

Implementação e validação de um método analítico para a determinação de patulina em produtos à base de maçã por cromatografia líquida de alta eficiência com detetor ultravioleta

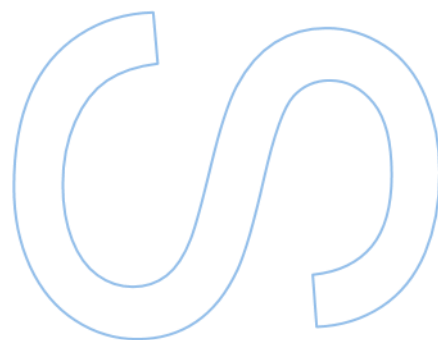
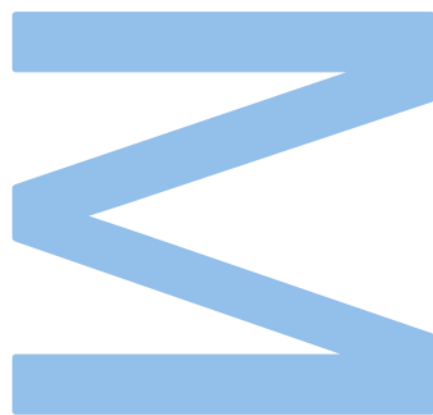
Diogo Miguel de Oliveira Gomes

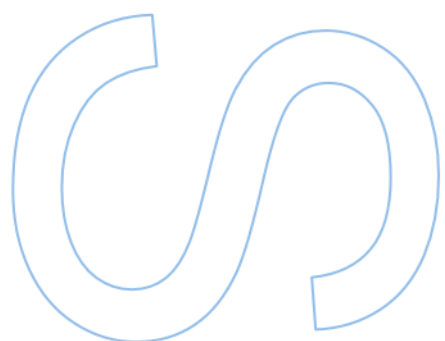
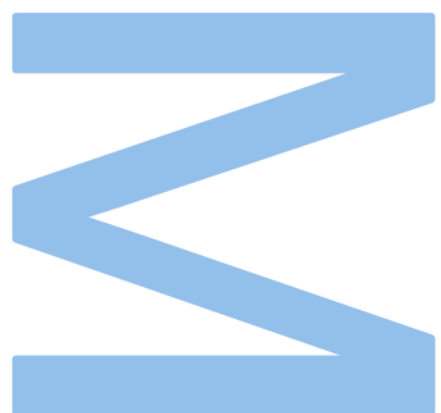
Mestrado em Métodos Avançados e Acreditação em Análise Química

Departamento de Química e Bioquímica
2023

Orientador

Paulo Almeida, Professor Auxiliar, FCUP





Agradecimentos

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer à FCUP e a todos os professores que ajudaram no meu percurso académico e contribuíram para o meu desenvolvimento pessoal e profissional.

De seguida, gostaria de agradecer à Silliker Portugal, S.A. por me terem mostrado como funcionava o ambiente empresarial e por possibilitar as condições necessárias para a realização deste relatório. Agradeço também às Eng.^a Alice Santos e Laura Sousa, que estiveram sempre disponíveis para me ajudar e por me terem dado motivação ao longo do meu estágio e aos restantes colegas da empresa, em especial, à Daniela, Andreia, Rita, Raúl, Jefferson, Joana, Olga, Isabel, Patrícia, Débora e Clariana, por toda a ajuda e bons momentos que me ofereceram.

Além disso, quero agradecer ao Professor Paulo Almeida, o meu orientador de estágio, por toda a ajuda, preocupação e dedicação indispensável para a realização deste trabalho.

Por fim, quero agradecer aos meus pais, aos meus amigos e à minha restante família, pela paciência e motivação que me deram ao longo dos anos, para poder seguir os meus sonhos.

Resumo

A validação de um método analítico é importante para mostrar que pela aplicação do método consegue-se obter resultados credíveis e adequados.

O presente trabalho, desenvolvido no âmbito do estágio na Silliker Portugal, S.A., teve como objetivo a implementação e validação de um novo método para a determinação de patulina em produtos à base de maçã.

A patulina é uma micotoxina produzida por vários fungos pertencentes aos géneros *Penicillium*, *Aspergillus*, *Paecilomyces* e *Byssochlamys*, tendo a tendência a aparecer em produtos à base de frutas e vegetais. Em termos de toxicidade, a exposição à patulina pode causar danos nos rins, no sistema imunitário e no sistema digestivo.

A extração da patulina das amostras foi efetuada recorrendo à extração líquido-líquido e à extração em fase sólida e quantificação por cromatografia líquida de alta eficiência com detetor ultravioleta. O método foi validado pela avaliação de vários parâmetros de desempenho: linearidade; gama de trabalho; limite de deteção e limite de quantificação; seletividade; precisão; justeza e incerteza do método, pela análise de dois materiais de referência e pela realização de ensaios de recuperação.

Por este processo de validação foi verificado que pela aplicação do método consegue-se obter resultados com uma elevada precisão e veracidade, apesar de terem uma incerteza considerável, tendo sido também demonstrada a linearidade e a seletividade. O limite de deteção e o limite de quantificação obtidos foram 0,660 µg/kg e 2,00 µg/kg, respetivamente. No final, o método foi devidamente implementado e foi demonstrada a sua adequação para a quantificação de patulina.

Palavras-chave: HPLC, maçã, patulina, validação de métodos.

Abstract

The validation of an analytical method is important to show that by applying the method it is possible to obtain credible and adequate results.

The present work, developed as part of an internship at Silliker Portugal, S.A, aimed to implement and validate a new method for determining patulin in apple-based products.

Patulin is a mycotoxin produced by several fungi belonging to the genera *Penicillium*, *Aspergillus*, *Paecilomyces* and *Byssoschlamys*, and tends to appear in fruit and vegetable products. In terms of toxicity, exposure to patulin can cause damage to the kidneys, immune system and digestive system.

The extraction of patulin from the samples was carried out by using liquid-liquid extraction and solid phase extraction and quantification by high-performance liquid chromatography with an ultraviolet detector. The method was validated by evaluating several performance parameters: linearity; working range; limit of detection and limit of quantification; selectivity; precision; accuracy and uncertainty of the method, by analyzing two reference materials and conducting recovery tests.

Through this validation process, it was verified that by applying the method it is possible to obtain results with high precision and veracity, despite having considerable uncertainty, the linearity and selectivity were also demonstrated. The limit of detection and limit of quantification obtained were 0.660 µg/kg and 2.00 µg/kg, respectively. In the end, the method was properly implemented and its suitability for patulin quantification was demonstrated.

Keywords: apple, HPLC, method validation, patulin.

Índice

Lista de Tabelas	vii
Lista de Figuras	ix
Lista de Equações	xi
Lista de Abreviaturas, Siglas e Acrónimos	xiii
1. Introdução	1
1.1. Enquadramento	1
1.2. A empresa Silliker Portugal, S.A.	1
1.3. Programação de estágio e atividades realizadas	2
1.4. Micotoxinas	2
1.4.1. Aflatoxinas	3
1.4.2. Ocratoxina A	5
1.4.3. Desoxinivalenol	6
1.4.4. Zearalenona	6
1.4.5. Patulina	8
1.5. Validação e verificação de métodos analíticos	11
1.6. Parâmetros de desempenho	12
1.6.1. Linearidade	12
1.6.1.1. Curva de calibração	13
1.6.1.2. Coeficiente de correlação linear	15
1.6.1.3. Teste de Mandel	15
1.6.2. Gama de trabalho	16
1.6.4. Limiares analíticos	17
1.6.5. Seletividade/Especificidade	18
1.6.6. Precisão	18
1.6.6.1. Repetibilidade	19
1.6.6.2. Precisão intermédia	20
1.6.7. Veracidade/Justeza	21

1.6.8.	Incerteza	21
1.6.8.1.	Abordagem “passo a passo”	22
1.6.8.2.	Abordagem empírica baseados nos dados de validação	23
1.7.	Ferramentas utilizadas na validação de um método	25
1.7.1.	Cálculo da estimativa central e de dispersão	26
1.7.2.	Branco	26
1.7.3.	Ensaio de recuperação	27
1.7.4.	Amostra diária de controlo do processo	27
1.7.5.	Materiais de referência	28
1.7.6	Ensaio interlaboratoriais	28
1.7.6.1.	Ensaio interlaboratoriais de aptidão	28
1.7.6.2.	Ensaio interlaboratoriais de normalização	29
1.7.6.3.	Avaliação do desempenho	29
1.7.7.	Cartas de controlo de médias ou indivíduos	30
1.7.8.	Teste de Grubbs	31
1.7.9.	Teste de Cochran	32
1.8.	Cromatografia líquida	32
2.	Parte Experimental	37
2.1.	Campo de aplicação	37
2.2.	Resumo do processo	37
2.3.	Reagentes e solventes	38
2.4.	Equipamentos, materiais e software	39
2.5.	Soluções padrão de patulina	40
2.6.	Procedimento experimental	41
2.6.1.	Pré – tratamento	41
2.6.2.	Extração	41
2.6.3.	Remoção dos compostos ácidos interferentes	41
2.6.4.	Preparação da solução amostra	42

2.6.5.	Ensaio de recuperação	42
2.6.6.	Fase móvel	43
2.6.7.	Condições cromatográficas	43
2.7.	Resultados	44
2.8.	Pontos críticos	45
2.9.	Fluxograma	46
3.	Resultados e discussão	47
3.1.	Otimização do método	47
3.1.1.	Otimização da fase móvel	47
3.1.2.	Otimização da limite de quantificação	50
3.1.3.	Otimização do processo de extração	51
3.2.	Parâmetros de validação	51
3.2.1.	Curva de calibração e linearidade	51
3.2.2.	Gama de trabalho	57
3.2.3.	Limites Analíticos	58
3.2.4.	Seletividade	60
3.2.5.	Precisão	62
3.2.5.1.	Repetibilidade	62
3.2.5.2.	Precisão intermédia	68
3.2.6.	Veracidade/justeza	72
3.2.7.	Incerteza	74
3.3.	Comparação com a metodologia anteriormente aplicada	76
4.	Conclusão	78
5.	Referências Bibliográficas	80

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Informações relativas à empresa Silliker Portugal, S.A	2
Tabela 2 - Teores máximos de patulina afixados no Regulamento (CE) N.º 1881/2006 9	
Tabela 3 - Critérios de desempenho definidos no Regulamento (CE) N.º 401/2006 para a determinação de patulina.....	11
Tabela 4 - Interpretação e avaliação do valor obtido para Z.....	29
Tabela 5 - Lista de reagentes/solventes utilizados	38
Tabela 6 - Lista de equipamento, de materiais, e software utilizados.....	39
Tabela 7 - Concentrações das soluções padrão de patulina	40
Tabela 8 - Lista de matrizes usadas em ensaios de recuperação com o respetivo nível de fortificação de patulina	42
Tabela 9 - Condições cromatográficas utilizadas	43
Tabela 10 - Fases móveis que se testaram durante a otimização do método	48
Tabela 11 - Resultados obtidos para o traçado da curva de calibração	52
Tabela 12 - Resultados obtidos pelo uso do teste de Mandel	54
Tabela 13 - Cálculo do coeficiente de variação obtido para os declives.....	57
Tabela 14 - Resultados obtidos para os 10 ensaios realizados para o padrão de menor e de maior concentração.....	57
Tabela 15 - Resultados obtidos no Teste de F de <i>Snedecor-Fisher</i>	58
Tabela 16 – LD e LQ obtidos	59
Tabela 17 - Resultados obtidos para o ensaio de recuperação para a confirmação experimental do LQ.....	59
Tabela 18 - Resultados obtidos no estudo da seletividade.....	61
Tabela 19 - Resultados obtidos nos 7 ensaios de cada matriz em estudo para a avaliação da repetibilidade	62
Tabela 20 - Resultados obtidos pelo uso do teste de Grubbs para a verificação de valores aberrantes	63
Tabela 21 - Resultados de interesse para o estudo da repetibilidade	64
Tabela 22 - Resultados obtidos pelo uso do teste de Cochran	65
Tabela 23 - Taxas de recuperação obtidas para a sidra de maçã no estudo da repetibilidade	65
Tabela 24 - Divisão das várias matrizes em estudo nas três gamas de concentração definidas	66
Tabela 25 - Resultado do teste de Cochran na gama de concentração baixa.....	66
Tabela 26 - Resultado do teste de Cochran na gama de concentração intermédia.....	67

Tabela 27 - Resultado do teste de Cochran na gama de concentração alta	67
Tabela 28 - Valores finais de CV _r , o r _r e o CV _{r,r} para cada gama de concentração.....	68
Tabela 29 - Avaliação dos duplicados obtidos pela comparação da máxima diferença aceitável com a diferença dos resultados dos duplicados na gama de concentração baixa.....	69
Tabela 30 - Avaliação dos duplicados obtidos pela comparação da máxima diferença aceitável com a diferença dos resultados dos duplicados na gama de concentração intermédia.....	70
Tabela 31 - Avaliação dos duplicados obtidos pela comparação da máxima diferença aceitável com a diferença dos resultados dos duplicados na gama de concentração alta	70
Tabela 32 - Resultados obtidos no estudo da precisão intermédia	71
Tabela 33 - Valores alvo da concentração de patulina e desvio padrão associado retirados dos certificados de cada um dos MR.....	72
Tabela 34 - Resultados obtidos pelo laboratório da análise dos 2 MRC em condições de repetibilidade, a média é posteriormente calculada para ser usada no cálculo do z-score.	72
Tabela 35 - Valores de z-score obtidos no estudo da veracidade dos dois MR.....	73
Tabela 36 - Média das taxas de recuperação obtidas no estudo de veracidade das restantes matrizes.....	73
Tabela 37 - Determinação da incerteza do método para a gama de concentração baixa	75
Tabela 38 - Determinação da incerteza do método para a gama de concentração intermédia, que foi expandida para a gama de concentração alta.....	75

Lista de Figuras

Figura 1 - Logótipo do grupo <i>Mérieux NutriSciences</i> à qual a Silliker Portugal, S.A. pertence.....	1
Figura 2 - Estrutura química da Aflatoxina B1	4
Figura 3 - Estrutura química da Aflatoxina B2	4
Figura 4 - Estrutura química da Aflatoxina G1.....	4
Figura 5 - Estrutura química da aflatoxina G2	4
Figura 6 - Estrutura química da Aflatoxina M1	4
Figura 7 - Estrutura química da Aflatoxina M2	4
Figura 8 - Estrutura química da Ocratoxina A	5
Figura 9 - Estrutura química de desoxinivalenol.....	6
Figura 10 - Estrutura química da zearalenona	7
Figura 11 - Estrutura química da patulina	8
Figura 12 - Exemplo do efeito que a patulina tem na fruta: a fruta ganha uma cor castanha e uma espécie de bolor azul na sua superfície	9
Figura 13 - Esquema da abordagem "passo-a-passo". Adaptado do Guia Eurachem (Ellison Secretary et al., 2009).	23
Figura 14 - Exemplo de uma carta de controlo de médias. Adaptado do Guia (Relacre, 1996).	30
Figura 15 - Exemplo de um cromatograma com a indicação do tempo de retenção (t_r), do tempo morto (t_m) e do tempo que o componente fica retido na fase estacionária (t_s). Adaptado de (Skoog et al., 2007).....	34
Figura 16 - Exemplo de uma bomba usada em HPLC	35
Figura 17 - Exemplo de um injetor automático típico usado em HPLC.....	35
Figura 18 - Exemplos de tamanhos diferentes de colunas	36
Figura 19 - Fluxograma que resume o procedimento experimental.....	46
Figura 20 - Cromatograma obtido com a fase móvel de 99% de solução aquosa de ácido perclórico (0,1%) e 1% de acetonitrilo	47
Figura 21 - Cromatograma obtido pelo uso da fase móvel A.....	48
Figura 22 - Cromatograma obtido pelo uso da fase móvel B.....	49
Figura 23 - Cromatograma obtido pelo uso da fase móvel C	49
Figura 24 - Cromatograma obtido pelo uso da fase móvel D	50
Figura 25 - Cromatograma obtido para uma das soluções padrão de calibração	51
Figura 26 - Curva de calibração de grau 1 da patulina.....	52
Figura 27 - Curva de calibração de grau 2 da patulina.....	53

Figura 28 - Curva de calibração da patulina do dia 31/05/2023.....	54
Figura 29 - Curva de calibração da patulina do dia 07/06/2023.....	55
Figura 30 - Primeira carta de controlo de indivíduos dos declives obtidos	55
Figura 31 - Carta de controlo de médias dos declives da tendência A	56
Figura 32 - Carta de controlo de médias dos declives da tendência B	56
Figura 33 - Cromatograma do branco de reagente	60
Figura 34 - Cromatograma da solução padrão de patulina de concentração igual a 100 ng/mL.....	60
Figura 35 - Cromatograma da amostra não fortificada	61
Figura 36 - Cromatograma da amostra fortificada	61

Lista de Equações

Equação 1 - Equação geral de uma curva de calibração do modelo linear	13
Equação 2 - Declive de uma reta de calibração	13
Equação 3 - Ordenada de origem de uma reta de calibração	14
Equação 4 - Desvio padrão associado à ordenada na origem	14
Equação 5 – Desvio padrão associado ao declive	14
Equação 6 - Desvio padrão residual	14
Equação 7 - Coeficiente de correlação linear (r)	15
Equação 8 - Diferença de variâncias do teste de Mandel.....	15
Equação 9 - Valor de PG do teste de Mandel	15
Equação 10 - Valor de PG do teste F de <i>Snedecor-Fisher</i>	16
Equação 11 - Determinação da sensibilidade do método analítico	17
Equação 12 - Limite de deteção.....	17
Equação 13 - Limite de quantificação	18
Equação 14 - Coeficiente de variação (CV)	19
Equação 15 - Coeficiente de variação da repetibilidade.....	19
Equação 16 - Limite de repetibilidade	19
Equação 17 - Limite de repetibilidade relativo.....	20
Equação 18 - Desvio padrão da precisão intermédia.....	20
Equação 19 - Limite da precisão intermédia	20
Equação 20 - Coeficiente de variação da precisão intermédia.....	20
Equação 21 - <i>Bias</i> na forma absoluta	21
Equação 22 - <i>Bias</i> na forma relativa	21
Equação 23 - Incerteza expandida (U).....	22
Equação 24 - Incerteza associada à precisão intermédia em termos absolutos.....	24
Equação 25 - Incerteza associada à precisão intermédia em termos relativos.....	24
Equação 26 - Incerteza padrão associada à concentração do MR.....	24
Equação 27 - Incerteza padrão associada à concentração do MR em termos relativos	24
Equação 28 - Desvio padrão relativo obtido na análise do MR	25
Equação 29 - Incerteza associada à veracidade na forma relativa.....	25
Equação 30 - Incerteza combinada pela abordagem empírica.....	25
Equação 31 - Média.....	26
Equação 32 - Desvio padrão amostral (s)	26
Equação 33 - Taxa de recuperação	27

Equação 34 - Taxa de recuperação (equação alternativa)	27
Equação 35 - <i>Z-score</i>	29
Equação 36 - Limite superior de aviso	31
Equação 37 - Limite inferior de aviso	31
Equação 38 - Limite superior de controlo	31
Equação 39 - Limite inferior de controlo	31
Equação 40 - Valor de <i>G</i> para o teste de Grubbs	32
Equação 41 - Valor de <i>C</i> do teste de Cochran	32
Equação 42 - Tempo de retenção	34
Equação 43 - Número de pratos teóricos (<i>N</i>)	34
Equação 44 - Resultado final da concentração de patulina em µg/kg	44
Equação 45 - Valor teórico da concentração de patulina num ensaio de recuperação	45
Equação 46 - Massa de patulina adicionada durante um ensaio de recuperação	45
Equação 47 - Curva de calibração de grau 1 da patulina	53
Equação 48 - Curva de calibração de grau 2 da patulina	53

Lista de Abreviaturas, Siglas e Acrónimos

ASTM	American Society for Testing and Materials
CV	Coeficiente de variação
DAD	Detetor de arranjo de díodos (do inglês: <i>Diode array detector</i>)
DON	Desoxinivalenol
EGI	Sociedade de Engenharia e Gestão da Qualidade, Lda.
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática (do inglês: <i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>)
FD	Detetor de fluorescência (do inglês: <i>fluorescence detector</i>)
GC	Cromatografia gasosa
GC-MS	Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (do inglês: <i>Gas chromatography with mass spectrometry</i>)
G.L.	Graus de liberdade
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência (do inglês: <i>High-performance liquid chromatography</i>)
HPLC-UV	Cromatografia líquida com detetor de ultravioleta (do inglês: <i>High-performance liquid chromatography with ultraviolet detector</i>)
IARC	Agência Internacional de Pesquisa em Cancro (do inglês: <i>International Agency for Research on Cancer</i>)
ISO	Organização Internacional de Normalização (do inglês: <i>International Organization for Standardization</i>)
LC	Cromatografia líquida
LCL	Limite de controlo inferior da concentração de um MR
LC-MS/MS	Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa em modo sequencial (do inglês: <i>Liquid chromatography with tandem mass spectrometry</i>)
LD	Limite de deteção
LIA	Limite inferior de aviso
LIC	Limite inferior de controlo
LQ	Limite de quantificação
LSA	Limite superior de aviso
LSC	Limite superior de controlo
MR	Material de referência
MRC	Material de referência certificado
MS	Espectrometria de massa (do inglês: <i>Mass spectrometry</i>)

MS/MS	Espectrometria de massa em modo sequencial (do inglês: <i>Tandem mass spectrometry</i>)
MSPD	Técnica da dispersão da matriz em fase sólida (do inglês: <i>Matrix solid phase dispersion</i>)
RPLC	Cromatografia líquida de fase reversa (do inglês: <i>Reverse-phase liquid chromatography</i>)
SPE	Extração em fase sólida (do inglês: <i>Solid phase extraction</i>)
PEEK	Polieterétercetona (do inglês: <i>Polyether ether ketone</i>)
UCL	Limite de controlo superior da concentração de um MR
UHPLC	Cromatografia líquida de ultra eficiência (do ingles: <i>Ultra-high-performance liquid chromatography</i>)
ZEA	Zearalenona

1. Introdução

1.1. Enquadramento

O trabalho apresentado neste relatório foi realizado no âmbito da unidade curricular de Estágio do Mestrado em Métodos Avançados e Acreditação em Análise Química da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto (FCUP).

Este estágio foi efetuado na Silliker Portugal, S.A., mais concretamente no laboratório de Métodos Instrumentais, tendo como objetivo principal a implementação e a validação de um novo método para a determinação de patulina em produtos à base de maçã por cromatografia líquida de alta eficiência com detetor ultravioleta (HPLC-UV).

1.2. A empresa Silliker Portugal, S.A

A Silliker Portugal, S.A., pertencente ao grupo *Mérieux NutriSciences*, é uma empresa independente de prestação de serviços que se encontra conectada a diversas áreas do setor agroalimentar. Esta empresa surgiu em julho de 1992, no concelho de Vila Nova de Gaia, como a EGI – Sociedade de Engenharia e Gestão da Qualidade, Lda., acabando por rapidamente assumir a posição de líder nacional neste setor. Em março de 2008, a Silliker, uma empresa multinacional norte-americana adquiriu a empresa, resultando na origem da Silliker Portugal, S.A. passando a integrar um dos maiores grupos mundiais na prestação de serviços na área da qualidade e segurança alimentar.



Figura 1 - Logótipo do grupo *Mérieux NutriSciences* à qual a Silliker Portugal, S.A. pertence

Atualmente, a Silliker oferece os seus serviços a empresas de outros setores principalmente nas áreas de ambiente, agroquímicos, bens de consumo, farmacêutica e cosméticos. A empresa tem como objetivo principal fornecer soluções práticas e inovadoras que permitam tornar os sistemas alimentares mais seguros, saudáveis e sustentáveis, uma vez que os clientes precisam mais do que resultados analíticos viáveis.

Tendo um começo na área da microbiologia e em consultadoria, a empresa alargou o âmbito das suas especialidades científicas à análise química, formação, certificação, investigação, rotulagem e análise sensorial.

Tabela 1 - Informações relativas à empresa Silliker Portugal, S.A

Lema	<i>Better Food. Better Health. Better World.</i>
Localização	Canelas, Porto, Portugal
Página oficial	https://www.merieuxnutrisciences.com/pt/quem-somos/

1.3. Programação de estágio e atividades realizadas

O estágio na empresa Silliker Portugal, S.A teve começo no dia 31 de outubro de 2022 e terminou a 30 de junho de 2023, sendo a Alice Santos, a orientadora da entidade de acolhimento e o docente Paulo Almeida, o orientador da FCUP.

Durante a realização deste estágio, estive no Laboratório de Métodos Instrumentais, sendo o foco do meu trabalho a implementação e a validação de uma nova metodologia para a determinação de patulina. Durante este estágio, também acompanhei o trabalho realizado na determinação de outras micotoxinas, como as aflatoxinas, ocratoxina A, desoxinivalenol, zearalenona, tendo ajudado na validação da determinação da ocratoxina A em diferentes matrizes e na validação de um método para a determinação da aflatoxina M1 em produtos à base de leite.

1.4. Micotoxinas

O termo “micotoxina” surgiu em 1962, depois da morte de cerca de cem mil perus, numa crise veterinária em Londres, devido a uma doença misteriosa. Posteriormente, os cientistas descobriram que esta doença estava ligada à farinha de amendoim contaminada com metabólitos secundários da *Aspergillus flavus*, a chamada aflatoxina, que levou à possibilidade de existirem metabólitos de fungos que possam ser mortais (Zain, 2011).

