp. 21–49, Jan. 2008.
- [17] H. S. Hussein, J. M. Brasel, «Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals», *Toxicology*, vol. 167, n. 2, pp. 101–134, 2001.
- [18] L. Pinotti, M. Ottoboni, C. Giromini, V. Dell’Orto, e F. Cheli, «Mycotoxin Contamination in the EU Feed Supply Chain: A Focus on Cereal Byproducts», *Toxins (Basel)*., vol. 8, n. 2, p. 45, Fev. 2016.
- [19] «Sociedade Geral de Superintendência (SGS)». [Em linha]. Disponível em: <http://www.sgs.pt/>. [Acedido: 24-Set-2017].
- [20] A. Gimeno, M. L. Martins, «Residuos de micotoxinas en leche, huevos y tejidos comestibles de aves, cerdos y rumiantes.», pp. 40–42, 2012.
- [21] K. Newman, «The biochemistry behind esterified glucomannans- titrating mycotoxins out of the diet.», *Biotechnology in the Feed Industry*, pp. 369-382, 2000.
- [22] S. Balter, «Foodborne Pathogens: Microbiology and Molecular Biology», *Emerg. Infect. Dis. J.*, vol. 12, n. 12, p. 2003, 2006.
- [23] M. Fani, *As micotoxinas. Aditivos & Ingredientes.* n.89, pp. 42-54, 2012.
- [24] S. C. Duarte, A. Pena, e C. M. Lino, «A review on ochratoxin A occurrence and effects of processing of cereal and cereal derived food products», *Food Microbiol.*, vol. 27, n. 2, pp. 187–198, 2010.

- [25] M. L. Fernández-Cruz, M. L. Mansilla, e J. L. Tadeo, «Mycotoxins in fruits and their processed products: Analysis, occurrence and health implications», *J. Adv. Res.*, vol. 1, n. 2, pp. 113–122, 2010.
- [26] R. Serra, «Micoflora das uvas portuguesas e seu potencial para a contaminação das uvas com micotoxinas, com destaque para a ocratoxina A. Tese de Doutorado.», Escola de Engenharia da Universidade do Minho - Braga, 2005.
- [27] A. . Hocking, J. . Pitt, R. . Samson, e U. Thrane, *Advances in Food Mycology*. Springer, 2006.
- [28] FIB-Food Ingredients Brasil, «As micotoxinas.», *Revista-Fi*, pp. 32–40, 2009.
- [29] (European Commission) EC, «Commission regulation (EC) No 1881/2006 of 19 December 2006 (consolidated version 2014-07-01) setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffse».
- [30] P. S. Steyn, «Mycotoxins, general view, chemistry and structure», *Toxicol. Lett.*, vol. 82, n. Supplement C, pp. 843–851, 1995.
- [31] R. Bhat, R. V Rai, e A. A. Karim, «Mycotoxins in Food and Feed: Present Status and Future Concerns», *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.*, vol. 9, n. 1, pp. 57–81, Jan. 2010.
- [32] S. W. Peterson, Y. Ito, B. W. Horn, e T. Goto, «*Aspergillus bombycis*, a New Aflatoxigenic Species and Genetic Variation in Its Sibling Species, *A. nomius*», *Mycologia*, vol. 93, n. 4, pp. 689–703, 2001.
- [33] P. Kumar, D. K. Mahato, M. Kamle, T. K. Mohanta, e S. G. Kang, «Aflatoxins: A Global Concern for Food Safety, Human Health and Their Management», *Front. Microbiol.*, vol. 7, p. 2170, Jan. 2016.
- [34] A. Pfohl-Leskowicz, T. Petkova-Bocharova, I. N. Chernozemsky, e M. Castegnaro, «Balkan endemic nephropathy and associated urinary tract tumours: a review on aetiological causes and the potential role of mycotoxins», *Food Addit. Contam.*, vol. 19, n. 3, pp. 282–302, Mar. 2002.
- [35] K. M. Soliman, «Incidence, Level, and Behavior of Aflatoxins during Coffee Bean Roasting and Decaffeination», *J. Agric. Food Chem.*, vol. 50, n. 25, pp. 7477–7481, Dez. 2002.
- [36] C. A. F. de Oliveira e P. M. L. Germano, «Aflatoxinas: conceitos sobre mecanismos de toxicidade e seu envolvimento na etiologia do câncer hepático

