

UFRRJ
INSTITUTO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E
TECNOLOGIA DOS ALIMENTOS

DISSERTAÇÃO

Desenvolvimento de Método de Quantificação de
Aflatoxinas em Amendoim por UPLC-MS
(ESI/QToF) e Parâmetros de Validação.

Juliana Scofano Barrabin

2012



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA
DE ALIMENTOS**

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO DE QUANTIFICAÇÃO DE
AFLATOXINAS EM AMENDOIM POR UPLC-MS (ESI/QTOF) E
PARÂMETROS DE VALIDAÇÃO**

JULIANA SCOFANO BARRABIN

Sob a Orientação do Professor
Ronoel Luiz de Oliveira Godoy

E co-orientação da pesquisadora
Renata Galhardo Borguini

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, do curso de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, área de concentração em Ciência de Alimentos.

Seropédica, RJ
Fevereiro de 2012

664.07

Barrabin, Juliana Scofano, 1986-

B268d

T

Desenvolvimento de método de quantificação de aflatoxinas em amendoim por UPLC-MS (ESI/QToF) e parâmetros de validação / Juliana Scofano Barrabin - 2012.

77 f.: il.

Orientador: Ronoel Luiz de Oliveira Godoy.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Bibliografia: f. 56-60.

1. Aflatoxina - Teses. 2. Amendoim - Análise - Teses. 3. Alimentos - Contaminação - Teses. 4. Espectrometria de massa - Teses. 5. Tecnologia de alimentos - Teses. I. Godoy, Ronoel Luiz de Oliveira, 1951-. II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos. III. Título.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS**

JULIANA SCOFANO BARRABIN

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências no Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos na Área de Concentração em Ciência de Alimentos

Dissertação aprovada em ___/___/___

Ronoel Luis de Oliveira Godoy (D. Sc.) Embrapa Agroindústria de Alimentos
(orientador)

Simone Pereira Mathias (D.Sc.) Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

Otniel Freitas Silva (Ph. D) Embrapa Agroindústria de Alimentos

AGRADECIMENTOS

Ao Ronoel, pesquisador chefe do laboratório de Cromatografia Líquida da Embrapa Agroindústria de Alimentos, pela oportunidade concedida, pela confiança depositada, incentivo e orientação.

À Renata Borguini, pesquisadora do laboratório de Cromatografia Líquida da Embrapa Agroindústria de Alimentos, pela orientação, pelos conselhos, incentivos e companheirismo.

Ao Amadeu, especialista em espectrometria de massas da Waters Corporation, pelos ensinamentos.

Aos membros e suplentes da banca, Otniel, Ângela e Simone por aceitar o convite de participação e pelas contribuições fornecidas.

À Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro e aos professores do programa de Ciência e Tecnologia de Alimentos pelo aprendizado.

Aos meus pais, Helena e Hector, pela educação recebida, pelo incentivo a este trabalho e por estarem sempre ao meu lado.

Aos demais colegas de laboratório: Daniel, Jeane, Sidney, Ana Cristina, Carolina e Bobeda pelo companheirismo, pelo clima de amizade e pela disposição em ajudar.

A Deus, pela vida concedida.