As micotoxinas são produtos naturais de baixo peso molecular, produzidos por fungos filamentosos e bolores, como metabólitos secundários, sendo um grupo diversos de substâncias químicas. Muitas das micotoxinas são tóxicas para seres humanos e outros seres vertebrados, em baixas concentrações, podendo causar doenças e morte, mas outras também são tóxicas para invertebrados, microrganismos e plantas. Apesar de

todas as micotoxinas serem de origem fúngica, nem todos os produtos tóxicos produzidos por fungos são micotoxinas, por exemplo, os antibióticos são produtos fúngicos, que são principalmente tóxicos para bactérias, como, a penicilina (Zain, 2011).

Cerca de 25% dos produtos alimentares mundiais são contaminados por micotoxinas, anualmente, quer pré ou após a sua colheita, sendo um problema bastante comum. As condições de armazenamento, ambientais e ecológicas, também são fatores que podem contribuir para a contaminação de comida, ao longo da cadeia alimentar. O grau de gravidade de contaminação das colheitas agrícolas varia anualmente. A humidade no campo ou no armazenamento, as temperaturas extremas, as variações nas práticas de colheita e a infestação de insetos, são uns dos principais fatores ambientais que afetam a gravidade da contaminação por micotoxinas. A exposição do Homem pode resultar do consumo de comidas contaminadas por micotoxinas, do transporte de micotoxinas e dos seus metabólitos em produtos de origem animal, como carne e ovos, ou da exposição a ar ou poeiras contendo as toxinas (Coulombe, 1993; Zain, 2011).

Atualmente, são conhecidas mais de 300 micotoxinas, mas apenas aquelas que são cancerígenas ou tóxicas, têm vindo a receber a maior parte da pesquisa científica (Zain, 2011).

Neste relatório apenas serão apresentadas as micotoxinas determinadas na Silliker, as aflatoxinas, a ocratoxina A, a desoxinivalenol, a zearalenona e a patulina. A patulina será descrita em maior pormenor, sendo que a nova metodologia adotada será descrita no capítulo 2 e os resultados obtidos na validação deste método, no capítulo 3.

1.4.1. Aflatoxinas

As aflatoxinas (figuras 2 a 7) são o grupo de micotoxinas mais importantes a nível mundial e as mais estudadas, devido à sua hepatotoxicidade e carcinogenicidade (Coppock et al., 2018). Este tipo de micotoxina é produzida por fungos do género *Aspergillus* como, *Aspergillus parasiticus* e *Aspergillus flavus*. As principais aflatoxinas são as aflatoxinas B1, B2, G1 e G2, mas também existe, a aflatoxina M1 e a aflatoxina M2, que são metabólitos hidroxilados, que surgem em tecidos animais e fluidos, como leite e urina (Richard, 2007).

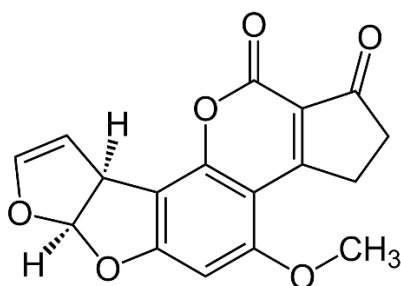


Figura 2 - Estrutura química da Aflatoxina B1

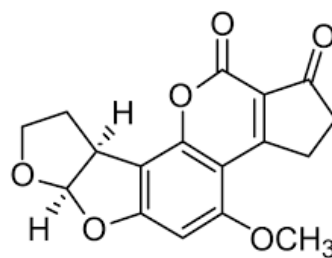


Figura 3 - Estrutura química da Aflatoxina B2

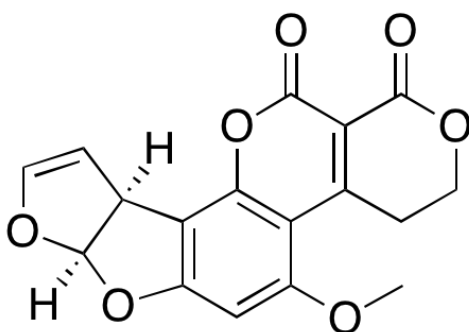


Figura 4 - Estrutura química da Aflatoxina G1

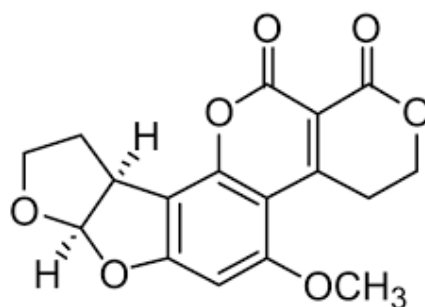


Figura 5 - Estrutura química da aflatoxina G2

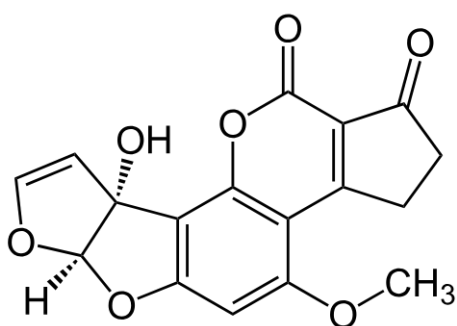


Figura 6 - Estrutura química da Aflatoxina M1

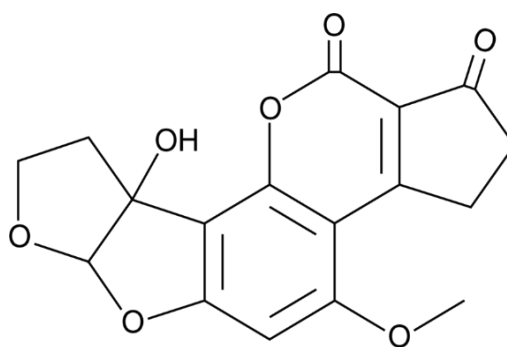


Figura 7 - Estrutura química da Aflatoxina M2

A isolamento das aflatoxinas de alimentos contaminados foi bastante facilitada quando se descobriu que estas substâncias eram fluorescentes. Esta propriedade levou à criação de diversos procedimentos de extração e purificação, para a determinação do teor desta micotoxina (Wogan, 1966). Por exemplo, a aflatoxina M1 pode ser extraída pela utilização de colunas de imunoafinidade e ser quantificada por HPLC com detetor de fluorescência (FD) (Tabari et al., 2011). Outra metodologia permitiu a quantificação das aflatoxinas B1, B2, G1, G2, M1 e M2 por HPLC-UV e HPLC-FD, sendo a extração em

fase sólida (SPE) utilizada para a purificação dos extratos das amostras (Herzallah, 2009). Num outro método foi feita a determinação simultânea das aflatoxinas B1, B2, G1 e G2 pelo uso de cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa em modo sequencial (LC-MS/MS) (Ferrer Amate et al., 2010). Além do uso de técnicas cromatográficas, também é comum a utilização de técnicas imunoquímicas, como os ensaios de imunoabsorção enzimática (ELISA), mas também a espectroscopia de infravermelho (Krska et al., 2008).

1.4.2. Ocratoxina A

A ocratoxina A (figura 8) é produzida por diversas espécies de *Aspergillus* e *Penicillium*, sendo conhecida pela sua nefrotoxicidade. Nos seres humanos, a exposição à ocratoxina A pela ingestão de alimentos contaminados, como cereais, pode ser nefrotóxica, ou seja, venenosa para os rins (Cabañes et al., 2002; Simon, 1996). Além disso, a ocratoxina A também é reconhecida pela sua imunotoxicidade, carcinogénese e neurotoxicidade (El Khoury & Atoui, 2010; Monaci & Palmisano, 2004).

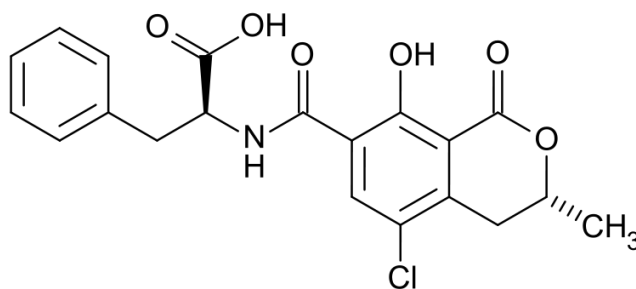


Figura 8 - Estrutura química da Ocratoxina A

Tal como as aflatoxinas, a ocratoxina A apresenta características fluorescentes, sendo os métodos cromatográficos os mais usados na sua determinação, quando acompanhada de métodos de extração líquido/líquido ou SPE, sendo que as matrizes mais comumente analisadas são: os frutos secos, o café, o leite, as bebidas alcoólicas e os cereais (El Khoury & Atoui, 2010). No caso dos vinhos, a ocratoxina A pode ser quantificada por HPLC com deteção MS/MS, sendo que os extratos dos vinhos podem ser limpos por SPE (Leitner et al., 2002). Noutro método, a ocratoxina foi extraída das amostras de cereais por utilização da técnica da dispersão da matriz em fase sólida (MSPD), sendo quantificada por HPLC-FD (Juan et al., 2008). Numa outra metodologia, a ocratoxina foi determinada pelo uso de ensaios de imunoabsorção enzimática (Barna-Vetró et al., 1996).

1.4.3. Desoxinivalenol

A desoxinivalenol (figura 9), conhecida por DON, é uma micotoxina produzida principalmente por fungos das espécies *Fusarium graminearum* e *Fusarium culmorum*, também conhecida por vomitoxina devido aos fortes efeitos eméticos causados pelo seu consumo (Sobrova et al., 2010). Devido a isto, a DON é considerada tóxica para ambos animais e seres humanos afetando, principalmente, o sistema digestivo e imunitário causando vômitos, diarreia e náuseas (Thapa et al., 2021). Este tipo de micotoxina é geralmente encontrada em cereais, como milho e trigo e nos seus derivados (Pestka, 2010).

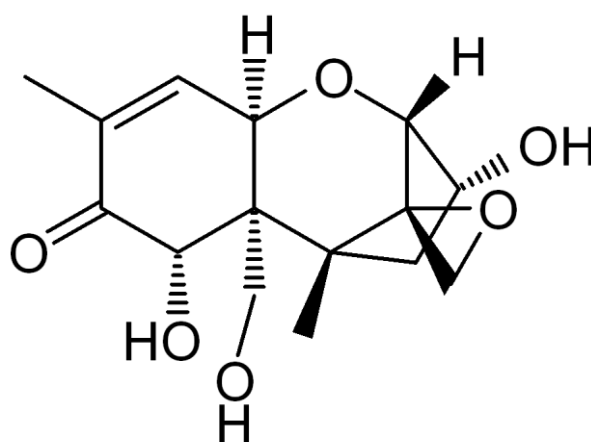


Figura 9 - Estrutura química de desoxinivalenol

As técnicas analíticas mais convencionais para a determinação da DON são os métodos cromatográficos, ou seja, LC e cromatografia gasosa (GC), muitas vezes acopladas a um espectrómetro de massa, uma vez que estas técnicas possuem uma elevada sensibilidade e especificidade. Por outro lado, estas técnicas requerem tempos de preparação de amostra elevados, equipamento dispendioso e pessoal altamente qualificado (Kamle et al., 2022). Por exemplo, a DON pode ser determinada por LC-MS/MS e por GC acoplada a espectrometria de massa (GC-MS) (Tacke & Casper, 1996; Yoshinari et al., 2015). Outro tipo de técnica utilizada é a ELISA (Y. Li et al., 2012). A SPE e o uso de colunas de imunoafinidade são exemplos de algumas das técnicas de purificação dos extratos obtidos a partir das amostras (Ran et al., 2013).

1.4.4. Zearalenona

A zearalenona (figura 10), também conhecida por ZEA e por toxina F-2, é produzida por fungos do género *Fusarium*, como *Fusarium graminearum*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium equisetum*, and *Fusarium nivalis*. Como a sua estrutura química é parecida à

do estrogénio, uns dos seus efeitos principais são os efeitos estrogénicos que podem surgir em vários organismos, podendo assim provocar diversas doenças no sistema reprodutivo e causar distúrbios no equilíbrio hormonal, apresentado um risco para seres humanos e animais (Han et al., 2022; Rogowska et al., 2019). Esta micotoxina é principalmente encontrada em produtos à base de cereais (Yazar & Omurtag, 2008).

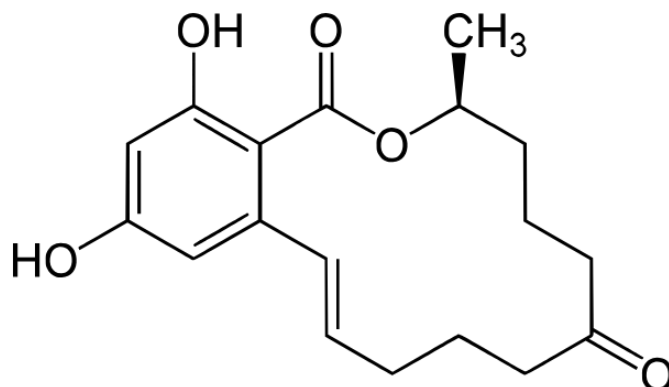


Figura 10 - Estrutura química da zearalenona

Em termos de métodos analíticos, a determinação da ZEA é, maioritariamente, feita pelo uso de métodos cromatográficos, em amostras cujos extratos são parcialmente puros. A confirmação da deteção de zearalenona posteriormente, pode ser alcançada por MS (Kuiper-Goodman et al., 1987). Por exemplo, a ZEA pode ser extraída das amostras pelo uso de uma solução de acetonitrilo, sendo o extrato purificado pelo uso de colunas de imunoafinidade e a zearalenona pode ser quantificada quer por HPLC, mas também por LC a pressão ultra alta (UHPLC) ambos com FD (Ok et al., 2014; Visconti & Pascale, 1998). Noutros trabalhos, a ZEA foi determinada pelo uso de testes ELISA, mas também pelo uso de uma das técnicas mais inovadoras, os imunoensaios de quimioluminescência (Wang et al., 2013).

1.4.5. Patulina

A patulina (figura 11) é uma micotoxina produzida por vários fungos pertencentes aos géneros *Penicillium*, *Aspergillus*, *Paecilomyces* e *Byssoschlamys*, tendo a tendência a aparecer em produtos à base de frutas e vegetais (Puel et al., 2010; Wright, 2015).

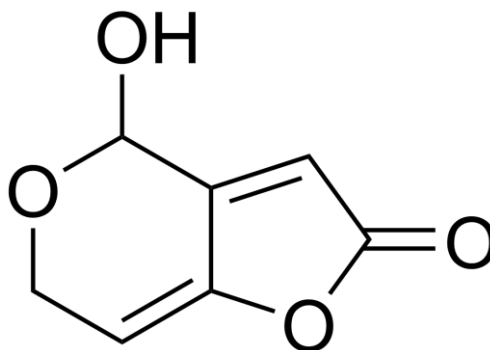


Figura 11 - Estrutura química da patulina

Os seres humanos são expostos à patulina pelo consumo de alimentos contaminados, principalmente as maçãs e os produtos à base da maçã. A contaminação deste alimentos pode surgir de infeções antes, durante e até após a colheita da fruta, como por exemplo durante o transporte, o processamento e o armazenamento destes alimentos. Além disso, vários tipos de animais podem transportar microrganismos, e, portanto, é necessário ter cuidado e mantê-los afastado da fruta fresca (Saleh & Goktepe, 2019).

A *Penicillium expansum* é considerada a principal espécie fúngica responsável pela contaminação em peras e maçãs. Este fungo causa uma espécie de bolor azul e a fruta ganha um aspeto castanho e fica macia, com o passar do tempo há o desenvolvimento de esporos azulados na superfície da fruta, como se pode observar na figura 12. Posteriormente, a patulina acumula-se na fruta infetada como consequência do ataque fúngico. A melhor maneira de evitar esta contaminação é selecionando fruta e legumes saudáveis para fazer os seus sumos e purés. Se a patulina atingir produtos já processados, então terá de se recorrer a medidas de descontaminação, como, tratamentos químicos, biológicos ou físicos, para reduzir os teores finais de patulina (Wright, 2015).



Figura 12 - Exemplo do efeito que a patulina tem na fruta: a fruta ganha uma cor castanha e uma espécie de bolor azul na sua superfície

Em termos de toxicidade, a exposição à patulina pode causar grandes danos nos rins, no sistema imunitário e no sistema digestivo, que inclui sintomas como náuseas, úlceras, hemorragias intestinais e lesões no duodeno (Saleh & Goktepe, 2019). De acordo com a Agência Internacional de Pesquisa em Cancro (IARC), a patulina é um carcinógeno do grupo C, o que significa que não há estudos baseados em pesquisas com animais ou estudos epidemiológicos suficientes para apoiar sua carcinogénese (Glaser & Stopper, 2012). Riscos crónicos para a saúde devido ao consumo de patulina podem incluir também efeitos imunossupressores, neurotóxicos, genotóxicos, teratogénicos e imunotóxicos (Moake et al., 2005).

A patulina é uma das micotoxinas cujos níveis em produtos alimentícios são regulados e controlados, de modo a reduzir os teores finais de patulina nos alimentos. Em Portugal, o Regulamento (CE) N.º 1881/2006 tem afixado os teores máximos aceitáveis para diversos contaminantes em alimentos, dos quais inclui a patulina, como ilustrado na tabela 2.

Tabela 2 - Teores máximos de patulina afixados no Regulamento (CE) N.º 1881/2006

Géneros alimentícios	Teores máximos de patulina (µg/kg)
Sumos de frutos, sumos de frutos concentrados reconstituídos e néctares de frutos.	50

Géneros alimentícios	Teores máximos de patulina (µg/kg)
Bebidas espirituosas, sidra e outras bebidas fermentadas derivadas de maçãs ou que contenham sumo de maçã.	50
Produtos sólidos à base de maçã, incluindo compota e puré de maçã, destinados ao consumo direto.	25
Sumo de maçã e produtos sólidos à base de maçã, incluindo compota e puré de maçã, destinados a ser consumidos por lactentes e crianças jovens e rotulados e vendidos enquanto tal.	10
Alimentos para bebés, com exceção de alimentos à base de cereais transformados destinados a lactentes e crianças jovens.	10

Outra legislação para ter em conta, é o Regulamento (CE) N.º 401/2006 que estabelece os métodos de amostragem e de análise para o controlo oficial dos teores de micotoxinas nos géneros alimentícios, estando afixado os requisitos de controlo do laboratório. No caso da patulina, os critérios de desempenho definidos são: os valores do desvio padrão relativo da repetibilidade (RSD_r) e da reprodutibilidade (RSD_R) e as taxas de recuperação (%), que devem estar entre os valores definidos na tabela 3.

Tabela 3 - Critérios de desempenho definidos no Regulamento (CE) N.º 401/2006 para a determinação de patulina

Teor (µg/kg)	Patulina		
	RSD _r (%)	RSD _R (%)	Taxa de Recuperação (%)
< 20	≤ 30	≤ 40	50 a 120
20 - 50	≤ 20	≤ 30	70 a 105
> 50	≤ 15	≤ 25	75 a 105

Em relação à determinação analítica da patulina, as extrações sólido/líquido-líquido são um das técnicas mais utilizadas para o pré-tratamento das matrizes. As colunas de imunoafinidade também são usadas para a extração e purificação da patulina, devido a terem uma elevada seletividade. HPLC-UV é a técnica mais aplicada para a deteção e identificação de patulina, podendo também ser acoplada a MS (Vidal et al., 2019). Por exemplo, a patulina pode ser determinada pela utilização de SPE com colunas C₁₈, com quantificação por HPLC com detetor DAD (*Diode Array Detetor*) (Sadok et al., 2018). Numa outra metodologia são utilizados kits de extração de fase sólida, chamados de *QuEChERS* (J. Li et al., 2007). Noutro trabalho, a patulina foi determinada em sumos de fruta por GC-MS, sendo a micotoxina extraída das amostras por sucessivas extrações líquido-líquido com acetato de etilo (Moukas et al., 2008). A ELISA também demonstra ser uma técnica promissora na determinação de patulina (Przybylska et al., 2021).

1.5. Validação e verificação de métodos analíticos

Durante a execução de um método analítico, é normal ocorrer a acumulação de erros, que poderão alterar de forma significativa o valor do resultado final. Por isso, os laboratórios dispõem de meios e critérios objetivos, para demonstrarem que o método é capaz de produzir resultados credíveis e adequados, através da validação do método analítico (Relacre, 2000). Segundo a NP EN ISO 17025, a validação é a confirmação por examinação e a obtenção de evidências objetivas que o método cumpre com os requisitos específicos para uma dada finalidade, sendo que o laboratório deverá validar: métodos não normativos; métodos desenvolvidos pelo próprio laboratório; métodos normalizados, mas que foram utilizados fora do âmbito para o qual foram desenvolvidos; modificações de um método normalizado.

Como consequência, antes da implementação de um método analítico para o uso de rotina, este deve ser validado para demonstrar que é adequado para a finalidade pretendida (Carda-Broch & Haddad, 2014).

O processo da avaliação do desempenho de um método previamente validado em relação às metas de desempenho do método estabelecidas é referido como verificação, por exemplo, em métodos normalizados publicados pela ISO (*International Organization for Standardization*) ou pela ASTM (*American Society for Testing and Materials*). A verificação também é necessária quando há uma mudança importante no procedimento, como um instrumento novo, mas semelhante, ou a realocização de um equipamento (Magnusson & Örnemark, 2014).

Existem duas abordagens diferentes para validação de um método: a abordagem interlaboratorial, muitas vezes referida como “estudos colaborativos” ou “estudos cooperativos”, em que se um método normalizado publicado estiver a ser desenvolvido, então um estudo colaborativo envolvendo um grupo de laboratórios é na maioria das vezes a forma preferida de validação; ou a abordagem de laboratório único, quando um método não normalizado estiver a ser desenvolvido num laboratório e não houver interesse geral no método ou porque outros laboratórios são rivais, sendo esta abordagem a mais pertinente (Magnusson & Örnemark, 2014).

A validação de um método analítico é feita pela determinação e evidenciação dos parâmetros de desempenho, que caracterizam o método analítico a ser validado, nomeadamente: a linearidade, a sensibilidade, a gama de trabalho, o limite de deteção e o limite de quantificação, a veracidade, a precisão e a incerteza do método (P. Ravisankar et al., 2015).

A extensão do processo de validação depende do método que se pretende validar, logo o laboratório deve determinar quais destes parâmetros precisam ser verificados para poder validar o método e, frequentemente, até que ponto a investigação de um único parâmetro de desempenho deve ser feita (Relacre, 2000).

1.6. Parâmetros de desempenho

1.6.1. Linearidade

Um método terá uma boa linearidade quando este consegue fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração do analito. O início da avaliação da linearidade começa sempre pelo traçado da curva de calibração. Posteriormente a

linearidade pode ser demonstrada pela determinação do coeficiente de correlação linear e pelo uso do teste de Mandel (Chan et al., 2004; Rawski et al., 2016).

1.6.1.1. Curva de calibração

Em análises quantitativas, a calibração permite relacionar a resposta de um sistema de medida com a concentração ou quantidade de uma substância conhecida. Para efetuar a calibração é preparada uma série de soluções padrão do analito e é efetuada a medição do sinal para cada uma dessas soluções. De seguida, é construído um gráfico do sinal obtido para as soluções padrão em função da concentração do analito, chamado de curva de calibração. Finalmente, a equação da curva de calibração é utilizada para determinar a concentração do analito numa amostra (de Souza & Junqueira, 2005).

Assim, o desafio antes de se proceder à determinação de qualquer parâmetro de desempenho reside na seleção do melhor modelo para ajustar os resultados obtidos, uma vez que existem diversos modelos de calibração/regressão para um conjunto de resultados obtidos por um método analítico. De um modo geral, o critério de escolha do modelo de regressão que melhor se ajusta aos pontos é baseado no método dos mínimos quadrados (Moosavi & Ghassabian, 2018).

No caso do modelo de regressão linear, verifica-se que existe uma relação linear entre os valores de y (sinal obtido) e de x (concentração do analito), que visualmente se traduz numa reta, cuja equação algébrica é dada pela equação 1 (Jurado et al., 2017):

$$y = a + bx$$

Equação 1 - Equação geral de uma curva de calibração do modelo linear

em que a representa a ordenada na origem e o b o declive da curva de calibração do modelo linear.

Os valores do declive e da ordenada de origem são facilmente obtidos durante o traçado da curva de calibração, pelo uso de Excel, mas podem ser calculados manualmente, pelo uso das equações 2 e 3, respetivamente (Relacre, 2000).

$$b = \frac{\sum_{i=1}^n [(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})]}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}$$

Equação 2 - Declive de uma reta de calibração

$$a = \bar{y} - b\bar{x}$$

Equação 3 - Ordenada de origem de uma reta de calibração

em que $\bar{y}$ representa o valor médio dos valores de y e $\bar{x}$ representa o valor médio dos valores de x .

Os valores de a e de b podem ser acompanhados da incerteza associada. Para tal, é necessário calcular os desvios padrão associados à ordenada na origem (s_a) e ao declive (s_b), utilizando as equações 4 e 5, respetivamente (Relacre, 2000).

$$s_a = s_{y/x} \times \sqrt{\frac{\sum x_i^2}{n \times \sum (x_i - \bar{x})^2}}$$

Equação 4 - Desvio padrão associado à ordenada na origem

$$s_b = \frac{s_{y/x}}{\sqrt{\sum (x_i - \bar{x})^2}}$$

Equação 5 – Desvio padrão associado ao declive

em que n corresponde ao número de soluções padrão utilizadas para a construção da curva de calibração, $\bar{x}$ corresponde ao valor médio amostral dos valores de x e $s_{y/x}$ é o desvio padrão residual do modelo de regressão linear, que é calculado pela uso da equação 6 (Relacre, 2000).

$$s_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum (y_i - \hat{y}_i)^2}{n - 2}}$$

Equação 6 - Desvio padrão residual

em que y_i representa a resposta obtida pelo equipamento e $\hat{y}_i$ o valor estimado de y pelo uso da curva de calibração.