- celular », *Revista de Saúde Pública*, vol. 31. scielo, pp. 417–424, 1997.
- [37] G. N. Wogan, «Chemical nature and biological effects of the aflatoxins.», *Bacteriol. Rev.*, vol. 30, n. 2, pp. 460–470, Jun. 1966.
- [38] N. Magan, D. Aldred, R. Hope, e D. Mitchell, «Environmental Factors and Interactions with Mycobiota of Grain and Grapes: Effects on Growth, Deoxynivalenol and Ochratoxin Production by *Fusarium culmorum* and *Aspergillus carbonarius* », *Toxins (Basel)*., vol. 2, n. 3, pp. 353–366, Mar. 2010.
- [39] K. R. N. Reddy, B. Salleh, B. Saad, H. K. Abbas, C. A. Abel, e W. T. Shier, «An overview of mycotoxin contamination in foods and its implications for human health», *Toxin Rev.*, vol. 29, n. 1, pp. 3–26, Mar. 2010.
- [40] S. Iqbal e S. Jinap, Variation in vitamin E level and aflatoxins contamination in different rice varieties. 2014.
- [41] J. W. Bennett e M. Klich, «Mycotoxins», *Clin. Microbiol. Rev.*, vol. 16, n. 3, pp. 497–516, Jul. 2003.
- [42] S. P. Diniz, *Micotoxinas*. Livraria e Editora Rural. pp. 181. 2002.
- [43] J. Jaimez et al., «Application of the assay of aflatoxins by liquid chromatography with fluorescence detection in food analysis», *J. Chromatogr. A*, vol. 882, n. 1, pp. 1–10, 2000.
- [44] M. Abrar et al., «Aflatoxins: Biosynthesis, Occurrence, Toxicity, and Remedies», *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, vol. 53, n. 8, pp. 862–874, Jan. 2013.
- [45] M. A. Abdel-Wahhab et al., «Zizyphus Spina-Christi Extract Protects Against Aflatoxin B(1)-Initiated Hepatic Carcinogenicity», *African J. Tradit. Complement. Altern. Med.*, vol. 4, n. 3, pp. 248–256, Fev. 2007.
- [46] E. RA, «Mycotoxins», *JAMA*, vol. 287, n. 4, pp. 425–427, Jan. 2002.
- [47] J. Mehrzad, B. Devriendt, K. Baert, e E. Cox, «Aflatoxin B1 interferes with the antigen-presenting capacity of porcine dendritic cells», *Toxicol. Vit.*, vol. 28, n. 4, pp. 531–537, 2014.
- [48] R. J. Verma, «Aflatoxin Cause DNA Damage.», em *International Journal of Human Genetics*, 2004, pp. 231–236.
- [49] T. E. Massey, R. K. Stewart, J. M. Daniels, e L. Liu, «Biochemical and Molecular Aspects of Mammalian Susceptibility to Aflatoxin B1 Carcinogenicity», *Proc. Soc.*

- Exp. Biol. Med., vol. 208, n. 3, pp. 213–227, Mar. 1995.
- [50] A. Glenn, *Mycotoxigenic Fusarium species in animal feed*, vol. 137. 2007.
- [51] I. M. Hueza, P. C. F. Raspantini, L. E. R. Raspantini, A. O. Latorre, e S. L. Górnjak, «Zearalenone, an Estrogenic Mycotoxin, Is an Immunotoxic Compound », *Toxins (Basel)*., vol. 6, n. 3, pp. 1080–1095, Mar. 2014.
- [52] B. Dixon, *Power Unseen, How Microbes Rule the World*. Oxford University Press, 1998.
- [53] W. H. Urry, H. L. Wehrmeister, E. B. Hodge, P. H. Hidy, The structure of zearalenone. *Tetrahedron Letters*, Vol. 7, 27, pp. 3109-3114, 1966,
- [54] W. T. Shier, A. C. Shier, W. Xie, e C. J. Mirocha, «Structure-activity relationships for human estrogenic activity in zearalenone mycotoxins», *Toxicol.*, vol. 39, n. 9, pp. 1435–1438, 2001.
- [55] D. Ryu, M. A. Hanna, K. M. Eskridge, e L. B. Bullerman, «Heat Stability of Zearalenone in an Aqueous Buffered Model System», *J. Agric. Food Chem.*, vol. 51, n. 6, pp. 1746–1748, Mar. 2003.
- [56] N. Magan, «Mycotoxins: Chemical, biological and environmental aspects (bioactive molecules, vol. 9)», *Trends Biochem. Sci.*, vol. 15, n. 9, p. 360, Set. 2017.
- [57] OMS - Organización Mundial de la Salud, «Criterios de salud ambiental Micotoxinas.», em *Organización Panamericana de la Salud.*, 1983, p. 133.
- [58] T. Kuiper-Goodman, P. M. Scott, e H. Watanabe, «Risk assessment of the mycotoxin zearalenone», *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, vol. 7, n. 3, pp. 253–306, 1987.
- [59] E. Čonková, A. Laciaková, G. Kováč, e H. Seidel, «Fusarial Toxins and their Role in Animal Diseases», *Vet. J.*, vol. 165, n. 3, pp. 214–220, 2003.
- [60] G. Avantiato, R. Havenaar, A. Visconti, «Assessing the zearalenone-binding activity of adsorbent materials during passage through a dynamic in vitro gastrointestinal model», *Food Chem. Toxicol.*, vol. 41, n. 10, pp. 1283–1290, 2003.
- [61] M. W. Trucksess, «Rapid analysis (thin layer chromatographic and immunochemical methods) for mycotoxins in food and feeds.», em *Mycotoxins and Phycotoxins in Perspective at the Turn of the Millennium 2*, 2000, pp. 29–40.