RESUMO

As aflatoxinas são atualmente as micotoxinas mais estudadas no mundo. São classificadas pela Organização Mundial da Saúde como carcinogênicas para humanos e sua ingestão causa diversos danos à saúde, variando de toxicidades agudas com lesões de fígado ao carcinoma hepatocelular. Muitos países já possuem regulamentação quanto a estes contaminantes e a União Européia (UE) é uma das comunidades mais críticas em relação à legislação das micotoxinas com foco na inocuidade alimentar. Possui uma rígida legislação não apenas em relação aos limites máximos permitidos de aflatoxinas em alimentos, mas também em relação à qualidade dos métodos analíticos utilizados para medir tais contaminantes. No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) publicou a resolução RDC Nº 7 de 18 de fevereiro de 2011, dispondo sobre limites máximos tolerados de micotoxinas em alimentos. Essa resolução fixa novos limites para aflatoxinas, além de ocratoxina A, desoxinivalenol, fumonisinas, patulina e zearalenona em matérias primas e alimentos prontos para consumo, estabelecendo metas para que a cada 2 anos os limites dessas toxinas sejam cada vez menores, tendendo a uma maior rigidez, assim como a UE. Para que essas metas possam ser cumpridas são necessárias metodologias analíticas de maior sensibilidade, seletividade e exatidão. Desta forma o presente trabalho visou desenvolver um método analítico e avaliar os parâmetros de validação necessários para determinação de aflatoxinas em amendoim. Utilizou-se cromatografia líquida de ultra eficiência e detecção por espectrometria de massas (UPLC-MS) de alta resolução, metodologia equiparada aos padrões de qualidade analítica da UE. No método desenvolvido obteve-se de 3 a 7 fragmentos para cada aflatoxina permitindo a análise qualitativa inequívoca das AFB₁, AFB₂, AFG₁ e AFG₂ em amendoim e cumpriu-se com os mais rigorosos critérios analíticos cromatográficos estabelecidos pela UE. O método apresentou uma corrida cromatográfica de 5 minutos e menor gasto de solventes orgânicos quando comparado à técnica de HPLC. Os limites de detecção alcançados foram de 1,6; 0,396; 1,608 e 1,396 µg/kg para as AFB₁, AFB₂, AFG₁ e AFG₂, respectivamente, e foram obtidas curvas de calibração com boa linearidade entre os valores de 1,6 a 12,0 µg/kg (AFB₁ e AFG₁) e 0,396 a 2,97 µg/kg (AFB₂ e AFG₂). Foram analisadas 10 amostras de amendoim adquiridas em feira livre do Rio de Janeiro e identificados traços das aflatoxinas B₁, B₂ e G₂ em duas delas.

ABSTRACT

Aflatoxins classified by the World Health Organization as carcinogenic to humans and their intake causes many health injuries, from acute toxicities with liver lesions to hepatocellular carcinoma. Many countries already have regulations regarding these contaminants and the European Union is the most critical in relation to food safety. It has a strict regulation not only in relation to maximum permitted levels of aflatoxins in foods, but also concerning the quality of the analytical methods used to measure such contaminants. In Brazil, the National Agency of Sanitary Surveillance (ANVISA) published the resolution RDC N° 7, February 18th, 2011, providing for maximum permitted levels on mycotoxins in food for human consumption and raw materials, setting every two years the limits of these toxins become smaller, tending to be as strict as the European Union. For these goals to be fulfilled high sensitivity, selectivity and accuracy analytical methodologies are needed. This work aimed to develop an analytical method and to calculate validation parameters for determination of aflatoxin in peanuts using ultra performance liquid chromatography and detection by high-resolution mass spectrometry, method equivalent to the analytical quality standards of the European Union, which are worldwide trend. The developed method showed high selectivity and resolution, allowing the unambiguous qualitative analysis of aflatoxins B₁, B₂, G₁ and G₂ in peanuts and fulfilled the most rigorous analytical chromatographic criteria established by the EU. The requirements for a quantitative analysis have been partially achieved. Calibration curves were obtained with good linearity, however, was not possible to fix the sensitivity of the method, compromising the accuracy and quantification of the test.

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Exemplo hipotético de quantificação por padronização interna onde a utilização da razão analito/PI compensa variações evitando sub ou superestimações de resultados.	17
Quadro 2	Fragmentos das aflatoxinas B1, B2, G1 e G2 obtidos por diversos autores utilizando analisadores de massas do tipo triplo quadrupólo (QQQ) e híbrido triplo quadrupólo linear ion trap (QqQLIT).	36

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Alíquotas de padrão e solução de diluição utilizadas para o preparo da curva de calibração em solvente..	22
Tabela 2	Alíquotas de padrão e extrato purificado utilizados para o preparo da curva de calibração em matriz.	23
Tabela 3	Descrição do nível de contaminação das amostras utilizadas para os ensaios de recuperação.	26
Tabela 4	Descrição dos parâmetros MS utilizados para detecção primária do sinal das aflatoxinas.	28
Tabela 5	Gradiente de eluição da fase móvel utilizada no método cromatográfico II.	29
Tabela 6	Descrição dos parâmetros MS utilizados no método analítico de aflatoxinas.	34
Tabela 7	Concentrações dos pontos das curvas de calibração das aflatoxinas B ₁ , B ₂ , G ₁ e G ₂ .	38
Tabela 8	Resultados dos ensaios de recuperação, expressos em percentagem, para as aflatoxinas B ₁ , B ₂ , G ₁ e G ₂ em amendoim, analisado por UPLC-MS-ESI-QToF.	39
Tabela 9	Dados da curva de calibração da aflatoxina B1 em matriz utilizada no experimento I.	62
Tabela 10	Dados da curva de calibração da aflatoxina B2 em matriz utilizada no experimento I	62
Tabela 11	Dados da curva de calibração da aflatoxina G1 em matriz utilizada no experimento I.	63
Tabela 12	Dados da curva de calibração da aflatoxina G2 em matriz utilizada no experimento I.	63
Tabela 13	Dados da curva de calibração da aflatoxina B1 em matriz utilizada no experimento II.	64
Tabela 14	Dados da curva de calibração da aflatoxina B2 em matriz utilizada no experimento II.	64
Tabela 15	Dados da curva de calibração da aflatoxina G1 em matriz utilizada no experimento II.	65
Tabela 16	Dados da curva de calibração da aflatoxina G2 em matriz utilizada no experimento II.	65