Após o cálculo do desvio padrão das duas grandezas, pode ser calculada a incerteza associada, multiplicado o valor do desvio padrão (s) por um valor de t , ou seja, $s_a \times t$ e $s_b \times t$, respetivamente. O valor de t utilizado é obtido a partir da tabela de t -student a um grau de confiança de 95% e $n-2$ graus de liberdade (G.L) (Relacre, 2000).

1.6.1.2. Coeficiente de correlação linear

Para avaliar linearidade, é calculado o coeficiente de correlação linear (r), que pode tomar valores entre -1 e +1. Um valor de $r = +1$ representa uma correlação positiva (a reta terá um declive positivo), enquanto um valor de $r = -1$ representa uma correlação negativa (a reta terá um declive negativo). Caso o valor seja igual a 0, não existe correlação entre as duas variáveis usadas na calibração. De um modo geral, se o valor de r for superior a 0,995, admitisse que o modelo de regressão linear se encontra bem ajustado (Araujo, 2009; Relacre, 2000).

Para uma regressão linear, o valor do coeficiente de correlação linear é calculado usando a equação 7, podendo ser obtido automaticamente pelo uso do Excel.

$$r = \frac{\sum[(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})]}{\sqrt{[\sum(x_i - \bar{x})^2][\sum(y_i - \bar{y})^2]}}$$

Equação 7 - Coeficiente de correlação linear (r)

1.6.1.3. Teste de Mandel

O teste de Mandel faz uma comparação entre os modelos linear e quadrático, para verificar qual será o método mais adequado a aplicar na calibração. Para aplicar este teste calculam-se os valores de $s_{y/x}$ e s_{y^2} , em que s_{y^2} representa o desvio padrão residual do modelo de regressão quadrático, e, posteriormente calcula-se a diferença das variâncias (DS^2), pela equação 8 (Raposo, 2016).

$$DS^2 = (n - 2) \times (s_{y/x})^2 - (n - 3) \times (s_{y^2})^2$$

Equação 8 - Diferença de variâncias do teste de Mandel

No final, é realizado um teste de F pelo cálculo do valor de PG (razão entre variâncias), pela equação 9:

$$PG = \frac{DS^2}{(s_{y^2})^2}$$

Equação 9 - Valor de PG do teste de Mandel

Com isto, é possível comparar o valor de PG obtido com o valor de F indicado na tabela de F de Fisher *two-tailed* para 1 G.L no numerador e n-3 G.L no denominador e para um grau de confiança de 95%. Se o valor de PG for inferior ao valor de F tabelado, significa que a função que melhor se ajusta ao conjunto dos resultados obtidos é a linear.

Caso o valor de PG for superior ao valor de F tabelado, a função quadrática será aquela que melhor se ajusta aos resultados experimentais (Raposo, 2016).

1.6.2. Gama de trabalho

A gama de trabalho corresponde ao intervalo de concentração de analito para qual o método consegue dar uma resposta com uma precisão e veracidade aceitáveis (Eldin, 2011).

Durante a validação de um método analítico, é comum fazer-se a avaliação da gama de trabalho pela realização do teste F de *Snedecor-Fisher*, de modo a demonstrar que existe homogeneidade de variâncias nos limites da gama de trabalho, ou seja, ao longo da curva de calibração (ISO 8466-2, 2001).

Para aplicar este teste, a primeira e a última solução padrão devem ser analisadas dez vezes independentemente, para se determinar a variância associada aos replicados das soluções padrão, posteriormente é calculado o valor de PG pela seguinte equação (ISO 8466-2, 2001):

$$PG = \frac{s_1^2}{s_2^2}, \text{ se } s_1^2 > s_2^2 \quad \text{ou} \quad PG = \frac{s_2^2}{s_1^2}, \text{ se } s_2^2 > s_1^2$$

Equação 10 - Valor de PG do teste F de *Snedecor-Fisher*

sendo s_1^2 a variância amostral associada aos replicados da primeira solução padrão e s_2^2 a variância amostral associada aos replicados da última solução padrão.

Com isto, é possível comparar o valor de PG obtido com o valor de F indicado na tabela de F de Fisher *two-tailed* para n-1 G.L no numerador e n-1 G.L. no denominador e para um grau de confiança de 95%. Se o valor de PG for inferior ao valor de F tabelado, a variância dos resultados do primeiro conjunto de medições (s_1^2) não difere estatisticamente da variância dos resultados do segundo conjunto de medições (s_2^2), logo existe homogeneidade de variâncias. Caso o valor de PG for superior ao valor de F tabelado, as variâncias serão estatisticamente diferentes, portanto não existe homogeneidade das variâncias e a gama de trabalho definida não se encontra bem ajustada e deve ser reduzida até que não haja diferenças significativas, ou então, deverá se testar uma regressão ponderada (ISO 8466-2, 2001).

1.6.3. Sensibilidade

A sensibilidade é a capacidade de um método, ou equipamento, para distinguir pequenas diferenças de concentração do analito, podendo ser definida pelo quociente entre a variação da resposta experimental (ΔY) e a variação da concentração de analito correspondente (ΔX), ou seja, a equação 11 (ISO 8466-2, 2001).

$$Sensibilidade = \frac{\Delta Y}{\Delta X}$$

Equação 11 - Determinação da sensibilidade do método analítico

Desta forma a sensibilidade corresponde à primeira derivada da curva de calibração nessa zona de concentração. Se a curva de calibração for definida pelo modelo linear, a sensibilidade será constante ao longo de toda a gama de trabalho e corresponderá ao declive da curva de calibração (Relacre, 2000).

Quanto maior for a sensibilidade do método, melhor será a capacidade que o método analítico tem para distinguir soluções com concentrações de analito muito próximas (Relacre, 2000).

1.6.4. Limiares analíticos

Os limiares analíticos são classificados como limite de deteção (LD) e limite de quantificação (LQ). O LD corresponde à concentração mínima de analito que pode ser detetada pelo método. O LQ corresponde à concentração de analito mais baixa, que pode ser quantificada pelo método, com um determinado nível de confiança (Magnusson & Örnemark, 2014).

Existem diversas maneiras de determinar o LD e o LQ de um método analítico, mas neste trabalho irá se apenas falar na abordagem que se utilizou neste relatório para a determinação destes limiares analíticos (Zorn et al., 1999).

A abordagem que foi usada só pode ser aplicada quando o método envolve a utilização de uma curva de calibração linear, tendo em conta isto, o LD e o LQ serão calculados usando as equações 12 e 13, respetivamente (Zorn et al., 1999).

$$LD = \frac{3,3 \times s_{y/x}}{b}$$

Equação 12 - Limite de deteção

$$LQ = \frac{10 \times s_{y/x}}{b}$$

Equação 13 - Limite de quantificação

Uma vez que estes limiares são calculados a partir dos resultados da curva de calibração, os valores obtidos são muito influenciados pelo próprio ajuste dos pontos de calibração, caso o ajuste dos pontos não seja o melhor, ou seja, caso o valor do coeficiente de correlação linear seja baixo, os valores dos limites irão aumentar. Devido a isto, o LD e o LQ deverão ser validados experimentalmente, pela realização de ensaios de recuperação (Relacre, 2000).

1.6.5. Seletividade/Especificidade

A seletividade é a capacidade de um método para identificar e distinguir um analito em particular numa mistura complexa sem interferência de outros componentes, que são suscetíveis de causar um desvio na quantificação do analito e assim provocar desvios sistemáticos (Relacre, 2000).

A seletividade é, habitualmente, avaliada através de ensaios de recuperação, para estudar as possíveis interferências existentes na matriz. O método só pode ser considerado seletivo, quando o valor da taxa de recuperação (%) obtida estiver entre 80% e 120%, que corresponde ao intervalo de valores de taxa de recuperação considerados aceitáveis. Tendo em conta as características do próprio método e da concentração do analito, é possível que este intervalo seja diferente tal como se pode verificar nas micotoxinas, cujos valores estão definidos no Regulamento (CE) N.º 401/2006 (Magnusson & Örnemark, 2014).

O método só pode ser considerado específico, caso este consiga discriminar o analito de interesse relativamente a outros componentes presentes na amostra a analisar, ou seja, quando o método consegue garantir que o resultado obtido provém apenas do analito de interesse. Portanto, será necessário descobrir a existência de possíveis interferentes presentes na amostra, utilizando para este efeito uma amostra complexa (European Medicines Agency, 1995).

1.6.6. Precisão

A precisão permite avaliar a dispersão dos resultados de replicados de uma amostra ou de uma solução padrão, obtidos pelo método em condições específicas. Consoante estas condições a precisão pode ser avaliada sob a forma de repetibilidade, precisão intermédia e reprodutibilidade (Prichard et al., 2011).

Este parâmetro pode ser expresso na forma de desvio padrão (s) ou de coeficiente de variação (CV), calculado pelo uso da equação 14 (P. Ravisankar et al., 2015).

$$CV = \frac{s}{\bar{x}} \times 100 (\%)$$

Equação 14 - Coeficiente de variação (CV)

Neste trabalho só será falado da precisão em termos de repetibilidade e de precisão intermédia.

1.6.6.1. Repetibilidade

A repetibilidade representa a precisão de um método analítico obtida em ensaios realizados em condições idênticas, como por exemplo: o mesmo laboratório; o mesmo analista; o mesmo equipamento; o mesmo tipo de reagentes e/ou os mesmos intervalos de tempo (Prichard et al., 2011).

A precisão em termos de repetibilidade pode ser avaliada através do desvio padrão da repetibilidade (s_r) associados aos resultados ou através do coeficiente de variação da repetibilidade (CV_r), expresso em percentagem, dado pela equação 15 (Relacre, 2000).

$$CV_r = \frac{s_r}{\bar{x}} \times 100 (\%)$$

Equação 15 - Coeficiente de variação da repetibilidade

Além disso, também se pode determinar o limite de repetibilidade (r_r) a partir do s_r . O limite de repetibilidade é o valor abaixo do qual se deve situar a diferença absoluta entre dois resultados de um ensaio, a uma determinada probabilidade, geralmente 95%. O r_r é calculado a partir da equação 16 (Magnusson & Örnemark, 2014).

$$r_r = 2,8 \times s_r$$

Equação 16 - Limite de repetibilidade

Se os resultados forem obtidos em condições de repetibilidade, eles apenas serão aceitáveis caso $|x_i - x_{i-1}| \leq r_r$. Na hipótese desta diferença for superior ao limite de repetibilidade definido, o ensaio deve ser repetido (Relacre, 2000).

O r_r , também, pode ser expresso na forma de limite de repetibilidade relativo (CVr_r), dado pela seguinte fórmula:

$$CVr_r = 2,8 \times CV_r \times 100$$

Equação 17 - Limite de repetibilidade relativo

1.6.6.2. Precisão intermédia

A precisão intermédia refere-se à precisão avaliada, sobre a mesma amostra, amostras idênticas ou soluções padrão, utilizando o mesmo método, no mesmo laboratório ou em laboratórios diferentes, mas fazendo variar uma ou mais condições, tais como: análises em dias diferentes ou analistas diferentes e/ou equipamentos diferentes. Esta medida de precisão é reconhecida como a mais representativa da variabilidade dos resultados num laboratório, pois permite avaliar o impacto das alterações que poderão ocorrer no dia-a-dia de um laboratório (Prichard et al., 2011).

A precisão em termos de precisão intermédia pode ser avaliada através do desvio padrão da precisão intermédia (s_I) associados aos resultados ou termos de coeficiente de variação da precisão intermédia (CV_I), expresso em percentagem. O s_I é calculado da seguinte forma, caso o número de replicados seja igual dois, que de modo geral costuma ser (Relacre, 2000).

$$s_I = \sqrt{\frac{1}{2 \times t} \sum_{j=1}^t (y_{j1} - y_{j2})^2}$$

Equação 18 - Desvio padrão da precisão intermédia

em que t corresponde ao número de amostras estudadas, y_{j1} ao primeiro resultado para o duplicado da amostra e y_{j2} ao segundo resultado para o duplicado da amostra.

Tal como a repetibilidade, podemos também determinar o limite da precisão intermédia e o CV_I , usando as equações 19 e 20, respetivamente.

$$r_I = 2,8 \times s_I$$

Equação 19 - Limite da precisão intermédia

$$CV_I = \frac{s_I}{\bar{x}} \times 100$$

Equação 20 - Coeficiente de variação da precisão intermédia

1.6.7. Veracidade/Justeza

A veracidade, muitas vezes chamada de justeza, avalia o grau de concordância entre a média de um número infinito de valores de replicados obtidos para uma mesma amostra e um valor de referência (x_{ref}) e permite avaliar a componente dos erros sistemáticos (Fajgelj & Ambrus, 2000). Contudo, não é possível realizar um número infinito de medições, mas é possível fazer uma estimativa pelo cálculo do *bias* (Magnusson & Örnemark, 2014).

O *bias* absoluto é calculado da seguinte forma:

$$bias = \bar{x} - x_{ref}$$

Equação 21 - *Bias* na forma absoluta

Podendo também ser expresso em termos relativos:

$$bias\ relativo = \frac{\bar{x} - x_{ref}}{x_{ref}} \times 100 (\%)$$

Equação 22 - *Bias* na forma relativa

Existem várias abordagens para poder avaliar a veracidade, tais como: a análise de matérias de referência (MR), a realização de ensaios de recuperação, a participação em ensaios interlaboratoriais e realização de testes comparativos com outro método. A escolha da abordagem depende das condições disponíveis pelo laboratório (Relacre, 2000).

1.6.8. Incerteza

A incerteza é um parâmetro não negativo associado ao resultado de uma medição, que caracteriza a dispersão dos valores que poderiam ser razoavelmente atribuídos à resposta obtida pelo sistema de medição, e, portanto, quanto maior for a incerteza, menos confiável será o resultado obtido (Ellison Secretary et al., 2009).

Existem duas abordagens principais usadas para o cálculo da incerteza da medição, a abordagem “passo a passo” e a abordagem empírica baseada nos dados da validação. Em ambos os casos, é necessário fazer a determinação das incertezas combinada (u_c) e da incerteza expandida (U) (Jcgm, 2008)

A incerteza combinada consiste numa incerteza padrão que é estimada considerando todas as fontes de incerteza que contribuem para o resultado final, sendo calculada a partir do uso da lei da propagação das incertezas. Contudo, esta incerteza sozinha não

consegue fornecer a confiança necessária no resultado, pelo que, geralmente a incerteza deve ser apresentada na forma de uma incerteza expandida, que é obtida multiplicando u_c por um fator superior a um, denominado fator de expansão (k), como indicado na equação 23, que assume o valor de dois quando se pressupõe que os resultados seguem uma distribuição normal (Jcgm, 2008)

$$U = u_c \times k$$

Equação 23 - Incerteza expandida (U)

Assumindo um valor de $k = 2$, a incerteza expandida obtida confere 95% de confiança ao resultado obtido e, deve ser expressa nas mesmas unidades que este.

1.6.8.1. Abordagem “passo a passo”

Esta abordagem é geralmente aplicada, no cálculo de incertezas associadas a soluções preparadas no laboratório, que são utilizadas durante a aplicação do método analítico. Esta metodologia encontra-se divididas em quatro passos, como ilustrado na figura 13 (Relacre, 2018).

A etapa inicial tem como objetivo especificar o resultado que se pretende determinar de forma clara e objetiva. No segundo passo é feita a identificação de todas as fontes de incerteza que podem afetar o resultado, e depois fazer a quantificação da incerteza-padrão associadas a estas fontes de incerteza identificadas. Por fim, é calculada a incerteza combinada u_c e a incerteza expandida (Relacre, 2002, 2018).

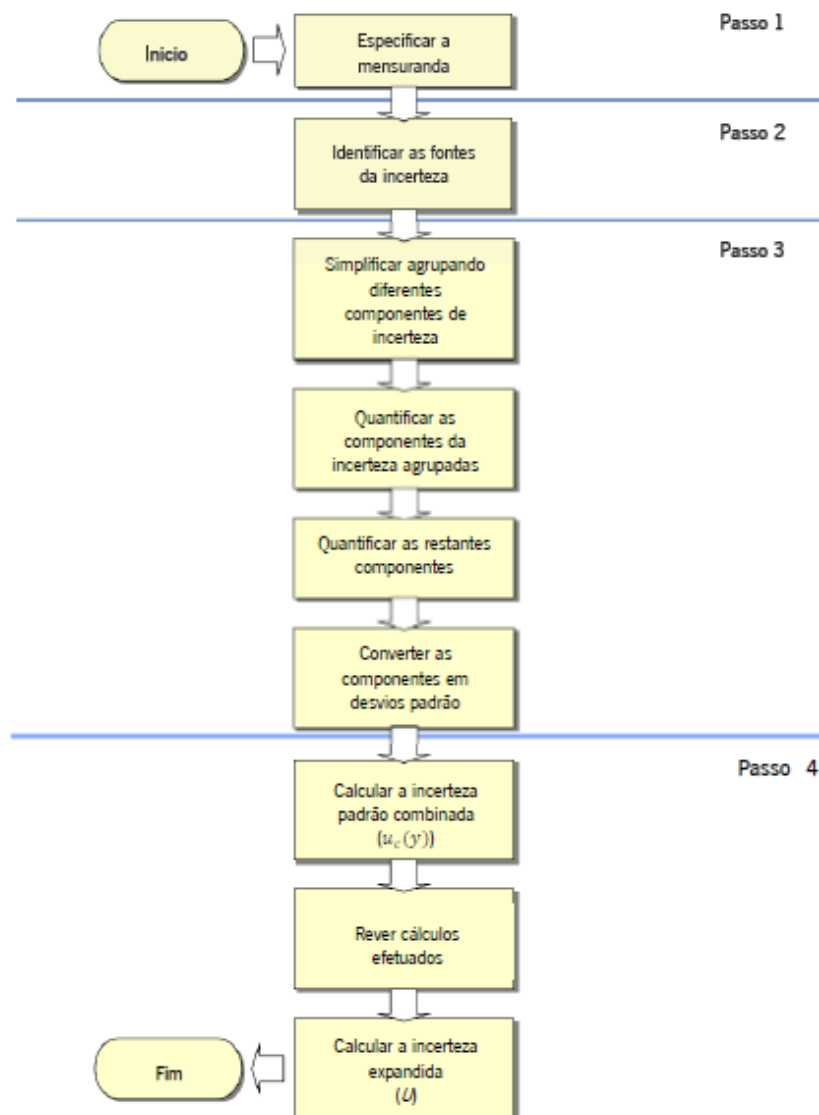


Figura 13 - Esquema da abordagem "passo-a-passo". Adaptado do Guia Eurachem (Ellison Secretary et al., 2009).

1.6.8.2. Abordagem empírica baseados nos dados de validação

Esta abordagem permite calcular a incerteza do método considerado os resultados reunidos durante a validação do método analítico, envolvendo a combinação de duas componentes da incerteza principais que descrevem o desempenho de todo o método de ensaio. As componentes de incerteza principais que são combinadas são as seguintes e é de notar que estas incertezas devem estar na forma relativa, de modo a serem combinadas: a incerteza-padrão associada aos efeitos aleatórios – incerteza da precisão ($u_{(precisão) relativa}$) e a incerteza-padrão associada aos efeitos sistemáticos – incerteza da veracidade/justeza ($u_{(veracidade) relativa}$) (Relacre, 2018).

Com isto, o primeiro passo a realizar será o cálculo da $u_{(precisão) relativa}$ e da $u_{(veracidade) relativa}$. Para o cálculo da $u_{(precisão) relativa}$ deve-se, em primeiro lugar determinar a incerteza associada à precisão intermédia na forma absoluta ($u_{(precisão)}$). Este valor equivale ao valor de s_I , como descrito na equação 24 (Leite et al., 2015):

$$u_{(precisão)} = s_I$$

Equação 24 - Incerteza associada à precisão intermédia em termos absolutos

Portanto, a $u_{(precisão) relativa}$ será equivalente ao CV_I , calculado pela equação 18, dando origem à equação 25 (Leite et al., 2015):

$$u_{(precisão) relativa} = CV_I$$

Equação 25 - Incerteza associada à precisão intermédia em termos relativos

A determinação da $u_{(veracidade) relativa}$ é mais complexa uma vez que, como mencionado anteriormente, a veracidade pode ser avaliada por diversas metodologias, mas neste trabalho a componente da incerteza associada à veracidade será apenas determinada pela análise de replicados de materiais de referência (MR) (Relacre, 2018).

Deste modo, inicialmente, deve considerar-se o *bias* relativo calculado na análise desse MR, além deve-se ter em consideração a incerteza padrão associada à concentração do MR (u_{Cref}). Geralmente, no certificado do MR emitido pelo fabricante vem indicado este valor, ou, o valor limite de controlo superior (UCL) e o valor limite de controlo inferior (LCL), e, com ambos estes valores podemos calcular u_{Cref} usando a seguinte equação (Relacre, 2018):

$$u_{Cref} = \frac{UCL - LCL}{2k}$$

Equação 26 - Incerteza padrão associada à concentração do MR

Como a incerteza tem de ser apresentada em termos relativos, será depois necessário calcular a $u_{(Cref) relativa}$, pela equação 27 (Relacre, 2018):

$$u_{(Cref) relativa} = \frac{u_{Cref}}{C_{MR}} \times 100 (\%)$$

Equação 27 - Incerteza padrão associada à concentração do MR em termos relativos

em que C_{MR} corresponde à concentração de analito do MR indicada no certificado dado pelo fabricante desse material.

De seguida, para a $u_{(veracidade) relativa}$ ainda será necessário ter em conta o desvio padrão relativo obtido na análise do MR ($s_{(bias) relativo}$), pela equação 28 (Leite et al., 2015):

$$s_{(bias) relativo} = \frac{s_{bias}}{\bar{x}_{lab}} \times 100 (\%)$$

Equação 28 - Desvio padrão relativo obtido na análise do MR

em que s_{bias} representa o desvio padrão obtido na análise do MR, facilmente obtido usando a ferramenta Excel, e $\bar{x}_{lab}$ corresponde ao valor médio da concentração do analito do MR obtido pelo laboratório.

Finalmente, o $u_{(veracidade) relativa}$ pode ser calculado pela combinação do $bias$ relativo com a $u_{(Cref) relativa}$ e o $s_{(bias) relativo}$, dado pela equação 29 (Relacre, 2018).

$$u_{(veracidade) relativa} = \sqrt{(bias relativo)^2 + \left(\frac{s_{(bias) relativo}}{\sqrt{n}}\right)^2 + (u_{(Cref) relativa})^2}$$

Equação 29 - Incerteza associada à veracidade na forma relativa

sendo n o número de leituras do material de referência.

Por fim, é calculada a incerteza combinada pela equação 30 (Leite et al., 2015; Relacre, 2018):

$$u_c = \sqrt{(u_{(precisão) relativa})^2 + (u_{(veracidade) relativa})^2}$$

Equação 30 - Incerteza combinada pela abordagem empírica

De seguida, efetua-se o cálculo da incerteza expandida U , usando a equação 21, com $k=2$.

1.7. Ferramentas utilizadas na validação de um método

Durante o processo de validação de um método analítico são usadas diversas ferramentas que permitem avaliar os parâmetros de desempenho de um método, devido à grande diversidade de ferramentas, neste relatório apenas serão faladas as que são mais pertinentes, como: brancos, ensaios de recuperação, amostras diárias de controlo

do processo, materiais de referência, ensaios interlaboratoriais, cartas de controlo de indivíduos, teste de Grubbs e teste de Cochran.

1.7.1. Cálculo da estimativa central e de dispersão

Durante a análise dos resultados é comum calcular duas estimativas populacionais indispensáveis: a média ($\bar{x}$) e o desvio padrão amostral (s).

De um modo geral, o resultado final de uma análise é apresentado com um valor médio de um conjunto de resultados obtidos, em vez de um valor individual. Assim sendo, a média é determinada através da equação 31 (Miller & Miller, 2010)

$$\bar{x} = \frac{\sum x_i}{n}$$

Equação 31 - Média

em que $\sum x_i$ corresponde ao somatório de todos os resultados individuais obtidos e n ao número de medições efetuadas.

O desvio padrão permite avaliar a influência dos erros aleatórios nos resultados obtidos, e é definido como um desvio padrão amostral (s), obtido através da equação 32 (Miller & Miller, 2010):

$$s = \sqrt{\sum \frac{(x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

Equação 32 - Desvio padrão amostral (s)

1.7.2. Brancos

Os brancos são soluções em que o analito não está presente. Estes permitem verificar quanto do sinal obtido é atribuível ao analito de interesse e quanto pode ser devido a outras causas (por exemplo, interferentes). Existem dois tipos de brancos: o branco de reagente e o branco de amostra. O branco de reagente corresponde a reagentes que são acrescentados à amostra durante o procedimento experimental, incluindo solventes, de modo a determinar se estes podem contribuir para o sinal obtido, possibilitando a correção adequada do mesmo. O branco de amostra, simplesmente, é a matriz da amostra sem o analito, este tipo de branco pode ser difícil de obter, mas é bastante importante pois permite fazer uma estimativa realista das interferências que podem ser encontradas durante a análise (Relacre, 1996).

1.7.3. Ensaios de recuperação

Os ensaios de recuperação são umas das ferramentas mais utilizadas no processo de validação. Este tipo de ensaio consiste na adição de uma quantidade conhecida do analito de interesse a uma amostra, ou seja, é feita uma fortificação. Caso a amostra já tenha uma determinada quantidade de analito, a adição deve ser feita de maneira a garantir que a concentração final de analito não exceda o máximo da gama de trabalho validada para o método analítico utilizado (Relacre, 2000; Thermo Scientific, 2007).

No final do ensaio, o resultado obtido na amostra fortificada é comparado com o resultado obtido para a mesma amostra, mas não fortificada, pelo cálculo da taxa de recuperação (R), recorrendo à equação 33 (Magnusson & Örnemark, 2014):

$$R = \frac{\bar{x}' - \bar{x}}{x_{add}} \times 100 (\%)$$

Equação 33 - Taxa de recuperação

em que $\bar{x}'$ representa o valor médio obtido na amostra fortificada, $\bar{x}$ o valor médio para a amostra não fortificada e o x_{add} representa a concentração de analito adicionada à amostra.

