

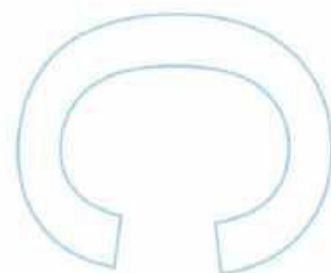
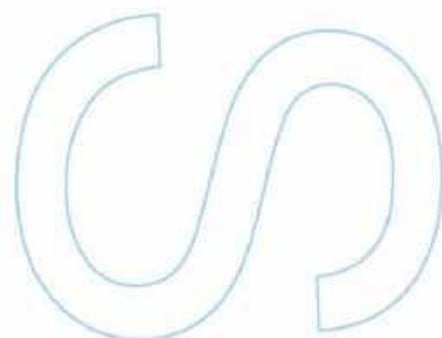
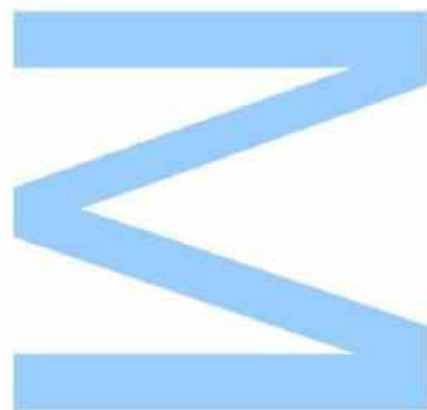
Validação de métodos de determinação de micotoxinas em alimentação humana e animal

Pâmela Mendonça Guimarães

Mestrado em Química
Departamento de Química
2020

Orientador

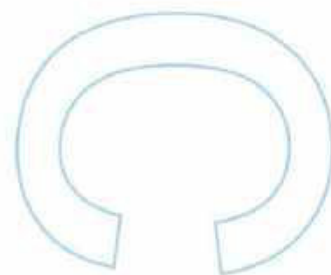
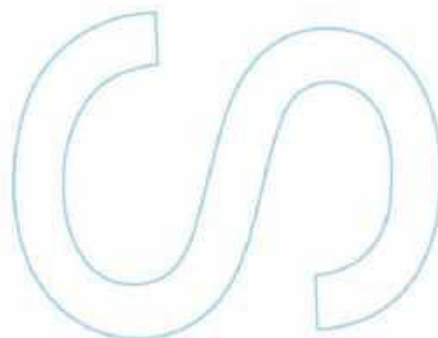
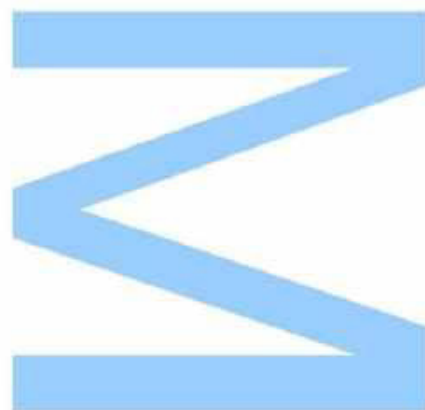
Paulo Joaquim Ferreira de Almeida, Professor Auxiliar,
Faculdade de Ciências da Universidade do Porto.





Todas as correções determinadas
pelo júri, e só essas, foram efetuadas.
O Presidente do Júri,

Porto, ____/____/____



Agradecimentos

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus por toda a força, por ter abençoado todas as minhas decisões na minha vida e principalmente a escolha de mudança de vida. Obrigada por não me permitir desistir ao enfrentar os desafios pelo qual passei.

Gostaria de agradecer a toda a minha família, em especial os meus avós Donato e Iza pelos seus sacrifícios, pelas suas lições de vida, pelos seus carinhos, amor e atenção. Muito obrigada por terem sempre me apoiado nas minhas escolhas e estarem sempre ao meu lado.

Aos meus pais, Cleber e Adenilce, gostaria de agradecer por todos os seus esforços para que eu pudesse ter uma boa educação e uma boa vida. Por sempre estarem ao meu lado nos bons e maus momentos e por sempre estarem-me ajudando no que me era preciso. E agradeço-lhes também por todo apoio no qual me deram na minha escolha de mudança de país.

A minha irmã Tábhata, por sempre estar ao meu lado, por ajudar-me quando era preciso. Aos meus tios, tias e primas, por sempre terem acreditado em mim e nas minhas escolhas. A minha sogra, cunhadas e cunhados, pelo vosso apoio e carinho ao longo desses anos.

Aos meus amigos, obrigada por terem sempre me ajudado quando precisava. A Fagner pelo seu apoio e conselhos durante esses anos. As minhas amigas da FCUP, Elisa, Catarina, Andreia, Alexandra, Ana Paula, Rita e Sofia, muito obrigada por tudo e por ajudarem-me não somente no percurso académico, mas também nos problemas pessoais. As amigas do estágio, Beatriz, Joana, Rita, Luísa, Mariana e Carina, por todo o vosso apoio ao longo desse ano.

A Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, pela oportunidade da realização do mestrado. Aos professores, pelos conhecimentos transmitidos e pela dedicação que tiveram. Em especial ao meu orientador professor Paulo Joaquim Ferreira de Almeida pelas suas correções, críticas, conselhos e apoio. Agradeço também ao professor Eduardo Marques, por ser um diretor de curso dedicado em oferecer o melhor aos seus alunos.

Gostaria de agradecer a MérieuxNutriScience Portugal pela oportunidade da realização do estágio. Ao técnico de laboratório Jefferson pelos seus conhecimentos transmitidos. A minha orientadora Laura pela sua orientação.

Por fim, ao meu marido Gustavo, muito obrigada por sempre estar ao meu lado me apoiando quando mais precisava. Obrigada pelos sacrifícios, dedicação e esforço, por suas chamadas de atenção e pelo seu amor incondicional. Obrigada por ter-me

ajudado a ser a pessoa que sou hoje e por oferecer-me uma vida melhor. Obrigada por ser meu porto seguro e por sempre estar comigo.

Resumo

As micotoxinas são metabólitos secundários provenientes de fungos, como: *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium*. Normalmente são encontradas em alimentos agrícolas e rações, e podem ser obtidas em diversas etapas do seu processo como na colheita, armazenamento e transporte. As micotoxinas possuem diversos efeitos toxicológicos, como carcinogénico e teratogénico. A contaminação nos humanos acontece através da ingestão de alimentos contaminados ou através de produtos derivados do leite, por exemplo. Das diversas micotoxinas existentes, algumas apresentam um certo tipo de perigo para a saúde humana e animal, como as Aflatoxinas (B1, B2, G1 e G2), Ocratoxinas, Desoxinivalenol, Zearalenona e Patulina. Para que se possa determinar as quantidades de micotoxinas presentes nos alimentos é preciso que os métodos analíticos utilizados sejam validados. É necessário a realização de ensaios específicos como: repetibilidade, precisão intermédia, limites de quantificação, entre outros. No presente trabalho será realizada a validação do método de determinação por HPLC/fluorescência, da micotoxina aflatoxina. A validação do método foi realizada para diferentes tipos de alimentos, dos quais: café, whisky, massa, chocolate, conserva de peixe, alheira e outros. As análises destas amostras foram realizadas em dias diferentes, sendo efectuada a análise da amostra de referência e a construção da curva de calibração em cada dia de análise. A amostra de referência, *corn flour*, possui um teor de aflatoxina entre 13,2 – 16,5 µg/kg e os valores experimentais obtidos nos 3 dias de análise foram de 14,2; 14,5 e 15,4 µg/kg, que se encontram dentro do referido intervalo. Portanto, o método mostra ser exato. A partir das curvas de calibração obtidas constatou-se um *r* muito próximo de 1,0, o que expressa uma boa correlação entre as duas variáveis utilizadas. A linearidade foi garantida a partir dos testes de Rikilt, das áreas normalizadas e pela norma ISO 8466-1 as quais apresentaram valores dentro dos limites estabelecidos. Os limites de deteção das aflatoxinas foram de 0,14 ng/ml; 0,15 ng/ml; 0,14 ng/ml e 0,07 ng/ml para G2, G1, B2, B1, respetivamente. E os limites de quantificação foram de 0,44 ng/ml; 0,45 ng/ml; 0,41 ng/ml e 0,22 ng/ml para G2, G1, B2, B1, respetivamente. A partir do estudo da repetibilidade e da precisão intermédia foi possível observar um baixo valor do desvio padrão e do coeficiente de variação. Portanto, o método revela ser preciso. A recuperação para este método apresentou uma média de 86%, estando as percentagens dentro dos limites estabelecidos.

Palavra chave: *Aspergillus*, fungos, aflatoxina, imunoafinidade, HPLC, contaminação.

Abstract

Mycotoxins are secondary metabolites derived from fungi such as *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium*. They are usually found in agricultural foods and feeds, and can be obtained at various stages of their process such as harvesting, storage and transport. Mycotoxins have several toxicological effects, such as carcinogenic and teratogenic. Contamination in humans occurs through the ingestion of contaminated food or through products derived from milk, for example. Of the various existing mycotoxins, some present a certain type of danger to human and animal health, such as Aflatoxins (B1, B2, G1 and G2), Ochratoxins, Deoxynivalenol, Zearalenone and Patulin. In order to determine the quantities of mycotoxins in food, the analytical methods used must be validated. Specific tests such as: repeatability, intermediate accuracy, limits of quantification and others are required. In this work the validation of the method for the determination by HPLC/fluorescence of the mycotoxin aflatoxin will be performed. The validation of the method has been carried out for different types of foods, of which: coffee, whisky, pasta, chocolate, canned fish, alheira and others. The analyses of these samples were carried out on different days and the reference sample was analyzed and the calibration curve built on each day of analysis. The reference sample, corn flour, has an aflatoxin content between 13,2 - 16,5 µg/kg and the experimental values obtained on the 3 days of analysis were 14,2; 14,5 and 15,4 µg/kg, which are within the said range. Therefore, the method shows to be accurate. From the calibration curves obtained, an r very close to 1.0 was observed, which expresses a good correlation between the two variables used. Linearity was guaranteed by the Rikilt tests, the standard areas and the ISO 8466-1 standard which showed values within the established limits. The detection limits for aflatoxins were 0.14 ng/ml; 0.15 ng/ml; 0.14 ng/ml and 0.07 ng/ml for G2, G1, B2, B1, respectively. And the quantification limits were 0.44 ng/ml; 0.45 ng/ml; 0.41 ng/ml and 0.22 ng/ml for G2, G1, B2, B1 respectively. From the study of repeatability and intermediate accuracy it was possible to observe a low value of standard deviation and coefficient of variation. Therefore, the method reveals to be precise. The recovery for this method showed an average of 86%, the percentages being within the established limits.

Keywords: *Aspergillus*, fungi, aflatoxin, immunoaffinity, HPLC, contamination

Índice

Agradecimentos	i
Resumo	iii
Abstract.....	iv
Índice de figuras	viii
Índice de tabelas.....	ix
Abreviaturas.....	xi
I. Introdução teórica	xiii
1. Introdução	1
1.1. A empresa.....	1
1.2. Micotoxinas	2
1.2.1. Aflatoxina.....	2
1.2.2. Desoxinivalenol	4
1.2.3. Zearalenona	5
1.2.4. Ocratoxina	6
1.2.5. Patulina	7
1.3. Cromatografia	8
1.3.1. Introdução	8
1.3.2. Classificações da cromatografia	9
1.3.3. Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)	11
1.3.3.1. Instrumentação do HPLC.....	14
1.3.3.1.1. Reservatório da fase móvel	14
1.3.3.1.2. Bomba.....	14
1.3.3.1.3. Injetor	15
1.3.3.1.4. Coluna	15
1.3.3.1.5. Detetor	16
1.3.3.1.6. Sistema de tratamento de dados	16
1.4. Cromatografia de imunoafinidade (IAC)	17
1.5. Técnicas de extração	18
1.5.1. Extração sólido-líquido	18
1.5.2. Extração líquido-líquido	19
2. Validação do método	19
2.1. Especificidade/Seletividade.....	20
2.2. Quantificação	21
2.2.1. Curva de calibração.....	21

2.2.1.1.	Teste de Rikilt.....	21
2.2.1.2.	Teste das áreas normalizadas.....	22
2.2.1.3.	Norma ISO 8466-1.....	22
2.2.2.	Limites analíticos.....	22
2.2.2.1.	Limite de deteção.....	23
2.2.2.2.	Limite de quantificação.....	23
2.2.3.	Sensibilidade.....	24
2.3.	Precisão.....	24
2.3.1.	Repetibilidade.....	24
2.3.1.1.	Teste de Grubbs.....	25
2.3.1.2.	Valores de Horrat.....	26
2.3.2.	Reprodutibilidade.....	26
2.3.3.	Precisão intermédia.....	27
2.4.	Exatidão.....	27
2.4.1.	Materiais de referência certificados (MRC).....	28
2.4.2.	Ensaio interlaboratoriais.....	28
II.	Determinação das aflatoxinas nos alimentos.....	29
3.	Objetivo.....	30
4.	Materiais, reagentes, soluções e equipamentos.....	30
4.1.	Materiais.....	30
4.2.	Reagentes e soluções.....	30
4.3.	Equipamentos.....	32
5.	Procedimentos.....	32
5.1.	Procedimento para a determinação das aflatoxinas.....	32
5.1.1.	Massa de toma e Extração.....	32
5.1.2.	Filtração.....	33
5.1.3.	Purificação.....	33
5.1.4.	Eluição.....	34
5.2.	Procedimento para o ensaio da repetibilidade.....	34
5.3.	Procedimento para o ensaio da precisão intermédia.....	35
5.4.	Procedimento para o ensaio da recuperação.....	35
6.	Resultados.....	36
6.1.	Quantificação.....	36
6.1.1.	Curva de calibração.....	36
6.1.1.1.	Teste da área normalizada.....	38
6.1.1.2.	Teste Rikilt.....	39

6.1.1.3. Teste norma ISO 8466-1	41
6.1.2. Limiares analíticos	41
6.1.3. Sensibilidade	41
6.2. Exatidão – Análise da amostra de referência	42
6.3. Especificidade/Seletividade	43
6.4. Precisão	47
6.4.1. Repetibilidade	47
6.4.2. Precisão intermédia	53
7. Conclusão	55
8. Planeamento futuro	56
9. Referências Bibliográficas	57

Índice de figuras

Figura 1 - Estrutura química das Aflatoxinas, B1, B2, G1 e G2.....	3
Figura 2 - Estrutura química da Desoxinivalenol.....	4
Figura 3 - Estrutura química da Zearalenona.....	6
Figura 4 - Estrutura química da Ocratoxina.....	7
Figura 5 - Estrutura química da Patulina.....	8
Figura 6 - Classificação de cromatografia pelas formas físicas.....	10
Figura 7 - Guia para escolha do melhor sistema cromatográfico, considerando as características da substância.....	13
Figura 8 - Componentes de um equipamento HPLC. Retirado do artigo Fundamentos de Cromatografia Líquida (HPLC) 2019 – Gilson Siqueira.	17
Figura 9 - Funcionamento da cromatografia de imunoafinidade.....	18
Figura 10 - Pesagem da amostra.....	33
Figura 11 - Homogeneização da amostra	33
Figura 12 - Processos de filtração e diluição.....	33
Figura 13 - Processo de purificação com o uso da coluna de imunoafinidade	34
Figura 14 - Curva de calibração para a aflatoxina G2.....	36
Figura 15 - Curva de calibração para a aflatoxina G1	37
Figura 16 - Curva de calibração para a aflatoxina B2.....	37
Figura 17 - Curva de calibração para a aflatoxina B1.....	38
Figura 18 - Cromatograma obtido para a amostra de referência com os respectivos picos das aflatoxinas G2, G1, B2 e B1.....	42

Índice de tabelas

Tabela 1 - Propriedades físico-químicas para as aflatoxinas G2, G1, B2 e B1.	4
Tabela 2 - Propriedades físico-químicas para a desoxinivalenol	5
Tabela 3 - Propriedades físico-químicas para a zearalenona.....	6
Tabela 4 - Propriedades físico-químicas para a ocratoxina	7
Tabela 5 - Propriedades físico-químicas para a patulina.....	8
Tabela 6 - Vantagens e Limitações da cromatografia líquida de alta eficiência	12
Tabela 7 - Valores recomendados pelo Regulamento (UE) N° 519/2014 da Comissão de 16 de maio de 2014 para a recuperação.....	21
Tabela 8 - Limites de referência para cada aflatoxina no material de referência	28
Tabela 9 - Volume medido da solução padrão 2 e concentração final de cada aflatoxina em cada solução padrão	31
Tabela 10 - Alíquota adicionada a cada alimento para a determinação da repetibilidade	35
Tabela 11 - Alíquota adicionada a cada alimento para a determinação da recuperação	35
Tabela 12 - Dados para realização da curva de calibração para cada aflatoxina	36
Tabela 13 - Teste da área normalizada para as aflatoxinas G2 e G1	39
Tabela 14 - Teste da área normalizada para as aflatoxinas B2 e B1	39
Tabela 15 - Teste de Rikilt aplicado as aflatoxinas G2, G1, B2 e B1	40
Tabela 16 - Resultados obtidos para o teste da norma ISO 8466-1	41
Tabela 17 - Resultados obtidos para os limites de detecção e quantificação	41
Tabela 18 - Resultados obtidos para a sensibilidade de cada aflatoxina	42
Tabela 19 - Resultados obtidos para a amostra de referência nos 3 dias de análise...	43
Tabela 20 - Erro relativo e valores de t-student para a amostra de referência.	43
Tabela 21 - Resultados obtidos para o ensaio de recuperação da aflatoxina G2	44
Tabela 22 - Resultados obtidos para o ensaio de recuperação da aflatoxina G1	44
Tabela 23 - Resultados obtidos para o ensaio de recuperação da aflatoxina B2.....	45
Tabela 24 - Resultados obtidos para o ensaio de recuperação da aflatoxina B1	46
Tabela 25 - Resultados obtidos para a repetibilidade da aflatoxina G2 (em ng/mL nos ensaio).....	47
Tabela 26 - Resultados obtidos para a repetibilidade da aflatoxina G2 (em ng/mL nos ensaio) - Continuação.....	48

Tabela 27 - Resultados obtidos para a repetibilidade da aflatoxina G1 (em ng/mL nos ensaios).....	49
Tabela 28 - Resultados obtidos para a repetibilidade da aflatoxina G1 (em ng/mL nos ensaios) - Continuação.....	49
Tabela 29 - Resultados obtidos para a repetibilidade da aflatoxina B2 (em ng/mL nos ensaios).....	50
Tabela 30 - Resultados obtidos para a repetibilidade da aflatoxina B2 (em ng/mL nos ensaios) - Continuação.....	51
Tabela 31 - Resultados obtidos para a repetibilidade da aflatoxina B1 (em ng/mL nos ensaios).....	52
Tabela 32 - Resultados obtidos para a repetibilidade da aflatoxina B1 (em ng/mL nos ensaios) - Continuação.....	52
Tabela 33 - Resultados obtidos para o CV (%), DPRr e HOr para as aflatoxinas G2, G1, B2 e B1, na repetibilidade	53
Tabela 34 - Resultados obtidos para a precisão intermédia das aflatoxinas G2, G1, B2 e B1. Resultados obtidos para o cálculo do valor de Horrat.	54

Abreviaturas

A.	<i>Aspergillus</i>
Ae	Área experimental
AFB1	Aflatoxina B1
AFB2	Aflatoxina B2
AFG1	Aflatoxina G1
AFG2	Aflatoxina G2
AFLA	Aflatoxina
At	Área teórica
BEN	Nefropatia Endêmica dos Balcãs
CE	Cromatografia por exclusão
CG	Cromatografia gasosa
CI	Cromatografia iónica
CL	Cromatografia Líquida
CLFL	Cromatografia líquida com fase ligada
CLL	Cromatografia líquido-líquido
CLS	Cromatografia líquido-sólido
CS	Cromatografia supercrítica
CV	Coeficiente de variação
CVr	Coeficiente de variação de repetibilidade
DON	Desoxinivalenol
DPR	Desvio padrão relativo
EGI	Sociedade de Engenharia e Gestão de Qualidade
ERSAR	Entidade Reguladora dos Serviços de Águas e Resíduos
F.	<i>Fusarium</i>
G_{cal}	Grubbs calculado
GPP	Gabinete de Planeamento, Políticas e Administração Geral do Ministério da Agricultura e do mar
G_{tab}	Grubbs tabelado
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
IAC	Cromatografia de imunoafinidade
IPAC	Instituto Português de Acreditação
IPMA	Instituto Português do Mar e da Atmosfera,

LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
MRC	Materiais de referência certificados
NIC	Nefropatia Intersticial Crônica
OCRA	Ocratoxina
t_{cal}	t-student calculado
t_{tab}	t-student tabelado
UV	Ultravioleta
ZEA	Zearalenona

I. Introdução teórica

1. Introdução

1.1. A empresa¹

Em 1992, em Vila Nova de Gaia, surge a EGI – Sociedade de Engenharia e Gestão de Qualidade com o propósito de responder as necessidades da sociedade e do mercado no âmbito da prevenção, e qualidade e segurança alimentar. Pelo facto de na época existirem poucos serviços de análises e assessoria, a empresa torna-se líder nacional neste setor.