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Estruturas químicas das principais aflatoxinas (B ₁ , B ₂ , G ₁ , G ₂ e M ₁) encontradas em alimentos	5
Figura 2	Área plantada, produção e produtividade de amendoim no Brasil entre 2004 e 2011.	9
Figura 3	Exportações brasileiras de amendoim descascado de 2006 a 2011.	10
Figura 4	Representação dos 3 setores do espectrômetro de massas QToF	13
Figura 5	Representação de uma fonte de ionização por eletrospray (ESI) operando em modo positivo	14
Figura 6	Representação de um setor quadrupólo	15
Figura 7	Representação de íons atravessando o setor TOF.	15
Figura 8	Cromatogramas das aflatoxinas G ₂ , G ₁ , B ₂ e B ₁ utilizando-se o método cromatográfico I.	28
Figura 9	Gráfico de força do gradiente de fase móvel e cromatogramas das aflatoxinas G ₂ , G ₁ , B ₂ e B ₁ respectivamente.	30
Figura 10	(A) Espectro da aflatoxina B ₁ onde se pode observar o pico m/z 313 da molécula ionizada e o pico m/z 335 da molécula sodiada, ambos na mesma intensidade relativa. (B) Espectro da aflatoxina B ₁ após a adição de formiato de amônio na fase móvel, onde se pode observar o aumento da intensidade relativa do pico m/z 313 em relação ao m/z 335	31
Figura 11	Cromatogramas das aflatoxinas G ₂ , G ₁ , B ₂ e B ₁ obtidos pela diluição de padrões em 3 diferentes soluções: acetonitrila:água 50:50 (v/v), acetonitrila:água 40:60 (v/v) e acetonitrila:água 30:70 (v/v)	32
Figura 12	(A) Espectro da aflatoxina G ₂ utilizando função MS ^E que alterna as voltagens de transfer de 20, 25, 30, 35 e 40. (B) Espectro da mesma aflatoxina, com função MS ^E que alterna apenas as voltagens de transfer de 20, 25 e 30 e no qual se podem observar 4 fragmentos com intensidade relativa superior a 10% do pico base.	34
Figura 13	Espectros MS ^E das aflatoxinas B ₁ , B ₂ , G ₁ e G ₂ mostrando os fragmentos encontrados e espectros MSMS das respectivas aflatoxinas, confirmando a origem destes fragmentos	35
Figura 14	(A) Cromatogramas de íons extraídos da matriz isenta de contaminação. (B) Cromatogramas de íons extraídos da matriz adicionada de padrões de aflatoxinas	37
Figura 15	Influência de efeito matriz na sensibilidade das aflatoxinas	38
Figura 16	Curvas de calibração das aflatoxinas B ₁ , B ₂ , G ₁ e G ₂ , com seus respectivos coeficientes de correlação linear (R ²), utilizadas nos	40