Ou como alternativa, a equação 34:

$$R = \frac{x_{obtido}}{x_{teórico}} \times 100 (\%)$$

Equação 34 - Taxa de recuperação (equação alternativa)

em que x_{obtido} representa o resultado obtido pelo laboratório na amostra fortificada e o $x_{teórico}$ representa o resultado teórico que devia ser obtido na amostra fortificada.

Preferencialmente, R deve ser igual a 100%, contudo este valor é dependente da concentração de analito presente na amostra e do método de ensaio utilizado, pelo que se deve realizar um ensaio de recuperação em três níveis de concentração da gama de trabalho (Relacre, 2000).

1.7.4. Amostra diária de controlo do processo

Uma amostra diária de controlo de processo (DPCS) consiste numa amostra que é habitualmente analisada no laboratório, que pode fornecer informações importantes, em relação à precisão e interferências que podem ser encontradas em análises de rotina, com a finalidade de avaliar a fiabilidade dos resultados obtidos no ensaio e, quando se

pretende realizar a validação de um método de ensaio. Este tipo de amostra é bastante utilizada pela empresa Silliker Portugal, S.A. de modo a controlar a qualidade dos seus resultados, sendo que muitas destas são materiais de referência (Vieira, 2019).

Caso o resultado obtido para um DPCS esteja fora dos limites estabelecidos, todos os resultados obtidos durante essa análise de rotina, devem ser suspensos, e será necessário fazer a repetição do trabalho realizado (Vieira, 2019).

1.7.5. Materiais de referência

Um material de referência (MR) consiste num material com uma ou mais propriedades bem definidas, que devido à sua elevada homogeneidade e estabilidade pode ser usado para calibrar instrumentos ou para a avaliação dos parâmetros de desempenho do método analítico (Magnusson & Örnemark, 2014).

Também existem materiais de referência certificados (MRC), cujas propriedades foram determinadas por um processo válido metrologicamente, e tal como um MR, estas propriedades tem de homogêneas e estáveis. Além disso, os MRC são acompanhados de um certificado emitido por uma entidade qualificada, que evidencia as características do material e os valores associados às propriedades e a sua respetiva incerteza (ISO, 2015).

Devido a isto, os MR e os MRC são bastante importantes na validação e verificação de métodos, principalmente na determinação da veracidade e da incerteza do método, e constituem uma importante ferramenta na determinação de diversas propriedades relacionadas com a qualidade de uma medição (Relacre, 2000).

1.7.6 Ensaios interlaboratoriais

Um ensaio interlaboratorial, segundo a ISO/IES 17043, corresponde à organização, realização e avaliação de ensaio no mesmo material, ou similares, por dois ou mais laboratórios respeitando as condições pré-estabelecidas.

Existem diversos tipos de ensaios interlaboratoriais, consoante o objetivo definido para cada um, dois dos mais importantes são: os ensaios interlaboratoriais de aptidão e os ensaios interlaboratoriais de normalização (Relacre, 2000).

1.7.6.1. Ensaios interlaboratoriais de aptidão

O objetivo deste tipo de ensaio é a avaliação do desempenho dos laboratórios participantes, sendo que em alguns países, estes funcionam como uma condição para a acreditação do laboratório. Normalmente, é feita a análise de um MRC, podendo os laboratórios participantes usarem os métodos que entenderem (Relacre, 2000).

1.7.6.2. Ensaios interlaboratoriais de normalização

Em ensaios interlaboratoriais de normalização, é feito o estudo das características de um método analítico, como a reprodutibilidade e repetibilidade, sendo que só pode ser utilizado o método em causa (Relacre, 2000).

1.7.6.3. Avaliação do desempenho

A avaliação do desempenho de um laboratório participante num ensaio interlaboratorial é feita pela entidade organizadora, como, por exemplo, a *Bureau Interprofessionnel d'Etudes Analytiques* (BIPEA) (Relacre, 1996).

De um modo geral, isto é feito pelo cálculo do *z-score* (Z), pela equação 35:

$$Z = \frac{x_{lab} - x_v}{s}$$

Equação 35 - *Z-score*

sendo x_{lab} o valor obtido pelo laboratório, x_v o valor aceite como verdadeiro que é estabelecido no ensaio interlaboratorial e s a unidade de desvio, pode ser o desvio padrão da média dos laboratórios no ensaio interlaboratorial, a incerteza de x_v ou outro desvio que assente em critérios de exigência da entidade organizadora.

A avaliação depois é feita consoante, o valor obtido para Z, de acordo com a tabela 4:

Tabela 4 - Interpretação e avaliação do valor obtido para Z

Módulo do <i>z-score</i>	Avaliação
$ Z \leq 2$	Resultado aceitável e o laboratório apresenta um desempenho satisfatório
$2 < Z \leq 3$	Resultado e desempenho questionável.
$ Z > 3$	Resultado incorreto e o laboratório apresenta um não desempenho satisfatório

Portanto, a participação de um laboratório nestes ensaios permite ao laboratório detetar erros sistemáticos nas suas análises e adotar medidas corretivas quando o nível de aceitação requerido não é atingido. Para além disso, estes ensaios podem ser usados

para a determinação da veracidade durante a validação do método analítico (Magnusson & Örnemark, 2014).

1.7.7. Cartas de controlo de médias ou indivíduos

Independentemente do método aplicado, os resultados de um laboratório devem ser controlados estatisticamente, de modo a garantir que estes sejam válidos. Por isso, é necessário fazer a monitorização destes resultados, mas esta monitorização pode gerar uma grande quantidade de resultados, tornando difícil a sua interpretação (Cardoso De Oliveira et al., 2013).

Devido a isto, os laboratórios usam as chamadas cartas de controlo que são ferramentas estatísticas, que permitem a monitorização dos resultados obtidos pelo laboratório de um modo mais prático, facilitando a sua compreensão dos dados, possibilitando verificar se os resultados estão fora do intervalo definido (Cardoso De Oliveira et al., 2013).

Visualmente, as cartas de controlo correspondem a gráficos em que são registados os valores obtidos durante a análise em função do tempo, e, existem três tipos de cartas de controlo: as cartas de controlo de médias ou indivíduos, as cartas de controlo de amplitudes e as cartas de controlo de somas cumulativas (Miller & Miller, 2010).

No entanto, neste relatório só se irá dar importância às cartas de controlo de médias ou indivíduos.

Graficamente, as cartas de controlo de médias ou indivíduos apresentam uma linha central que corresponde ao valor médio dos resultados ($\bar{x}$), um conjunto de linhas chamadas de linhas de aviso e outro conjunto chamado de linhas de controlo, como se poder ver pela figura 14 (Miller & Miller, 2010).

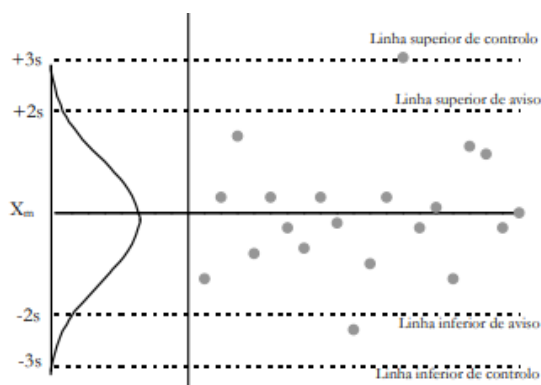


Figura 14 - Exemplo de uma carta de controlo de médias. Adaptado do Guia (Relacre, 1996).

Os limites superiores de aviso (LSA) e inferiores de aviso (LIA) são calculados a um nível de confiança de 95%, pelas equações 36 e 37:

$$LSA = \bar{x} + 2s$$

Equação 36 - Limite superior de aviso

$$LIA = \bar{x} - 2s$$

Equação 37 - Limite inferior de aviso

OS limites superiores de controlo (LSC) e inferiores de controlo (LIC) são obtidos a um nível de confiança de 99,7% de confiança recorrendo às equações 38 e 39:

$$LSC = \bar{x} + 3s$$

Equação 38 - Limite superior de controlo

$$LIC = \bar{x} - 3s$$

Equação 39 - Limite inferior de controlo

Após a construção da carta de controlo, todos os resultados obtidos diariamente, devem ser introduzidos na carta de controlo, que deve ser interpretada para verificar se existem alguns pontos fora de controlo. Um ponto estará fora de controlo quando o seu valor estiver acima dos limites de controlo estabelecidos. Além disso, caso de verifique a existência de uma série de 7 ou mais pontos consecutivos acima (ou abaixo) do valor médio, esses pontos estarão fora de controlo. Se algum ponto estiver fora do controlo, será necessário adotar medidas corretivas (Relacre, 1996).

1.7.8. Teste de Grubbs

Quando se termina uma análise quantitativa, é importante definir quais dos valores obtidos fornecem efetivamente informação relevante acerca do objeto em estudo e quais dos valores podem ser desprezados. De modo a verificar a existência de valores aberrantes é utilizado o teste de Grubbs, para determinar quão desviado um valor suspeito (x_s) se encontra do valor médio ($\bar{x}$) obtido durante a análise, tendo em conta o s do mesmo. Os valores que são considerados suspeitos são os valores extremos obtidos, ou seja, o valor máximo e o valor mínimo do conjunto de resultados (Miller & Miller, 2010).

Este teste começa pelo cálculo do valor de G para cada um dos valores extremos, usando a equação 40:

$$G = \frac{|x_s - \bar{x}|}{s}$$

Equação 40 - Valor de G para o teste de Grubbs

Seguidamente, o valor de G é comparado com o valor de G indicado na tabela de Grubbs para um nível de confiança de 95% e para n observações (incluindo o valor suspeito). Se o valor de G calculado for inferior ao valor de G tabelado, o valor suspeito não difere significativamente dos restantes e, portanto, não deve ser rejeitado. Caso valor de G calculado for superior ao valor de G tabelado, o valor suspeito é considerado aberrante e deve ser rejeitado.

1.7.9. Teste de Cochran

O teste de Cochran é outro teste estatístico que permite avaliar a homogeneidade das variâncias. Para começar, é calculado o valor de C, que resultada da razão entre a maior variância (s_{max}^2) e o somatório de todas as outras ($\sum_i s_i^2$), como mostrado na equação 41 (Miller & Miller, 2010):

$$C = \frac{s_{max}^2}{\sum_i s_i^2}$$

Equação 41 - Valor de C do teste de Cochran

Posteriormente, o valor de C calculado é comparado com o valor de C definido na tabela de Cochran, para 95% de confiança, e n número de níveis de fatores e k número de medidas em cada nível do fator, Caso o valor de C calculado for inferior ao valor de C tabelado, não existem evidências de que as variâncias diferem significativamente, e, como tal, o ensaio com maior variância não deve ser desprezado. Caso o valor de C calculado for superior ao valor de C tabelado, não existe homogeneidade de variâncias e a maior variância dos ensaios teria de ser desprezada, posteriormente, seria novamente aplicado o teste de Cochran no novo conjunto de variâncias.

1.8. Cromatografia líquida

A cromatografia é uma técnica analítica que engloba um grande conjunto de métodos diversos e importantes, permitindo a separação, identificação e determinação de componentes muito semelhantes em matrizes complexas. Dependendo da natureza da fase móvel, a cromatografia pode ser dividida em dois tipos diferentes: a cromatografia gasosa (GC) e cromatografia líquida (LC) (Skoog et al., 2007).

Neste relatório, a patulina foi determinada por cromatografia líquida de alta eficiência com detetor ultravioleta, e, portanto, será esta que irá ser discutida.

A cromatografia líquida mais comumente chamada de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) é uma técnica de separação que envolve a injeção de um volume pequeno de uma amostra líquida numa coluna que contém uma fase estacionária, sendo os componentes individuais da amostra movidos pela coluna por uma fase móvel, pelo uso de uma bomba, a altas pressões. Esta técnica é usada para a separação e análise de compostos químicos e biológicos não voláteis, como, por exemplos: diversos farmacêuticos, como a aspirina; sais; proteínas; compostos orgânicos e polímeros; produtos naturais; hidrocarbonetos pesados; como o asfalto; compostos termicamente instáveis, como algumas enzimas (Bootman, 2021; Snyder & Kirkland, 1979).

A cromatografia líquida pode também ser classificada pelo seu mecanismo de separação. Os quatros tipos mais utilizados são os seguintes: cromatografia de fase reversa, cromatografia de adsorção e de fase normal, cromatografia de troca de iões e cromatografia de exclusão de tamanho (Steed, 2007).

Neste trabalho, foi utilizado a cromatografia líquida de fase reversa (RPLC). Neste tipo de cromatografia a fase estacionária é não polar (por exemplo, C_{18}) e a fase móvel é um solvente relativamente polar, como a água, metanol ou acetonitrilo. Com este tipo de cromatografia, o componente mais polar é o primeiro a ser eluído e o aumento da polaridade da fase móvel leva a um aumento do tempo de eluição. Além disso, RPLC é mais popular em relação à cromatografia de fase normal, uma vez que esta pode utilizar como uma fase móvel a água, que é um produto barato, não toxico, transparente a raios ultravioleta e compatível com diversos solutos biológicos. Esta técnica também demonstrou ser bastante versátil, podendo ser usada separar e determinar moléculas polares, não polares, iónicas e ionizáveis (Skoog et al., 2007).

A separação cromatográfica começa com a amostra a ser dissolvida na fase móvel líquida. De seguida, a fase móvel é forçada a passar por uma fase estacionária, que está fixada numa coluna. As fases móveis e estacionárias são escolhidas de modo que os componentes da amostra sejam distribuídos pelas duas fases. A velocidade com que os componentes fluem com a fase móvel depende da afinidade com que estes tenham com a fase estacionária, ou seja, compostos que tem menos afinidade com a fase estacionária, são menos retidos e percorrem mais rapidamente. Devido a esta diferença de velocidade, os componentes são separados em picos ou bandas discretas, que

podem ser analisadas qualitativamente e/ou quantitativamente (Skoog et al., 2007; Snyder & Kirkland, 1979).

A separação dos picos permite obter um cromatograma que é um gráfico em que a intensidade do sinal obtido por um detetor é representada em função do tempo. O tempo de retenção (t_r) representa a quantidade de tempo que o componente passou na coluna depois de ser injetado. Numa amostra com vários componentes, cada componente terá um tempo de retenção diferente. O t_r de um componente (figura 15) é calculado tendo em conta, o tempo morto (t_m), que representa o tempo que um componente não retido demora a chegar ao detetor, e o tempo que o componente fica retido na fase estacionária (t_s), como é representado na equação 42. Com isto, a posição dos picos no cromatograma possibilita a identificação dos componentes da amostra e a área de cada pico permite a quantificação da quantidade de cada componente (Skoog et al., 2007; Snyder & Kirkland, 1979).

$$t_r = t_m + t_s$$

Equação 42 - Tempo de retenção

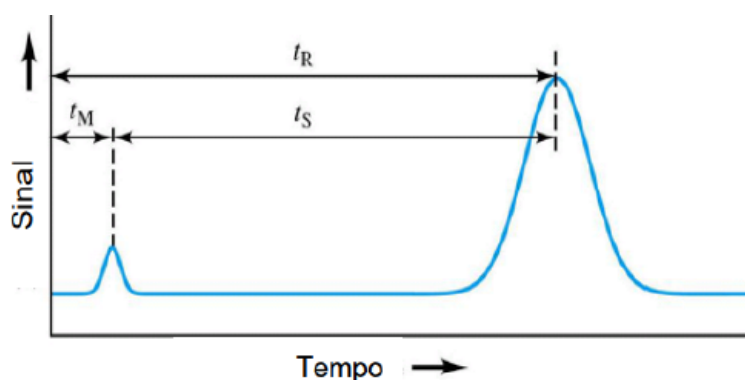


Figura 15 - Exemplo de um cromatograma com a indicação do tempo de retenção (t_r), do tempo morto (t_m) e do tempo que o componente fica retido na fase estacionária (t_s). Adaptado de (Skoog et al., 2007).

A eficiência de uma coluna pode determinada pelo cálculo (Equação 41) do número de pratos teóricos (N), sendo determinado para cada pico cromatográfico a partir do seu tempo de retenção (t_r) e da largura do pico a meia altura ($W_{1/2}$) (S. A. Ravisankar & Supriya, 2019).

$$N = 5,54 \times \left(\frac{t_r}{W_{1/2}} \right)^2$$

Equação 43 - Número de pratos teóricos (N)

Os fatores que podem influenciar a eficiência de uma separação cromatográfica são: as condições de análise, o tamanho da amostra, o tipo de soluto, o comprimento da coluna e a própria fase estacionária (Paschoal et al., 2008).

Um cromatógrafo líquido comum possui cinco componentes bastantes importantes: a bomba, o injetor, a coluna, o detetor e o computador (Skoog et al., 2007).

A bomba (figura 16) tem como objetivo forçar a fase móvel pelo sistema cromatográfico a um fluxo específico, expresso em mililitros por minutos (mL/min). Existem dois tipos de bombas: as isocráticas que garantem uma composição constante da fase móvel, em que os solventes têm de ser pré-misturados, sendo assim as bombas mais baratas; as em gradiente que permitem obter uma composição variável da fase móvel ao longo da análise, as binárias permitem a mistura de dois solventes e as quaternárias quatro solventes (Snyder & Kirkland, 1979).



Figura 16 - Exemplo de uma bomba usada em HPLC

O injetor (figura 17), como o nome indica, introduz a amostra líquida no fluxo da fase móvel, sendo que este componente deve ser capaz de aguentar as altas pressões do sistema. A injeção pode ser feita manualmente, usando uma seringa, ou automaticamente pelo uso de um *autosampler*, onde o analista coloca vials enchidos com a solução amostra no tabuleiro do *autosampler*. O *autosampler* mede o volume apropriado de amostra, injeta a amostra e lava o injetor para estar preparado para a próxima amostra (Skoog et al., 2007).



Figura 17 - Exemplo de um injetor automático típico usado em HPLC

A coluna (figura 18) é o componente mais importante do sistema cromatográfico, sendo considerado o “coração do cromatógrafo”. A fase estacionária da coluna separa os componentes de interesse pelo uso de diversos parâmetros químicos e/ou físicos. A pressão elevada do sistema é devida à força com que a bomba puxa a fase móvel pela coluna. O processo de retenção dos analitos é determinado pela escolha do empacotamento da coluna (fase estacionária) e a seleção da fase móvel para puxar os componentes de interesse pela coluna. Existem vários tipos de colunas como por exemplo as analíticas, as preparativas, as capilares e as nano, podendo existir diferenças no material usado para a tubagem, como, o aço, o vidro ou o polímetro polietereétercetona (PEEK) (Sirard, 2012; Steed, 2007).



Figura 18 - Exemplos de tamanhos diferentes de colunas

O detetor permite detetar as moléculas individuais que eluem da coluna, através da medição de um sinal. Da observação do cromatograma obtido, o analista poderá identificar os componentes da amostra e quantificá-los. Os detetores mais comuns são: os espectroscópicos, os de índice de refração e os de fluorescência. Para a determinação da patulina foi usado um detetor ultravioleta, ou seja, um detetor espectroscópico. Neste tipo de detetor, um raio ultravioleta com um determinado comprimento de onda incide numa célula e um sensor mede a luz passa na célula. Quando um componente que elui da coluna é capaz de absorver esta radiação, o sensor consegue detetar a mudança de energia que ocorreu devido a esta absorção, e irá produzir um sinal que é amplificado e direccionado para o computador. O comprimento de onda da radiação ultravioleta depende do analito de interesse, que queremos determinar (Sirard, 2012; Skoog et al., 2007).

O computador, muitas vezes é chamado de sistema de dados, permite controlar todos os módulos do instrumento de HPLC, mas também recebe o sinal do detetor e usa-o para determinar o tempo de retenção dos componentes e a sua quantidade (Snyder & Kirkland, 1979).

2. Parte Experimental

Este capítulo descreve a metodologia para a determinação da patulina por HPLC-UV.

O método descrito teve como base a norma EN 15890 (2010). Este método foi otimizado e as alterações efetuadas foram encontradas noutros trabalhos (Barreira et al., 2010; J. Li et al., 2007; Notardonato et al., 2021; Spadaro et al., 2007).

A validação do método foi feita pela análise de dois MR (*FAPAS T1681 Apple juice* e *FAPAS T1679 Apple puree*) e pela realização de ensaios de recuperação nas seguintes matrizes: néctar de maçã, puré infantil, farinha láctea, tarte de maçã e sidra de maçã.

Devido a um acordo de confidencialidade e de sigilo assinado com a empresa de estágio, não será possível indicar pormenores específicos do procedimento final, tais como as massas pesadas e volumes medidos.

2.1. Campo de aplicação

A metodologia aqui descrita é aplicada a amostras das seguintes matrizes:

- ✓ Alimentos confeccionados e pré-confeccionados;
- ✓ Alimentos dietéticos, suplementos alimentares, produtos de alimentação especial;
- ✓ Bebidas alcoólicas;
- ✓ Bebidas não alcoólicas;
- ✓ Frutos, algas, produtos hortícolas e derivados.

2.2. Resumo do processo

A patulina das amostras é extraída através de uma mistura de acetato de etilo e n-hexano na presença de sulfato de sódio anidro, hidrogenocarbonato de sódio e areia, seguido da remoção de compostos ácidos interferentes do extrato através de uma extração em fase sólida, e por fim a evaporação do eluato e a sua redissolução numa solução aquosa de ácido acético glacial a pH 4.

A patulina presente na amostra é depois quantificada por HPLC-UV.

2.3. Reagentes e solventes

Todos os reagentes e solventes utilizados que foram de qualidade analítica e a água foi ultrapura e estão listados na tabela 5:

Tabela 5 - Lista de reagentes/solventes utilizados

Reagente/Solvente	Fórmula Química	Grau de pureza (%)	Marca
Acetato de etilo	$C_4H_8O_2$	$\geq 99,5\%$	VWR
Acetonitrilo	C_2H_3N	$\geq 99,9\%$	Honeywell
Ácido acético glacial	$C_2H_4O_2$	$\geq 99,8\%$	VWR
Ácido perclórico	$HClO_4$	60 %.	VWR
Areia de mar	-	-	Sigma Aldrich
Azoto gasoso	N_2	-	Air Liquide
Etanol absoluto	C_2H_6O	$\geq 99,8\%$	VWR
Hidrogenocarbonato de sódio	$NaHCO_3$	$\geq 99,7\%$	VWR
N-Hexano	C_6H_{14}	95%	Honeywell
Patulina	$C_7H_6O_4$	$\geq 98,0\%$	Sigma Aldrich
Sulfato de sódio anidro	Na_2SO_4	$\geq 99,6\%$.	José Manuel Gonçalves dos Santos, LDA

2.4. Equipamentos, materiais e software

O material e equipamento de laboratório de uso corrente e o software utilizado está listado na tabela 6.

Tabela 6 - Lista de equipamento, de materiais, e software utilizados

Lista de equipamento, de materiais, e software utilizados
Agitador mecânico.
Balança analítica, capaz de pesar com a aproximação de 0,1 mg.
Centrífuga Hettich Zentrifugen Rotina 180 e Centrífuga Thermo Scientific Legend X1R.
Colunas de extração de fase sólida Strata Phenomenex de sílica gel.
Dispensadores de volume variável.
Frascos para amostrador automático (<i>vials</i>), com tampa e septo, de capacidade aproximada de 2 mL.
Micropipetas, de volume variado, com capacidade adequada.
Pipetas graduadas de volume variável.
Pipetas volumétricas de volume variável.
Sistema de HPLC da Agilent Technologies composto por: ✓ Sistema de injeção, manual ou automático, com capacidade para diferentes volumes. ✓ Bomba quaternária de HPLC com capacidade de fluxo constante. ✓ Coluna para HPLC: Phenomenex, LUNA ® 5 µm C₁₈(2) 100 Å 250 x 4,6 mm. ✓ Detetor de UV. ✓ Módulo para ajustar a temperatura da coluna Torrey Pines Scientific C020.

Lista de equipamento, de materiais, e software utilizados
Software informático <i>Chromeleon</i> .
Tubo de plástico, capacidade aproximada de 10 mL.
Tubos de centrífuga com tampas de rosca e capacidade de 50 mL.
Vórtex.

2.5. Soluções padrão de patulina

Para a preparação das soluções padrão de patulina foi necessário preparar as seguintes soluções:

- ✓ **Solução padrão inicial de patulina:** Esta solução é preparada a partir da diluição da solução comercial de patulina com acetato de etilo.
- ✓ **Solução padrão final de patulina:** Esta solução é preparada pela diluição do resíduo evaporado da solução padrão inicial de patulina em etanol absoluto.

Posteriormente, foram preparadas cinco soluções padrão de patulina pela diluição da solução padrão final de patulina numa solução aquosa de ácido acético glacial a pH 4. Estas soluções padrão tinham as seguintes concentrações:

Tabela 7 - Concentrações das soluções padrão de patulina

Solução padrão nº	Concentração de patulina (ng/mL)
1	5,00
2	25,0
3	50,0
4	75,0
5	100

2.6. Procedimento experimental

2.6.1. Pré – tratamento

Para um tubo de centrífuga, foi pesada a amostra, e foi registada a massa (massa inicial - m_i), de seguida adicionou-se água ultrapura e registou-se novamente a massa (massa inicial + água - m_{i+H_2O}). Logo após o tubo foi agitado manualmente e centrifugado.

Para amostras límpidas, este passo não é realizado, e passa-se logo para a extração.

2.6.2. Extração

Para outro de tubo de centrífuga, foi adicionado areia, sulfato de sódio anidro e hidrogenocarbonato de sódio e o tubo foi agitado. Posteriormente, adicionou-se um determinado volume da solução de extração (V_E), que é uma mistura de acetato de etilo e n-hexano (60:40), ao tubo preparado e este foi fechado bem.