Por ter como uma política de qualidade a sustentabilidade, em 1993, passa a ser um laboratório acreditado pelo Instituto Português de Acreditação, IPAC. No ano 2000, é criado o laboratório de Análise Sensorial, devido à necessidade de análises dos produtos de consumo através da avaliação organolética.

No ano de 2008, a empresa passa a pertencer à multinacional norte-americana Silliker, um grupo que presta serviços na área da qualidade e segurança alimentar, o que origina a Silliker Portugal, S.A. Desde o ano de 2014 que a empresa se apresenta como MérieuxNutriSciences.

Esta empresa tem como missão proteger a saúde dos consumidores através dos serviços analíticos e de consultoria para diversos tipos de empresas nas mais diversas áreas, tais como: a segurança e qualidade alimentar, água e ambiente, cosméticos e higiene pessoal, bens de consumo, farmacêuticas e dispositivos médicos e agroquímicos.

Para além da acreditação pela IPAC possui reconhecimento pela Entidade Reguladora dos Serviços de Águas e Resíduos, ERSAR, para a colheita e análises das águas próprias para o consumo humano. Também possui reconhecimento pelo Instituto Português do Mar e da Atmosfera, IPMA, para as análises microbiológicas. E por fim possui o reconhecimento do Gabinete de Planeamento, Políticas e Administração Geral do Ministério da Agricultura e do mar, GPP, na emissão de boletins das análises do azeite consumido no mercado interno e no que é exportado para outros países.

1.2. Micotoxinas

As micotoxinas são metabólitos secundários provenientes de fungos como: *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium*. Estas são geradas quando a temperatura e a humidade são favoráveis para a sua geração²⁻⁸. Normalmente as micotoxinas são encontradas em alimentos agrícolas e rações, e podem ser obtidas em diversas etapas do seu processo, como na colheita, armazenamento e transporte²⁻⁸.

As micotoxinas possuem diversos efeitos toxicológicos, como carcinogénico, teratogénico, mutagénico e neurotóxico, sendo que estes efeitos na saúde humana e animal dependem do grau de exposição, da quantidade consumida e da toxicidade da micotoxina. A contaminação pode ocorrer por via direta, que é quando há a geração de micotoxinas no alimento final, ou por via indireta, que é quando os ingredientes necessários para a produção de um determinado alimento já contém as micotoxinas, pois mesmo que os ingredientes sejam tratados durante o processo as micotoxinas permanecem no alimento final^{2-4,9}. Portanto, a contaminação nos humanos ocorre através da ingestão de alimentos contaminados ou através de produtos derivados como, por exemplo, leite, arroz, carne e outros⁹.

Cerca de 400 espécies de micotoxinas já foram identificadas ao longo dos anos^{9,10}. Contudo, apenas algumas apresentam perigo à saúde humana e animal, sendo então estabelecidos determinados limites de tolerância^{4,5,9}. As principais micotoxinas encontradas nos alimentos são: Aflatoxinas (B1, B2, G1 e G2), Ocratoxinas, Desoxinivalenol, Zearalenona e Patulina^{2,3,8,9}.

1.2.1. Aflatoxina

A Aflatoxina (AFLA) é produzida a partir do fungo do género *Aspergillus*, no qual as espécies principais são: *A. flavus*, e a *A. parasiticus*. Recentemente foi determinado que a AFLA também é produzida a partir das espécies *A. nomius*, *A. pseudotamari* e *A. ochraceoroseus*.

Dos diversos tipos de aflatoxina existentes, a aflatoxina B1 (AFB1), aflatoxina B2 (AFB2), aflatoxina G1 (AFG1) e aflatoxina G2 (AFG2) são as que apresentam um alto grau de toxicidade para os humanos e os animais. As AFB1 e AFB2 são produzidas a partir da *A. flavus* enquanto que na *A. parasiticus* são encontradas ambas as aflatoxinas B e G^{5,9,11-13}. A designação B e G é referente à fluorescência da aflatoxina sob a luz ultravioleta, em que B é a inicial de *Blue* e G de *Green*^{5,9}.

Entre estas quatro classes, a AFB1 é classificada como a mais tóxica devido a apresentar propriedades carcinogénicas, e com isso a Agência Internacional de

Pesquisa do Cancro a classificou como cancerígena do grupo 1, que tem como principal órgão afetado o fígado¹¹⁻¹³. Além de ser classificada como carcinogénica, todas as quatro aflatoxinas também podem ser classificadas como imunossupressoras, mutagénicas e teratogénicas¹¹.

Os efeitos que podem causar nos humanos são diversos tais como lesões hepáticas agudas, distúrbios cutâneos, defeitos hormonais, tumores, comprometimento do sistema nervoso central, cirrose hepática e diminuição da força óssea¹².

Os alimentos que são mais propícios a contaminação de aflatoxinas são cereais, amêndoas, especiarias, amendoim, milho, pistache, frutos secos, arroz, figo, leite entre outros^{5,11,12}. O teor máximo de aflatoxinas permitido pela Comissão Europeia para estes alimentos varia entre 4,0 µg/kg e 15,0 µg/kg, dependendo do tipo de alimento¹⁴.

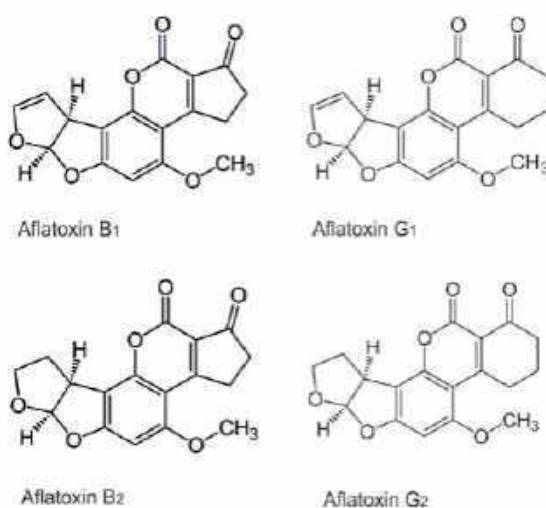


Figura 1 - Estrutura química das Aflatoxinas, B1, B2, G1 e G2.

Na Figura 1 estão representadas as estruturas químicas para os 4 tipos de aflatoxinas. Estas apresentam ser instáveis à luz UV na presença de oxigénio, em extremos de pH (menor do que 3 ou maior do que 10) e na presença de agentes oxidantes. Em questão da solubilidade, apresenta ser insolúvel em solventes não polares, ligeiramente solúvel em água e muito solúvel em solventes orgânicos moderadamente polares (por exemplo metanol)¹⁵.

Na tabela a seguir encontram-se outras propriedades físico-químicas para as aflatoxinas G2, G1, B2 e B1.

Tabela 1 - Propriedades físico-químicas para as aflatoxinas G2, G1, B2 e B1.

	Fórmula molecular	Massa molecular (g/mol)	Cor	Ponto de fusão (°C)	UV
G2	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	330,3	Cristais	237-240	Verde
G1	C ₁₇ H ₁₂ O ₇	328,3	incolores a	244-246	
B2	C ₁₇ H ₁₄ O ₆	314,3	amarelos-	268-269	Azul
B1	C ₁₇ H ₁₂ O ₆	312,3	pálidos		

1.2.2. Desoxinivalenol

A desoxinivalenol (DON) pertence ao grupo dos tricotecenos, sendo um dos mais relevantes deste grupo, gerada a partir do fungo *Fusarium*. Esta também é conhecida como vomitotoxina, devido apresentar como um principal sintoma, o vômito^{9,11,16-18}.

A Agência Internacional de Pesquisa do Cancro classificou-a como não carcinogénica para seres humanos, colocando-a no grupo 3. Contudo, a ocorrência juntamente com a aflatoxina pode aumentar a carcinogenicidade desta^{9,17,18}.

A DON é comumente encontrada nos grãos, como aveia, trigo e milho, além de ser detetada nos pães, macarrão, cerveja e rações^{9,18}. Nas rações, a presença da DON pode provocar nos animais a perda de peso e a recusa alimentar. Os suínos são os animais mais afetados pela DON tendo como uma das consequências o decréscimo do crescimento do animal. As aves e o gado também são um grupo de animais afetados e com isso os seus derivados, como ovo e leite, tornam-se grandes alvos de contaminação^{9,16,18}.

Os outros sintomas mais comuns que a DON causa nos humanos, além do vômito, são diarreias, dor abdominal, dor de cabeça, tontura e febre^{9,18}.

O teor máximo de DON permitido pela Comissão Europeia para estes alimentos pode ser de 1250 µg/kg, 1750 µg/kg, 750 µg/kg, 500 µg/kg, 200 µg/kg, dependendo do tipo de alimento¹⁴.

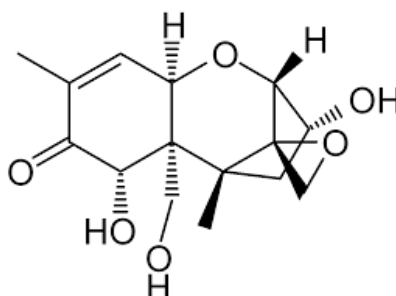


Figura 2 - Estrutura química da Desoxinivalenol

A sua estrutura química esta representada na Figura 2. A desoxinivalenol é solúvel em diversos solventes, como o clorofórmio, metanol, etanol e acetato de etilo. A

sua estabilidade irá depender do pH e da temperatura, pois a pH 4,0 com uma temperatura 100°C apresenta ser estável e com um pH de 10,0 com uma temperatura com 120°C já apresenta ser instável¹⁵.

Na tabela a seguir encontram-se outras propriedades físico-químicas para a desoxinivalenol.

Tabela 2 - Propriedades físico-químicas para a desoxinivalenol

Fórmula molecular	Massa molecular (g/mol)	Cor	Ponto de fusão (°C)
C₁₅H₂₀O₆	296,32	Agulhas brancas	151-153

1.2.3. Zearalenona

A Zearalenona (ZEA) é um metabólico secundário gerado a partir do fungo do género *Fusarium*, mais comumente das espécies, *F. culmorum* e *F. graminearum*.

Apesar de apresentar uma baixa toxicidade, a ZEA apresenta propriedades estrogénicas e anabolizantes em diversos tipos de animais, principalmente nos suínos. Os efeitos que a ZEA pode causar nestes animais são principalmente no sistema reprodutivo, como a infertilidade, inchaço da vulva, grande desenvolvimento do útero, prolapsos da vagina, entre outros. No gado bovino, os efeitos são menos pronunciados, contudo podem afetar a fertilidade e o decréscimo na produção de leite^{9,11,13,16,17,19}.

A Agência Internacional de Pesquisa do Cancro classificou-a como não carcinogénica tanto para os animais quanto para os seres humanos, colocando-a no grupo 3^{13,16,20}.

A ZEA está presente mais comumente em milho, trigo, cevada, centeio e arroz. O teor máximo permitido pela Comissão Europeia para estes alimentos varia entre os 20 µg/kg e 4000 µg/kg, dependendo do tipo de alimento¹⁴. A sua estrutura química está representada na figura 3.

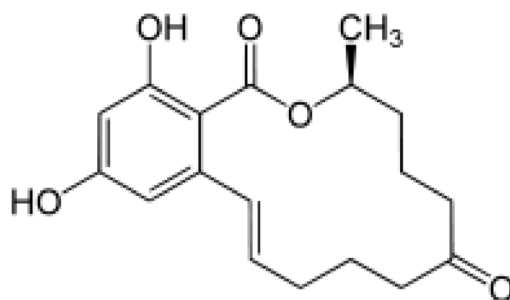


Figura 3 - Estrutura química da Zearalenona

Foram estabelecidas as absorvidades molares da ZEA em acetonitrilo a 236, 274 e 314 nm, tendo sido recomendado um comprimento de onda de referência comum de 274 nm com uma absorvidade molar de $12\,623 \pm 111 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$. A ZEA apresenta uma solubilidade a 25°C nos seguintes solventes, água, n-hexano, benzeno, acetonitrilo, diclorometano, metanol, etanol e acetona. Esta apresenta ser estável quando aquecida a 120°C, à hidrólise em soluções tampão neutras ou ácidas e a pH 7,0. Apresenta ser instável a temperaturas superiores a 150°C¹⁵.

Na tabela 3 encontram-se as suas outras propriedades físico-químicas.

Tabela 3 - Propriedades físico-químicas para a zearalenona.

Fórmula molecular	Massa molecular (g/mol)	Cor	Ponto de fusão (°C)
C₁₈H₂₂O₅	318,4	Cristais brancos	164-165

1.2.4. Ocratoxina

A Ocratoxina (OCRA) é um metabólico secundário derivado dos fungos *Aspergillus ochraceus*, *A. carbonarius*, *A. niger* e do *Penicillium verrucosum*.

A Ocratoxina é uma potente nefrotoxina e hepattoxina com efeitos teratogénicos, mutagénicos, imunossupressores e classificada pela Agência Internacional de Pesquisa do Cancro como cancerígenos de Classe 2B.

Esta pode ser encontrada em diversos tipos de alimentos como a aveia, cevada, trigo, café, alimentos de origem animal, peixes, frutos secos, além dos derivados da uva, como o vinho, uvas-passas e vinagres de vinho, entre outros. A OCRA é mais comumente encontrada nos países da Europa e no Canadá onde se tem o maior consumo dos alimentos com base de trigo e cevada. Também é possível encontrar OCRA nas carnes de animais que foram alimentados com rações contaminadas.

As suas causas nos animais são nefrotoxicidade, tumores renais e cancro do trato urinário. Os efeitos que podem causar nos humanos são as doenças renais,

nefropatia endêmica dos Balcãs (BEN) e nefropatia intersticial crônica (NIC). Porém os efeitos nos animais são mais acentuados dos que nos humanos^{5,9,11,16,17,20-22}.

O teor máximo permitido pela Comissão Europeia para estes alimentos varia entre 0,5 µg/kg e 80 µg/kg, dependendo do tipo de alimento¹⁴. A estrutura química da Ocratoxina está representada na Figura 4.

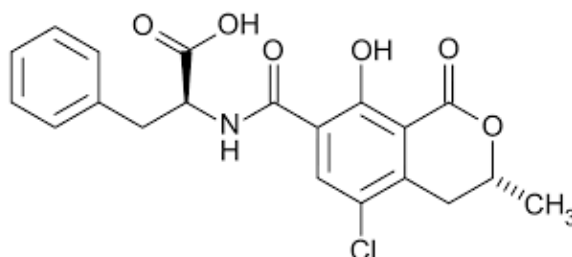


Figura 4 - Estrutura química da Ocratoxina

A Ocratoxina apresenta uma solubilidade moderada em solventes polares orgânicos (exemplo, metanol e etanol). A sua estabilidade irá depender da atividade da água do meio sendo parcialmente degradada em condições de cozedura normais¹⁵.

Na tabela 4 encontram-se as suas outras propriedades físico-químicas.

Tabela 4 - Propriedades físico-químicas para a ocratoxina

Fórmula molecular	Massa molecular (g/mol)	Cor	Ponto de fusão (°C)	UV
C₂₀H₁₈ClNO₆	403,8	Sólido cristalino branco, inodoro.	159 ou 169 ou 168-173	Verde (solução ácida) e azul (solução básica)

1.2.5. Patulina

A patulina é uma micotoxina derivada dos fungos do género *Penicillium*, *Aspergillus*, *Paecilomyces* e *Byssoschlamys*.

A patulina ocorre principalmente nos frutos, ocorrendo principalmente nas maçãs. Outros alimentos que podem apresentar esta micotoxina são queijo, feijão, cereais, milho, amendoim, entre outros. Normalmente, surge nas partes danificadas dos frutos, sendo que a intensidade da sua difusão pode ser de até 2 cm em direção ao tecido sadio.

Esta micotoxina apresenta atividades antibacteriana, antiviral e anti protozoário, sendo que somente em 1960 é que esta foi classificada como tóxica aos animais e as plantas apresentando um potencial carcinogénico, mutagénico e teratogénico. Contudo,

segundo a Agência Internacional de Pesquisa do Cancro esta é classificada como não carcinogénica para os humanos sendo colocada no grupo 3^{5,9,16,23,24}.

O teor máximo de patulina, permitido pela Comissão Europeia, para estes alimentos pode ser de 10 µg/kg, 25 µg/kg e 50 µg/kg, dependendo do tipo de alimento¹⁴.

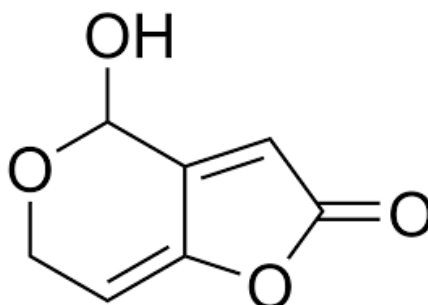


Figura 5 - Estrutura química da Patulina

Na Figura 5 está representada a sua estrutura química. A patulina é solúvel em água, etanol, acetato de etilo, clorofórmio, acetona, sendo ligeiramente solúvel em éter etílico e benzeno, porém insolúvel em éter de petróleo, pentano e hexano. É instável em soluções alcalinas e estável em meio ácido²⁵.

Na tabela 5 encontram-se as suas outras propriedades físico-químicas.

Tabela 5 - Propriedades físico-químicas para a patulina

Fórmula molecular	Massa molecular (g/mol)	Cor	Ponto de fusão (°C)
C ₇ H ₅ O ₄	153,1	Sólido branco cristalino.	105-108

1.3. Cromatografia²⁶⁻²⁹

1.3.1. Introdução

A cromatografia é um método físico-químico poderoso que pode ser aplicado de forma ampla e generalizada. É adotado nas separações, identificações e quantificações de substâncias químicas que estejam presentes em misturas complexas. O método é realizado através da distribuição das substâncias entre duas fases, que estão em contato. Uma das fases é a estacionária, enquanto que a outra é a fase móvel. A fase móvel pode ser um líquido, um gás ou um fluido supercrítico. Já a fase estacionária pode ser um sólido ou um líquido. Para o processo de separação, a mistura passa pelas duas fases, a estacionária e a móvel, sendo que os constituintes dessa mistura interagem com as fases através de forças intermoleculares e iônicas, fazendo a separação. A

mistura pode ser separada em várias partes distintas ou ainda ser purificada eliminando-se as substâncias indesejáveis. Assim, cada constituinte da mistura é seletivamente retido por uma das fases, originando tempos de retenção diferentes.

O cromatograma é a representação gráfica da resposta do detetor em função do tempo. Os picos cromatográficos que se observam num cromatograma permitem, através dos respetivos tempos de retenção, a identificação de cada substância responsável por cada pico. Para o estudo quantitativo de cada substância presente numa amostra é utilizada a área do correspondente pico cromatográfico.

O fator de retenção é o intervalo de tempo que uma substância permanece na fase estacionária relativo ao tempo que esta permanece na fase móvel. Logo, tem-se que quanto mais tempo uma substância for retida pela coluna, maior será o fator de retenção. Este fator pode ser manipulado de forma a se obter uma melhor separação das substâncias. Esta manipulação decorre através da variação da composição tanto da fase estacionária quanto da fase móvel. Os fatores de retenção das substâncias presentes na amostra devem estar entre 1 e 5, para que o tempo de eluição não seja muito longo.

A resolução de uma coluna cromatográfica é a sua capacidade em separar dois analitos de forma quantitativa. A resolução é capaz de informar o quanto dois picos cromatográficos se distanciam um em relação a outro, tendo em consideração as suas larguras.

A forma dos picos obtidos nos cromatogramas irá depender do número de etapas de equilíbrio existentes na coluna. Logo, quanto maior o número de equilíbrios mais estreito será o pico obtido. Tem-se também que quanto mais equilíbrios existir, maior será a sua eficiência.

1.3.2. Classificações da cromatografia

A classificação dos diferentes tipos de cromatografia é feita com base em diversos critérios, sendo os mais comuns, a técnica empregada, o mecanismo de separação e os diferentes tipos de fases.

Um tipo de classificação é aquele que se baseia em como a fase estacionária é utilizada, ou seja, sendo posta em tubo cilíndrico ou posicionada sobre uma superfície planar. Com isso, a cromatografia é subdividida em duas, a cromatografia planar e a cromatografia em coluna. A cromatografia em coluna consiste de uma fase estacionária que é mantida num tubo estreito enquanto que a fase móvel é forçada através da coluna sob pressão ou por gravidade. Na cromatografia planar tem-se que a fase estacionária

será apoiada sobre uma placa plana ou sobre um papel, e com isso a fase móvel irá se deslocar através desta fase por ação da gravidade por capilaridade.