- [62] F. Soleimany, S. Jinap, e F. Abas, «Determination of mycotoxins in cereals by liquid chromatography tandem mass spectrometry», *Food Chem.*, vol. 130, n. 4, pp. 1055–1060, 2012.
- [63] H. H. L. González, S. L. Resnik, R. T. Boca, e W. F. O. Marasas, «Mycoflora of Argentinian corn harvested in the main production area in 1990», *Mycopathologia*, vol. 130, n. 13, pp. 115–120, 1995.
- [64] S. E. Katz e M. Siewerski, «Drug residue analysis using immunoaffinity chromatography.», *J. Chromatogr.*, n. 642, pp. 403–409, 1992.
- [65] M. Muscarella, M. Iammarino, D. Nardiello, S. Lo Magro, C. Palermo, E. D. Centonze, Validation of a Confirmatory Analytical Method for the Determination of Aflatoxins B1, B2, G1 and G2 in Foods and Feed Materials by Hplc with On-Line Photochemical Derivatization and Fluorescence Detection. 2009.
- [66] M. Kuster, M. Alda, e B. D., «Chromatographytandem, Analysis of pesticides in water by liquid mass spectrometric techniques», em *Mass Spectrometry Reviews*, 2006, pp. 900–916.
- [67] W. M. A. Niessen, *Liquid chromatography-mass spectrometry*, 3.^a ed. 2006.
- [68] W. M. A. Niessen, «State-of-art in liquid chromatography-mass spectrometry», *J. Chromatogr. A*, vol. 856, pp. 179–197, 1999.
- [69] RELACRE, *Guia RELACRE 13: Validação de métodos internos de ensaio em análise química*. Lisboa: Relacre, 2000.
- [70] I. Ribeiro, *Validação de métodos*. Encontro de Técnicos de Laboratórios de Saúde Pública. Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge – Lisboa., 2008.
- [71] A. Gustavo González e M. Ángeles Herrador, «A practical guide to analytical method validation, including measurement uncertainty and accuracy profiles», *TrAC Trends Anal. Chem.*, vol. 26, n. 3, pp. 227–238, 2007.
- [72] M. R. S. Almeida, «Validação de um Método Analítico: Determinação de fósforo total. Dissertação de Mestrado», Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra, 2012.
- [73] M. Ribani, C. B. G. Bottoli, C. H. Collins, I. C. S. F. Jardim, e L. F. C. Melo, «Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos », *Química Nova* , vol. 27. scielo , pp. 771–780, 2004.
- [74] T. M. P. Figueiredo, «Validação de Métodos Analíticos – Determinação do teor

- de açúcar numa amostra de produto alimentar. Tese de Mestrado.», Faculdade de Ciências e Tecnologias da Universidade de Coimbra, 2012.
- [75] INMETRO, Validação, Normalização e Qualidade Industrial – Orientação sobre a Químicos, de métodos de ensaios. Instituto Nacional de Metrologia, 2007.
- [76] N. M. Brito e O. P. A. Junior, «Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão.», em Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente, 2005, pp. 129–146.
- [77] S. Henriques, «Hormonas naturais e de síntese, bisfenol A, octilfenol e nonilfenol em águas para consumo humano: optimização do método de análise por SPE-LC-ESI-MS/MS. Dissertação de Mestrado.», Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa, 2008.
- [78] IPAC, Guia para Acreditação de Laboratórios Químicos. 2011.
- [79] J. Stahl-Zeng, S. Lock, S. Kreppenhofer, e K. Czapiewski, «The Quantitation of Mycotoxins in Cereals using a simple sample extraction and LC-MS with Fast Polarity Switching and the Scheduled MRM Algorithm».