Desta forma, os tubos de centrífuga podem ser preparados com antecedência antes da análise.

Logo após pesou-se a amostra centrifugada (m_f) para o tubo de centrífuga preparado e adicionou-se esferas de inox e agitou-se vigorosamente à mão por alguns segundos e depois num agitador mecânico.

Posteriormente, a mistura de extração foi centrifugada a baixa velocidade para forçar a separação das camadas.

A patulina não é estável em soluções alcalinas, portanto esta etapa do método deve ser realizada o mais rápido possível para evitar perdas.

2.6.3. Remoção dos compostos ácidos interferentes

Este passo serve para remover os compostos ácidos interferentes na amostra, pelo uso de SPE.

Assim, foi adicionado um pequeno volume de mistura de ácido acético e acetato de etilo a um tubo de plástico, sendo este colocado sob uma coluna SPE de sílica gel não condicionada com um adaptador de seringa.

De seguida, foi transferido imediatamente um determinado volume do extrato centrifugado (V_P) para a coluna SPE não condicionada. O eluato foi coletado para o tubo de plástico e a coluna SPE foi lavada, imediatamente, com solvente de extração para eluir os restos de extrato.

Quando a maior parte do eluato tiver passado, o restante do solvente da coluna foi empurrado com uma seringa cheia de ar para dentro do tubo.

2.6.4. Preparação da solução amostra

Em seguida, a solução no tubo de plástico foi evaporada até à secura sob uma corrente de azoto e o resíduo seco foi dissolvido num determinado volume (V_R) de solução aquosa de ácido acético glacial a pH=4, que depois foi agitada no vórtex. E finalmente, a solução amostra foi transferida para um frasco para amostrador automático (*vial*), estando assim a amostra preparada para ser analisada por HPLC-UV.

2.6.5. Ensaio de recuperação

Caso se realize um ensaio de recuperação, a matriz em branco (matriz que não contém o analito) é contaminada com uma quantidade conhecida de patulina e a taxa de recuperação é determinada após a aplicação do método analítico.

No caso de amostras límpidas, a fortificação com patulina é feita no tubo de centrifuga onde é realizado o processo de extração. Para as restantes amostras, a fortificação com patulina é realizada no tubo de centrifuga utilizado no pré-tratamento.

Para a validação foi necessário realizar ensaios de recuperação para validar determinadas matrizes das quais não possuíamos qualquer tipo de material de referência. Estas matrizes estão listadas na tabela 8, em conjunto com o nível às quais elas foram fortificadas.

Tabela 8 - Lista de matrizes usadas em ensaios de recuperação com o respetivo nível de fortificação de patulina

Matrizes	Nível de fortificação de patulina ($\mu\text{g/kg}$)
Néctar de maçã	5,00
Puré infantil	5,00
Farinha láctea	30,0
Tarte de maçã	40,0
Sidra de maçã	50,0

2.6.6. Fase móvel

A fase móvel utilizada era 95% de uma solução aquosa de ácido perclórico + 5% acetonitrilo.

Inicialmente, é preparada a solução aquosa de ácido perclórico. Neste caso, um pequeno volume de ácido perclórico a 60% é adicionado a frasco com um determinado volume de água ultrapura.

A mistura desta solução com o acetonitrilo é realizada no próprio sistema cromatográfico, com o uso de uma bomba quaternária, que permite preparar a mistura final que é usada como fase móvel.

2.6.7. Condições cromatográficas

Para a determinação da patulina as condições cromatográficas específicas utilizadas são as seguintes:

Tabela 9 - Condições cromatográficas utilizadas

Condições cromatográficas	
Fase móvel	95% de uma solução aquosa de ácido perclórico + 5% de acetonitrilo
Fluxo da fase móvel	1,00 mL/min.
Detetor	Ultravioleta – comprimento de onda a 276 nm.
Volume de injeção	300 µL.
Temperatura do módulo para ajustar a temperatura da coluna	30,0 °C
Tempo de análise	1 hora para amostras e 30 minutos para soluções padrão de calibração

Condições cromatográficas	
Sequência da análise	As sequências de análise criados no software do equipamento seguiram a seguinte ordem: 1. Branco de reagente. 2. Soluções padrão de calibração 3. Branco de reagente. 4. Soluções padrão de verificação. 5. Materiais de referências. 6. Amostras.

2.7. Resultados

Após a obtenção dos cromatogramas é feita a análise dos resultados recorrendo *software Chromeleon* e ao *Microsoft Excel*.

O pico da patulina é identificado por comparação do seu tempo de retenção com o pico das soluções padrão de calibração. O tempo de retenção da patulina é, aproximadamente, entre 14 e 15 minutos.

Posteriormente, o teor final de patulina na amostra é calculado usando a seguinte expressão:

$$\text{Resultado final } (\mu\text{g/kg}) = \frac{C_i \times m_{i+H_2O} \times V_E \times V_R}{m_i \times m_f \times V_P}$$

Equação 44 - Resultado final da concentração de patulina em $\mu\text{g/kg}$

sendo, C_i - a concentração de patulina na solução amostra determinada pela curva de calibração, expressa em ng/mL ; m_{i+H_2O} - a massa inicial da amostra com água, expressa em g; V_E - o volume de extração, expresso em mL; V_R - o volume de dissolução do resíduo, expresso em mL; m_i - a massa inicial da amostra, expressa em g; m_f - a massa final da amostra, expressa em g; V_P - o volume de purificação, expresso em mL.

Na análise de amostra que não sofrem o pré-tratamento, assume-se que m_i é igual a m_{i+H_2O} e igual a m_f .

Para os ensaios de recuperação, a taxa de recuperação é calculada pela equação 34 apresentada no capítulo 1.7.3, em que $x_{teórico}$ é calculado usando a seguinte fórmula:

$$x_{teórico} (\mu\text{g/kg}) = \frac{m_{patulina\ adicionada} (\mu\text{g})}{m_i (kg)}$$

Equação 45 - Valor teórico da concentração de patulina num ensaio de recuperação

em que $m_{patulina\ adicionada}$ representa a massa de patulina que foi adicionada à amostra, que é calculada utilizando a equação 46:

$$m_{patulina\ adicionada} (\mu\text{g}) = C_{sol.pat} \times V_{adicionado}$$

Equação 46 - Massa de patulina adicionada durante um ensaio de recuperação

em que $C_{sol.pat}$ representa a concentração mássica da solução de patulina usado no ensaio de recuperação, em $\mu\text{g/mL}$, e $V_{adicionado}$ representa o volume, em mL, que foi adicionado desta solução.

2.8. Pontos críticos

Aqui serão listados alguns pontos críticos da metodologia que devem ser realizados com o máximo cuidado e atenção possível:

- ✓ Todas as micropipetas utilizadas no método devem ser verificadas antes da medição de qualquer volume.
- ✓ Durante o processo de extração e o processo de evaporação do solvente na corrente de azoto não pode ocorrer perda de resíduo, uma vez que isso significa a perda de amostra.
- ✓ A passagem do extrato pela coluna SPE deve ser realizada lentamente com a ajuda de uma seringa, para evitar que os compostos ácidos interferentes estejam presentes no eluato.
- ✓ O tempo com que a amostra é agitada no vórtex deve ser cumprido rigorosamente, para garantir a redissolução completa da patulina da amostra.

2.9. Fluxograma

O seguinte fluxograma resume a metodologia aplicada.

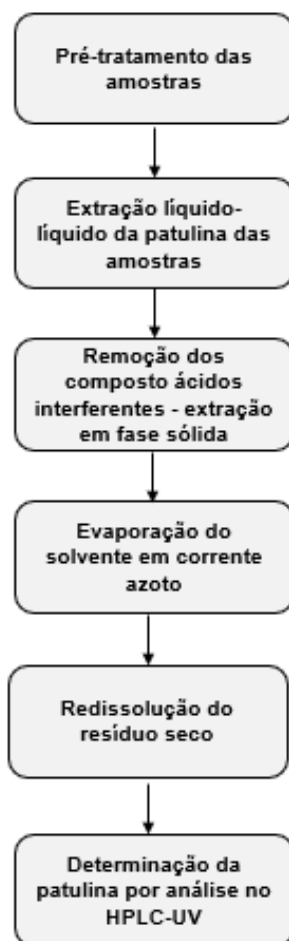


Figura 19 - Fluxograma que resume o procedimento experimental

3. Resultados e discussão

3.1. Otimização do método

Antes de se ter começado com a validação do método, foi necessário fazer determinadas alterações ao procedimento experimental. Neste caso, foi necessário modificar a fase móvel, as concentrações das soluções padrão e o processo de extração de patulina, para garantir a otimização do método, de modo a obter resultados satisfatórios.

3.1.1. Otimização da fase móvel

Inicialmente, a fase móvel utilizada era de 99% de solução aquosa de ácido perclórico (0,1%) e 1% de acetonitrilo, mas observou-se que o pico da patulina estava a ser registado com um tempo de retenção muito elevado (aproximadamente, 24 minutos), como se pode observar na figura 20.

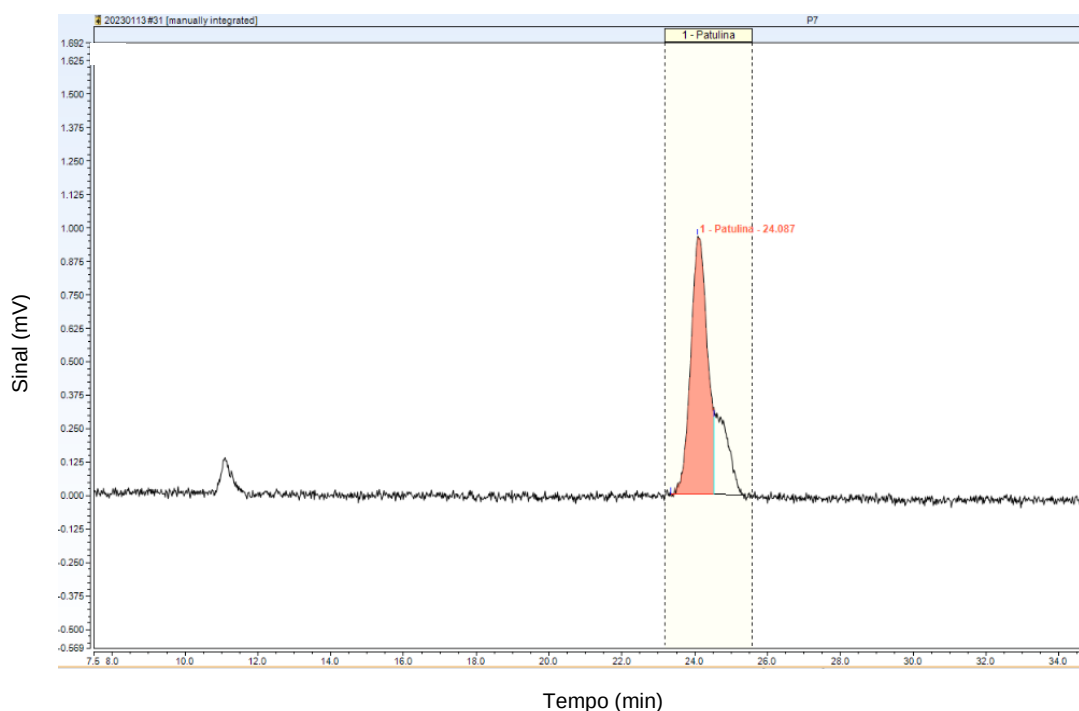


Figura 20 - Cromatograma obtido com a fase móvel de 99% de solução aquosa de ácido perclórico (0,1%) e 1% de acetonitrilo

Como, se queria diminuir o tempo de retenção, foram-se testar diversas fases móveis, sendo a principal diferença as proporções de água, acetonitrilo e ácido perclórico.

Com isto testaram-se as seguintes quatro fases móveis (tabela 10) e compararam-se os seus cromatogramas (figuras 21 a 24).

Tabela 10 - Fases móveis que se testaram durante a otimização do método

Nome da fase móvel	Composição
Fase móvel A	96% de uma solução aquosa de ácido perclórico e 4% acetonitrilo
Fase móvel B	95% de uma solução aquosa de ácido perclórico e 5% acetonitrilo
Fase móvel C	92% de uma solução aquosa de ácido perclórico e 8% acetonitrilo
Fase móvel D	90% de uma solução aquosa de ácido perclórico e 10% acetonitrilo

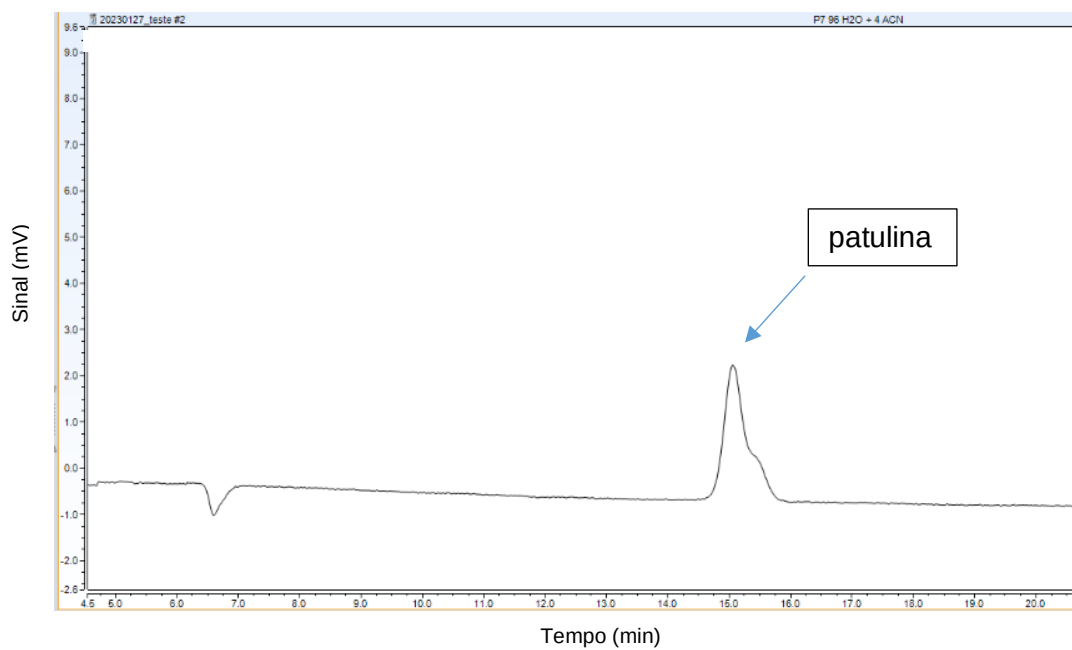


Figura 21 - Cromatograma obtido pelo uso da fase móvel A

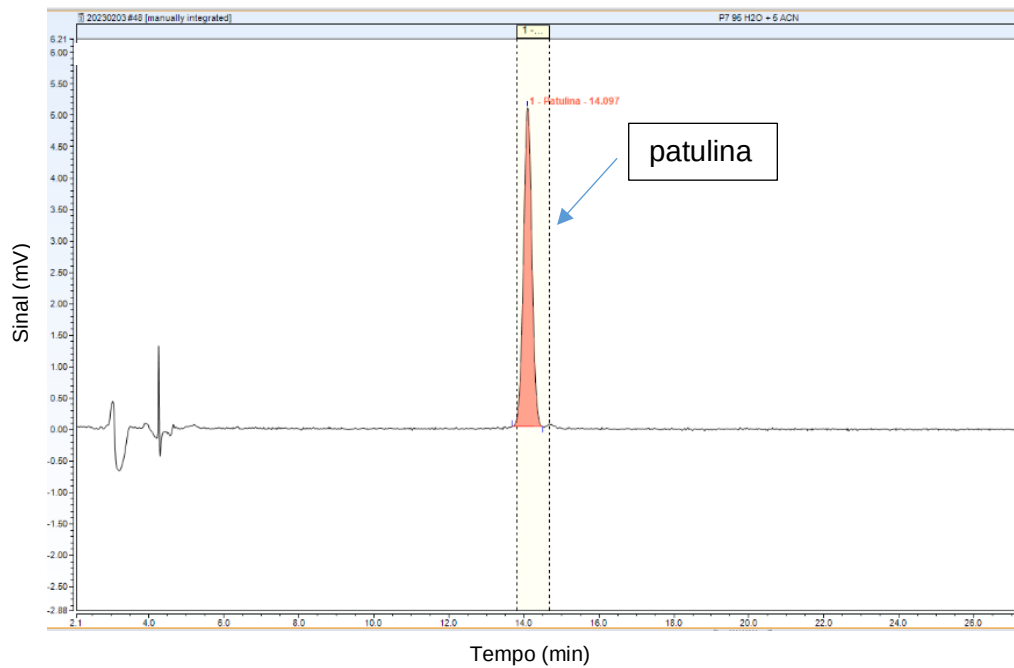


Figura 22 - Cromatograma obtido pelo uso da fase móvel B

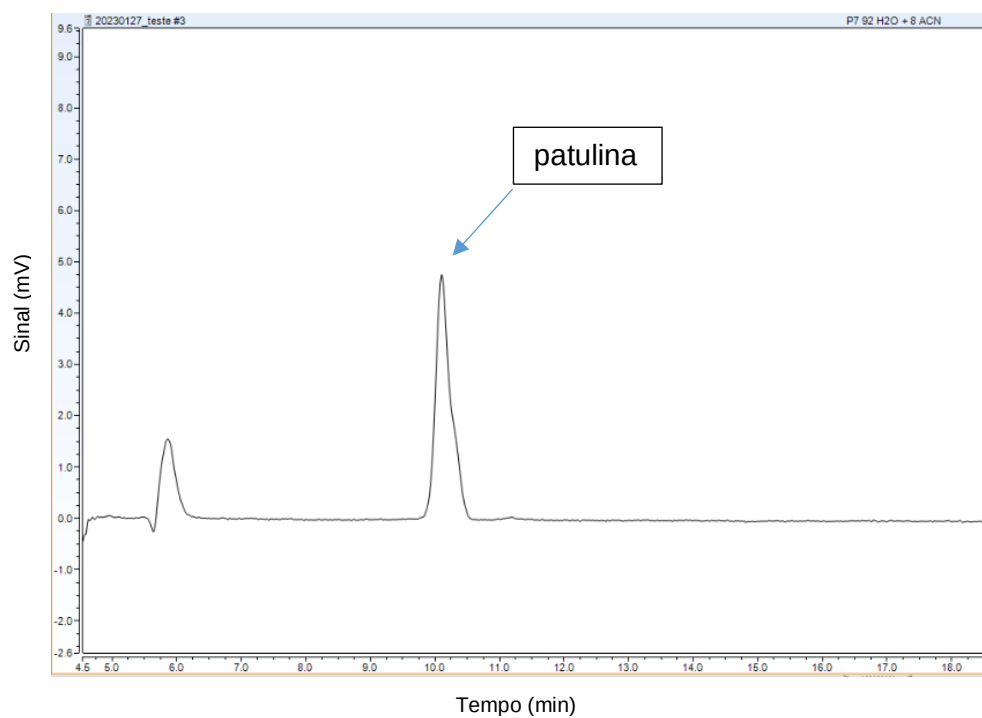


Figura 23 - Cromatograma obtido pelo uso da fase móvel C

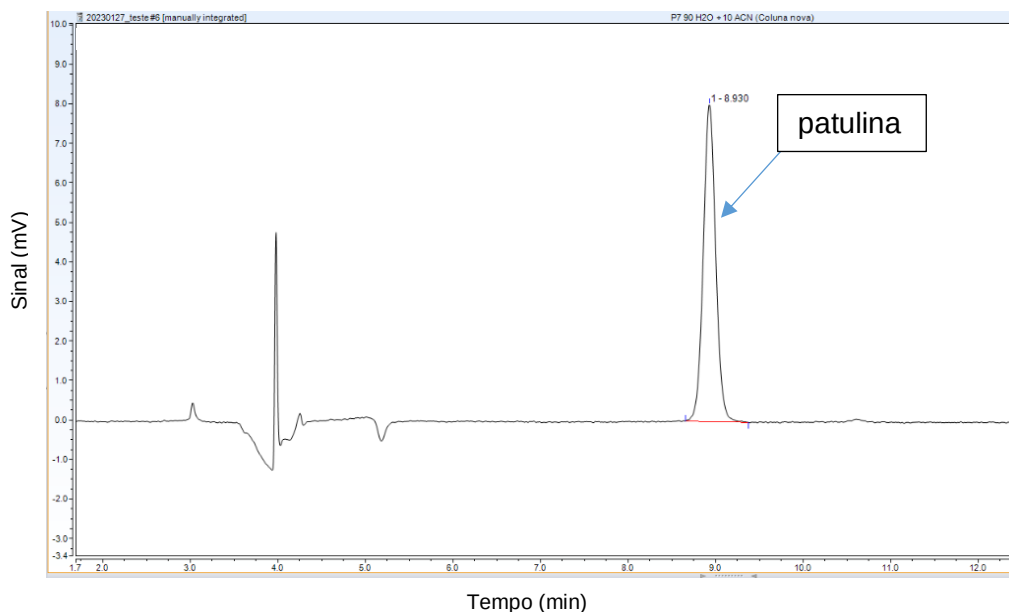


Figura 24 - Cromatograma obtido pelo uso da fase móvel D

No final da testagem, verificou-se que com a utilização das fases móveis C e D, o tempo de retenção diminuía consideravelmente, mas decidiu-se não as usar, porque não se queria que o pico da patulina saísse muito próximo dos picos associados ao tempo morto. Portanto, ficou decidido utilizar-se a fase móvel B, pois com um tempo de retenção, por volta dos 14 minutos, o pico encontrava-se mais afastado da zona inicial do cromatograma, onde existe uma menor probabilidade de o pico ficar sobreposto com o tempo morto, em comparação com as fases móveis C e D. Em relação à fase móvel A, esta apresenta resultados semelhantes à fase móvel B, assim o laboratório optou por utilizar a fase móvel B.

3.1.2. Otimização da limite de quantificação

Na fase inicial de testagem deste método, eram preparadas sete soluções padrão de patulina com concentrações entre 12,0 ng/mL e 84,0 ng/mL, mas notou-se logo um problema, o LQ deste método era, aproximadamente, 5,00 µg/kg, que era considerado um valor elevado. Segundo o Regulamento (CE) N.º 1881/2006, a concentração máxima de patulina em alimentos infantis é 10,0 µg/kg, portanto, o LQ do nosso método teria de ser pelo menos um terço desta concentração, ou seja, ser abaixo de 3,30 µg/kg.

Com isto, decidiu-se começar por preparar um conjunto de soluções padrão completamente diferente. Neste caso, eram preparadas cinco soluções padrão com concentrações entre 5,00 ng/mL e 100 ng/mL, tendo-se obtido um LQ de 2,00 µg/kg, que já era considerado aceitável (ver capítulo 3.2.3).

3.1.3. Otimização do processo de extração

Em relação ao processo de extração, no início, estávamos a ter dificuldades em extrair matrizes que eram mais espessas e viscosas porque, não conseguíamos ter volume de extrato suficiente para passar na coluna SPE.

Desta maneira, antes do processo de extração, decidiu-se fazer uma diluição das amostras, e, além disso, aumentou-se o tempo de centrifugação. Com a realização destas alterações conseguimos aumentar o volume de extrato disponível, acabando-se por duplicar o volume de extrato que passa na coluna SPE, pois verificou-se que os resultados eram mais satisfatórios com este aumento.

3.2. Parâmetros de validação

Neste capítulo serão apresentados e discutidos os resultados obtidos durante a validação do método. Para a validação do método foram realizados os ensaios necessários para avaliar os seguintes parâmetros de desempenho: linearidade; gama de trabalho; LD e LQ; seletividade; precisão (em condições de repetibilidade e de precisão intermédia); veracidade/justeza e a incerteza do método.

3.2.1. Curva de calibração e linearidade

Antes de começar a validação do método analítico, foi necessário traçar as curvas de calibração. Para isto, cada uma das soluções padrão de patulina foram analisadas por HPLC-UV, obtendo-se um cromatograma para cada um deles. Na figura 25, está apresentado um dos cromatogramas obtidos.

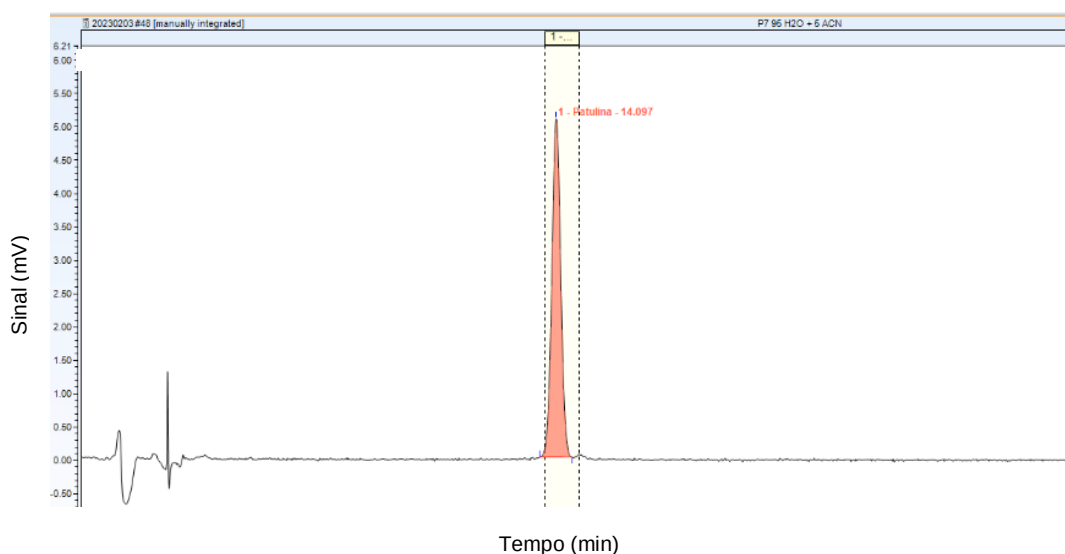


Figura 25 - Cromatograma obtido para uma das soluções padrão de calibração

Com isto foram registados os valores das áreas obtidas para cada uma das soluções padrão, em mV.s, obtidas a partir dos picos dos cromatogramas, e que estão apresentadas na tabela 11.