Especificamente para o método de cromatografia em coluna tem-se que esta é subdividida em três categorias que estão baseadas na natureza da fase móvel. Estas são a cromatografia gasosa (CG), cromatografia líquida (CL) e a cromatografia supercrítica (CS). A cromatografia líquida é subdividida em duas, a cromatografia líquida clássica e a cromatografia líquida de alta eficiência.

Na figura a seguir se encontra as classificações da cromatografia, segundo as formas físicas.

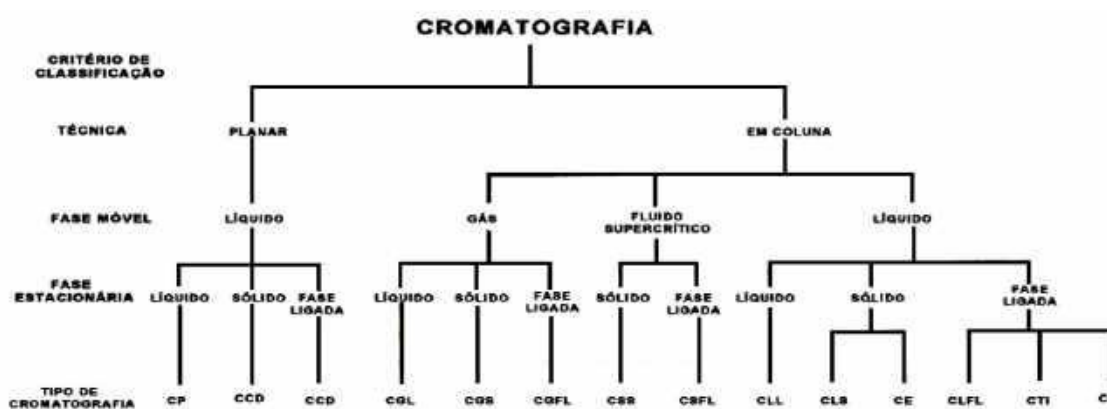


Figura 6 - Classificação de cromatografia pelas formas físicas

Um dos tipos de classificação mais importante é a que consiste no mecanismo de separação. Sendo dado por processos físicos, químicos ou mecânicos.

Na cromatografia por adsorção tem-se uma fase estacionária sólida e uma fase móvel líquida no qual o soluto irá ser adsorvido na superfície das partículas sólidas. A adsorção ocorre devido a presença de grupos ativos na superfície da fase estacionária. A cromatografia por partição contém uma fase estacionária líquida que está ligada à superfície de um suporte sólido. O processo consiste nas diferentes solubilidades dos componentes da amostra na fase estacionária. O retorno destes componentes à fase móvel irá depender de suas volatilidades ou da solubilidade nesta fase.

Na cromatografia de troca iônica a fase móvel será um líquido e a fase estacionária será um sólido ligado covalentemente a grupos iônicos. Portanto, os iões presentes no soluto serão atraídos para a fase estacionária por forças eletrostáticas.

A cromatografia de exclusão molecular, baseia-se no tamanho das moléculas da mistura. Logo, moléculas maiores irão passar mais rapidamente pela coluna do que as

menores devido a estas penetrarem nos poros da fase estacionária levando mais tempo para serem eluídas. Não havendo interações entre a fase estacionária e o soluto.

Por fim, a cromatografia por afinidade é a mais seletiva. Esta característica, é devida as interações específicas entre uma molécula do soluto com uma que esteja imobilizada à fase estacionária.

1.3.3. Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

O presente trabalho terá então como foco o uso da cromatografia líquida, mas especificamente a cromatografia líquida de alta eficiência, HPLC.

A cromatografia líquida sempre teve como princípio desde o seu início até os dias de hoje, a busca por um melhor desempenho cromatográfico e a melhor reprodutibilidade. Além de análises mais rápidas sem que haja a perda da eficiência e da resolução. Inicialmente nos anos 50 utilizavam-se colunas recheadas com partículas irregulares de dimensões de 100-200 μm , nos anos 60 os tamanhos destas partículas diminuíram para 40-50 μm , e assim também ocorreu nos anos 70, tendo uma dimensão de 10 μm . Já nos anos 80 além de se diminuir o tamanho, estas seriam partículas esféricas o que melhoraram ainda mais a sua eficiência. Os avanços continuaram até que se obtiveram partículas esféricas porosas de 2,5 μm no qual resultou em análises mais rápidas³⁰. Contudo, conforme se teve a diminuição do tamanho destas partículas, fez-se necessário que os instrumentos acoplados também fossem melhorados para que se obtivesse resultados adequados²⁵. Foi a partir destas necessidades que surgiu a cromatografia líquida de alta eficiência, no qual se faz uso de altas pressões e uma fase estacionária muito finamente dividida.

A fase estacionária utilizada no HPLC pode ser de dois tipos dando uma característica específica a cromatografia. Portanto, a cromatografia pode ser de fase normal ou de fase reversa. A de fase normal opera com uma fase estacionária polar e com um solvente menos polar, consequentemente tem-se que a força eluente irá aumentar conforme se tem a adição de solvente mais polar. Na cromatografia de fase reversa tem-se uma fase estacionária apolar e o solvente será polar, sendo este tipo o mais usual. Portanto, ao contrário da anterior, tem-se que a força eluente irá aumentar conforme se tem a adição de um solvente menos polar. O fato de a fase reversa ser a mais usual é devido a esta eliminar a cauda que pode vir a existir nos picos presentes nos cromatogramas, e pelo fato de ser insensível às impurezas polares que estejam presentes no eluente.

Como em toda técnica, o HPLC apresenta algumas vantagens e limitações. Na tabela 6 apresenta-se algumas de suas vantagens e limitações.

Tabela 6 - Vantagens e Limitações da cromatografia líquida de alta eficiência

Vantagens	Limitações
Menor tempo de análise , separações normalmente realizadas em poucos minutos.	Alto custo da instrumentação , altos preços do equipamento.
Alta resolução , análise de misturas complexas (ex.: urina)	Alto custo de operação , alto custo das fases móvel e estacionária e das colunas.
Resultados quantitativos , análises quantitativas de fácil execução.	Difícil análise qualitativa , não é um método para identificação.
Boa sensibilidade , análises de nanogramas e picogramas.	Falta de detetor universal sensível , não se tem um detetor que seja simultaneamente universal e sensível.
Versatilidade , aplicada para compostos orgânicos e inorgânicos, amostras líquidas, sólidas, iônicas e covalentes.	Necessidade de experiência no seu manuseio , para se obter o máximo de aproveitamento do sistema, é necessário que o operador tenha uma grande experiência com ele.
Automatização , sistema de injeção automático, integração das áreas e etc.	

O HPLC pode funcionar com base em cinco tipos diferentes de mecanismos, que são provenientes de cinco tipos diferentes de fase estacionária.

Há a cromatografia líquido-sólido (CLS), em que seu mecanismo consiste na competição entre as moléculas da amostra e da fase móvel em ocupar os sítios ativos na superfície da fase estacionária.

O mecanismo de separação presente na cromatografia líquido-líquido (CLL), consiste nas diferentes solubilidades que as substâncias na amostra apresentam nas fases móvel e estacionária.

A cromatografia líquida com fase ligada (CLFL) para alguns autores tem como mecanismo a partição, ou seja, uma técnica líquido-líquido. Enquanto que para outros autores, esta tem como mecanismo a adsorção, uma vez que a fase estacionária apresenta influência de grupos polares.

O mecanismo de separação presente na cromatografia por exclusão (CE), consiste na separação de acordo com o tamanho efetivo das moléculas.

Por fim, a cromatografia iônica (CI) tem o seu mecanismo baseado na permuta de iões. Pois, a fase estacionária normalmente é constituída por uma resina de poliestireno mesclada com divinilbenzeno, a qual são ligados grupos iônicos.

Para uma correta utilização de uma determinada técnica cromatográfica é necessário ter em conta certas propriedades, tais como: massa molecular, solubilidade, estrutura e etc da substância presente na amostra a ser analisada. Na figura 7 tem-se um guia para a melhor escolha do sistema a ser utilizado.

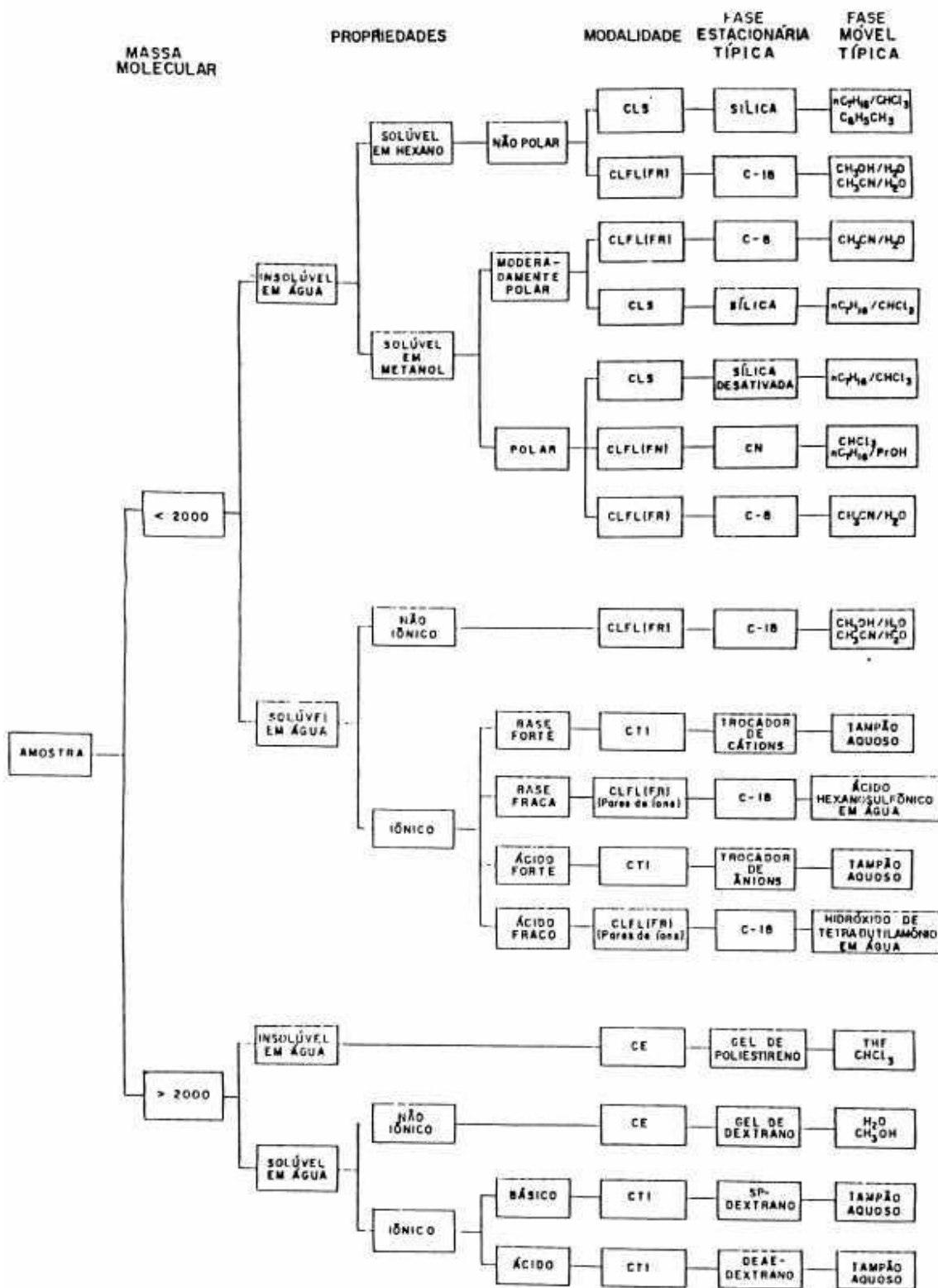


Figura 7 - Guia para escolha do melhor sistema cromatográfico, considerando as características da substância

1.3.3.1. Instrumentação do HPLC

A parte instrumental do HPLC esta dividida em 6 partes que são: reservatório da fase móvel, a bomba, o injetor, a coluna, o detetor e o sistema de tratamento de dados. Na figura 8 encontra-se uma ilustração de um equipamento de HPLC.

1.3.3.1.1. Reservatório da fase móvel

Um HPLC pode ser constituído por um ou mais reservatórios de vidro com uma capacidade de 500 ml, ou mais. Os solventes a serem utilizados devem estar livres de gases e de partículas indesejadas, para tal é feito mais comumente o uso de filtração a vácuo para a remoção destes.

A eluição pode ser dada de duas formas, por gradiente ou por eluição isocrática. A eluição por gradiente utiliza dois ou mais solventes que possuem uma polaridade significativamente diferente entre si. A razão entre estes solventes varia de forma contínua ou numa série de etapas. Já a eluição isocrática é feita com o uso de um solvente ou de uma mistura, de forma constante. Instrumentalmente se tem uma válvula que é responsável por introduzir os solventes em proporções pré-estabelecidas que podem variar continuamente.

1.3.3.1.2. Bomba

Os requisitos necessários para que uma bomba de cromatografia líquida possua um bom desempenho são: 1) suportar altas pressões que devem rondar por volta dos 420 atm (aproximadamente 6000 psi); 2) o fluxo de saída deve ser estável e sem pulsações para que não haja ruído de fundo no detetor; 3) a vazão do fluxo não deve ser muito alta nem muito ampla de forma que se possa obter uma boa reprodutibilidade, a gama ideal está entre os 0,1 a 10 ml/min; 4) a reprodutibilidade relativa então deve ter uma vazão de 0,5 % ou mais; 5) o volume a ser deslocado deve ser constante para que se possa obter uma melhor análise quantitativa e qualitativa e 6) deve apresentar certa resistência quanto à corrosão por diversos tipos de solventes.

Existem vários tipos de sistema de bombagem, sendo três tipos os principais. Tem-se os de seringa acionada por rosca, a bomba recíproca e a bomba pneumática de pressão constante. As bombas de seringa são pouco usadas devido a sua pequena capacidade (~250 ml). Contudo, apresentam uma saída livre de pulsação em que a sua vazão é facilmente controlada. Já as bombas pneumáticas são simples e de baixo custo. Consistem num reservatório maleável que é pressurizado por um gás comprimido. Porém, apresentam uma pressão de saída limitada e as vazões são dependentes das

viscosidades dos solventes. Além de também não poderem ser usadas para o modo de eluição por gradiente. Por fim, tem-se a bomba recíproca que é a mais utilizada devido a apresentar um volume interno pequeno e uma alta pressão de saída. Além também, da possibilidade do uso da eluição por gradiente, das vazões serem constantes e serem independentes da viscosidade do solvente^{27,31}.

1.3.3.1.3. Injetor

Há diversas formas de injeção no HPLC, sendo os mais comuns os de válvulas manuais ou os injetores automáticos. As válvulas manuais consistem em 6 vias e 2 posições que irão permitir o loop (alça de amostragem) ser preenchido pela amostra, seja total ou parcialmente. Em seguida a válvula é girada de forma a permitir que o loop seja introduzido na linha cromatográfica, posicionando-a entre a bomba e a coluna. Já os sistemas de injeção automático podem consistir em diversos tipos de arranjos, como, por exemplo, um em que a agulha da amostragem esta integrada ao loop. Esta é a mais comum de ser utilizada uma vez que apresenta uma maior velocidade de injeção além da redução do efeito de memória³².

1.3.3.1.4. Coluna

As colunas utilizadas em HPLC costumam ser constituídas por tubos de aço inoxidável com um comprimento na faixa de 10 a 30 cm e com um diâmetro interno entre 2 e 5 mm. Os recheios que constituem as colunas normalmente apresentam partículas de diâmetro entre os 3 e 10 μm e são constituídas normalmente por partículas de sílica. Contudo, partículas de alumina, polímeros porosos e resinas de troca iônica também são comumente utilizadas.

É na coluna cromatográfica que se dá o processo de separação das substâncias presentes numa amostra. Portanto, a sua escolha deve ser feita com cautela e tendo em consideração o tipo de amostra a ser analisada. Além disto, o tipo de preenchimento que a constitui e as suas características físicas (como comprimento, material, diâmetro interno) também devem ser levadas em consideração³¹.

Umas das suas desvantagens são o alto custo e a fácil degradação pela adsorção irreversível das impurezas que provem das amostras e dos solventes. Uma forma então criada para minimizar tal problema, é o uso de uma pequena pré-coluna que é posta na entrada da coluna principal. Esta deve ser constituída similarmente a coluna analítica utilizada. Porém os tamanhos das partículas devem ser maiores de forma a minimizar a queda de pressão. Esta pré-coluna tem como finalidade além de

umentar a vida útil da coluna analítica, de realizar a remoção de material particulado e de contaminantes dos solventes.

1.3.3.1.5. Detetor

Os detetores utilizados no HPLC são diversos, sendo o mais comum o de ultravioleta. Este é usado devido a apresentar um baixo custo, insensível a variações pequenas de fluxo e de temperatura e compatível para gradientes de solventes. Este tipo de detetor é constituído por uma lâmpada de excitação, um filtro ou uma rede de difração e um divisor de feixe de luz. O divisor irá dirigir cada um dos feixes resultantes, com uma igual intensidade, a cada uma das duas células de detecção que irão incidir sobre um fotodetetor. Contudo, a sua desvantagem é a sua seletividade, pois não pode ser utilizado na determinação de compostos como lipídios, carboidratos e polímeros²⁹.

Outros tipos de detetores são o de índice de refração diferencial, que são considerados universais, ou seja, podem ser utilizados para qualquer espécie de amostra. O de condutividade elétrica é mais utilizado na cromatografia iónica, apresentando uma alta sensibilidade e seletividade³¹.

Especificamente para este trabalho, foi utilizado o detetor de fluorescência, que possui além das vantagens do ultravioleta, possui uma maior sensibilidade e especificidade. O seu funcionamento consiste em uma lâmpada de excitação (de espectro de bandas ou contínuo) que emite um feixe de luz no qual passa por um filtro ou uma rede de difração. Este feixe é incidido sobre a amostra excitando-a, originando a emissão de um feixe de luz ao retornar ao seu estado fundamental. A emissão deste feixe é dirigida a um filtro ou monocromador, que seleciona o comprimento de onda emitido, fazendo-o incidir no fotodetetor. Este converte a emissão em sinal de corrente elétrica e assim digitalizado para processamento e análise dos dados.

1.3.3.1.6. Sistema de tratamento de dados

O sistema de tratamento de dados é um componente de fundamental importância. Pois ele irá transformar os sinais obtidos pelo detetor nos cromatogramas onde se consegue retirar diversas informações. Como por exemplo, o tempo de retenção, a altura do pico, a área e a linha de base. É feito o uso de softwares e interfaces para que se possa obter tais informações além de poder controlar todo o funcionamento de cada componente, como a bomba, o injetor e o fluxo aplicado³¹.

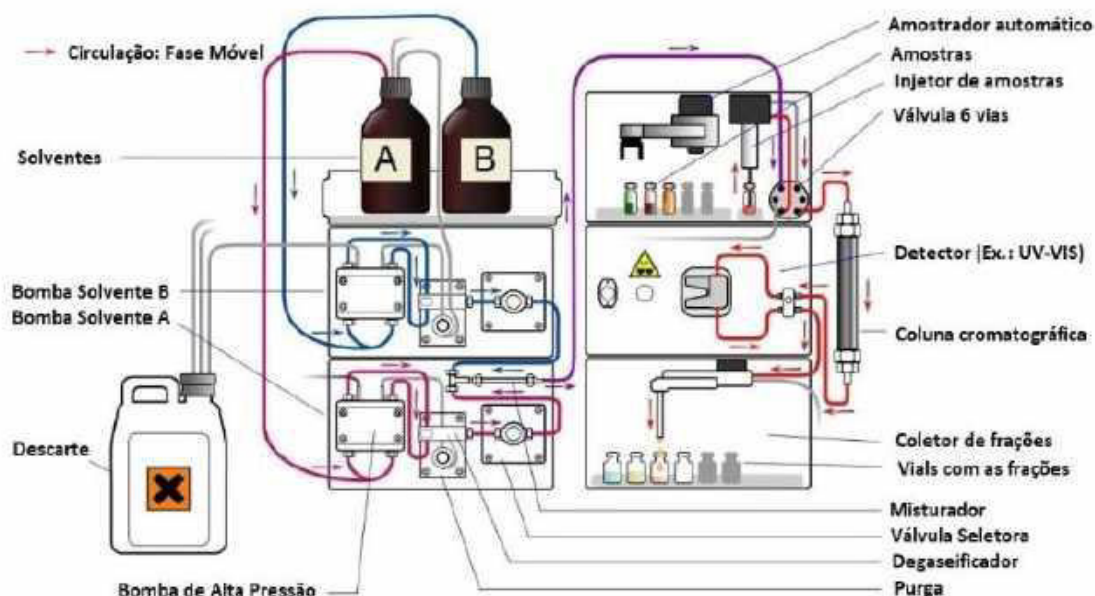


Figura 8 - Componentes de um equipamento HPLC. Retirado do artigo Fundamentos de Cromatografia líquida (HPLC) 2019 – Gilson Siqueira.

1.4. Cromatografia de imunoafinidade (IAC)

A cromatografia de imunoafinidade (IAC) faz parte do grupo de cromatografia líquida, sendo uma subcategoria da cromatografia por afinidade. Esta apresenta como fase estacionária um anticorpo seletivo imobilizado específico para uma determinada substância. É feito o uso de um agente biológico para a purificação ou a análise seletiva de uma determinada substância. Os anticorpos utilizados podem ser de dois tipos, monoclonais ou policlonais. Os monoclonais são anticorpos obtidos a partir da clonagem de uma única célula-mãe sendo produzidos como uma resposta a um antígeno específico. Os policlonais são anticorpos obtidos de diferentes linfócitos B que consequentemente irá reagir com várias áreas do antígeno^{33,34}.

A IAC apresenta ser uma técnica específica e seletiva tendo como vantagens o fornecimento de extratos limpos, com resultados precisos e exatos. Possui um menor uso de solventes perigosos, redução das etapas de purificação e do tempo total de análise. Além de ter uma interação específica entre o anticorpo e o analito. Suas desvantagens são o alto custo, ser de único uso e à desnaturação dos anticorpos na presença de solventes orgânicos^{12,35,36}.

Devido a estas vantagens apresentadas a IAC vem sendo muito utilizada nas análises de micotoxinas. A utilização dá-se pela adição gradualmente do extrato à coluna. O analito de interesse então irá se ligar seletivamente ao anticorpo e as impurezas serão percoladas. De seguida é feito a passagem de uma solução que pode

ser um solvente ou uma mistura de solventes para a eluição da micotoxina a ser determinada. A escolha da solução de eluição deve ser feita com cuidado, devido aos anticorpos desnaturarem na presença de solventes orgânicos. Portanto, deve ser utilizado uma solução com pouco ou nenhum solvente orgânico^{12,36}. Na figura 9 encontra-se uma ilustração de como é o processo da cromatografia por imunoafinidade.

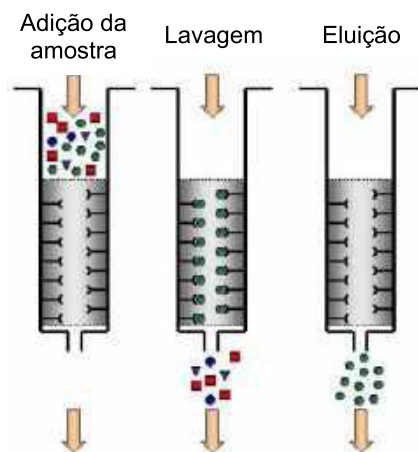


Figura 9 - Funcionamento da cromatografia de imunoafinidade

1.5. Técnicas de extração

A extração pode ser definida como um processo de separação tendo como base as diferenças de afinidade. Pode-se dizer que é a transferência de um soluto, que está presente em uma fase, para uma outra fase. Pode-se distinguir este processo entre duas classes de extração, a extração sólido-líquido e a líquido-líquido³⁷.

1.5.1. Extração sólido-líquido

Este tipo de extração é baseado no processo de dissolução de um ou mais componentes presentes na mistura sólida por um solvente líquido. O seu mecanismo consiste na penetração do solvente no sólido e a dissolução dos elementos. Há também o transporte dos solutos do interior das partículas sólidas para a sua superfície por difusão. O objetivo desta extração é extrair a maior quantidade possível de soluto sendo utilizado uma quantidade limitada de solvente de forma a obter um extrato concentrado.

A extração sólido-líquido é a técnica mais utilizada para a extração de micotoxinas nos mais diversos tipos de alimentos. Os solventes utilizados irão depender do analito a ser extraído. Porém, a maioria das micotoxinas são solúveis em solventes polares e insolúveis em solventes apolares. Logo, os solventes ou as suas misturas mais comuns são o acetonitrilo, acetona, clorofórmio, diclorometano, acetato de etilo,

metanol e água. O uso de água como um dos solventes tende a ter uma eficiência melhor de extração devido a esta aumentar a penetração do solvente no material^{36,37}.

1.5.2. Extração líquido-líquido

A extração líquido-líquido é um processo de separação que se baseia na transferência de um soluto de um solvente para outro. Sendo que os dois solventes utilizados devem ser imiscíveis ou parcialmente miscíveis um com o outro. Esta extração também é conhecida como partição. Um dos solventes comumente utilizado é a água ou uma mistura aquosa e o outro solvente é um líquido orgânico não polar. Neste tipo de extração também contém uma etapa de mistura, seguida por uma etapa de separação de fases. Assim, embora a mistura vigorosa seja favorável à transferência do extrato de um solvente para o outro, ela também pode prejudicar na separação de fases ao formar emulsões³⁷.

Um parâmetro importante a ter em conta é o tempo de extração, pois este deve ser controlado para que se possa obter uma quantificação precisa. Após a extração é recomendado realizar uma centrifugação ou uma filtração do extrato, antes de ser realizada a etapa de clean-up³⁶.

2. Validação do método³⁸⁻⁴⁴

A validação de um método analítico tem como finalidade a comprovação de que um determinado método aplicado é exato, preciso, reprodutível e confiável. Ou seja, realizar uma validação é garantir que o método aplicado irá fornecer resultados confiáveis e consistentes com os valores de referência. Esta deve ser realizado sempre que o método utilizado for modificado, seja por alterar alguma técnica ou por uso de algum equipamento diferente. Também é realizado quando se é aplicado um novo método.

O processo de validação de um método consiste no estudo de parâmetros que é dividido em duas partes, a avaliação direta e indireta. Na avaliação indireta se tem os estudos dos seguintes parâmetros, especificidade/seletividade, curvas de calibração, sensibilidade, limiares analíticos, linearidade, precisão, repetibilidade, reprodutibilidade, precisão intermédia, exatidão e robustez. Já na avaliação direta se tem o uso de materiais de referência certificados, ensaios interlaboratoriais e testes comparativos¹²⁻

2.1. Especificidade/Seletividade

A seletividade de um método é quando este pode detetar e distinguir o analito de interesse numa amostra complexa sem que haja interferência dos outros componentes. A amostra a ser analisada pode conter compostos que interferem na medição. Os interferentes presentes poderão aumentar ou diminuir o sinal obtido⁴⁵.

A especificidade é quando o método é capaz de diferenciar o analito dos outros componentes presentes na amostra, ou seja, garantir que determinado valor medido provém do analito em estudo.

Um meio de se determinar a seletividade/especificidade de um método é através de ensaios de recuperação utilizando uma série de amostras em duplicado e em condição de repetibilidade. O método então pode ser classificado como seletivo/específico quando se obtém as taxas de recuperação as mais próximas de 100%, obtidas a partir da seguinte equação:

$$\% \text{ Recuperação} = \frac{\text{valor experimental}}{\text{valor teórico}} \times 100 \quad (1)$$

O valor teórico é obtido a partir da seguinte equação:

$$\text{Valor teórico} = \frac{\text{Concentração final} \times \text{fator de diluição}}{\text{massa de toma}} \quad (2)$$

Uma forma de se constatar a existência de um desvio significativo nos resultados obtidos, é a partir do teste de t-student no qual se aplica a seguinte equação:

$$t = \frac{(\bar{x} - \mu)\sqrt{N}}{s} \quad (3)$$

Em que $\bar{x}$ é o valor médio de %, μ é o valor esperado, 100%, N é o número de casos e s o desvio padrão. O valor t_{cal} é comparado com o t_{tab} para n - 1 graus de liberdade em diferentes níveis de confiança⁴⁶.

Para o caso específico das Aflatoxinas G1, G2, B1 e B2, o Regulamento (UE) Nº 519/2014 da Comissão de 16 de maio de 2014⁴⁷, especifica a % de recuperação recomendada para cada aflatoxina. Na Tabela 7 encontra-se as percentagens de recuperação recomendada de acordo com a gama de concentrações.

Tabela 7 - Valores recomendados pelo Regulamento (UE) N° 519/2014 da Comissão de 16 de maio de 2014 para a recuperação

Aflatoxina	Gama de concentração	Valor recomendado
G2, G1, B2 e B1	< 1,0 µg/kg	50 a 120 %
	1 – 10 µg/kg	70 a 110 %
	>10 µg/kg	80 a 110%

2.2. Quantificação

O método pode ser quantificado através das seguintes determinações, adição padrão, padrão interno e curva de calibração. Nas empresas costuma-se empregar o uso da curva de calibração, uma vez que é um processo simples de ser aplicado. Portanto, será feito o uso da construção da curva de calibração para a quantificação do presente método.

2.2.1. Curva de calibração

A construção de uma curva de calibração é realizada com o propósito de se observar a linearidade do método, ou seja, verificar se a resposta de um equipamento possui uma relação proporcional com a concentração da amostra dentro de um intervalo específico. É então obtido uma equação do género $y = a + bx$, em que a é a ordenada na origem e b é o declive da reta. Também é obtido o coeficiente de correlação linear, r , que tem um intervalo entre -1 e 1. Quanto mais próximo de 1 ou de -1 for o valor de r maior a probabilidade de se obter uma correlação linear entre as variáveis consideradas.

Para saber se o método é linear, é realizado diversos tipos de testes como a análise do valor do coeficiente de correlação, o teste de Rikilt, teste das áreas normalizadas e pela norma ISO 8466-1.

2.2.1.1. Teste de Rikilt

O teste de Rikilt irá analisar a linearidade em cada ponto da curva de calibração. O cálculo é feito a partir da razão $R_{y/x}$ determinado para cada concentração. Depois é feita uma média na qual é atribuído o valor de 100%. Em seguida, é feito o cálculo da percentagem correspondente para cada valor $R_{y/x}$. Os resultados obtidos não devem apresentar um desvio superior a 10%, ou seja, tem de estar entre 90% e 110%. Caso contrário os valores devem ser retirados e de seguida realizado novamente o teste.

2.2.1.2. Teste das áreas normalizadas

No teste das áreas normalizadas é feita uma comparação entre as áreas obtidas experimentalmente com as áreas teóricas obtidas através da equação da curva de calibração. Para a razão que mais se aproximar de 1 é considerado este um valor de referência, C₁₀₀. Para tal é utilizado a seguinte equação:

$$\text{Área normalizada} = 100 \times \frac{\frac{A_i}{C_i}}{\frac{A_{100}}{C_{100}}} \quad (4)$$

Em que A_i e C_i é a área e a concentração em cada ponto e A₁₀₀ é a área experimental na concentração considerado como referência.

Os resultados então obtidos devem estar compreendidos dentro do intervalo de 85% a 115% para ser considerado a existência de linearidade.

2.2.1.3. Norma ISO 8466-1

Pela norma ISO 8466-1 é feita o cálculo com base na seguinte equação:

$$PG = \frac{DS^2}{S_{y^2}^2} \quad (5)$$

Em que DS² é a diferença das variâncias calculada pela equação:

$$DS^2 = (N - 2) \times S_{\frac{y}{x}}^2 - (N - 3) \times S_{y^2}^2 \quad (6)$$

em que N é o número de padrões da calibração, $S_{\frac{y}{x}}$ e S_{y^2} são os desvios padrões residuais.

O valor obtido de PG é comparado com o valor tabelado da distribuição F de Snedecor / Fisher. Para $PG \leq F$ a função é considerada linear, para $PG > F$ a função é não linear.⁴¹

2.2.2. Limiares analíticos

Para a determinação dos limiares analíticos é feito a determinação dos limites de detecção e de quantificação.

2.2.2.1. Limite de detecção

O limite de detecção (LD) é a menor quantidade de analito que está presente numa determinada amostra que pode ser detetada, sob as condições experimentais estabelecidas.

A análise é realizada através de soluções com concentrações previamente conhecidas e decrescentes do analito, até o de menor concentração que seja detetável.

Assim, para uma calibração linear, o LD pode ser determinado através da seguinte equação:

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

Em que $S_{\frac{y}{x}}$ é o desvio padrão residual da curva de calibração, dada pelo método dos mínimos quadrados, e b é o declive da curva de calibração.

2.2.2.2. Limite de quantificação

O limite de quantificação (LQ) é a menor quantidade de analito presente numa amostra que se pode quantificar com exatidão e precisão aceitáveis, sob as condições experimentais estabelecidas. Para certificar que este limiar apresenta ser exato e preciso é necessário realizar um teste de confirmação. Este é feito pela análise de padrões internos, sob condição de precisão intermédia, cuja concentração deve ser próxima ou igual ao limiar de quantificação.

Assim, para uma calibração linear, o LQ pode ser determinado através da seguinte equação:

$$LQ = \frac{10 \times S_{\frac{y}{x}}}{b} \quad (8)$$

Em que $S_{\frac{y}{x}}$ é o desvio padrão residual da curva de calibração, dada pelo método dos mínimos quadrados, e b é o declive da curva de calibração.

2.2.3. Sensibilidade

A sensibilidade de um método é determinada através da sua capacidade em diferenciar duas concentrações próximas de um analito, com um determinado nível de confiança. Esta pode ser determinada através da seguinte equação:

$$S = \frac{dx}{dc} \quad (9)$$

Em que dx é a variação da resposta e dc é variação da concentração.

Porém, para o caso de a curva de calibração ser um modelo linear, é considerado a sensibilidade constante ao longo de toda a gama de trabalho. Portanto esta será igual ao declive desta curva para o intervalo de concentração considerado.

A sensibilidade irá depender não somente do analito em estudo, mas também da técnica a ser utilizada.

2.3. Precisão

A precisão do método irá avaliar a dispersão dos resultados obtidos de uma série de análises independentes, que são repetidas sobre uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, em condições definidas. A precisão pode ser dividida em 3 níveis, a repetibilidade, reprodutibilidade e precisão intermédia.

A precisão pode ser determinada através do cálculo do desvio padrão relativo (DPR) ou do coeficiente de variação (CV%), que é dado pela seguinte equação:

$$DPR = \frac{DP}{CMD} \times 100 \quad (10)$$

Em que DP é o desvio padrão e CMD é a concentração média determinada.

2.3.1. Repetibilidade

A repetibilidade é obtida quando se realiza sucessivas medições de um analito sob as mesmas condições num curto intervalo de tempo. Estas condições são, o mesmo laboratório, mesmo analista, mesmo equipamento, tipos de reagentes e soluções.

Para a sua determinação, é realizada uma série de análises ($n > 10$) sobre uma mesma amostra nas referidas condições. O limite de repetibilidade corresponde ao valor máximo aceitável para uma diferença absoluta entre duas análises, em que para isto, é

preciso estar sob condições de repetibilidade, para um nível de confiança de 95%. Este limite é determinado da seguinte forma:

$$r = t \times \sqrt{2} \times S_{ri} \quad (11)$$

em que S_{ri} é o desvio padrão de repetibilidade associada aos resultados considerados e t é o valor crítico da distribuição t-student, com um nível de significância de 0,05 e com $n-1$ graus de liberdade.

É considerado também o coeficiente de variação de repetibilidade (CV_r) para cada nível de concentração que é dado da seguinte forma:

$$CV_r = \frac{S_{ri}}{X_m} \times 100 \quad (12)$$

Em que S_{ri} é o desvio padrão de repetibilidade e X_m é a média dos valores considerados.

2.3.1.1. Teste de Grubbs

O teste de Grubbs é realizado para que se possa saber a existência de valores discrepantes numa série de resultados. O teste é determinado através da seguinte equação:

$$G_{cal} = \frac{X_s - X_m}{s} \quad (13)$$

Em que X_s é o valor suspeito, X_m é o valor médio e S é o desvio padrão. O valor de G_{tab} é obtido considerando um nível de confiança de 99% com n graus de liberdade.

Para $G_{cal} < G_{tab}$, tem-se que o valor suspeito não é discrepante considerando o grupo de dados. Para $G_{cal} \geq G_{tab}$, tem-se que o valor suspeito é discrepante considerando o grupo de dados e com isso deve ser descartado. Logo o teste deve ser realizado novamente.

Um outro teste que é utilizado para se averiguar a homogeneidade das variâncias dos resultados obtidos, é o teste de Cochran.

2.3.1.2. Valores de Horrat

Dado não haver outro método para comparar os resultados da precisão, é feito o uso de valores teóricos de repetibilidade, por exemplo, a partir da equação de Horwitz, de forma a se avaliar a aceitabilidade dos resultados para a precisão do método. Para tal são utilizados os valores da Horrat obtidos pela seguinte equação⁴⁸:

$$HO_r = \frac{DPR (CV) \text{ dos resultados experimentais}}{DPR_r \text{ previsto da equação de Horwitz}} \quad (14)$$

Em que DPR_r será dado pela equação de Horwitz que é estabelecido para qualquer tipo de método:

$$DPR_r = 2^{(1 - 0,5 \log C)} \quad (15)$$

Em que C será a fração de massa como exponencial de 10 (por exemplo, 1 µg/g = 10^{-6}).

Os valores de Horrat encontrados devem ser inferiores a 2 para que o método utilizado seja considerado adequado.

2.3.2. Reprodutibilidade

A reprodutibilidade é realizada através de ensaios interlaboratoriais em que se utiliza uma mesma amostra, mesmo método e mesmo analito. Outras condições são variadas como, operadores, equipamentos, e tempo de realização.

A determinação é feita através da análise de uma amostra feita por n laboratórios diferentes. O limite de reprodutibilidade será aquele no qual apresenta um valor abaixo do que se deve situar a diferença absoluta entre dois resultados de ensaio, obtidos nas condições referidas, cujo nível de confiança seja de 95%.

A reprodutibilidade tem associada um valor de variância que pode ser determinado através da seguinte equação:

$$S_{Ri}^2 = S_{Li}^2 + S_{ri}^2 \quad (16)$$

Em que S_{Ri}^2 é a variância da reprodutibilidade, S_{Li}^2 é a variância interlaboratorial (variância dos erros sistemáticos), S_{ri}^2 é a variância da repetibilidade (variâncias dos erros aleatórios).

2.3.3. Precisão intermédia

A precisão intermédia avalia a precisão sobre a mesma amostra ou padrões, utilizando um mesmo método no mesmo laboratório, mas tendo definido quais as condições a serem variadas. Estas condições podem ser: diferentes dias, diferentes analistas e diferentes equipamentos.

Este tipo de análise é reconhecido como o que mais representa a variabilidade dos resultados num laboratório, portanto, é o mais aconselhável a ser utilizado.

A sua determinação pode-se dar de diferentes formas. Com o uso da carta de controlo de amplitudes ou através de n medições em replicado, duplicado ou em ensaio único, sobre uma amostra em condições pré-definidas.

Ao realizar a determinação por $n=2$ medições é feito o uso da seguinte equação:

$$Si = \sqrt{\frac{1}{2*t} * \sum_{j=1}^t (y_{j1} - y_{j2})^2} \quad (17)$$

Em que Si é o desvio padrão de precisão intermédia, t é o número de amostras ensaiadas, j é o número da amostra, y_{j1} é o primeiro resultado obtido para a amostra j e y_{j2} é o segundo resultado obtido para a amostra j .

O limite da precisão intermédia pode ser obtido a partir da seguinte equação, sendo expressa em percentagem:

$$r_i = \frac{Si * 2,8}{\bar{x}} * 100 \quad (18)$$

Em que Si é o desvio padrão e $\bar{x}$ é a média da média dos valores obtidos.

2.4. Exatidão

A exatidão de um método irá avaliar a concordância entre os valores obtidos a partir de ensaios experimentais e o valor de referência, o verdadeiro. Contudo, para este parâmetro deve-se ter em conta a junção dos erros sistemáticos e dos erros aleatórios

de uma série de resultados de ensaio. Para se avaliar é usado diversos tipos de processos, tais como o uso de materiais de referência certificados e ensaios interlaboratoriais.

2.4.1. Materiais de referência certificados (MRC)

Os materiais de referência certificados (MRC) possuem um valor de concentração certificado e com uma incerteza associada. Devido a isto, são comumente utilizados no processo de validação de um método de modo a se avaliar desempenho do laboratório através da comparação entre o valor obtido experimentalmente e o valor certificado. Para o caso do valor experimental não se encontrar dentro do intervalo considerado deve-se realizar uma avaliação com as possíveis causas e com isso eliminá-las.

Para se avaliar os resultados obtidos se tem 4 processos mais comumente utilizados, que são o erro relativo, o teste de hipóteses, o fator de desempenho Z e o erro normalizado.

O material de referência utilizado neste trabalho foi o *corn flour*. Os limites inferiores e superiores de concentração para cada aflatoxina são estabelecidos pelo fabricante. Na Tabela 8 esta representado estes limites.