Tabela 11 - Resultados obtidos para o traçado da curva de calibração

Solução padrão nº	Concentração de patulina (ng/mL)	Área (mV.s)
1	5,25	7,85
2	26,3	38,6
3	52,5	75,0
4	78,8	114
5	105	149

De seguida, foi representado graficamente os valores das áreas obtidas em função da concentração de patulina das soluções padrão, usando o modelo linear (grau 1), como se verifica na figura 26.

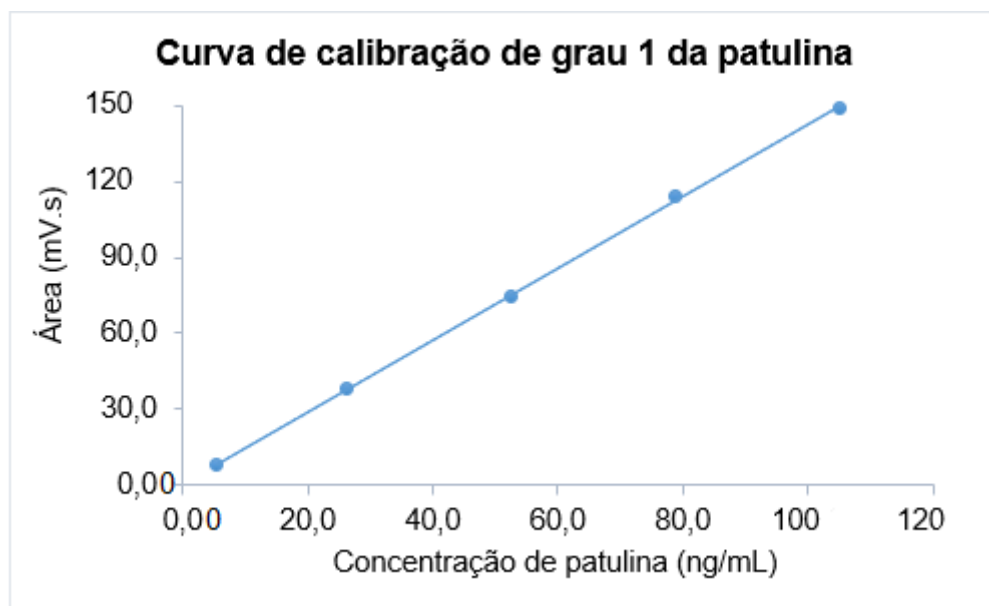


Figura 26 - Curva de calibração de grau 1 da patulina

Obtém-se uma curva de calibração cuja equação de reta é dada por:

$$\text{Área (mV.s)} = 1,42 \left(\frac{\text{mV.s}}{\text{ng/mL}} \right) \times \text{Concentração de patulina (ng/mL)} + 0,928 \text{ (mV.s)}$$

Equação 47 - Curva de calibração de grau 1 da patulina

em que o declive e a ordenada de origem foram calculados pelo uso das equações 2 e 3.

Além disso, também foi calculado o valor do coeficiente de correlação linear r , por uso da equação 7, e verificou-se que esta curva de calibração apresentava um r de 0,9999. Como se pode verificar o valor de r obtido é superior a 0,995, e, portanto, podemos concluir que existe uma correlação linear entre as áreas obtidas e as concentrações de patulina das soluções padrão.

Esta linearidade foi também evidenciada pela realização de um teste de Mandel.

Para isto foi necessário traçar uma curva de calibração usando o modelo quadrático, ou seja, de grau 2, usando o mesmo conjunto de pontos, indicados na tabela 11, tendo-se obtido o gráfico 2, cuja equação da curva de calibração é a seguinte:

$$\begin{aligned} \text{Área (mV.s)} = & 0,0493 \left[\frac{\text{mV.s}}{(\text{ng/mL})^2} \right] \times \text{Concentração de patulina}^2 (\text{ng/mL})^2 \\ & + 1,47 \left(\frac{\text{mV.s}}{\text{ng/mL}} \right) \times \text{Concentração de patulina (ng/mL)} + 0,0610 \text{ (mV.s)} \end{aligned}$$

Equação 48 - Curva de calibração de grau 2 da patulina

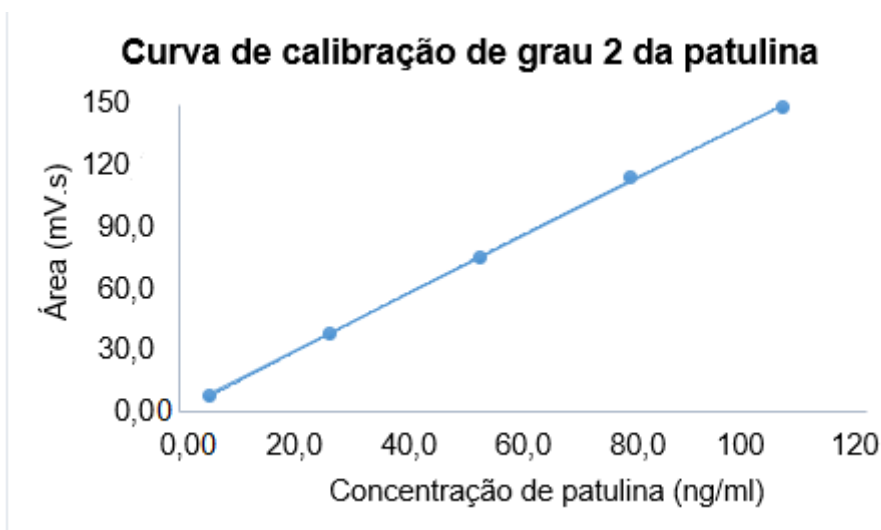


Figura 27 - Curva de calibração de grau 2 da patulina

Continuando com o teste de Mandel, calculou-se o valor de DS^2 e de PG, usando as equações 8 e 9, tendo-se obtido os resultados apresentados na tabela 12, em que se verifica que existe uma relação linear entre as áreas e as concentrações das soluções padrão, comprovando o que foi dito para o valor do coeficiente de correlação linear.

Tabela 12 - Resultados obtidos pelo uso do teste de Mandel

Teste de Mandel	
$DS^2 [(mV.s)^2]$	5,51
PG	4,65
F (95%;1;2)	98,5
Avaliação: $PG \leq F$: a calibração é linear (de grau 1), ou seja, os pontos de calibração são adequadamente ajustados por uma reta.	

Com a linearidade comprovada, todos os pontos de calibração obtidos nos dias seguintes foram ajustados usando uma regressão linear simples. As imagens seguintes ilustram outros exemplos de curvas de calibração obtidas ao longo da validação, onde a linearidade continua a ser observada.

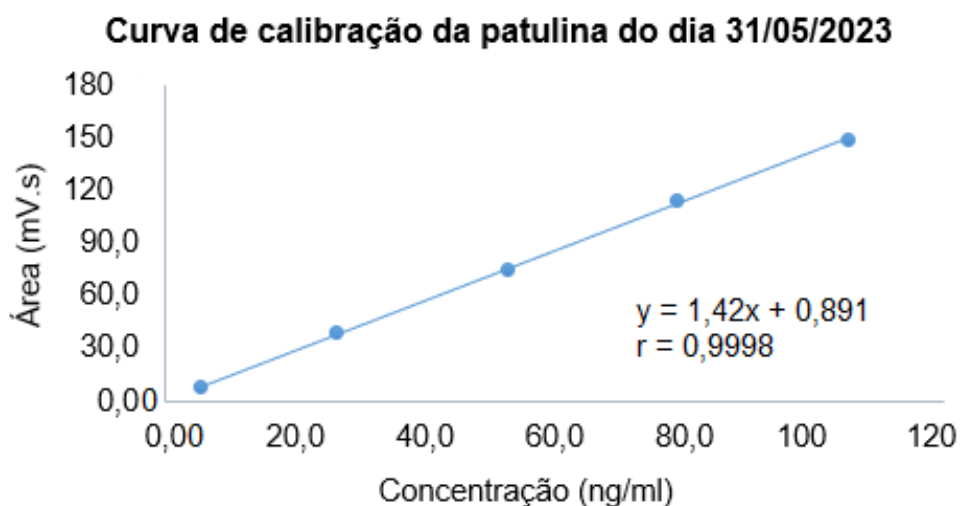


Figura 28 - Curva de calibração da patulina do dia 31/05/2023

Curva de calibração da patulina do dia 07/06/2023

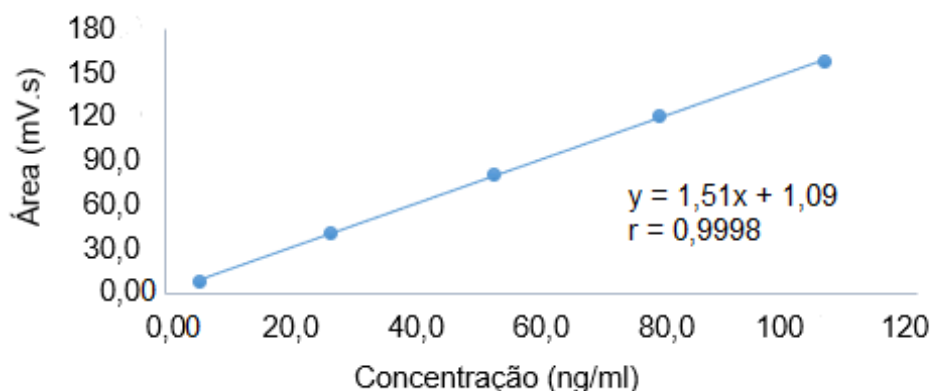


Figura 29 - Curva de calibração da patulina do dia 07/06/2023

Como, a curva de calibração para a patulina foi traçada diariamente, foi necessário avaliar a estabilidade destas curvas. Isto foi feito pela construção de uma carta de controlo de médias dos declives das curvas de calibração traçadas ao longo do tempo. A partir de todos os declives obtidos, elaborou-se uma carta de controlo de indivíduos (figura 30), usando as fórmulas apresentadas no capítulo 1.7.7.

Pela observação da carta de controlo, podemos verificar a existências de duas tendências, a tendência A entre os dias 3/5/23 e 19/6/23, e, uma tendência B entre os dias 20/6/23 e 28/6/23, uma vez que verificamos uma mudança drástica do declive do dia 19/6/23 para o dia 20/6/23, isto foi devido ao facto de se ter preparado um novo conjunto de soluções padrão, levando a esta mudança de comportamento.

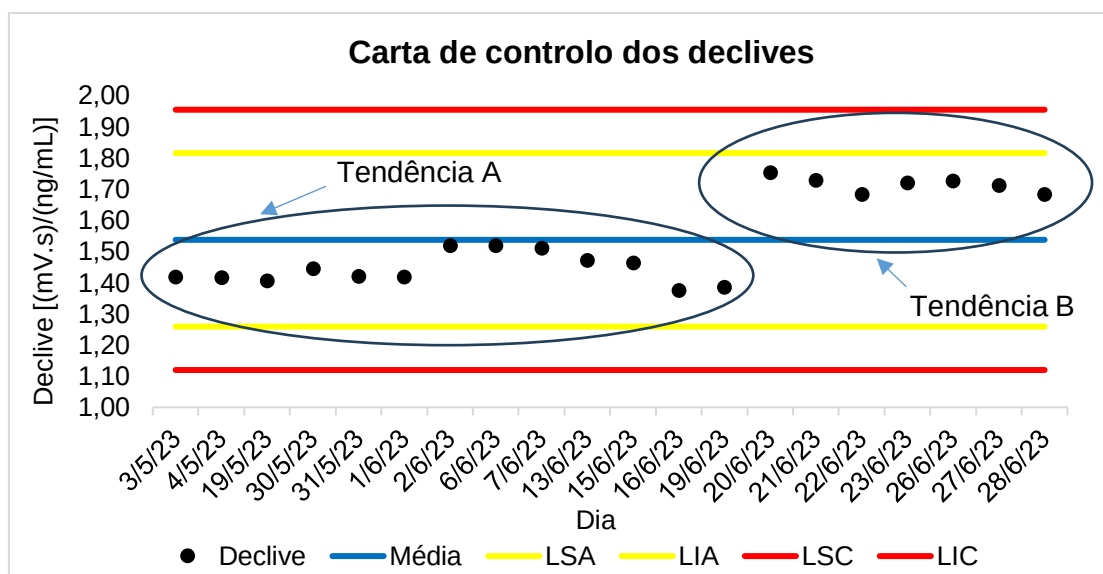


Figura 30 - Primeira carta de controlo de indivíduos dos declives obtidos

Devido a isto decidiu-se construir uma carta de controlo de médias para cada uma das tendências (figuras 31 e 32) e fazer avaliação dessas cartas. Por observação destas cartas verificamos que nenhum ponto se encontra fora de controlo, tendo em conta o que foi definido no capítulo 1.7.7.

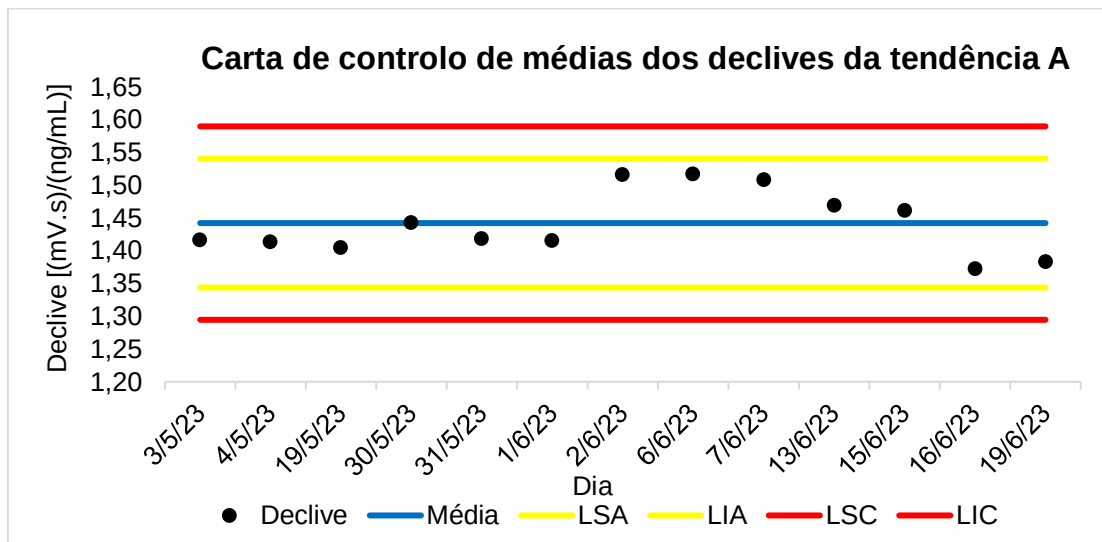


Figura 31 - Carta de controlo de médias dos declives da tendência A

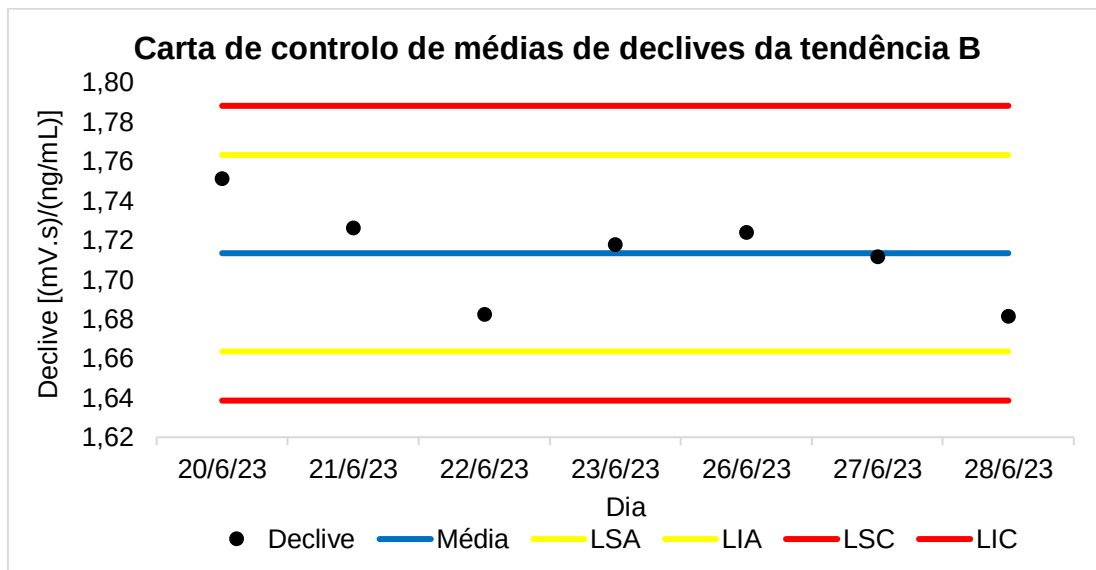


Figura 32 - Carta de controlo de médias dos declives da tendência B

Além disso, foi calculado o coeficiente de variação associado aos declives, pelo uso da equação 14, tendo obtido os resultados apresentados na tabela 13.

Como o CV (%) obtido é inferior a 10% e as cartas de controlo mostram que não existem pontos fora de controlos, os declives obtidos durante a validação do método são considerados aceitáveis e satisfatórios.

Tabela 13 - Cálculo do coeficiente de variação obtido para os declives

$\bar{x}$ dos declives $\left[\left(\frac{\text{mV.s}}{\text{ng/mL}}\right)\right]$	s dos declives $\left[\left(\frac{\text{mV.s}}{\text{ng/mL}}\right)\right]$	$\text{CV (\%)} = \frac{\bar{x} \text{ dos declives}}{s \text{ dos declives}} \times 100$
1,54	0,139	9,05

3.2.2. Gama de trabalho

A gama de trabalho definida para este método foi de 5,00 ng/mL a 100 ng/mL, que em µg/kg, corresponde a uma gama de trabalho de 2,00 µg/kg a 50,0 µg/kg, tendo em consideração o LQ obtido (ver capítulo 3.2.3) e o valor máximo do teor de patulina registado no processo de validação do método.

Para a validação do método, a gama de trabalho foi avaliada pelo uso de teste F de *Snedecor-Fisher*. Para este teste a solução padrão de menor concentração e a solução padrão de maior concentração foram analisados dez vezes seguidas, tendo-se obtido os seguintes resultados em termos de área.

Tabela 14 - Resultados obtidos para os 10 ensaios realizados para o padrão de menor e de maior concentração

		Solução padrão de 5 ng/mL	Solução padrão de 100 ng/mL
Área (mV.s)	Ensaio 1	7,85	149
	Ensaio 2	7,78	148
	Ensaio 3	7,58	148
	Ensaio 4	7,52	153
	Ensaio 5	7,82	149
	Ensaio 6	8,08	150
	Ensaio 7	8,16	159
	Ensaio 8	8,49	163
	Ensaio 9	8,22	159
	Ensaio 10	8,10	159

Utilizando a equação 10 do capítulo 1.6.2, foi-se calcular o valor de PG, tendo obtido os resultados apresentados na tabela 15.

Tabela 15 - Resultados obtidos no Teste de F de *Snedecor-Fisher*

Teste de F de <i>Snedecor-Fisher</i>	
$s_1^2 [(mV.s)^2]$	0,101
$s_2^2 [(mV.s)^2]$	31,3
PG	312
F (95%; 9 G.L)	5,35
Avaliação: A diferença entre variâncias é significativa, ou seja, não há homogeneidade de variâncias ao longo da gama de trabalho.	

Como se pode verificar a diferença entre as variâncias é significativa. Logo, devia-se reduzir a gama de trabalho, até que a diferença entre as variâncias relativas às soluções padrão de menor concentração e de maior concentração permitam obter $PG < F$, ou, como alternativa fazer um ajuste dos pontos de calibração com pesos (regressão ponderada).

Contudo, devido a restrições de tempo, não foi possível avaliar a redução da gama de trabalho. Relativamente à possibilidade de efetuar uma regressão ponderada, em contexto empresarial não é temporalmente vantajosa pois para além de ser mais complexa teria de ser aplicada sempre que fosse realizada a curva de calibração, o que implica um maior tempo de espera por parte do cliente.

No entanto, a linearidade da reta de calibração foi demonstrada na gama de trabalho selecionada, logo a gama de trabalho pode ser considerada válida e encontra-se bem ajustada, de acordo com os procedimentos internos da empresa.

3.2.3. Limiares Analíticos

Para este método, foi determinado o LD e LQ, pelas equações 12 e 13 indicadas no capítulo 1.6.4.

Inicialmente foi necessário calcular o valor do desvio padrão residual de uma das retas de calibração usadas na validação, e depois foi calculado o LD e o LQ, sendo que estes foram convertidos para $\mu\text{g/kg}$, pela equação 44, como se pode observar na tabela 16, em que se verifica que o LQ corresponde à concentração da solução padrão de menor concentração.

Tabela 16 – LD e LQ obtidos

Declive $\left(\frac{\text{mV.s}}{\text{ng/mL}}\right)$	$s_{y/x}$ (mV.s)	LD (ng/mL)	LQ (ng/mL)	LD ($\mu\text{g/kg}$)	LQ ($\mu\text{g/kg}$)
1,41	0,704	1,65	5,00	0,660	2,00

Posteriormente, foi necessário validar experimentalmente os valores obtidos, contudo devido a contingências de tempo, isto só pode ser feito para o LQ. Para fazer isto, foi realizado um ensaio de recuperação, numa das matrizes em estudo, neste caso, o néctar de maçã, que foi fortificado com patulina a um nível de concentração de 2,00 $\mu\text{g/kg}$, e foi analisado em triplicado, obtendo-se os resultados apresentados na tabela 17.

Tabela 17 - Resultados obtidos para o ensaio de recuperação para a confirmação experimental do LQ

Amostra	Néctar maçã 2 $\mu\text{g/kg}$ A1	Néctar maçã 2 $\mu\text{g/kg}$ A2	Néctar maçã 2 $\mu\text{g/kg}$ A3
$m_{\text{patulina adicionada}} (\mu\text{g})$	0,0222	0,0222	0,0222
$x_{\text{obtido}} (\mu\text{g/kg})$	1,78	1,68	1,70
$x_{\text{teórico}} (\mu\text{g/kg})$	2,22	2,22	2,22
Taxa de recuperação (%)	80,0	75,7	76,5

Como as taxas de recuperação obtidas estão dentro dos limites estabelecidos, os resultados obtidos são considerados satisfatórios e aceitáveis, demonstrando que o método consegue quantificar a concentração de patulina da solução padrão de menor concentração, comprovando experimentalmente o LQ obtido.

3.2.4. Seletividade

A seletividade do método foi avaliada pela comparação dos resultados obtidos de um branco de reagente, de uma solução padrão, de uma amostra não fortificada e de uma amostra fortificada com patulina e, também, pelo cálculo da taxa de recuperação obtida neste ensaio de recuperação efetuado.

Nas figuras 33 a 36 estão representadas os cromatogramas obtidos para cada uma destas análises, em conjunto com a sobreposição dos seus cromatogramas para uma melhor comparação e, na tabela 18 está resumido o estudo da seletividade.