Tabela 8 - Limites de referência para cada aflatoxina no material de referência

Aflatoxina	Limite inferior ($\mu\text{g/kg}$)	Limite superior ($\mu\text{g/kg}$)
G2	3,5	4,5
G1	3,3	4,8
B2	2,8	3,8
B1	2,9	4,2

2.4.2. Ensaios interlaboratoriais

Os ensaios interlaboratoriais podem ser realizados de diversas formas dependendo do objetivo que se deseja, como, por exemplo o ensaio interlaboratorial de aptidão e o ensaio interlaboratorial de normalização. O primeiro tem como objetivo avaliar os laboratórios participantes através da exatidão, já o segundo tem como objetivo avaliar a repetibilidade e a reprodutibilidade de um método de um laboratório com os outros laboratórios⁴¹.

II. Determinação das aflatoxinas nos alimentos

3. Objetivo

O presente trabalho tem como por objetivo a validação do método analítico para a determinação de micotoxinas, as aflatoxinas, por HPLC-fluorescência, método adotado na empresa *MérieuxNutriSciences* - Portugal. A confiabilidade dos resultados obtidos será certificada através de diversos parâmetros, tais como a precisão, exatidão, sensibilidade, especificidade entre outros.

O trabalho tinha como objetivo o estudo além das aflatoxinas a da Zearalenona. Contudo por motivos de força maior, somente foi possível realizar o estudo das aflatoxinas.

4. Materiais, reagentes, soluções e equipamentos

4.1. Materiais

- ✓ Recipiente de plástico
- ✓ Espátula
- ✓ Proveta de vidro de 250 ml e 500 ml
- ✓ Matraz
- ✓ Filtro de plástico
- ✓ Papel de filtro – VWR 474
- ✓ Papel filtro de microfibra de vidro – VWR 691
- ✓ Reservatório de vidro para colunas de imunoafinidade (10 ml) – Poulsen&Graf
- ✓ Colunas de Imunoafinidade para Aflatoxinas – R-Biopharm
- ✓ Unidade de filtração a vácuo
- ✓ Micropipeta (Eppendorf)
- ✓ Seringa de plástico
- ✓ Tubo Falcon – Sarstedt AG & Co (15 ml)
- ✓ Vial âmbar – VWR 1,5 ml

4.2. Reagentes e soluções

- ✓ Cloreto de sódio, NaCl – VWR Chemicals (99,9%)
- ✓ Metanol – Honeywell (99,9%)
- ✓ Acetonitrilo – Honeywell (99,9%)
- ✓ Iodo cristalino – Sigma Aldrich (99,8%)

- ✓ Solução de extração composta por Metanol/Água (70:30)
- ✓ Reagente de derivatização pós coluna constituído por 0,5 g de Iodo com 10 ml de metanol para 1L de solução. Homogeneizado por agitação por cerca de 2 horas e de seguida realizada a filtração a vácuo.
- ✓ Foram preparados 2 L de fase móvel constituída de uma mistura Água/Metanol/Acetonitrilo numa proporção de 3:1:1, sendo esta solução filtrada sob vácuo para a retirada de gases.
- ✓ Padrão para aflatoxinas B1, B2, G1 e G2 – Sigma Aldrich (G2 98,5%; G1 99,7%; B2 99,0% e B1 99,0%)

No preparo das soluções padrões foi utilizado uma ampola de 2,00 ml contendo as seguintes concentrações de aflatoxinas: G2 – 20,84 µg/ml, G1 – 20,85 µg/ml, B2 – 20,77 µg/ml e B1 – 20,69 µg/ml. Para o preparo da solução padrão 1 é transferido todo o conteúdo da ampola para um balão volumétrico de 100,0 ml e aferido com metanol. Esta solução apresenta as seguintes concentrações das aflatoxinas: G2 – 0,417 µg/ml, G1 – 0,417 µg/ml, B2 – 0,415 µg/ml, B1 – 0,414 µg/ml. A solução padrão 2 é preparada a partir da solução padrão 1 com um volume de 500 µl em um balão volumétrico de 10 ml aferido com uma solução de água:metanol (50:50). As concentrações das aflatoxinas nesta solução são: G2 – 20,84 ng/ml, G1 – 20,85 ng/ml, B2 – 20,77 ng/ml, B1 – 20,69 ng/ml.

Para a elaboração da curva de calibração foram utilizadas 7 soluções padrão preparadas com volumes adequados da solução padrão 2 diluídos para um volume final de 5,00 ml. Na Tabela 9 encontram-se os volumes utilizados da solução padrão 2 e as concentrações finais das aflatoxinas na solução padrão.

Tabela 9 - Volume medido da solução padrão 2 e concentração final de cada aflatoxina em cada solução padrão

Aflatoxinas (ng/ml)				
Volume (ml)	G2	G1	B2	B1
0,025	0,104	0,104	0,104	0,104
0,050	0,209	0,209	0,209	0,209
0,125	0,521	0,521	0,521	0,521
0,25	1,043	1,043	1,043	1,043
0,50	2,085	2,085	2,085	2,085
1,25	5,213	5,213	5,213	5,213
2,5	10,425	10,425	10,425	10,425

4.3. Equipamentos

- ✓ Misturador equipado com copo de aço inox – WaringLaboratory
- ✓ Bomba peristáltica - ISMATEC
- ✓ Balança eletrônica de precisão – Mettler Toledo
- ✓ HPLC (Agilent Technologies Série 1200) com os seguintes elementos
 - ✓ Bomba HPLC
 - ✓ Sistema de injeção automático com um loop de 300 μ L.
 - ✓ Sistema de derivatização pós-coluna constituído por uma segunda bomba não peristáltica, uma peça T, um tubo em PTGE ou aço inox com comprimento de 3000 mm a 5000 mm e um diâmetro interno de 0,5 mm, e um banho de água regulado a 70°C.
 - ✓ Fluxo de iodo de 0,4
 - ✓ Modo isocrático
 - ✓ Coluna analítica C18 (250 mm x 4 mm e porosidade de 10 μ m)
 - ✓ Detetor de fluorescência com um comprimento de onda de excitação de 365 nm e um comprimento de onda de emissão de 435 nm.
 - ✓ Tempo de análise de 25 min.

5. Procedimentos

5.1. Procedimento para a determinação das aflatoxinas

O procedimento adotado pela empresa para a determinação das aflatoxinas nos alimentos foi adaptado da norma ISO 16050⁴⁹ e descreve-se da seguinte forma.

5.1.1. Massa de toma e Extração

Numa balança analítica, é pesado num recipiente de plástico cerca de 25 g de amostra com mais 5 g de NaCl (Figura 10). A contaminação é aplicada de forma homogénea sobre o alimento. É realizada então a transferência para um copo misturador de aço inox sendo o recipiente lavado com 125 ml da solução de extração metanol/água (70:30). A homogeneização desta mistura é feita por 3 min em alta velocidade (Figura 11).



Figura 10 - Pesagem da amostra



Figura 11 - Homogeneização da amostra

5.1.2. Filtração

Após a homogeneização realiza-se uma primeira filtração com o uso de um filtro de papel. De seguida é retirado 15 ml do filtrado para outro matraz sendo adicionado 30 ml de água desionizada e realizada a homogeneização. Realizada a filtragem desta mistura com o uso de um filtro de microfibra de vidro (Figura 12).



Figura 12 - Processos de filtração e diluição

5.1.3. Purificação

Para o processo de purificação, é utilizado a coluna de imunoafinidade. Nela foi presa uma seringa de vidro e este conjunto é colocado na bomba peristáltica. Após a coluna estar pronta é transferido 10 ml do filtrado. Após passar estes 10 ml do filtrado é realizado a limpeza com duas porções de 10 ml de água desionizada (Figura 13).



Figura 13 - Processo de purificação com o uso da coluna de imunoafinidade

5.1.4. Eluição

Terminada a passagem de água, a coluna é retirada da bomba peristáltica e colocada num tubo *Falcon*. É realizada a eluição das aflatoxinas com 1 ml de metanol seguido de 1 ml de água desionizada. A solução obtida é homogeneizada manualmente e vertida para um vial de 2 ml.

O fator de diluição para este processo é dado a partir do seguinte cálculo:

$$FD = 125(V_1) \times 45(V_2) \times 2(V_3) / 10 (V_4) / 15 (V_5) = 75$$

Em que V_1 é o volume de solvente utilizado na extração, V_2 volume total da diluição realizada. V_3 é o volume da eluição final, V_4 é o volume do segundo filtrado que é transferido para a coluna de imunoafinidade. E o V_5 é volume do primeiro filtrado.

5.2. Procedimento para o ensaio da repetibilidade

Para a repetibilidade, o procedimento adotado foi descrito no item 5.1. Realizou-se um conjunto de 10 ensaios para os seguintes alimentos: cárnico, alheira, conserva de peixe, bebida de soja, azeite, massa, prato cozinhado, chocolate, concentrado de tomate, whisky, alimento infantil, gelado, café. Também foi efetuada a determinação das aflatoxinas na amostra de referência, *corn flour*.

Todos os alimentos foram fortificados com uma quantidade específica de cada aflatoxina. Na Tabela 10 encontra-se o volume adicionado em cada alimento, bem como a respetiva solução padrão utilizada.

Tabela 10 - Aliquota adicionada a cada alimento para a determinação da repetibilidade

Alimento	Volume	Alimento	Volume
Cárnico	600 µL solução padrão 1	Chocolate	500 µL solução padrão 1
Alheira	1750 µL solução padrão 1	Concentrado de tomate	1500 µL solução padrão 1
Conserva de peixe	750 µL solução padrão 2	Whisky	60 µL solução padrão 2
Bebida de soja	1000 µL solução padrão 2	Alimento infantil	400 µL solução padrão 2
Azeite	1000 µL solução padrão 1	Gelado	1250 µL solução padrão 1
Massa	750 µL solução padrão 1	Café	5000 µL solução padrão 2
Prato cozinhado	2000 µL solução padrão 2		

5.3. Procedimento para o ensaio da precisão intermédia

Para a precisão intermédia foram analisados 3 tipos de alimentos diferentes em duplicado no decorrer de 5 dias. O procedimento adotado foi o que consta no item 5.1. Os alimentos analisados foram: pistachio, farinha de milho e amendoim.

5.4. Procedimento para o ensaio da recuperação

Este ensaio foi realizado através da contaminação de 8 alimentos diferentes em quadruplicado. Na Tabela 11 encontra-se qual solução padrão é utilizada em cada alimento. O procedimento adotado foi o que consta no item 5.1. Os alimentos analisados foram: alimento infantil, whisky, alheira, massa, azeite, bebida de soja, concentrado de tomate e prato cozinhado.

Tabela 11 - Aliquota adicionada a cada alimento para a determinação da recuperação

Alimento	Volume	Alimento	Volume
Alheira	1750 µL solução padrão 1	Bebida de soja	1000 µL solução padrão 2
Concentrado de tomate	1500 µL solução padrão 1	Whisky	60 µL solução padrão 2
Azeite	1000 µL solução padrão 1	Alimento infantil	400 µL solução padrão 2
Massa	750 µL solução padrão 1	Prato cozinhado	2000 µL solução padrão 2

6. Resultados

6.1. Quantificação

6.1.1. Curva de calibração

A partir da análise feita dos padrões estabelecidos na Tabela 9, foram obtidos os dados da Tabela 12. Este processo foi realizado para cada dia de análise, sendo abaixo apresentados os dados obtidos num dia. No anexo 2 encontra-se as curvas de calibração para os outros dois dias.

Tabela 12 - Dados para realização da curva de calibração para cada aflatoxina

Aflatoxina G2		Aflatoxina G1	
Concentração (ng/ml)	Área	Concentração (ng/ml)	Área
0,104	387,769	0,104	304,559
0,208	568,301	0,208	443,892
0,521	1427,623	0,521	1103,049
1,042	2814,881	1,042	2162,835
2,084	5899,722	2,085	4593,948
10,42	28161,344	10,425	21988,743
Aflatoxina B2		Aflatoxina B1	
Concentração (ng/ml)	Área	Concentração (ng/ml)	Área
0,104	1468,908	0,103	843,972
0,208	2183,966	0,207	1276,91
0,519	5597,092	0,517	3141,818
1,039	11203,752	1,035	6466,117
2,077	22502,108	2,069	12834,879
5,193	55741,633	5,173	32443,83
10,385	109322,302	10,346	64413,359

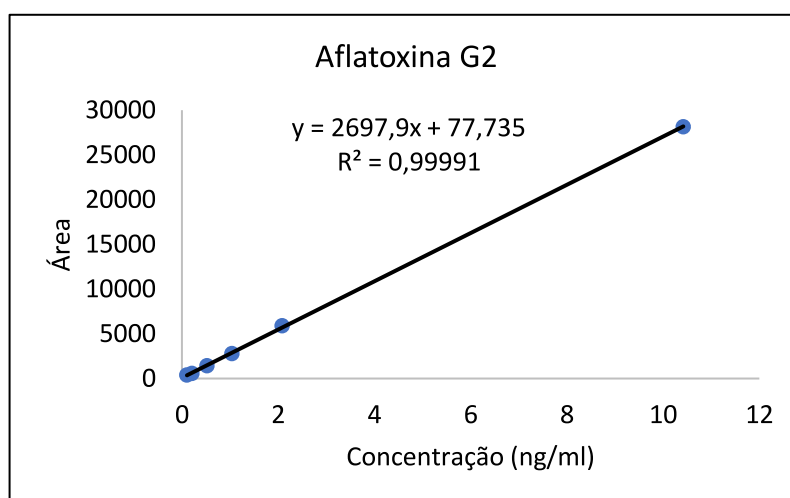


Figura 14 - Curva de calibração para a aflatoxina G2

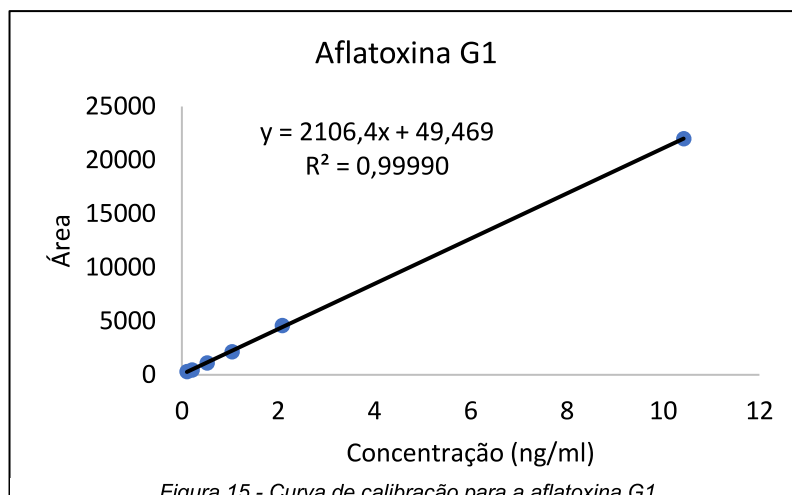


Figura 15 - Curva de calibração para a aflatoxina G1

Na Figura 14 está representada a curva de calibração para a aflatoxina G2 que tem a seguinte equação da reta $y = 2697,9x + 77,735$. Possui um R^2 de 0,99991 e um coeficiente de correlação linear de 0,99995. Na Figura 15 encontra-se a curva de calibração para a aflatoxina G1 que apresenta a seguinte equação da reta $y = 2106,4x + 49,469$. O R^2 obtido foi de 0,99990 e o coeficiente de correlação linear de 0,99995.

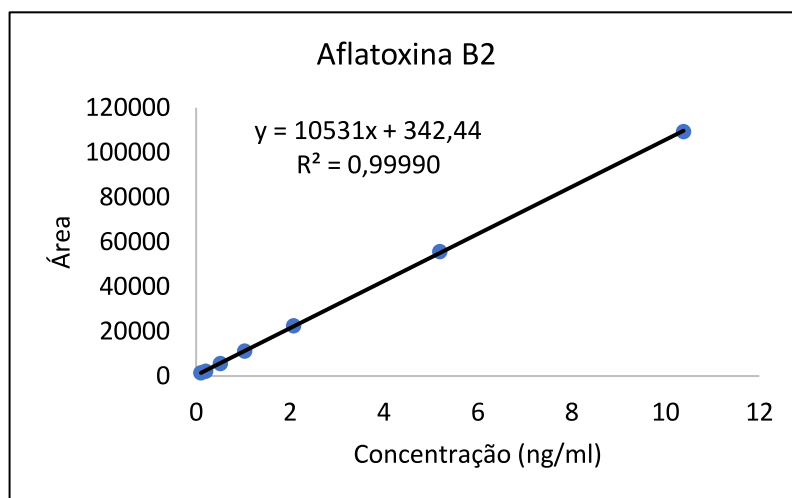


Figura 16 - Curva de calibração para a aflatoxina B2

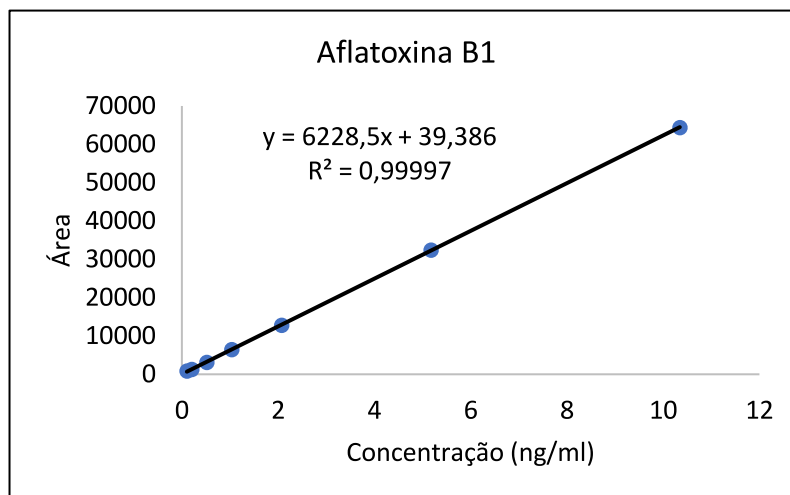


Figura 17 - Curva de calibração para a aflatoxina B1

Na Figura 16 está representada a curva de calibração para a aflatoxina B2 que tem a seguinte equação da reta $y = 10531x + 342,44$. Obtido um R^2 de 0,99990 e um coeficiente de correlação linear de 0,99995. Na Figura 17 encontra-se a curva de calibração para a aflatoxina B1 que apresenta a seguinte equação da reta $y = 6228,5x + 39,386$. O R^2 obtido foi de 0,99997 e o coeficiente de correlação linear foi de 0,99999.

Verifica-se que os valores obtidos para o coeficiente de correlação linear, r , de todas as curvas de calibração das aflatoxinas são muito próximos de 1,0. Isto expressa uma boa correlação entre as duas variáveis utilizadas, a área do pico e a concentração da aflatoxina. Os valores obtidos para o R^2 de todas as aflatoxinas, também apresentaram estar próximos de 1,0. Portanto, pode-se dizer que este modelo linear se ajusta ao conjunto de dados.

No anexo 1 encontram-se os cromatogramas obtidos para o padrão de concentração mais baixa e para o padrão de concentração mais alta. Observa-se que os picos das aflatoxinas têm tempos de retenção similares aos registrados no cromatograma da amostra de referência.

A partir destes resultados, foram realizados os testes da área normalizada, teste de Rikilt e o teste pela norma ISO 8466-1, para se verificar a linearidade do método.

6.1.1.1. Teste da área normalizada

Para o teste da área normalizada foram obtidos os resultados apresentados nas Tabelas 13 e 14, sendo já realizado o ajuste com a retirada de valores fora do limite permitido. Estes limites estão compreendidos entre os 85% e 110%. Como os resultados se encontraram dentro do limite permitido, significa que a curva de calibração possui linearidade.

Tabela 13 - Teste da área normalizada para as aflatoxinas G2 e G1

Aflatoxina G2				
Concentração (ng/ml)	Área experimental (Ae)	Área teórica (At)	Ae/At	Área normalizada
0,208	568,301	638,8982	0,89	101,09
0,521	1427,623	1483,3409	0,96	101,39
1,042	2814,881	2888,9468	0,97	99,96
2,084	5899,722	5700,1586	1,04	104,75
10,42	28161,344	28189,853	1,00	100,00
Aflatoxina G1				
Concentração (ng/ml)	Área experimental (Ae)	Área teórica (At)	Ae/At	Área normalizada
0,208	443,892	487,6002	0,91	101,18
0,521	1103,049	1146,9034	0,96	100,38
1,042	2162,835	2244,3378	0,96	98,41
2,085	4593,948	4441,313	1,03	104,46
10,425	21988,743	22008,689	1,00	100,00

Tabela 14 - Teste da área normalizada para as aflatoxinas B2 e B1

Aflatoxina B2				
Concentração (ng/ml)	Área experimental (Ae)	Área teórica (At)	Ae/At	Área normalizada
0,208	2183,966	2532,888	0,86	99,74
0,519	5597,092	5808,029	0,96	102,45
1,039	11203,752	11284,149	0,99	102,43
2,077	22502,108	22215,327	1,01	102,92
5,193	55741,633	55029,923	1,01	101,97
10,385	109322,302	109706,88	1,00	100,00
Aflatoxina B1				
Concentração (ng/ml)	Área experimental (Ae)	Área teórica (At)	Ae/At	Área normalizada
0,207	1276,91	1328,6855	0,961	99,08
0,517	3141,818	3259,5205	0,964	97,61
1,035	6466,117	6485,8835	0,997	100,35
2,069	12834,879	12926,1525	0,993	99,64
5,173	32443,83	32259,4165	1,006	100,74
10,346	64413,359	64479,447	0,999	100,00

6.1.1.2. Teste Rikilt

Para o teste de Rikil foram obtidos os resultados apresentados na Tabela 15, sendo já realizado também o ajuste com a retirada de valores fora do limite permitido.

Estes limites estão compreendidos entre os 90% e 110%. Como se tem os resultados também dentro dos limites permitidos para todas as aflatoxinas, tem-se uma curva linear.

Tabela 15 - Teste de Rikilt aplicado as aflatoxinas G2, G1, B2 e B1

Aflatoxina G2			
Concentração (ng/ml)	Área experimental (Ae)	R(y/x)	%
0,208	568,301	2732,22	99,66
0,521	1427,623	2740,16	99,95
1,042	2814,881	2701,42	98,54
2,084	5899,722	2830,96	103,26
10,42	28161,344	2702,62	98,58
Média		2741,48	100
Aflatoxina G1			
Concentração (ng/ml)	Área experimental (Ae)	R(y/x)	%
0,208	443,892	2134,10	100,29
0,521	1103,049	2117,18	99,50
1,042	2162,835	2075,66	97,54
2,085	4593,948	2203,33	103,54
10,425	21988,743	2109,23	99,12
Média		2127,90	100
Aflatoxina B2			
Concentração (ng/ml)	Área experimental (Ae)	R(y/x)	%
0,208	2183,966	10499,84	93,88
0,519	5597,092	10784,38	96,43
1,039	11203,752	10783,21	96,42
2,077	22502,108	10833,95	96,87
5,193	55741,633	10733,99	95,98
10,385	109322,302	10526,94	94,13
Média		10693,72	100
Aflatoxina B1			
Concentração (ng/ml)	Área experimental (Ae)	R(y/x)	%
0,207	1276,91	6168,65	99,51
0,517	3141,818	6077,02	98,03
1,035	6466,117	6247,46	100,78
2,069	12834,879	6203,42	100,07
5,173	32443,83	6271,76	101,17
10,346	64413,359	6225,92	100,43
Média		6199,04	100

6.1.1.3. Teste norma ISO 8466-1

Para o teste feito pela norma ISO 8466-1 foram obtidos os resultados apresentados na Tabela 16. É considerado um valor de F de 5,05 com 5% de probabilidade. Os valores de PG para todas as aflatoxinas são menores que o valor de F. Logo, tem-se que as respectivas curvas de calibração são lineares.

Tabela 16 - Resultados obtidos para o teste da norma ISO 8466-1

Aflatoxinas	DS ²	S ² _{y2}	PG
G2	-3,92 x10 ¹⁷	8,55 x10 ¹⁶	4
G1	-1,46 x10 ¹⁷	3,18 x10 ¹⁶	4
B2	-7,44 x10 ¹⁹	1,68 x10 ¹⁹	4
B1	-8,97 x10 ¹⁸	2,02 x10 ¹⁸	4

Com base nos resultados obtidos pelos três testes realizados, teste da área normalizada, teste de Rikilt e a norma ISO é possível confirmar a linearidade de cada curva de calibração. Isto é possível através das percentagens obtidas, em que estas encontraram-se dentro do intervalo estabelecido para cada teste. Por isso, conclui-se que o método apresenta linearidade.

6.1.2. Limiares analíticos

A partir dos resultados relatados na Tabela 12 e com o auxílio das equações 7 e 8 foi possível obter o valor para o limite de detecção e o valor para o limite de quantificação para cada aflatoxina. Estes resultados estão apresentados na Tabela 17.

Tabela 17 - Resultados obtidos para os limites de detecção e quantificação

Aflatoxina	Sy/x	b	LD (ng/ml)	LQ (ng/ml)
G2	117,35	2697,91	0,144	0,435
G1	94,17	2106,38	0,148	0,447
B2	426,70	10531,25	0,134	0,405
B1	134,33	6228,54	0,071	0,216

6.1.3. Sensibilidade

Como a curva de calibração mostrou ser uma função linear, a sensibilidade do método será constante ao longo de toda a gama de trabalho e com isso, sendo igual ao

declive da reta. Logo, a sensibilidade para cada aflatoxina está representada na Tabela 18.

Tabela 18 - Resultados obtidos para a sensibilidade de cada aflatoxina

Afla	Equação da reta	Sensibilidade
G2	$y = 2697,91x + 77,735$	2697,9
G1	$y = 2106,38x + 49,469$	2106,4
B2	$y = 10531,25x + 342,44$	10531
B1	$y = 6228,54x + 39,386$	6228,5

6.2. Exatidão – Análise da amostra de referência

Os resultados obtidos para a análise da amostra referência (MRC), do *corn flour*, encontraram-se dentro do intervalo estabelecido pelo fabricante. Na Tabela 19 encontram-se os resultados obtidos para os 3 dias de análise. Na Tabela 20 encontra-se o erro relativo e os valores de t-student. Para o erro relativo obtiveram-se percentagens abaixo dos 20%. Para o teste t-student, uma vez que t calculado é menor que o t tabelado, não se tem uma diferença significativa entre o valor médio e o valor de referência. Portanto, conclui-se que o método mostrou ser exato para a determinação das micotoxinas.

A detecção dos picos das aflatoxinas pelo cromatograma efetuou-se através dos tempos de retenção para cada uma. As aflatoxinas G2, G1, B2 e B1 possuem um tempo de retenção cerca de 11,6 min; 13,9 min; 15,8 min e 19,2 min, respetivamente, como pode ser visto na Figura 18.

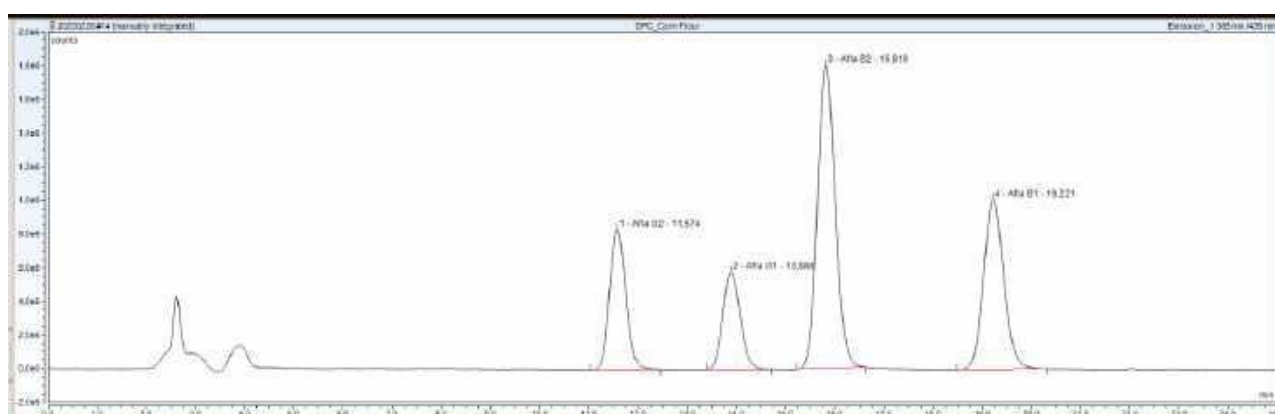


Figura 18 - Cromatograma obtido para a amostra de referência com os respetivos picos das aflatoxinas G2, G1, B2 e B1

Tabela 19 - Resultados obtidos para a amostra de referência nos 3 dias de análise

18/10/2019				
	Massa	Aflatoxina	Área	Resultado (µg/kg)
Corn Flour	13,095	G2	2307,83	4,32
		G1	1677,35	3,88
		B2	5635,78	3,15
		B1	3042,23	2,84
25/10/2019				
	Massa	Aflatoxina	Área	Resultado (µg/kg)
Corn Flour	13,33	G2	1912,52	3,83
		G1	1687,81	4,38
		B2	5780,98	2,91
		B1	3769,28	3,37
05/11/2019				
	Massa	Aflatoxina	Área	Resultado (µg/kg)
Corn Flour	13,072	G2	2101,47	4,29
		G1	1638,73	4,36
		B2	5718,51	3,35
		B1	3394,43	3,44

Tabela 20 - Erro relativo e valores de t-student para a amostra de referência.

Aflatoxina	Resultados (µg/kg)				X _m	ER (%)	S	t _c	t _r (α = 0,05)
G2	4,32	3,83	4,29	4,15	7,85	0,275	2,228	4,303	
G1	3,88	4,38	4,36	4,21	12,36	0,283	3,630		
B2	3,15	2,91	3,35	3,14	12,02	0,220	2,647		
B1	2,84	3,37	3,44	3,22	10,92	0,328	1,672		

6.3. Especificidade/Seletividade

Para o estudo da especificidade/seletividade do método realizou-se o ensaio de recuperação. Nas tabelas 21-24 encontram-se as respectivas soluções padrões utilizadas para cada alimento, os valores experimentais obtidos e os teóricos e a % de recuperação. Para a obtenção destes resultados fez-se uso das equações 1 a 3.

Tabela 21 - Resultados obtidos para o ensaio de recuperação da aflatoxina G2

Amostra	Alimento infantil	Whisky	Alheira	Massa	Azeite	Bebida de Soja	Cocen. de Tomate	Prato cozinhado
Aflatoxina					G2			
Concentração do padrão (ng/ml)	20,84	20,84	417	417	417	20,84	417	20,84
Volume adicionado (ml)	0,40	0,60	1,75	0,75	1,00	1,00	1,50	2,00
Valor experimental (µg/kg)	0,30	0,44	29,37	11,55	15,68	0,73	22,14	1,56
Concentração final (µg/ml)	0,111	0,167	9,730	4,170	5,560	0,278	8,340	0,556
Valor teórico (µg/kg)	0,33	0,50	29,19	12,51	16,68	0,83	25,02	1,67
% Recuperação	90,0	88,0	100,6	92,3	94,0	87,0	88,5	93,3
% Média					91,70			
Desvio Padrão (%)					4,42			
CV (%)					4,83			
t _{cal}					5,30			

Tabela 22 - Resultados obtidos para o ensaio de recuperação da aflatoxina G1

Amostra	Alimento infantil	Whisky	Alheira	Massa	Azeite	Bebida de Soja	Cocen. de Tomate	Prato cozinhado
Aflatoxina					G1			
Concentração do padrão (ng/ml)	20,85	20,85	417	417	417	20,85	417	20,85
Volume adicionado (ml)	0,40	0,60	1,75	0,75	1,00	1,00	1,50	2,00
Valor real (µg/kg)	0,33	0,42	25,23	11,01	14,66	0,68	22,75	1,33
Concentração final (µg/ml)	0,111	0,167	9,730	4,170	5,560	0,278	8,340	0,556
Valor teórico (µg/kg)	0,33	0,50	29,19	12,51	16,68	0,83	25,02	1,67
% Recuperação	99,7	84,4	86,4	88,0	87,9	81,2	90,9	79,7
% Média					87,29			
Desvio Padrão (%)					6,21			
CV (%)					7,11			
t _{cal}					5,79			

Para a aflatoxina G2, a percentagem de recuperação das aflatoxinas nos alimentos (Tabela 21) apresenta valores dentro dos limites recomendados. A percentagem média de recuperação foi de 91,70% com um desvio padrão de 4,42%. Além de um baixo valor do desvio padrão, o coeficiente de variação também apresentou um baixo valor. Com isso, pode-se dizer que as percentagens de recuperação das aflatoxinas para cada alimento mostraram ser homogêneas. Considerando um t tabelado de 5,41 para 99,9% de confiança, o teste t de student, revelou um t calculado de 5,30. Logo, tem-se um t calculado $<$ t tabelado o que leva a concluir que não há diferença significativa entre o valor médio e o valor de referência.

As mesmas conclusões podem ser tomadas para a aflatoxina G1, com base nos resultados apresentados na Tabela 22. A percentagem média de recuperação foi de 87,29% com um desvio padrão de 6,21%. Além de um baixo valor do desvio padrão, o coeficiente de variação também apresentou um baixo valor. Para o teste t de student neste caso, é considerado um t tabelado de 6,08 com 99,95% de confiança. O t calculado obtido foi de 5,79, logo também não há uma diferença significativa entre o valor médio e o valor de referência.

Tabela 23 - Resultados obtidos para o ensaio de recuperação da aflatoxina B2

Amostra	Alimento infantil	Whisky	Alheira	Massa	Azeite	Bebida de Soja	Cocen. de Tomate	Prato cozinhado
Aflatoxina	B2							
Concentração do padrão (ng/ml)	20,77	20,77	415	415	415	20,77	415	20,77
Volume adicionado (ml)	0,40	0,60	1,75	0,75	1,00	1,00	1,50	2,00
Valor real (µg/kg)	0,29	0,41	27,54	10,77	15,00	0,65	19,91	1,23
Concentração final (µg/ml)	0,111	0,166	9,683	4,150	5,533	0,277	8,300	0,554
Valor teórico (µg/kg)	0,33	0,50	29,05	12,45	16,60	0,83	24,90	1,66
% Recuperação	87,3	82,3	94,8	86,5	90,4	78,5	80,0	73,7
% Média					84,18			
Desvio Padrão (%)					6,85			
CV (%)					8,14			
t _{cal}					6,53			

Tabela 24 - Resultados obtidos para o ensaio de recuperação da aflatoxina B1

Amostra	Alimento infantil	Whisky	Alheira	Massa	Azeite	Bebida de Soja	Cocen. de Tomate	Prato cozinhado
Aflatoxina					B1			
Concentração do padrão (ng/ml)	20,69	20,69	414	414	414	20,69	414	20,69
Volume adicionado (ml)	0,40	0,60	1,75	0,75	1,00	1,00	1,50	2,00
Valor real (µg/kg)	0,27	0,3775	23,3875	10,325	13,915	0,68	20,06	1,1975
Concentração final (µg/ml)	0,110	0,166	9,660	4,140	5,520	0,276	8,280	0,552
Valor teórico (µg/kg)	0,33	0,50	28,98	12,42	16,56	0,83	24,84	1,66
% Recuperação	81,6	76,0	80,7	83,1	84,0	82,2	80,8	72,3
% Média	80,09							
Desvio Padrão (%)	3,94							
CV (%)	4,92							
t_{cal}	14,30							

Na Tabela 23 tem-se as percentagens de recuperação obtidas para a aflatoxina B2 que apresentaram estar dentro dos limites recomendados pelo regulamento. A percentagem média obtida foi de 84,18% e um desvio padrão de 6,85%. O coeficiente de variação também apresentou um baixo valor, com 8,14 concluindo-se então que os dados obtidos apresentaram ser homogêneos. No teste t de student, o t tabelado considerado é de 7,89 com um α de 0,0001. O t calculado foi de 6,53, logo não há uma diferença significativa entre o valor médio e o valor de referência.

Na Tabela 24 estão apresentadas as percentagens de recuperação obtidas para a aflatoxina B1 que se encontram dentro dos limites estabelecidos pelo regulamento. A percentagem média obtida foi de 80,09% e um desvio padrão de 3,94%. O coeficiente de variação também apresentou um baixo valor, com 4,92. Portanto, os dados obtidos apresentaram ser homogêneos. No teste t de student, o t tabelado considerado é de 15,77 com um α de 0,000001. O t calculado foi de 14,30, logo não há uma diferença significativa entre o valor médio e o valor de referência.

Com base em todos estes resultados para as aflatoxinas, é possível verificar que os ensaios de recuperação se encontram dentro dos limites estabelecidos pelo regulamento, logo o método apresenta ser seletivo/específico.

6.4. Precisão

6.4.1. Repetibilidade

A partir dos resultados obtidos foi possível calcular a concentração do analito para cada um dos ensaios (ng/ml), o valor médio, o desvio padrão, o coeficiente de variação (%) e o limite relativo da repetibilidade (%). Foi aplicado o teste de Grubbs aos resultados obtidos para cada alimento para verificar a existência de valores discrepantes em relação ao conjunto de dados. Em alguns casos somente foi necessário realizar o teste uma única vez, tendo como resultado aceitável. Porém, em outros, ao realizar o teste verificou-se a necessidade de se descartar alguns valores, sendo então realizado novamente o teste tendo como resultado aceitável. Nas Tabelas 25 – 32 encontram-se estes resultados.

Tabela 25 - Resultados obtidos para a repetibilidade da aflatoxina G2 (em ng/mL nos ensaios)

Aflatoxina G2						
Matriz	Café	Gelado	Alimento infantil	Whisky	Cárnico	Conserva de peixe
Ensaio 1	0,21	5,33	0,08	0,14	2,88	0,09
Ensaio 2	0,19	5,27	0,09	0,14	2,42	0,12
Ensaio 3	0,20		0,11	0,14		0,10
Ensaio 4	0,19	5,69	0,10	0,15	2,54	
Ensaio 5	0,15	5,29	0,07	0,15	2,14	0,11
Ensaio 6	0,15	5,47	0,09	0,12	2,88	0,12
Ensaio 7	0,18	5,37	0,09	0,15	2,47	0,11
Ensaio 8	0,18	5,37	0,09	0,14	2,28	0,08
Ensaio 9	0,15	5,00	0,08	0,13	2,15	0,12
Ensaio 10	0,18	4,91	0,11	0,14	2,11	0,07
Valor médio	0,18	5,30	0,09	0,14	2,43	0,10
Desvio Padrão (%)	0,021	0,221	0,011	0,008	0,281	0,016
CV (%)	11,86	4,17	12,34	5,67	11,55	15,43
LRR (%)	32,88	11,57	34,20	15,71	32,03	42,76
Condição	Aceitável	Aceitável	Aceitável	Aceitável	Aceitável	Aceitável

Tabela 26 - Resultados obtidos para a repetibilidade da aflatoxina G2 (em ng/mL nos ensaios) - Continuação

Aflatoxina G2							
Matriz	Aleira	Massa	Azeite	Bebida de Soja	Conc. de tomate	Chocolate	Prato cozinhado
Ensaio 1	9,40	3,78	5,19	0,22	6,31	1,79	0,43
Ensaio 2	9,92	3,72	5,15	0,26	6,92	2,06	0,40
Ensaio 3	10,39	3,55	4,92	0,26	6,89	2,16	0,40
Ensaio 4	9,12	3,81	5,43	0,24	7,40	2,17	0,46
Ensaio 5	9,71	3,37	5,21	0,16	7,00	2,33	0,50
Ensaio 6	9,05	3,98	4,83	0,18	7,23	2,20	0,49
Ensaio 7	9,40	3,71	5,22	0,23	7,03	2,18	0,58
Ensaio 8	9,09	3,83	5,24	0,21	8,04	1,96	0,48
Ensaio 9		3,64	4,97	0,16	6,80	2,01	0,44
Ensaio 10	8,53	3,85	5,09	0,16	6,58	1,95	0,51
Valor médio	9,40	3,72	5,13	0,21	7,02	2,08	0,47
Desvio Padrão (%)	0,517	0,164	0,169	0,038	0,448	0,148	0,052
CV (%)	5,50	4,41	3,29	18,41	6,38	7,11	11,11
LRR (%)	15,24	12,23	9,13	51,04	17,69	19,71	30,80
Condição	Aceitável	Aceitável	Aceitável	Aceitável	Aceitável	Aceitável	Aceitável

Nas Tabelas 25 e 26 são apresentados os resultados para a aflatoxina G2 para os alimentos analisados. Nas duas tabelas é possível notar que os valores do coeficiente de variação foram inferiores ao limite de repetibilidade relativo. Estes dados apresentam na sua grande maioria serem homogêneos, ou seja, os valores mostraram ser pouco dispersivos em relação ao valor médio.

Os resultados para a aflatoxina G1 são apresentados nas Tabelas 27 e 28 para os alimentos analisados. As mesmas conclusões feitas para a aflatoxina G2 podem ser feitas para a aflatoxina G1, pois nas duas tabelas é possível notar que os valores do coeficiente de variação também foram inferiores ao limite de repetibilidade relativo. Portanto, apresentam ser na sua grande maioria homogêneos, ou seja, os valores mostraram ser pouco dispersivos em relação ao valor médio.