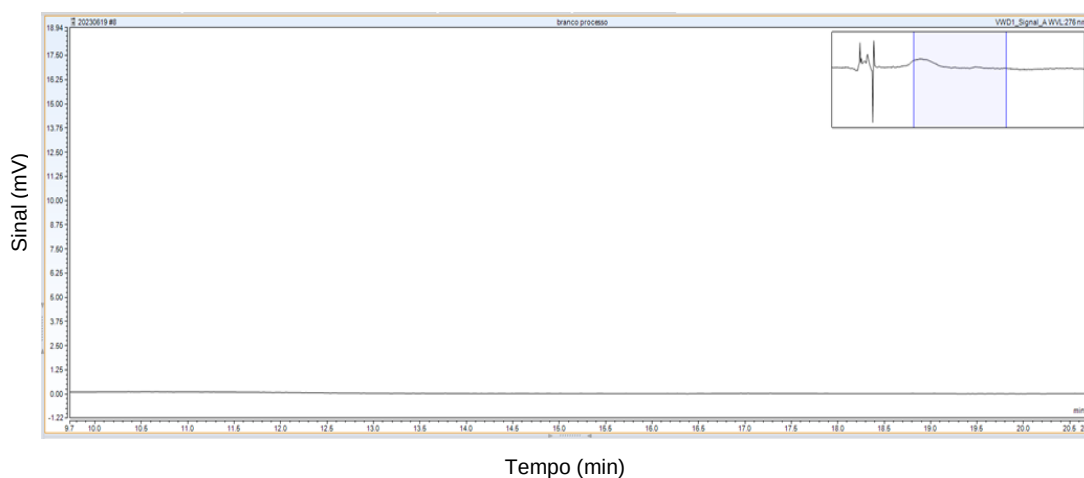


Figura 33 - Cromatograma do branco de reagente

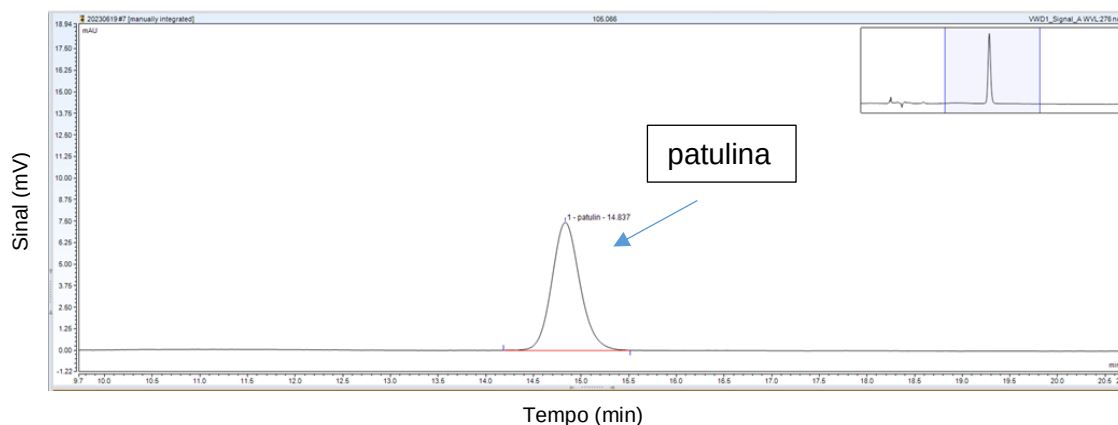


Figura 34 - Cromatograma da solução padrão de patulina de concentração igual a 100 ng/mL

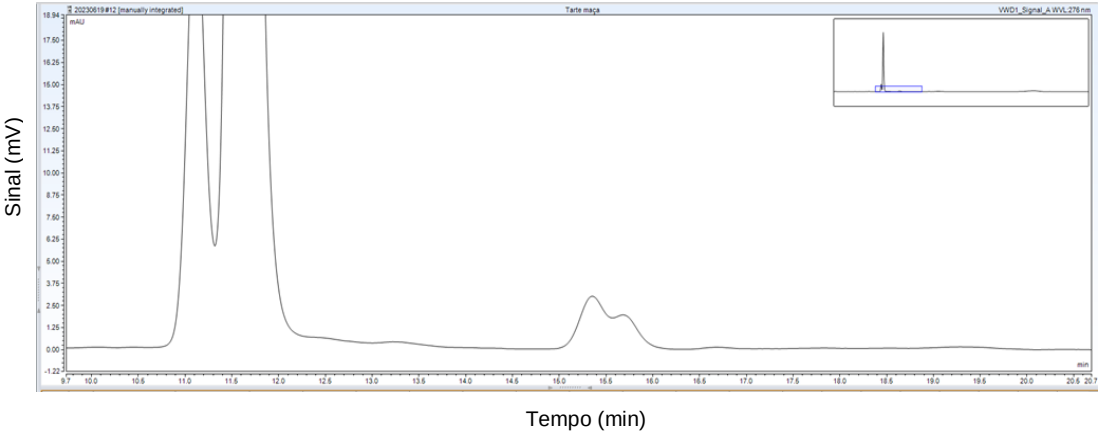


Figura 35 - Cromatograma da amostra não fortificada

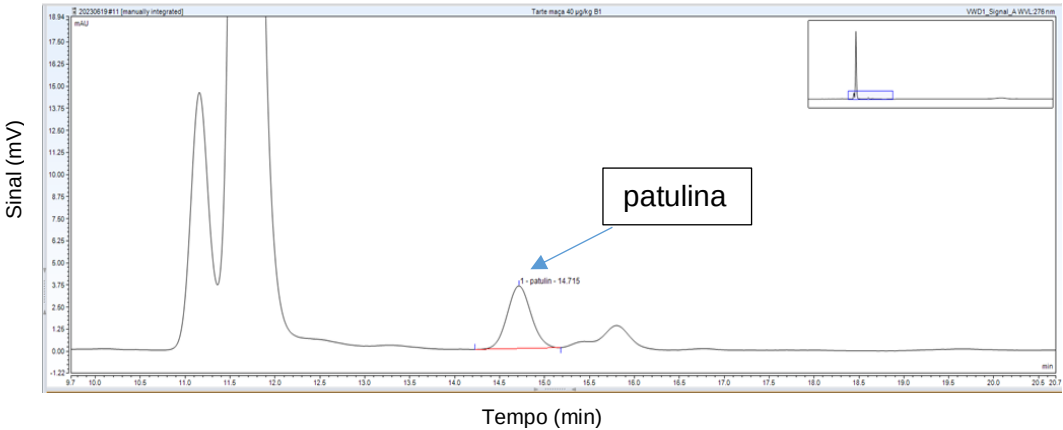


Figura 36 - Cromatograma da amostra fortificada

Tabela 18 - Resultados obtidos no estudo da seletividade

Injeção	Tempo de retenção (min)	Taxa de Recuperação (%)
Branco de reagente	-	-
Solução padrão 100 ng/mL	14,9	-
Amostra não fortificada	-	-
Amostra fortificada	14,7	88,0

Pela observação dos cromatogramas do branco de reagente e da amostra não fortificada, podemos verificar que não existe nenhum pico interferente na zona do tempo de retenção da patulina. Logo, podemos concluir que o resultado obtido pelos cromatogramas do padrão analisado e da amostra fortificada provém apenas do analito

de interesse (patulina). A percentagem de recuperação obtida, é considerada satisfatória e aceitável, permitindo comprovar que o resultado realmente provém apenas da patulina, e, portanto, o método é considerado seletivo.

3.2.5. Precisão

A precisão deste método foi avaliada em termos de repetibilidade e de precisão intermédia.

3.2.5.1. Repetibilidade

O estudo da repetibilidade foi feito a partir da realização de 7 ensaios para cada uma das matrizes estudadas, sendo que estes ensaios foram feitos nas mesmas condições de tempo, ou seja, no mesmo dia. Os dois MR foram analisados diretamente enquanto, as restantes matrizes foram estudadas a partir do uso de ensaios de recuperação, estando, na tabela 19, os resultados obtidos para cada um dos 7 ensaios realizados.

Tabela 19 - Resultados obtidos nos 7 ensaios de cada matriz em estudo para a avaliação da repetibilidade

Matrizes	Teor de patulina (µg/kg)						
	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	Ensaio 4	Ensaio 5	Ensaio 6	Ensaio 7
FAPAS T1681 Apple juice	19,1	18,8	17,4	18,1	18,0	19,0	19,0
FAPAS T1679 Apple puree	12,0	12,2	11,9	12,7	12,7	11,8	11,9
Néctar maçã	5,15	5,20	4,71	4,91	4,88	5,32	5,24
Puré infantil	3,78	3,61	4,22	3,81	3,80	3,79	3,93
Farinha láctea	23,4	23,6	23,5	24,1	23,0	23,8	23,2
Tarte maçã	39,1	38,8	35,3	37,7	37,3	36,1	36,2
Sidra maçã	48,3	45,0	47,9	47,7	43,3	44,2	43,5

De seguida, foi necessário verificar se existia algum valor mínimo ou máximo, que fosse aberrante, e, portanto, usou-se o teste de Grubbs para esse efeito, com o uso da equação 40, sendo o valor de G tabelado (95%,7) igual a 2,02.

Tabela 20 - Resultados obtidos pelo uso do teste de Grubbs para a verificação de valores aberrantes

Matrizes	Teor mínimo de patulina (µg/kg)	$G_{\text{teor mínimo}}$	Avaliação do teor mínimo	Teor máximo de patulina (µg/kg)	$G_{\text{teor máximo}}$	Avaliação do teor máximo
FAPAS T1681 Apple juice	17,4	1,63	Aceitável	19,1	0,89	Aceitável
FAPAS T1679 Apple puree	11,8	0,89	Aceitável	12,7	1,37	Aceitável
Néctar maçã	4,71	1,55	Aceitável	5,32	1,18	Aceitável
Puré infantil	3,61	1,24	Aceitável	4,22	1,98	Aceitável
Farinha láctea	23,0	1,40	Aceitável	24,0	1,51	Aceitável
Tarte maçã	35,3	1,32	Aceitável	39,1	1,30	Aceitável
Sidra maçã	43,3	1,10	Aceitável	48,3	1,19	Aceitável

Logo, segundo o teste de Grubbs, não é necessário remover nenhum dos teores de patulina máximos e mínimos obtidos, pois os valores de G obtidos são inferiores ao valor de G tabelado.

Posteriormente, já podemos fazer a avaliação da repetibilidade, calculando diversos parâmetros de interesse, como, o desvio padrão amostral, a variância (igual ao desvio padrão amostral ao quadrado), o coeficiente de variação e os limites de repetibilidade, pelo uso das equações 15, 16, 17 e 32.

Tabela 21 - Resultados de interesse para o estudo da repetibilidade

Matrizes	Variância (s^2) [($\mu\text{g/kg}$) ^{2}]	Desvio padrão amostral (s) [$\mu\text{g/kg}$]	CV_r (%)	Limite da repetibilidade (r_r) [$\mu\text{g/kg}$]	Limite da repetibilidade relativo (CVr_r) (%)
FAPAS T1681 Apple juice	0,418	0,646	3,50	1,81	9,79
FAPAS T1679 Apple puree	0,149	0,386	3,17	1,08	8,87
Néctar maçã	0,0501	0,224	4,43	0,627	12,4
Puré infantil	0,0355	0,189	4,90	0,528	13,7
Farinha láctea	0,132	0,363	1,55	1,02	4,33
Tarte maçã	2,01	1,42	3,81	3,97	10,7
Sidra maçã	4,80	2,19	4,80	6,13	13,4

Por uma observação rápida da tabela, podemos verificar que todos os CV_r obtidos são inferiores a 5%, o que indica que resultados são precisos, ou seja, não existe uma grande dispersão entre os vários valores obtidos.

De seguida, foi necessário fazer uma avaliação da homogeneidade das variâncias dos resultados, para verificar se os valores obtidos eram estatisticamente diferentes, e, portanto, foi-se aplicar o teste de Cochran, tendo em conta o que foi no capítulo 1.7.9, estando na tabela 22, os resultados obtidos.

Tabela 22 - Resultados obtidos pelo uso do teste de Cochran

Teste de Cochran			
Máxima Variância $[(\mu\text{g/kg})^2]$	C calculado	C tabelado (n=7;k=7;95%)	Avaliação
4,80	0,632	0,373	Não há homogeneidade de variâncias. Será necessário remover a maior variância.

Segundo o teste de Cochran seria correto remover os resultados da sidra de maçã, que apresentavam a maior variância, e aplicar novamente o teste de Cochran nos restantes, ou então, repetir os ensaios da sidra de maçã para obter novos valores e fazer esta avaliação novamente.

No entanto, como os resultados da sidra eram considerados precisos, e as percentagens de recuperação obtidas nos sete ensaios estavam dentro de critério de aceitação (ver tabela 23), o laboratório decidiu dividir as várias matrizes estudadas em três gamas de concentração diferentes, e fazer a avaliação do teste de Cochran em cada uma dessas gamas definidas.

Tabela 23 - Taxas de recuperação obtidas para a sidra de maçã no estudo da repetibilidade

Matriz	Taxa de recuperação (%)						
	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	Ensaio 4	Ensaio 5	Ensaio 6	Ensaio 7
Sidra maçã	88,6	82,6	86,2	85,9	81,2	82,7	81,3

A divisão das matrizes pelas gamas de concentração está ilustrada na tabela 24.

Tabela 24 - Divisão das várias matrizes em estudo nas três gamas de concentração definidas

Gamas de concentração		
Gama de concentração baixa ($< 15,0 \mu\text{g/kg}$)	Gama de concentração intermédia (de $15,0$ a $30,0 \mu\text{g/kg}$)	Gama de concentração alta ($\geq 30,0 \mu\text{g/kg}$)
<i>FAPAS T1679 Apple puree</i>	<i>FAPAS T1681 Apple juice</i>	Tarte maçã
Néctar maçã	Farinha láctea	Sidra maçã
Puré infantil	-	-

Os resultados obtidos pelo uso do teste de Cochran, nas três gamas de concentração diferentes, estão representados nas tabelas 25, 26 e 27.

Tabela 25 - Resultado do teste de Cochran na gama de concentração baixa

Teste de Cochran na gama de concentração baixa			
Máxima Variância [[$\mu\text{g/kg}$] ²]	C calculado	Valor tabelado ($n=3; k=7; 95\%$)	Avaliação
0,149	0,634	0,677	Existe homogeneidade de variâncias. Resultados não são estatisticamente diferentes.

Tabela 26 - Resultado do teste de Cochran na gama de concentração intermédia

Teste de Cochran na gama de concentração intermédia			
Máxima Variância [(µg/kg) ²]	C calculado	C tabelado (n=2;k=7;5%)	Avaliação
0,418	0,760	0,853	Existe homogeneidade de variâncias. Resultados não são estatisticamente diferentes.

Tabela 27 - Resultado do teste de Cochran na gama de concentração alta

Teste de Cochran na gama de concentração alta			
Máxima Variância [(µg/kg) ²]	C calculado	C tabelado (n=2;k=7;5%)	Avaliação
4,80	0,705	0,853	Existe homogeneidade de variâncias. Resultados não são estatisticamente diferentes.

Portanto, podemos verificar que nas três gamas de concentração definidas, existe homogeneidade de variâncias, logo, os resultados não estatisticamente diferentes. Por isso, podemos definir um único valor representativo para o CV_r e para o limite de repetibilidade, para cada uma das gamas. Isto é feito pelo cálculo da média dos CV_r e dos limites de repetibilidade de cada matriz estudada, dentro de cada gama de concentração. Por exemplo, no caso da gama de concentração mais baixa, seria calculada a média dos CV_r e a média dos limites de repetibilidade das três matrizes inseridas nesta gama, os valores médios obtidos são depois considerados os representativos dessa gama. Os resultados finais estão representados na tabela 28.

Tabela 28 - Valores finais de CV_r, o r_r e o CV_r para cada gama de concentração

Parâmetros de interesse	Gamas de concentração		
	Gama de concentração baixa (< 15,0 µg/kg)	Gama de concentração intermédia (de 15,0 a 30,0 µg/kg)	Gama de concentração alta (≥ 30,0 µg/kg)
CV _r (%)	3,73	4,16	4,30
Limite da repetibilidade (r _r) [µg/kg]	2,17	0,745	5,05
Limite da repetibilidade relativo (CV _r) (%)	10,5	11,7	12,1

Com isto, o estudo da repetibilidade fica concluído, em que se pode verificar que pela aplicação deste método consegue-se obter resultados precisos, em condições de repetibilidade, pois os coeficientes de variação de repetibilidade obtidos são inferiores a 5%.

3.2.5.2. Precisão intermédia

A precisão intermédia foi determinada a partir pela da análise de seis duplicados de cada uma das matrizes em estudo, em seis dias diferentes.

Antes de se calcular as medidas de dispersão de interesse foi necessário fazer a avaliação dos duplicados obtidos usando o respetivo valor do limite de repetibilidade relativo obtido anteriormente, para verificar se era necessário fazer a repetição de algum dos ensaios, dividindo novamente os resultados nas gamas de concentração definidas no capítulo 3.2.5.1. Esta avaliação está representada na tabelas 29, 30 e 31.

Tabela 29 - Avaliação dos duplicados obtidos pela comparação da máxima diferença aceitável com a diferença dos resultados dos duplicados na gama de concentração baixa

Gama de concentração baixa (< 15,0 µg/kg)							
Matriz	Dia	Resultado (µg/kg)		CV _r (%)	Média (µg/kg)	Máxima diferença aceitável (CV _r X Média) [µg/kg]	Diferença R ₁ -R ₂ (µg/kg)
		R ₁	R ₂				
FAPAS T1679 <i>Apple puree</i>	Dia 1	12,2	11,9	11,7	12,1	1,41	0,378
	Dia 2	11,1	11,7	11,7	11,4	1,33	0,606
	Dia 3	11,4	11,2	11,7	11,3	1,32	0,202
	Dia 4	11,6	11,1	11,7	11,4	1,33	0,480
	Dia 5	11,1	11,1	11,7	11,1	1,30	0,0107
Néctar maçã	Dia 1	5,44	5,46	11,7	5,45	0,635	0,0292
	Dia 2	5,15	5,20	11,7	5,17	0,603	0,0441
	Dia 3	4,45	4,52	11,7	4,49	0,523	0,0700
	Dia 4	4,98	5,03	11,7	5,00	0,583	0,0465
	Dia 5	3,16	3,05	11,7	3,10	0,362	0,104
	Dia 6	3,48	3,66	11,7	3,57	0,417	0,183
Puré infantil	Dia 1	3,78	3,93	11,7	3,85	0,449	0,152
	Dia 2	3,02	3,22	11,7	3,12	0,364	0,205
	Dia 3	4,70	4,98	11,7	4,84	0,564	0,278
	Dia 4	3,97	3,87	11,7	3,92	0,457	0,100
	Dia 5	3,87	3,88	11,7	3,88	0,452	0,0100
	Dia 6	4,47	4,19	11,7	4,33	0,505	0,280

Tabela 30 - Avaliação dos duplicados obtidos pela comparação da máxima diferença aceitável com a diferença dos resultados dos duplicados na gama de concentração intermédia

Gama de concentração intermédia (de 15,0 a 30,0 µg/kg)							
Matriz	Dia	Resultado (µg/kg)		CV _r (%)	Média (µg/kg)	Máxima diferença aceitável (CV _r X Média) [µg/kg]	Diferença R ₁ -R ₂ (µg/kg)
		R ₁	R ₂				
FAPAS T1681 <i>Apple Juice</i>	Dia 1	19,1	18,8	7,06	19,0	1,34	0,224
	Dia 2	17,9	18,3	7,06	18,1	1,28	0,403
	Dia 3	22,6	22,8	7,06	22,7	1,60	0,250
	Dia 4	21,0	22,4	7,06	21,7	1,53	1,37
	Dia 5	26,9	27,6	7,06	27,2	1,92	0,720
	Dia 6	24,0	22,6	7,06	23,3	1,64	1,36
Farinha Láctea	Dia 1	28,3	30,2	7,06	29,2	2,06	1,85
	Dia 2	22,9	22,7	7,06	22,8	1,61	0,170
	Dia 3	23,9	23,9	7,06	23,9	1,69	0,0500
	Dia 4	23,4	23,6	7,06	23,5	1,66	0,194
	Dia 5	33,8	32,9	7,06	33,3	2,35	0,815
	Dia 6	25,5	25,6	7,06	25,5	1,80	0,0386

Tabela 31 - Avaliação dos duplicados obtidos pela comparação da máxima diferença aceitável com a diferença dos resultados dos duplicados na gama de concentração alta

Gama de concentração alta (≥ 30,0 µg/kg)							
Matriz	Dia	Resultado (µg/kg)		CV _r (%)	Média (µg/kg)	Máxima diferença aceitável (CV _r X Média) [µg/kg]	Diferença R ₁ -R ₂ (µg/kg)
		R ₁	R ₂				
Tarte Maçã	Dia 1	31,2	34,6	12,0	32,9	3,96	3,45
	Dia 2	37,3	36,1	12,0	36,7	4,42	1,20
	Dia 3	30,8	31,1	12,0	30,9	3,73	0,240

Gama de concentração alta ($\geq 30,0 \mu\text{g/kg}$)							
Matriz	Dia	Resultado ($\mu\text{g/kg}$)		CV _r (%)	Média ($\mu\text{g/kg}$)	Máxima diferença aceitável (CV _r X Média) [$\mu\text{g/kg}$]	Diferença a R ₁ -R ₂ ($\mu\text{g/kg}$)
		R ₁	R ₂				
	Dia 4	30,7	30,8	12,0	30,7	3,70	0,0400
	Dia 5	32,1	32,5	12,0	32,3	3,89	0,387
	Dia 6	32,9	33,3	12,0	33,1	3,99	0,387
Sidra Maçã	Dia 1	44,4	42,1	12,0	43,2	5,21	2,32
	Dia 2	45,0	44,2	12,0	44,6	5,37	0,740
	Dia 3	40,8	40,8	12,0	40,8	4,91	0,00
	Dia 4	39,1	38,9	12,0	39,0	4,70	0,175
	Dia 5	45,4	45,1	12,0	45,3	5,45	0,229
	Dia 6	41,2	39,3	12,0	40,2	4,85	1,94

Pela observação destas tabelas podemos verificar que os todos os duplicados são aceitáveis, pois o valor da diferença entre os resultados dos duplicados é inferior à máxima diferença aceitável, logo não é necessário remover nenhum duplicado.

Posteriormente, foi-se determinar o desvio padrão da precisão intermédia (s_i) e o coeficiente de variação da precisão intermédia, dentro de cada gama de concentração, usando a equação 18 e 20. Os resultados estão representados na tabela 32.

Tabela 32 - Resultados obtidos no estudo da precisão intermédia

Parâmetros associados à precisão intermédia	Gama de concentração baixa ($< 15,0 \mu\text{g/kg}$)	Gama de concentração intermédia (de $15,0$ a $30,0 \mu\text{g/kg}$)	Gama de concentração alta ($\geq 30,0 \mu\text{g/kg}$)
s_i ($\mu\text{g/kg}$)	0,183	0,601	0,989

CV_i (%)	2,87	2,49	2,64
---------------------------	------	------	------

Pelos resultados obtidos no estudo da precisão intermédia, podemos observar que os CV_i obtidos para cada uma das gamas de concentração definidas, são inferiores a 5%, indicando que pela aplicação deste método consegue-se obter resultados precisos em condições de precisão intermédia.

3.2.6. Veracidade/justeza

A veracidade/justeza foi avaliada pela análise de 2 MR– o *FAPAS T1681 Apple juice* e o *FAPAS T1679 Apple puree* – sendo calculado o z-score (equação 35), e, também pela realização de ensaios de recuperação no resto das matrizes usadas na validação (néctar maçã, puré infantil, farinha láctea, tarte maçã e sidra maçã), sendo calculado as taxas de recuperação (equação 34). Nesta avaliação, foram usados os resultados obtidos no estudo da repetibilidade para os cálculos necessários.

Começando pelos dois MR, na tabela 33 estão apresentados os resultados provenientes dos seus certificados e na tabela 34 os resultados obtidos pelo laboratório.

Tabela 33 - Valores alvo da concentração de patulina e desvio padrão associado retirados dos certificados de cada um dos MR

Matriz	<i>FAPAS T1681 Apple juice</i>	<i>FAPAS T1679 Apple puree</i>
Valor alvo do teor de patulina (µg/kg)	24,2	19,8
Desvio padrão (µg/kg)	5,32	4,35

Tabela 34 - Resultados obtidos pelo laboratório da análise dos 2 MRC em condições de repetibilidade, a média é posteriormente calculada para ser usada no cálculo do z-score.

Matriz		FAPAS T1681 Apple juice	FAPAS T1679 Apple puree
Teor de patulina (µg/kg)	Ensaio 1	19,1	12,0
	Ensaio 2	18,8	12,2
	Ensaio 3	17,4	11,9

	Ensaio 4	18,1	12,7
	Ensaio 5	18,0	12,7
	Ensaio 6	19,0	11,8
	Ensaio 7	19,0	11,9
Média do teor de patulina (µg/kg)		18,5	12,2
Desvio padrão do teor de patulina (µg/kg)		0,646	0,385

Com o valor alvo e o desvio padrão de cada MR e com os resultados das análises, pode-se calcular o valor do z-score, utilizando a equação 35, estando na tabela 36, os valores obtidos.

Tabela 35 - Valores de z-score obtidos no estudo da veracidade dos dois MR

Matriz	<i>FAPAS T1681 Apple juice</i>	<i>FAPAS T1679 Apple puree</i>
 z-score 	1,07	1,75
Avaliação dos resultados	Ambos os resultados são aceitáveis e o laboratório apresenta um desempenho satisfatório	

Em relação às outras matrizes, a veracidade foi estudada pela realização de ensaios de recuperação, na tabela 36, estão apresentadas as médias das taxas de recuperação (%) obtidas para cada uma delas, pelo uso da equação 34.

Tabela 36 - Média das taxas de recuperação obtidas no estudo de veracidade das restantes matrizes

Matriz	Taxa de recuperação (%) média
Néctar maçã	79,5

Matriz	Taxa de recuperação (%) média
Puré infantil	75,8
Farinha láctea	71,9
Tarte maçã	84,1
Sidra maçã	84,0

Como podemos observar, os módulos dos valores de z-score obtidos são inferiores a dois e as percentagens de recuperação médias obtidas estão dentro do critério de aceitação definido pelo Regulamento (CE) N.º 401/2006, portanto, podemos concluir que o método tem uma elevada veracidade/justeza, ou seja, pela aplicação deste método consegue-se obter resultados que são muito próximos do valor considerado verdadeiro.

3.2.7. Incerteza

A incerteza associada ao nosso método foi estimada usando a abordagem empírica baseada nos dados da validação, utilizando o que foi escrito no capítulo 1.6.8.

Uma vez que existem três gamas de concentração diferentes, foi calculada uma incerteza para cada uma delas, mas como não possuíamos um MR na gama alta, a incerteza da gama intermédia foi expandida para a gama de concentração alta.

Para ambos os MR utilizados, o valor da u_{Cref} estava indicado no seu certificado, sendo que para ambos, esta tinha um valor de 0,9, e usou-se os valores obtidos no estudo da repetibilidade para calcular a componente da incerteza associada à veracidade. Para o estudo da componente da precisão foi utilizando o valor do CV_I obtido no estudo da precisão intermédia.

Nas tabelas 37 e 38, estão representados os resultados obtidos para o estudo da incerteza do método, para a gama baixa e para a gama intermédia, respetivamente.