Tabela 27 - Resultados obtidos para a repetibilidade da aflatoxina G1 (em ng/mL nos ensaios)

Aflatoxina G1						
Matriz	Café	Gelado	Alimento infantil	Whisky	Cárnico	Conserva de peixe
Ensaio 1	0,85	4,96	0,10	0,14	2,60	0,06
Ensaio 2	0,79	4,84	0,11	0,14	2,03	0,11
Ensaio 3	0,76		0,12			0,07
Ensaio 4	0,79	5,25	0,10	0,14	2,10	
Ensaio 5	0,70	4,83	0,09	0,13	1,64	0,08
Ensaio 6	0,76	5,13	0,09		2,50	0,09
Ensaio 7	1,03	4,91	0,11	0,13	2,14	0,11
Ensaio 8	0,95	4,98	0,11	0,14	1,83	0,06
Ensaio 9	0,75	4,51	0,08	0,13	1,70	0,08
Ensaio 10	0,94	4,56	0,13	0,14	1,64	0,04
Valor médio	0,83	4,89	0,10	0,14	2,02	0,08
Desvio Padrão (%)	0,101	0,226	0,014	0,004	0,336	0,022
CV (%)	12,18	4,63	13,30	2,86	16,62	27,76
LRR (%)	33,76	12,83	36,88	7,93	46,08	76,96
Condição	Aceitável	Aceitável	Aceitável	Aceitável	Aceitável	Aceitável

Tabela 28 - Resultados obtidos para a repetibilidade da aflatoxina G1 (em ng/mL nos ensaios) - Continuação

[illegible]

Para a aflatoxina B2, os resultados obtidos encontram-se nas Tabelas 29 e 30. Os valores do coeficiente de variação apresentados nas duas tabelas são inferiores a 20% e estão abaixo do limite de repetibilidade relativo. Esta baixa percentagem traduz-se em dados homogêneos e com pouca dispersão em relação ao valor médio. Nota-se também que o desvio padrão esteve abaixo de 1,0 para todos os alimentos.

Tabela 29 - Resultados obtidos para a repetibilidade da aflatoxina B2 (em ng/mL nos ensaios)

Aflatoxina B2						
Matriz	Café	Gelado	Alimento infantil	Whisky	Cárnico	Conserva de peixe
Ensaio 1	0,56	5,28	0,08	0,13	2,69	0,16
Ensaio 2	0,50	5,33	0,07	0,14	2,73	0,17
Ensaio 3	0,48		0,10	0,13		0,16
Ensaio 4	0,46	5,65	0,09		2,76	
Ensaio 5	0,36	5,33	0,07	0,13		0,14
Ensaio 6	0,39	5,52	0,09		2,81	0,16
Ensaio 7	0,38	5,31	0,09	0,13	2,65	0,15
Ensaio 8	0,43	5,44	0,09	0,13	2,75	0,14
Ensaio 9	0,40	4,95	0,07	0,13	2,73	0,14
Ensaio 10	0,42	4,96	0,10	0,13	2,78	0,13
Valor médio	0,44	5,31	0,09	0,13	2,74	0,15
Desvio Padrão (%)	0,059	0,218	0,010	0,003	0,045	0,014
CV (%)	13,47	4,10	11,91	1,89	1,66	9,49
LRR (%)	37,33	11,38	33,01	5,23	4,59	26,30
Condição	Aceitável	Aceitável	Aceitável	Aceitável	Aceitável	Aceitável

Tabela 30 - Resultados obtidos para a repetibilidade da aflatoxina B2 (em ng/mL nos ensaios) - Continuação

Aflatoxina B2							
Matriz	Aleira	Massa	Azeite	Bebida de Soja	Conc. de tomate	Chocolate	Prato cozinhado
Ensaio 1	8,76	3,56	5,05	0,20		1,45	0,37
Ensaio 2	9,28	3,52	4,73	0,21	6,33	1,70	0,37
Ensaio 3	9,63	3,58	4,51	0,24	6,42	1,72	0,34
Ensaio 4	8,99	3,56	5,13	0,19	6,51	1,74	0,40
Ensaio 5	9,07		4,91	0,15	6,38	1,84	0,40
Ensaio 6	8,03	3,55	4,74	0,15	6,45	1,83	0,40
Ensaio 7	8,37	3,53	5,00	0,22	6,54	1,81	0,39
Ensaio 8	8,09	3,62	5,04	0,20		1,55	0,41
Ensaio 9		3,50	4,94	0,13	6,51	1,65	0,40
Ensaio 10	8,22	3,68	4,96	0,14	6,43	1,61	0,42
Valor médio	8,72	3,57	4,90	0,18	6,45	1,69	0,39
Desvio Padrão (%)	0,536	0,050	0,177	0,036	0,067	0,120	0,022
CV (%)	6,15	1,41	3,61	19,42	1,04	7,13	5,70
LRR (%)	17,03	3,91	10,00	53,83	2,88	19,76	15,80
Condição	Aceitável	Aceitável	Aceitável	Aceitável	Aceitável	Aceitável	Aceitável

Para a aflatoxina B1, os resultados obtidos encontram-se nas Tabelas 31 e 32. As conclusões a serem feitas para esta aflatoxina são as mesmas que foram feitas para a aflatoxina B2. Portanto, o valor do coeficiente de variação ficou abaixo dos 20% e abaixo do limite de repetibilidade relativo. Esta baixa percentagem traduz-se em dados homogêneos e com pouca dispersão em relação ao valor médio. Nota-se também que o desvio padrão esteve abaixo de 1,0 para todos os alimentos.

Tabela 31 - Resultados obtidos para a repetibilidade da aflatoxina B1 (em ng/mL nos ensaios)

Aflatoxina B1						
Matriz	Café	Gelado	Alimento infantil	Whisky	Cárnico	Conserva de peixe
Ensaio 1	0,71	4,88	0,08	0,12	2,36	0,14
Ensaio 2	0,69	4,98	0,08	0,11	2,42	0,15
Ensaio 3	0,62		0,09	0,11		0,17
Ensaio 4	0,65	5,29	0,08	0,14	2,36	
Ensaio 5	0,64	5,08	0,08	0,12	2,55	0,10
Ensaio 6	0,67	5,16	0,09		2,23	0,13
Ensaio 7	0,63	5,08	0,08	0,12	2,31	0,12
Ensaio 8	0,63	5,33	0,08	0,12	2,34	0,11
Ensaio 9	0,69	4,68	0,07	0,12	2,30	0,10
Ensaio 10	0,67	4,66	0,10	0,12	2,34	0,10
Valor médio	0,66	5,02	0,08	0,12	2,36	0,12
Desvio Padrão (%)	0,029	0,226	0,009	0,008	0,084	0,023
CV (%)	4,32	4,51	10,45	6,63	3,56	18,99
LRR (%)	11,98	12,50	28,96	18,37	9,86	52,63
Condição	Aceitável	Aceitável	Aceitável	Aceitável	Aceitável	Aceitável

Tabela 32 - Resultados obtidos para a repetibilidade da aflatoxina B1 (em ng/mL nos ensaios) - Continuação

[illegible]

Pelo facto de não haver outro método para comparar os resultados da precisão, utilizam-se valores teóricos de repetibilidade, por exemplo, a partir da equação de Horwit, de forma a se avaliar a aceitabilidade dos resultados para a precisão do método. Para tal é utilizado os valores da Horrat que é dado pela equação 14.

Com o auxílio dos resultados das Tabelas 25 a 32, obtém-se os valores para o DPR_r e para o HO_r , que são apresentados na Tabela 33. Como se vê, os valores para HO_r são inferiores a 2, logo os resultados obtidos para a repetibilidade são considerados adequados para este método⁵⁰.

Tabela 33 - Resultados obtidos para o CV (%), DPR_r e HO_r para as aflatoxinas G2, G1, B2 e B1, na repetibilidade

Matriz	DPR_r	Afla	CV (%)	HO_r	Afla	CV (%)	HO_r	Afla	CV (%)	HO_r	Afla	CV (%)	HO_r
Café	16	G2	11,86	0,74	G1	12,18	0,76	B2	13,47	0,84	B1	4,32	0,27
Gelado			4,17	0,26		4,63	0,29		4,10	0,26		4,51	0,28
Alimento infantil			12,34	0,77		13,30	0,83		11,91	0,74		10,45	0,65
Whisky			5,67	0,35		2,86	0,18		1,89	0,12		6,63	0,41
Conserva de peixe			15,43	0,96		27,76	1,74		9,49	0,59		18,99	1,19
Cárnico			11,55	0,72		16,62	1,04		1,66	0,10		3,56	0,22
Alheira			5,50	0,34		7,38	0,46		6,15	0,38		6,55	0,41
Massa			4,41	0,28		3,47	0,22		1,41	0,09		3,00	0,19
Azeite			3,29	0,21		5,59	0,35		3,61	0,23		6,88	0,43
Bebida de Soja			18,41	1,15		14,61	0,91		19,42	1,21		18,36	1,15
Cocen. de Tomate			6,38	0,40		5,79	0,36		1,04	0,06		3,86	0,24
Chocolate			7,11	0,44		7,27	0,45		7,13	0,45		6,49	0,41
Prato cozinhado			11,11	0,69		6,00	0,38		5,70	0,36		7,13	0,45

6.4.2. Precisão intermédia

A partir dos resultados apresentados na Tabela 34, onde se encontra a concentração para cada duplicado correspondente a cada aflatoxina de cada alimento estudado, foram calculados o desvio padrão, o coeficiente de variação e o limite da precisão intermédia.

Tabela 34 - Resultados obtidos para a precisão intermédia das aflatoxinas G2, G1, B2 e B1. Resultados obtidos para o cálculo do valor de Horrat.

Amostra	Aflatoxina G2		Aflatoxina G1		Aflatoxina B2		Aflatoxina B1	
	Ensaio A	Ensaio B	Ensaio A	Ensaio B	Ensaio A	Ensaio B	Ensaio A	Ensaio B
Pistacho	0,74	0,77	1,65	1,60	1,46	1,51	7,60	7,92
	0,92	0,93	1,76	1,76	1,82	1,87	9,32	9,41
	0,78	0,78	1,54	1,52	1,55	1,6	8,11	8,24
	0,82	0,88	1,56	1,67	1,61	1,75	8,27	8,99
	0,78	0,88	1,46	1,63	1,60	1,78	7,89	8,72
Farinha de milho	0,95	0,92	0,94	0,92	1,52	1,47	1,64	1,70
	1,05	1,05	0,98	0,98	1,67	1,66	2,13	2,14
	1,07	1,10	1,00	1,06	1,70	1,73	1,90	1,99
	1,05	1,11	0,98	1,04	1,68	1,76	1,96	2,04
	1,05	1,12	0,95	1,00	1,70	1,78	1,89	1,96
Amendoim	1,41	1,53	2,10	2,25	1,29	1,40	5,03	5,36
	1,69	1,69	2,50	2,52	1,67	1,66	6,03	6,06
	1,68	1,73	2,38	2,49	1,58	1,61	5,90	6,12
	1,62	1,59	2,33	2,31	1,52	1,49	5,81	5,75
	1,62	1,64	2,19	2,21	1,53	1,53	5,65	5,50
Desvio padrão	0,038		0,055		0,055		0,227	
Coeficiente de variação (%)	1,08		1,11		1,13		1,41	
Limite da precisão intermédia (%)	3,04		3,11		3,16		3,94	
DPRr	16							
HOr	0,07		0,07		0,07		0,09	

Com base nos valores obtidos na Tabela 34, os valores para o desvio padrão mostraram ser baixos, ou seja, apresentaram uma dispersão baixa com relação ao valor esperado. O mesmo pode ser dito para o coeficiente de variação que apresentou valores por volta dos 1%, que é um valor muito baixo tendo em conta o fator do tempo (dias distintos) que pode afetar o desempenho do método.

Para a precisão intermédia também se calculou o valor de Horrat, como mostrado na Tabela 34. Os valores obtidos também são inferiores a 2, portanto estes resultados obtidos são considerados adequados para este método.

A partir de todos os resultados obtidos para a repetibilidade e para a precisão intermédia, pode-se dizer que o método mostrou ser preciso. Tanto na repetibilidade quanto na precisão intermédia é possível se observar um valor baixo tanto do coeficiente de variação quanto do desvio padrão quanto do valor de Horrat.

7. Conclusão

A realização da validação de um método é de extrema importância para um laboratório, pois certifica que os métodos utilizados neste fornecem resultados confiáveis. Portanto, ao analisar uma amostra qualquer no qual se suspeita a presença de substâncias perigosas para a saúde, como, por exemplo, as micotoxinas, é preciso ter a certeza que o método utilizado irá fornecer um resultado correto e não um falso negativo.

A validação deve ser feita sempre que um método sofrer algum tipo de modificação, seja por alterar alguma técnica ou por uso de algum equipamento diferente. Também é realizada a validação quando é aplicado um novo método.

Para a validação do método da determinação das aflatoxinas em alimentos, realizada na presente empresa, obtiveram-se os resultados apresentados anteriormente.

Para a análise da amostra de referência foi possível observar que os resultados obtidos estavam dentro do intervalo certificado pelo fabricante. O que mostra que o método além de eficiente, é exato para a determinação da micotoxina.

A curva de calibração obteve um coeficiente de correlação linear muito próximo de 1,0, o que expressa uma boa correlação entre as variáveis estabelecidas. Pelos testes feitos, Rikilt, área normalizada e norma ISSO 8466-1, chega-se a conclusão de que o método apresenta linearidade.

No estudo da repetibilidade é visto que os valores do coeficiente de variação para cada aflatoxina mostraram ser pouco dispersivos em relação ao valor médio. Isto deve-se a estes apresentarem baixos valores de percentagens. Comparando-se estes valores com os valores teóricos obtidos pela equação de Horrat, se conclui que os resultados obtidos para a repetibilidade são adequados para o método aplicado. O mesmo pode ser dito para o estudo da precisão intermédia.

No estudo da recuperação obteve-se percentagens acima dos 70%. As percentagens obtidas encontraram-se dentro do limite recomendado pelo regulamento. Portanto, o método mostra-se ser específico/seletivo para as aflatoxinas.

Após realizado a análise de todos os parâmetros da validação, chega-se a uma conclusão a respeito do método adotado. O presente método então, apresentou ser seletivo/específico, com linearidade, exato e preciso. Portanto o método adotado pela empresa mostra-se ser adequado para a determinação de micotoxinas em vários alimentos.

8. Planeamento futuro

Devido ao estágio ter sido suspenso por alguns meses por conta da pandemia Covid-19 presente neste ano de 2020, não foi possível realizar a validação do método para a determinação da Zearalenona nos alimentos. Contudo, o planeamento para a sua validação consistia nos seguintes quesitos:

- Escolha da mistura de solventes mais adequada para a extração;
- Confirmação dos limites de deteção e de quantificação;
- Estudo da repetibilidade;
- Estudo da precisão intermédia;
- Ensaio de recuperação.

Os alimentos a serem estudados seriam: preparado para pudim, sobremesa, chocolate, pizza, folhado, farinha láctea, puré, ração, bolacha, cereal, farinha, pão, concentrado de tomate e fruto seco.

O método a ser validado consistia no seguinte processo:

- Pesagem de 55 g da amostra com 5 g de Cloreto de Sódio (NaCl);
- Solvente de extração, Acetonitrilo/Água (60:40) com volume de 150 ml;
- Extração realizada por 4 min com o uso de agitadores;
- Filtração com papel de filtro (V_1);
- Diluição, 10 ml do filtrado num balão volumétrico de 50 ml perfeito com água;
- Filtração com papel de microfibra de vidro (V_2);
- Clean-up com o uso da coluna de imunoafinidade, eluindo todo o filtrado (V_2), de seguida 20 ml de água;
- Eluição, 2 x 460 μ l Actonitrilo + 160 μ l Metanol + 920 μ l Água;
- Análise por HPLC com detetor de fluorescência.

Este método seria validado devido à alteração na parte da eluição, visto que no método antigo era feito a eluição com 4 ml de metanol, seguido da evaporação por azoto e diluição com a fase móvel. Esta alteração seria feita para que fosse reduzido o gasto de gás azoto.

A validação do método consistia na determinação dos seguintes parâmetros: análise da amostra de referência, curva de calibração, limites de deteção e de quantificação, linearidade, sensibilidade, especificidade/seletividade, repetibilidade e precisão intermédia.

Referências Bibliográficas

- (1) Silliker. Silliker Portugal <https://www.merieuxnutrisciences.com/pt/silliker-portugal>.
- (2) Zhang, Z.; Hu, X.; Zhang, Q.; Li, P. Determination for Multiple Mycotoxins in Agricultural Products Using HPLC-MS/MS via a Multiple Antibody Immunoaffinity Column. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci.* **2016**, *1021*, 145–152. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2016.02.035>.
- (3) Hoyos Ossa, D. E.; Hincapié, D. A.; Peñuela, G. A. Determination of Aflatoxin M1 in Ice Cream Samples Using Immunoaffinity Columns and Ultra-High Performance Liquid Chromatography Coupled to Tandem Mass Spectrometry. *Food Control* **2015**, *56*, 34–40. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.03.011>.
- (4) Zöllner, P.; Jodlbauer, J.; Lindner, W. Determination of Zearalenone in Grains by High-Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry after Solid-Phase Extraction with RP-18 Columns or Immunoaffinity Columns. *J. Chromatogr. A* **1999**, *858* (2), 167–174. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(99\)00821-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(99)00821-3).
- (5) Murphy, P. A.; Hendrich, S.; Landgren, C.; Bryant, C. M. Food Mycotoxins: An Update. *J. Food Sci.* **2006**, *71* (5). <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2006.00052.x>.
- (6) Rosenberg, E.; Krska, R.; Wissiack, R.; Kmetov, V.; Josephs, R.; Razzazi, E.; Grasserbauer, M. High-Performance Liquid Chromatography-Atmospheric-Pressure Chemical Ionization Mass Spectrometry as a New Tool for the Determination of the Mycotoxin Zearalenone in Food and Feed. *J. Chromatogr. A* **1998**, *819* (1–2), 277–288. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(98\)00462-2](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(98)00462-2).
- (7) Berthiller, F.; Crews, C.; Dall'Asta, C.; Saeger, S. D.; Haesaert, G.; Karlovsky, P.; Oswald, I. P.; Seefelder, W.; Speijers, G.; Stroka, J. Masked Mycotoxins: A Review. *Mol. Nutr. Food Res.* **2013**, *57* (1), 165–186. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201100764>.
- (8) Wang, Y.; Chai, T.; Lu, G.; Quan, C.; Duan, H.; Yao, M.; Zucker, B. A.; Schlenker, G. Simultaneous Detection of Airborne Aflatoxin, Ochratoxin and Zearalenone in a Poultry House by Immunoaffinity Clean-up and High-Performance Liquid Chromatography. *Environ. Res.* **2008**, *107* (2), 139–144. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2008.01.008>.
- (9) Embrapa. Micotoxinas: Importância Na Alimentação e Na Saúde Humana e Animal. **2007**.
- (10) Betina, V. *Mycotoxins: Production, Isolation, Separation, and Purification*, 1984th ed.; Elsevier.
- (11) Peraica, M.; Radić, B.; Lucić, A.; Pavlović, M. Toxic Effects of Mycotoxins in Humans. *Bull. World Health Organ.* **1999**, *77* (9), 754–766.
- (12) Jinap, S.; De Rijk, T. C.; Arzandeh, S.; Kleijnen, H. C. H.; Zomer, P.; Van der Weg, G.; Mol, J. G. J. Aflatoxin Determination Using In-Line Immunoaffinity Chromatography in Foods. *Food Control* **2012**, *26* (1), 42–48. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.12.007>.
- (13) Iqbal, S. Z.; Asi, M. R.; Jinap, S.; Rashid, U. Detection of Aflatoxins and Zearalenone Contamination in Wheat Derived Products. *Food Control* **2014**, *35* (1), 223–226. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.06.048>.

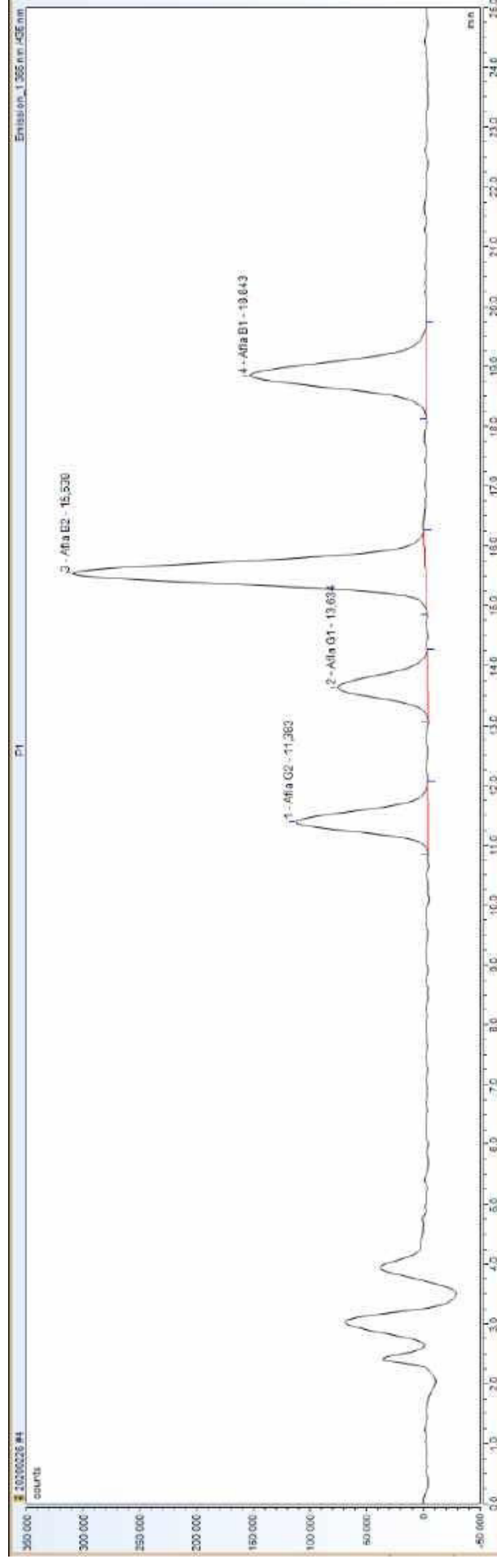
- (14) Jornal Oficial da União Européia. *REGULAMENTO (CE) N. o 1881/2006 DA COMISSÃO de 19 de Dezembro de 2006 Que Fixa Os Teores Máximos de Certos Contaminantes Presentes Nos Géneros Alimentícios*; 2005; pp 1–54.
- (15) IARC. Chemical and Physical Characteristics of the Principal Mycotoxins. *IARC Sci. Publ.* **2012**, No. 158, 31–38.
- (16) Iamanaka, B. T.; Oliveira, I. S.; Taniwaki, M. H. Micotoxinas Em Alimentos. *An. Acad. Pernambucana Ciênc. Agronômica* **2013**, 7 (0), 138–161.
- (17) Seo, J. A.; Yu, J. H. Toxigenic Fungi and Mycotoxins. *Handb. Ind. Mycol.* **2004**, 56 (1), 689–722. <https://doi.org/10.1201/9780203970553>.
- (18) Sobrova, P.; Adam, V.; Vasatkova, A.; Beklova, M.; Zeman, L.; Kizek, R. Deoxynivalenol and Its Toxicity. *Interdiscip. Toxicol.* **2010**, 3 (3), 94–99. <https://doi.org/10.2478/v10102-010-0019-x>.
- (19) Visconti, A.; Pascale, M. Determination of Zearalenone in Corn by Means of Immunoaffinity Clean-up and High-Performance Liquid Chromatography with Fluorescence Detection. *J. Chromatogr. A* **1998**, 815 (1), 133–140. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(98\)00296-9](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(98)00296-9).
- (20) IARC. Mycotoxins and Human Health. *IARC Sci. Publ.* **2012**, No. 158, 87–104.
- (21) Ibáñez-Vea, M.; Corcuera, L. A.; Remiro, R.; Murillo-Arbizu, M. T.; González-Peñas, E.; Lizarraga, E. Validation of a UHPLC-FLD Method for the Simultaneous Quantification of Aflatoxins, Ochratoxin A and Zearalenone in Barley. *Food Chem.* **2011**, 127 (1), 351–358. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.12.157>.
- (22) Travis R Bui-Klimke; Felicia Wu. Ochratoxin A and Human Health Risk: A Review of the Evidence. *Physiol. Behav.* **2016**, 176 (1), 139–148. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2017.03.040>.
- (23) Zhong, L.; Carere, J.; Lu, Z.; Lu, F.; Zhou, T. Patulin in Apples and Apple-Based Food Products: The Burdens and the Mitigation Strategies. *Toxins* **2018**, 10 (11), 1–30. <https://doi.org/10.3390/toxins10110475>.
- (24) Welke, J. E.; Hoeltz, M.; Dottori, H. A.; Noll, I. B. Ocorrência, Aspectos Toxicológicos, Métodos Analíticos e Controle Da Patulina Em Alimentos. *Cienc. Rural* **2009**, 39 (1), 300–308. <https://doi.org/10.1590/s0103-84782009000100052>.
- (25) de Pádua, R. A. F.; Machinski Junior, M. Aspectos Toxicológicos e Ocorrência de Patulina Em Suco de Maçã. *Semina Ciênc. Agrár.* **2005**, 26 (4), 535. <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2005v26n4p535>.
- (26) Harris, D. C. *HARRIS - QUÍMICA ANALÍTICA - 4ª Ed.*; 2011.
- (27) Skoog, D. A.; Crouch, F. J. H.; West, D. M. *Fundamentos de Química Analítica*; 2013; Vol. 53. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>.
- (28) Collins, C. H.; Braga, G. L.; Bonato, P. S. *Introducao a Metodos Cromatograficos*; 1997.
- (29) Harris, D. C. *Análise Química Quantitativa, 8ª Edição*.
- (30) Maldaner, L.; Jardim, I. C. S. F. O Estado Da Arte Da Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência. *Química Nova* **2009**, 32 (1), 214–222. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422009000100036>.
- (31) Chust, R. B. Introdução Cromatografia de Líquidos. *Bol. Soc. Port. Quím.* **1990**, 43–54.

- (32) José Santos-neto, Á. Uma Visão Técnica Para Compreensão e Resolução de Problemas Em Sistemas de Cromatografia Líquida. *Sci. Chromatogr.* **2009**, 1 (2), 83–96. <https://doi.org/DOI 10.1007/s10008-008-0735-8>.
- (33) Amado, M. A. (2002). Métodos Imunológicos Na Detecção e Determinação de Aflatoxinas Em Alimentos, Vantagens e Inconvenientes. **1394**, No. Figura 1.
- (34) Moser, A. C.; Hage, D. S. Immunoaffinity Chromatography, an Introduction to Applications and Recent Developments. *Power* **2011**, 2 (4), 769–790. <https://doi.org/10.4155/bio.10.31.Immunoaffinity>.
- (35) Xie, J.; Wang, L.; Wu, W.; Ou, J. Recent Advances on Determination Methods of Mycotoxins and Marine Biotoxins. *Med. Res.* **2018**, 2 (3), 1–7. <https://doi.org/10.21127/yaoyimr20180011>.
- (36) Pereira, V. L.; Fernandes, J. O.; Cunha, S. C. Mycotoxins in Cereals and Related Foodstuffs: A Review on Occurrence and Recent Methods of Analysis. *Trends Food Sci. Technol.* **2014**, 36 (2), 96–136. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2014.01.005>.
- (37) Berk, Z. Chapter 11 - Extraction. *Food Sci. Technol.* **2009**, 259–277.
- (38) ANVISA. Resolução - RE Nº 899, de 29 de Maio de 2003. 2011.
- (39) INMETRO. Orientação Sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos. **2007**, 25.
- (40) BRITO, N. M.; DE AMARANTE JUNIOR, O. P.; POLESE, L.; RIBEIRO, M. L. Validação De Métodos Analíticos: Estratégia E Discussão. *Pestic. Rev. Ecotoxicologia E Meio Ambiente* **2003**, 13, 129–146. <https://doi.org/10.5380/pes.v13i0.3173>.
- (41) Relacre. *Guia Relacre 13 - Validação de Métodos Internos de Ensaio Em Análise Química*; 2000; Vol. 13.
- (42) RELACRE. *Gui Relacre 3 - Validação de Resultados Em Laboratórios Químicos*; 1996. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>.
- (43) RELACRE. *Guia Relacre 9 - Alguns Exemplos de Cartas de Controlo Em Laboratórios de Análise Química*; 1998. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>.
- (44) Melo, E. P. de A. A Importância da Validação de Métodos Analíticos <https://revistaanalytica.com.br/a-importancia-da-validacao-de-metodos-analiticos/#> (accessed Mar 5, 2020).
- (45) ANVISA. RESOLUÇÃO DA DIRETORIA COLEGIADA - RDC Nº 166, DE 24 DE JULHO DE 2017; 2017; Vol. 2017.
- (46) Junior, E. J. A. G; Roeder, J. S.; Oliveira, K. B. L.; Ferreira, M. P. e Silva, J. G. *Validação de Método Espectrofotométrico de Análise Para a Quantificação de Ácido Acetilsalicílico Em Formulações Farmacêuticas: Uma Proposta de Aula Experimental Para Análise Instrumental*.
- (47) Comissão Europeia. REGULAMENTO (UE) N.º 519/2014 DA COMISSÃO de 16 de Maio de 2014. 2014.
- (48) INMETRO. Doq-Cgcre-008 - Orientação Sobre Validação De Métodos Analíticos. *Inst. Nac. Metrol. Qual. E Tecnol.* **2016**, 31.
- (49) International Standard. Foodstuffs — Determination of Aflatoxin B1, and the Total Content of Aflatoxins B1, B2, G1 and G2 in Cereals, Nuts and Derived Products — High Performance Liquid Chromatographic Method. *61010-1 @ lec2001* **2006**, 2006, 13.

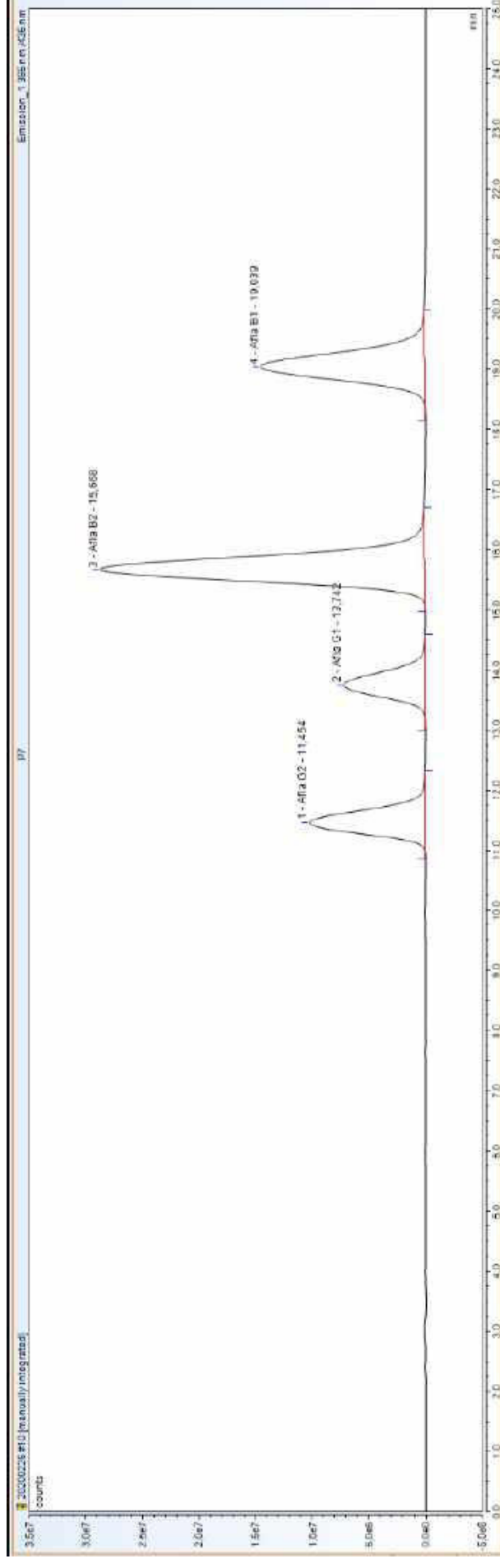
- (50) Paschoal, J. A. R.; Rath, S.; Airoidi, F. P. D. S.; Reyes, F. G. R. Validação de Métodos Cromatográficos Para a Determinação de Resíduos de Medicamentos Veterinários Em Alimentos. *Química Nova* **2008**, 31 (5), 1190–1198. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422008000500048>.
- (51) Ok, H. E.; Choi, S. W.; Kim, M.; Chun, H. S. HPLC and UPLC Methods for the Determination of Zearalenone in Noodles, Cereal Snacks and Infant Formula. *Food Chem.* **2014**, 163, 252–257. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.04.111>.
- (52) Maziero, M. T.; Bersot, L. S. Micotoxinas Em Alimentos Produzidos No Brasil. *Rev. Bras. Prod. Agroindustriais* **2010**, 12 (1), 89–99. <https://doi.org/10.15871/1517-8595/rbpa.v12n1p89-99>.
- (53) Rogowska, A.; Pomastowski, P.; Sagandykova, G.; Buszewski, B. Zearalenone and Its Metabolites: Effect on Human Health, Metabolism and Neutralisation Methods. *Toxicon* **2019**, 162, 46–56. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2019.03.004>.
- (54) Krska, R.; Kos, G. EMAN: Internet Training Course on Modern Sample Preparation Techniques for the Determination of Mycotoxins. *Eur. Mycotoxin Aware. Netw. EMAN* **2000**, No. EC project QLK1-CL-2000-01248, 1–11.
- (55) Thompson, M.; Ellison, S. L. R.; Wood, R. Harmonized Guidelines for Single-Laboratory Validation of Methods of Analysis (IUPAC Technical Report). *Pure Appl. Chem.* **2002**, 74 (5), 835–855. <https://doi.org/10.1351/pac200274050835>.
- (56) Sengoku, T.; Morita, K.; Sakuma, S.; Motoyama, Y.; Goto, T. *Possible Inhibitory Mechanism of FK506 (Tacrolimus Hydrate) Ointment for Atopic Dermatitis Based on Animal Models*; 1999; Vol. 379. [https://doi.org/10.1016/S0014-2999\(99\)00500-2](https://doi.org/10.1016/S0014-2999(99)00500-2).

Anexo 1

Cromatograma do padrão mais baixo



Cromatograma do padrão mais alto



Anexo 2 – Curvas de calibração

Curva de calibração do dia 18/10/2019

Aflatoxina G2

Pontos	Conc. (ng/ml)	Área
1	0,104	332,317
2	0,208	645,458
3	0,521	1542,52
4	1,042	3203,659
5	2,084	6398,702
6	5,21	15893,719
7	10,42	31823,468

Aflatoxina G1

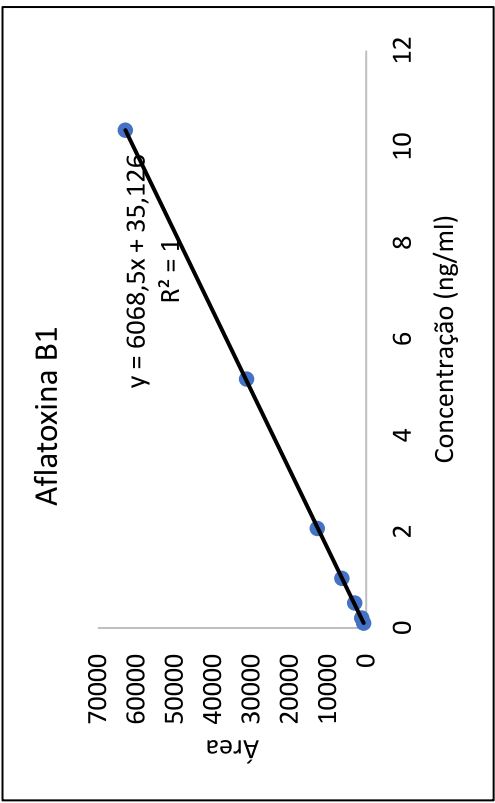
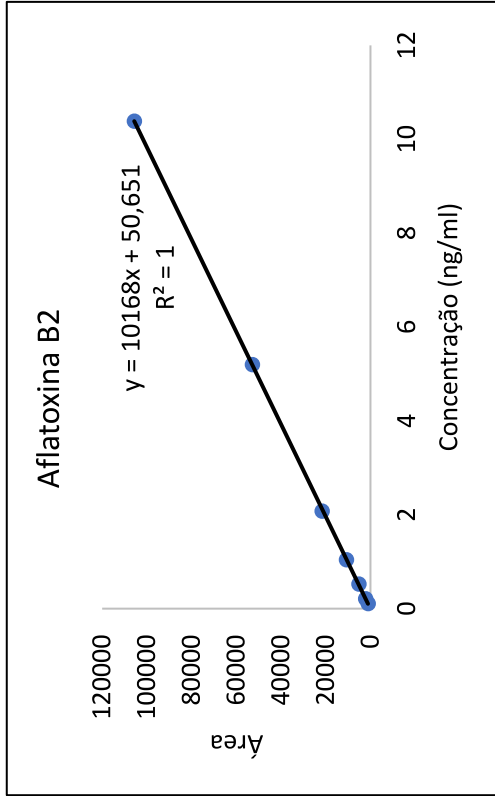
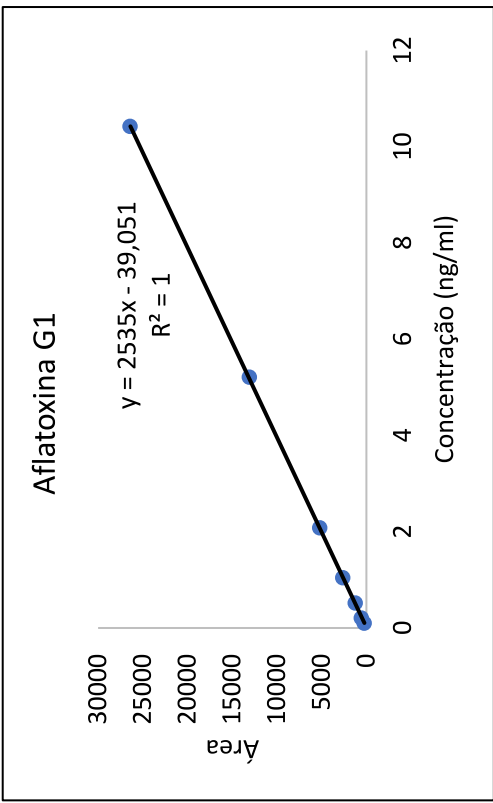
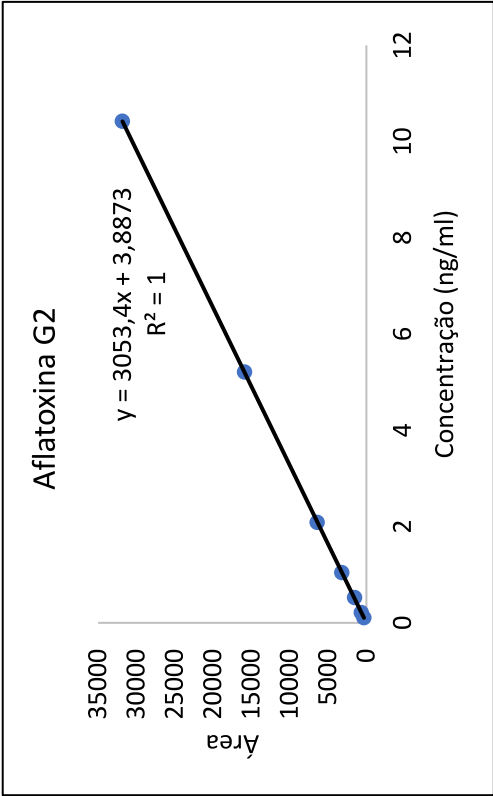
Pontos	Conc. (ng/ml)	Área
1	0,104	245,115
2	0,208	550,814
3	0,521	1254,775
4	1,042	2633,45
5	2,085	5197,705
6	5,212	13083,151
7	10,425	26439,816

Aflatoxina B2

Pontos	Conc. (ng/ml)	Área
1	0,104	1030,043
2	0,208	2108,448
3	0,519	5145,224
4	1,039	10646,34
5	2,077	21538,23
6	5,193	52817,71
7	10,385	105593,8

Aflatoxina B1

Pontos	Conc. (ng/ml)	Área
1	0,103	669,798
2	0,207	1233,269
3	0,517	3049,97
4	1,035	6395,286
5	2,069	12830,804
6	5,173	31228,761
7	10,346	62870,782



Curva de calibração do dia 05/11/2019

Aflatoxina G2

Pontos	Conc. (ng/ml)	Área
1	0,104	272,112
2	0,208	606,562
3	0,521	1533,155
4	1,042	3007,137
5	2,084	5582,33
6	5,21	14308,178
7	10,42	28076,355

Aflatoxina G1

Pontos	Conc. (ng/ml)	Área
1	0,104	263,578
2	0,208	502,12
3	0,521	1215,872
4		
5	2,085	4243,617
6	5,212	10977,635
7	10,425	21697,714

Aflatoxina B2

Pontos	Conc. (ng/ml)	Área
1	0,104	926,839
2	0,208	2028,077
3	0,519	5145,071
4	1,039	10300,78
5	2,077	20934,543
6	5,193	51706,216
7	10,385	105017,478

Aflatoxina B1

Pontos	Conc. (ng/ml)	Área
1	0,103	580,208
2	0,207	1129,463
3	0,517	3004,349
4	1,035	5836,747
5	2,069	11896,711
6	5,173	30113,406
7	10,346	60640,641