Tabela 37 - Determinação da incerteza do método para a gama de concentração baixa

Gama de concentração baixa (< 15,0 µg/kg)			
Componente	Variável	Valor	Unidades
Precisão intermédia	$u_{(precisão) \text{ relativa}}$	2,87	%
Veracidade considerando a análise de um MR	u_{Cref}	0,900	µg/kg
	C_{MR}	19,8	µg/kg
	$u_{(Cref) \text{ relativa}}$	4,55	%
	$bias \text{ relativo}$	38,5	%
	S_{bias}	0,385	µg/kg
	$\bar{x}_{lab}$	12,2	µg/kg
	$S_{(bias) \text{ relativo}}$	3,17	%
	$u_{(veracidade) \text{ relativa}}$	38,8	%
Incerteza combinada	u_c	38,9	%
Incerteza expandida	U	77,9	%

Tabela 38 - Determinação da incerteza do método para a gama de concentração intermédia, que foi expandida para a gama de concentração alta

Gama de concentração intermédia (de 15,0 a 30,0 µg/kg) expandida para a gama de concentração alta			
Componente	Variável	Valor	Unidades
Precisão	$u_{(precisão) \text{ relativa}}$	2,49	%
Veracidade considerando a análise de um MR	u_{Cref}	0,900	µg/kg
	C_{MR}	24,2	µg/kg
	$u_{(Cref) \text{ relativa}}$	3,72	%
	$bias \text{ relativo}$	23,6	%
	S_{bias}	0,646	µg/kg
	$\bar{x}_{lab}$	18,5	µg/kg
	$S_{(bias) \text{ relativo}}$	3,49	%
	$u_{(veracidade) \text{ relativa}}$	23,9	%

Gama de concentração intermédia (de 15,0 a 30,0 µg/kg) expandida para a gama de concentração alta			
Componente	Variável	Valor	Unidades
Incerteza combinada	u_c	24,0	%
Incerteza expandida	U	48,1	%

Geralmente, em âmbito laboratorial, a incerteza do método só é considerada aceitável caso esta não exceda os 20%. No caso das micotoxinas, como a patulina, é normal as incertezas estarem acima deste valor, portanto o laboratório considera aceitáveis valores de incerteza entre os 30% e os 40%. No entanto, como se pode verificar as incertezas obtidas estão acima do que é considerado aceitável. As elevadas incertezas obtidas são devido à componente da incerteza da veracidade, para ambas, ser dez vezes superior à componente da incerteza da precisão, algo que é mais notável na gama de concentração baixa, o que indica que os resultados obtidos estão muito afastados da valor alvo definido para cada MR.

No entanto, no futuro, deviam ser feitas algumas correções para tentar reduzir as incertezas, tais como: repetir os ensaios novamente com os mesmos MR, ou até, tentar encontrar outros materiais de referência que estejam dentro das gamas de concentração definidas, para verificar se as incertezas obtidas seriam tão elevadas. Caso não haja MR pode-se eventualmente utilizar ensaios de recuperação para avaliar a incerteza.

3.3. Comparação com a metodologia anteriormente aplicada

Pela metodologia anteriormente aplicada, a patulina era determinada por HPLC-UV. Inicialmente as amostras eram pré-tratadas com a enzima pectinase, para evitar muitas perdas de patulina durante a extração, e água. Na nova metodologia, a pectinase não é utilizada uma vez que demonstrou ser ineficaz, porque os resultados obtidos com o uso da pectinase eram semelhantes aos resultados obtidos sem o uso desta enzima. A extração da patulina das amostras era feita a partir da realização de várias extrações líquido-líquido com acetato de etilo e uma solução de carbonato de sódio. De seguida, o extrato era evaporado num evaporador rotativo e também em corrente de azoto, e, finalmente, o resíduo seco era redissolvido numa solução aquosa de ácido acético a pH 4, e era transferido para um *vial* para ser analisado por HPLC-UV.

Esta era metodologia que a empresa aplicou durante vários anos, só que com a o passar do tempo, começou-se a verificar as desvantagens que este método trazia. Em primeiro lugar, os tempos de preparação de amostras eram muito elevados, uma vez que um técnico de laboratório só consegue extrair duas amostras ao mesmo tempo e os extratos demoram algum tempo a evaporar devido à quantidade de volume obtido. Em segundo lugar, os tempos de análise em HPLC eram de duas horas, o que implicava muitas vezes uma sequência demorar quase três dias a completar, que obrigava a um maior gasto de solventes para a fase móvel, um maior desgaste da coluna e a uma indisponibilidade do equipamento para ser usado para outro método, que levou a menor sustentabilidade e maiores gastos para a empresa. Além disso, em termos de resultados obtidos, a empresa obtinha taxas de recuperação bastante baixas, mais baixas em comparação como método novo, e alguns dos resultados eram falsos positivos, ou seja, acusavam ter patulina, mas na verdade as amostras não continham.

Devido a isto a empresa tentou arranjar soluções, e uma destas foi a implementação de um método novo para a determinação de patulina, que foi o método que foi aplicado neste trabalho.

Em termos de resultados obtidos, a metodologia nova permitiu obter resultados bastante satisfatórios, devido ao facto de existirem menos condicionantes que afetem o resultado final, apesar da incerteza ser elevada. O próprio procedimento experimental demonstrou ser mais rápido, eficiente e não é complexo, que permitiu com que os tempos de preparação de amostra diminuíssem consideravelmente, e além disso, o próprio tempo de análise em HPLC diminui para metade, permitindo um menor gasto de reagentes e solventes, um menor desgaste da coluna e o próprio equipamento fica disponível mais rapidamente, para ser utilizado para outro método.

4. Conclusão

Pela realização deste trabalho, foi possível validar um novo método para a determinação de patulina por HPLC-UV, em produtos à base de maçã, pertencentes às famílias dos alimentos confeccionados e pré-confeccionados; dos alimentos dietéticos, suplementos alimentares, produtos de alimentação especial; das bebidas alcoólicas e não alcoólicas e dos frutos, algas, produtos hortícolas e derivados. Com este propósito, foi realizado um conjunto de ensaios diferentes que levou à determinação de diversos parâmetros de desempenho, nomeadamente, a linearidade, o limite de deteção, o limite de quantificação, a gama de trabalho, a seletividade, a precisão em termos de repetibilidade e de precisão intermédia, a veracidade, e, por fim, a incerteza do método analítico.

Com este trabalho conseguiu-se demonstrar que existe uma relação linear entre a área do pico da patulina e a concentração de patulina, que foi comprovada pelo cálculo do coeficiente de correlação linear obtido ($r=0,9999$) e confirmada pelo teste de Mandel.

A gama de trabalho selecionada foi avaliada pelo uso do teste de *Snedecor-Fisher*, tendo-se verificado que esta se encontrava mal ajustada. Apesar disto, uma vez que foi verificada a linearidade da curva de calibração na gama definida, internamente, não foi necessário fazer a redução da gama de trabalho, tendo-se posteriormente dividido a gama de trabalho em três gamas de concentração diferentes.

Além disso, obteve-se um LD de $0,660 \mu\text{g/kg}$ e um LQ de $2,00 \mu\text{g/kg}$. O LQ foi comprovado experimentalmente pela realização de um ensaio de recuperação, demonstrando que o método é capaz de quantificar a concentração de patulina da solução padrão de menor concentração.

Em relação à seletividade, o método é considerado seletivo, tendo em conta a análise comparativa que foi feita e o ensaio de recuperação realizado, tendo-se obtido uma taxa de recuperação de 88,0%.

Tanto o estudo da repetibilidade como o estudo da precisão intermédia, permitiram avaliar a precisão do método analítico, tendo-se verificado que os valores dos CV obtidos eram aceitáveis, nas três gamas de concentração definidas. Assim, os resultados são considerados precisos quando obtidos, quer em condições de repetibilidade, quer em condições de precisão intermédia, e os erros aleatórios observados não afetam a confiança nos resultados obtidos.

Pelo estudo da veracidade, constatou-se que não existem evidências da ocorrência de erros sistemáticos, uma vez que o método mostrou ter uma elevada veracidade/justeza, tendo em conta os resultados obtidos na análise de MR e na realização de ensaios de recuperação.

Os resultados obtidos pelo método têm uma incerteza considerável, apesar de se ter conseguido resultados com uma elevada precisão e veracidade. Assim, no futuro deve ser feita uma nova estimativa da incerteza do método, de modo a tentar corrigir esta situação.

Em conclusão, é possível afirmar que o método apresentado neste trabalho está bem encaminhado para ser validado para a quantificação de patulina, em produtos à base de maçã.

5. Referências Bibliográficas

- Araujo, P. (2009). Key aspects of analytical method validation and linearity evaluation. *Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 877(23), 2224–2234. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2008.09.030>
- Barna-Vetró, I., Lá Szló Solti, †, Téren, J., Gnes Gyöngyösi, A. Ä., Szabó, E., & Wölfling, A. (1996). Sensitive ELISA test for determination of ochratoxin A. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 4071–4074.
- Barreira, M. J., Alvito, P. C., & Almeida, C. M. M. (2010). Occurrence of patulin in apple-based-foods in Portugal. *Food Chemistry*, 121(3), 653–658. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.12.085>
- Bootman, V. (2021, April 15). Liquid Chromatography vs Gas Chromatography. <https://www.lcservicesltd.co.uk/liquid-chromatography-vs-gas-chromatography/>.
Último acesso a 01/09/2023 às 22h.
- Cabañes, F. J., Accensi, F., Bragulat, M. R., Abarca, M. L., Castellá, G., Minguez, S., & Pons, A. (2002). What is the source of ochratoxin A in wine? *International Journal of Food Microbiology*, 79(3), 213–215. [https://doi.org/10.1016/s0168-1605\(02\)00087-9](https://doi.org/10.1016/s0168-1605(02)00087-9)
- Carda-Broch, S., & Haddad, P. R. (2014). Method validation. *Journal of Chromatography. A*, 1353, 1. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.06.004>
- Cardoso De Oliveira, C., Granato, D., Solange, M., Caruso, F., & Sakuma, A. M. (2013). Manual para elaboração de cartas de controle para monitoramento de processos de medição quantitativos em laboratórios de ensaio.
- Chan, C. C., Lam, H., Lee, Y. C., & Zhang, X.-M. (2004). Analytical method validation and instrument performance verification (C. C. Chan, H. Lam, Y. C. Lee, & X.-M. Zhang, Eds.). Wiley. <https://doi.org/10.1002/047146372>
- Coppock, R. W., Christian, R. G., & Jacobsen, B. J. (2018). Aflatoxins. In *Veterinary Toxicology* (pp. 983–994). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811410-0.00069-6>
- Coulombe, R. A. (1993). Biological action of mycotoxins. *Journal of Dairy Science*, 76(3), 880–891. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(93\)77414-7](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(93)77414-7)

- de Souza, S. V. C., & Junqueira, R. G. (2005). A procedure to assess linearity by ordinary least squares method. *Analytica Chimica Acta*, 552(1–2), 25–35. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2005.07.043>
- El Khoury, A., & Atoui, A. (2010). Ochratoxin A: general overview and actual molecular status. *Toxins*, 2(4), 461–493. <https://doi.org/10.3390/toxins2040461>
- Eldin, A. B. (2011). Validation of an analytical procedure. *Quality Control of Herbal Medicines and Related Areas*, 17–24.
- Ellison Secretary, U. S., Bettencourt da Silva, R., Poland Fodor, E. P., Kaarls, R., Germany Magnusson, E. B., Robouch, I. P., St Gallen, E., van der Veen, S. A., Walsh Eurachem IRE Wegscheider, M. W., Yolci Omeroglu, P., & Representatives, E. (2009). Quantifying uncertainty in analytical measurement. *Eurachem Guide*.
- EN 15890. (2010). Foodstuffs - Determination of patulin in fruit juice and fruit based puree for infants and young children - HPLC method with liquid/liquid partition cleanup and solid phase extraction with UV detection. *European Standard EN 15890*, 1st, 1–16.
- European Medicines Agency. (1995). Note for guidance on validation of analytical procedures: text and methodology. *European Medicines Agency*.
- Fajgelj, A., & Ambrus, A. (2000). Principles and practices of method validation (A. Fajgelj & A. Ambrus, Eds.). *The Royal Society of Chemistry*. <https://doi.org/10.1039/9781847551757>
- Ferrer Amate, C., Unterluggauer, H., Fischer, R. J., Fernández-Alba, A. R., & Masselter, S. (2010). Development and validation of a LC-MS/MS method for the simultaneous determination of aflatoxins, dyes and pesticides in spices. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 397(1), 93–107. <https://doi.org/10.1007/s00216-010-3526-X>
- Glaser, N., & Stopper, H. (2012). Patulin: mechanism of genotoxicity. *Food and Chemical Toxicology : An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, 50(5), 1796–1801. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.02.096>
- Han, X., Huangfu, B., Xu, T., Xu, W., Asakiya, C., Huang, K., & He, X. (2022). Research progress of safety of zearalenone: a review. *Toxins*, 14(6), 386. <https://doi.org/10.3390/toxins14060386>

- Herzallah, S. M. (2009). Determination of aflatoxins in eggs, milk, meat and meat products using HPLC fluorescent and UV detectors. *Food Chemistry*, 114(3), 1141–1146. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.10.077>
- ISO. (2015). ISO/REMCO Guide 30:2015 Reference materials - selected terms and definitions.
- ISO 8466-2. (2001). Water quality — calibration and evaluation of analytical methods and estimation of performance characteristics — Part 2: calibration strategy for non-linear second-order calibration function.
- Jcgm. (2008). Evaluation of measurement data - guide to the expression of uncertainty in measurement. Joint Committee for Guides in Metrology, 1–134.
- Juan, C., Moltó, J. C., Lino, C. M., & Mañes, J. (2008). Determination of ochratoxin A in organic and non-organic cereals and cereal products from Spain and Portugal. *Food Chemistry*, 107(1), 525–530. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.08.019>
- Jurado, J. M., Alcázar, A., Muñoz-Valencia, R., Ceballos-Magaña, S. G., & Raposo, F. (2017). Some practical considerations for linearity assessment of calibration curves as function of concentration levels according to the fitness-for-purpose approach. *Talanta*, 172, 221–229. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.05.049>
- Kamle, M., Mahato, D. K., Gupta, A., Pandhi, S., Sharma, B., Dhawan, K., Vasundhara, Mishra, S., Kumar, M., Tripathi, A. D., Rasane, P., Selvakumar, R., Kumar, A., Gamlath, S., & Kumar, P. (2022). Deoxynivalenol: an overview on occurrence, chemistry, Biosynthesis, health effects and its detection, management, and control strategies in food and feed. *Microbiology Research*, 13(2), 292–314. <https://doi.org/10.3390/microbiolres13020023>
- Krska, R., Schubert-Ullrich, P., Molinelli, A., Sulyok, M., MacDonald, S., & Crews, C. (2008). Mycotoxin analysis: an update. *Food Additives & Contaminants. Part A, Chemistry, Analysis, Control, Exposure & Risk Assessment*, 25(2), 152–163. <https://doi.org/10.1080/02652030701765723>
- Kuiper-Goodman, T., Scott, P. M., & Watanabe, H. (1987). Risk assessment of the mycotoxin zearalenone. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 7(3), 253–306. [https://doi.org/10.1016/0273-2300\(87\)90037-7](https://doi.org/10.1016/0273-2300(87)90037-7)

- Leite, I., Jalukse, L., & Helm, I. (2015). Estimation of measurement uncertainty in chemical analysis. <https://sisu.ut.ee/measurement/uncertainty>. Último acesso a 05/09/2023 às 18h.
- Leitner, A., Zöllner, P., Paolillo, A., Stroka, J., Papadopoulou-Bouraoui, A., Jaborek, S., Anklam, E., & Lindner, W. (2002). Comparison of methods for the determination of ochratoxin A in wine. *Analytica Chimica Acta*, 453(1), 33–41. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(01\)01483-0](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(01)01483-0)
- Li, J., Wu, R., Hu, Q., & Wang, J. (2007). Solid-phase extraction and HPLC determination of patulin in apple juice concentrate. *Food Control*, 18(5), 530–534. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2005.12.014>
- Li, Y., Shi, W., Shen, J., Zhang, S., Cheng, L., & Wang, Z. (2012). Development of a rapid competitive indirect ELISA procedure for the determination of deoxynivalenol in cereals. *Food and Agricultural Immunology*, 23(1), 41–49. <https://doi.org/10.1080/09540105.2011.589046>
- Magnusson, B., & Örnemark, U. (2014). The fitness for purpose of analytical methods: a laboratory guide to method validation and related topics. *Eurachem Guide*, 1–70.
- Mérieux NutriSciences. (n.d.). <https://www.merieuxnutrisciences.com/Pt/Quem-Somos/>. Último acesso a 16/06/2023 às 15h.
- Miller, J. N., & Miller, J. C. (2010). *Statistics and chemometrics for analytical chemistry* (6th ed.). Pearson.
- Moake, M. M., Padilla-Zakour, O. I., & Worobo, R. W. (2005). Comprehensive review of patulin control methods in foods. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 4(1), 8–21. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2005.tb00068.x>
- Monaci, L., & Palmisano, F. (2004). Determination of ochratoxin A in foods: state-of-the-art and analytical challenges. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 378(1), 96–103. <https://doi.org/10.1007/s00216-003-2364-5>
- Moosavi, S., & Ghassabian, S. (2018). Calibration and validation of analytical methods - a sampling of current approaches (M. T. Stauffer, Ed.). InTech. <https://doi.org/10.5772/intechopen.69918>
- Moukas, A., Panagiotopoulou, V., & Markaki, P. (2008). Determination of patulin in fruit juices using HPLC-DAD and GC-MSD techniques. *Food Chemistry*, 109(4), 860–867. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.01.015>

- Notardonato, I., Gianfagna, S., Castoria, R., Ianiri, G., De Curtis, F., Russo, M. V., & Avino, P. (2021). Critical review of the analytical methods for determining the mycotoxin patulin in food matrices. *Reviews in Analytical Chemistry*, 40(1), 144–160. <https://doi.org/10.1515/revac-2021-0131>
- Ok, H. E., Choi, S.-W., Kim, M., & Chun, H. S. (2014). HPLC and UPLC methods for the determination of zearalenone in noodles, cereal snacks and infant formula. *Food Chemistry*, 163, 252–257. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.04.111>
- Paschoal, J. A. R., Rath, S., Airoidi, F. P. da S., & Reyes, F. G. R. (2008). Validação de métodos cromatográficos para a determinação de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos. *Química Nova*, 31(5), 1190–1198. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422008000500048>
- Pestka, J. J. (2010). Deoxynivalenol: mechanisms of action, human exposure, and toxicological relevance. *Archives of Toxicology*, 84(9), 663–679. <https://doi.org/10.1007/s00204-010-0579-8>
- Prichard, E., Magnusson, B., Patriarca, M., Superiore di Sanità, I., Elizabeth Prichard, I., Andersen, J., Yavuz Ataman, O., Ellison, S., Anders Kallner, U., & Hospital, K. (2011). Terminology in analytical measurement - introduction to VIM 3. Eurachem Guide.
- Przybylska, A., Chrustek, A., Olszewska-Słonina, D., Koba, M., & Kruszewski, S. (2021). Determination of patulin in products containing dried fruits by enzyme-linked immunosorbent assay technique patulin in dried fruits. *Food Science & Nutrition*, 9(8), 4211–4220. <https://doi.org/10.1002/fsn3.2386>
- Puel, O., Galtier, P., & Oswald, I. (2010). Biosynthesis and toxicological effects of patulin. *Toxins*, 2(4), 613–631. <https://doi.org/10.3390/toxins2040613>
- Ran, R., Wang, C., Han, Z., Wu, A., Zhang, D., & Shi, J. (2013). Determination of deoxynivalenol (DON) and its derivatives: Current status of analytical methods. *Food Control*, 34(1), 138–148. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.04.026>
- Raposo, F. (2016). Evaluation of analytical calibration based on least-squares linear regression for instrumental techniques: a tutorial review. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 77, 167–185. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.12.006>
- Ravisankar, P., Naga Navya, C., Pravallika, D., & Navya, D. (2015). A review on step-by-step analytical method validation. *Iosr Journal Of Pharmacy*, 5(10), 7–19.

- Ravisankar, S. A., & Supriya, U. A. K. (2019). Fundamental chromatographic parameters. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 55(2), 46–50.
- Rawski, R. I., Sanecki, P. T., Kijowska, K. M., Skitat, P. M., & Saletnik, D. E. (2016). Regression analysis in analytical chemistry. Determination and validation of linear and quadratic regression dependencies. *South African Journal of Chemistry*, 69, 166–173. <https://doi.org/10.17159/0379-4350/2016/v69a20>
- Relacre. (1996). Guia Relacre 3 - Validação de resultados em laboratórios químicos.
- Relacre. (2000). Guia Relacre 13 - Validação de método internos de ensaio em análise química. In Relacre.
- Relacre. (2002). Guia Eurachem/Relacre 1 - Exemplos de cálculos de incertezas. In Relacre.
- Relacre. (2018). Guia Relacre 31 - Quantificação da incerteza de medição em ensaios químicos e físico-químicos. In Relacre.
- Richard, J. L. (2007). Some major mycotoxins and their mycotoxicoses--an overview. *International Journal of Food Microbiology*, 119(1–2), 3–10. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.07.019>
- Rogowska, A., Pomastowski, P., Sagandykova, G., & Buszewski, B. (2019). Zearalenone and its metabolites: Effect on human health, metabolism and neutralisation methods. *Toxicon*, 162, 46–56. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2019.03.004>
- Sadok, I., Szmagara, A., & Staniszewska, M. M. (2018). The validated and sensitive HPLC-DAD method for determination of patulin in strawberries. *Food Chemistry*, 245, 364–370. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.10.093>
- Saleh, I., & Goktepe, I. (2019). The characteristics, occurrence, and toxicological effects of patulin. *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, 129, 301–311. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.04.036>
- Simon, P. (1996). Ochratoxin and kidney Disease in the human. *Journal of Toxicology: Toxin Reviews*, 15(3), 239–249. <https://doi.org/10.3109/15569549609016446>
- Sirard, T. (2012). Waters: Fundamentals of HPLC. Último acesso a 15/09/2023 às 23h.

- Skoog, D. A., Holler, F. J., & Crouch, S. R. (2007). Principles of instrumental analysis (6th ed.). David Harris.
- Snyder, L. R., & Kirkland, J. J. (Joseph J. (1979). Introduction to modern liquid chromatography (2nd ed.). Wiley.
- Sobrova, P., Adam, V., Vasatkova, A., Beklova, M., Zeman, L., & Kizek, R. (2010). Deoxynivalenol and its toxicity. *Interdisciplinary Toxicology*, 3(3), 94–99. <https://doi.org/10.2478/v10102-010-0019-x>
- Spadaro, D., Ciavarella, A., Frati, S., Garibaldi, A., & Gullino, M. L. (2007). Incidence and level of patulin contamination in pure and mixed apple juices marketed in Italy. *Food Control*, 18(9), 1098–1102. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2006.07.007>
- Steed, R. (2007). Agilent Technologies: HPLC separation fundamentals - LC columns and consumables. Último acesso a 10/09/2023 às 19h.
- Tabari, M., Karim, G., Ghavami, M., & Chamani, M. (2011). Method validation for aflatoxin M1 determination in yoghurt using immunoaffinity column clean-up prior to high-performance liquid chromatography. *Toxicology and Industrial Health*, 27(7), 629–635. <https://doi.org/10.1177/0748233710394236>
- Tacke, B. K., & Casper, H. H. (1996). Determination of deoxynivalenol in wheat, barley, and malt by column cleanup and gas chromatography with electron capture detection. *Journal of AOAC INTERNATIONAL*, 79(2), 472–475. <https://doi.org/10.1093/jaoac/79.2.472>
- Thapa, A., Horgan, K. A., White, B., & Walls, D. (2021). Deoxynivalenol and zearalenone-synergistic or antagonistic agri-food chain co-contaminants? *Toxins*, 13(8), 561. <https://doi.org/10.3390/toxins13080561>
- Thermo Scientific. (2007). Tech Tip #58: Spike-and-recovery and linearity-of-dilution assessment. Último acesso a 01/09/2023 às 21h.
- Vidal, A., Ouhibi, S., Ghali, R., Hedhili, A., De Saeger, S., & De Boevre, M. (2019). The mycotoxin patulin: An updated short review on occurrence, toxicity and analytical challenges. *Food and Chemical Toxicology : An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, 129, 249–256. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.04.048>
- Vieira, A. (2019). Auditorias técnicas no laboratório de química clássica da Silliker Portugal [Mestrado em Bioquímica em Saúde]. In 2019. Escola Superior de Saúde.

- Visconti, A., & Pascale, M. (1998). Determination of zearalenone in corn by means of immunoaffinity clean-up and high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Chromatography A*, 815(1), 133–140. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(98\)00296-9](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(98)00296-9)
- Wang, Y.-K., Yan, Y.-X., Ji, W.-H., Wang, H., Zou, Q., & Sun, J.-H. (2013). Novel chemiluminescence immunoassay for the determination of zearalenone in food samples using gold nanoparticles labeled with streptavidin-horseradish peroxidase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(18), 4250–4256. <https://doi.org/10.1021/jf400731j>
- Wogan, G. N. (1966). Chemical nature and biological effects of the aflatoxins. *Bacteriological Reviews*, 30(2), 460–470. <https://doi.org/10.1128/br.30.2.460-470.1966>
- Wright, S. A. (2015). Patulin in food. *Current Opinion in Food Science*, 5, 105–109. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2015.10.003>
- Yazar, S., & Omurtag, G. (2008). Fumonisin, trichothecenes and zearalenone in cereals. *International Journal of Molecular Sciences*, 9(11), 2062–2090. <https://doi.org/10.3390/ijms9112062>
- Yoshinari, T., Ohashi, H., Abe, R., Kaigome, R., Ohkawa, H., & Sugita-Konishi, Y. (2015). Development of a rapid method for the quantitative determination of deoxynivalenol using quenchbody. *Analytica Chimica Acta*, 888, 126–130. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.07.020>
- Zain, M. E. (2011). Impact of mycotoxins on humans and animals. *Journal of Saudi Chemical Society*, 15(2), 129–144. <https://doi.org/10.1016/j.jscs.2010.06.006>
- Zorn, M. E., Gibbons, R. D., & Sonzogni, W. C. (1999). Evaluation of approximate methods for calculating the limit of detection and limit of quantification. *Environmental Science & Technology*, 33(13), 2291–2295. <https://doi.org/10.1021/es981133b>