ensaios de recuperação

Figura 17	Cromatogramas e espectros MS ^E das aflatoxinas G ₂ e B ₁ encontradas em uma das dez amostras adquiridas em feira livre do Rio de Janeiro.	42
Figura 18	Cromatogramas e espectros MS ^E das aflatoxinas B ₂ e B ₁ encontradas em outra das dez amostras adquiridas em feira livre do Rio de Janeiro.	43
Figura 19	Curvas de calibração das aflatoxinas B ₁ , B ₂ , G ₁ e G ₂ , com seus respectivos coeficientes de correlação linear (R ²), utilizadas nas análises das 10 amostras de amendoim adquiridas no mercado varejista.	44
Figura 20	Varição, em intervalo de 47 dias, na sensibilidade das aflatoxinas B ₁ , B ₂ , G ₁ e G ₂ em solvente	46
Figura 21	Testes de ganho do detector realizados antes (A) e depois (B) da constatação de variação na sensibilidade de resposta às aflatoxinas.	47
Figura 22	Varição, no intervalo de um dia, da intensidade do sinal da aflatoxina B ₁ em amendoim, após realização de limpeza completa da fonte.	47
Figura 23	Varição da sensibilidade da análise de aflatoxinas em solvente com o intervalo de 7 dias, em segundo espectrômetro de massas de mesma marca (UPLC Acquity [®] e QToF Synapt [®]).	48
Figura 24	Varição da sensibilidade da análise de aflatoxinas em matriz ao longo de 3 dias consecutivos, em segundo espectrômetro de massas de mesma marca (UPLC Acquity [®] e QToF Synapt [®]).	49
Figura 25	Curvas de calibração de aflatoxinas em matriz (mesmas curvas exibidas na Figura 19) obtidas modificando-se método de quantificação, aumentando-se janela de erro para 0,2Da.	50
Figura 26	Cromatogramas com a contagem de íons e espectros mostrando a relação entre moléculas protonadas/sodiadas (m/z 313/335) da aflatoxina B ₁ (20µg/kg) nos dias 2 e 3.	51
Figura 27	Gráficos de intensidade de resposta a 3 injeções consecutivas de padrão AZA1 após terem sido injetados 5 extratos de 5 diferentes espécies de moluscos (adaptado de Kilcoyne e Fux, 2010).	52

LISTA DE ABREVIACOES

AFB ₁	Aflatoxina B ₁
AFB ₂	Aflatoxina B ₂
AFG ₁	Aflatoxina G ₁
AFG ₂	Aflatoxina G ₂
AFM ₁	Aflatoxina M ₁
APCI	Ionização Química sob Pressão Atmosférica - <i>Atmospheric Pressure Chemical Ionization</i>
API	Ionização sob Pressão Atmosférica – <i>Atmospheric Pressure Ionization</i>
CCD	Cromatografia de Camada Delgada
DF	Detecção por Fluorescência
ESI	Ionização por Eletrospray - <i>Electrospray Ionization</i>
FAPAS	<i>Food Analysis Performance Assessment Scheme</i>
GC	Cromatografia Gasosa – <i>Gas Chromatography</i>
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência - <i>High Performance Liquid Chromatography</i>
LC	Cromatografia Líquida – <i>Liquid Chromatography</i>
MCP	Detector <i>Multiplier Channel Plate</i>
MRC	Material de Referência Certificado
MS	Espectrometria de Massas - <i>Mass Spectrometry</i>
MSMS	Espectrometria Massa/Massa
QqQ	Triplo Quadrupólo – <i>Triple Quadrupole</i>
QqQLIT	Híbrido Triplo Quadrupólo e Ion Trap – <i>Triple Quadrupole Linear Ion Trap</i>
QToF	Híbrido Quadrupólo Tempo de Vo - <i>Quadrupole Time of Flight</i>
ToF	Tempo de Vo - <i>Time of Flight</i>
UE	União Européia
UPLC	Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência – <i>Ultra Performance Liquid</i>

Chromatography

UPLC - MS Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência acoplada a Espectrometria de Massas - *Ultra Performance Liquid Chromatography tandem Mass Spectrometry*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
1.2 Objetivos	2
1.2.1 Objetivo principal	2
1.2.2 Objetivos Específicos	2
2 REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 Segurança Alimentar	3
2.2 Aflatoxinas: Um Desafio à Qualidade de Grãos e Produtos Correlatos	4
2.2.1 O que são aflatoxinas	4
2.2.2 Contaminação de produtos agrícolas e acúmulo na cadeia alimentar	5
2.2.3 Via metabólica e mecanismos de ação	6
2.2.4 Danos à saúde	6
2.2.5 Legislação sobre limites máximos admissíveis	8
2.3 Contaminação do Amendoim por Aflatoxinas	8
2.3.1 Panorama Econômico do Amendoim	8
2.3.2 Colheita e pós-colheita: prevenção e controle da contaminação por aflatoxinas	10
2.4 Considerações Sobre Metodologias Analíticas	11
2.4.1 Cromatografia e análise por espectrometria de massas	11
2.4.1.1 Cromatografia líquida de alta e ultra eficiência	12
2.4.1.2 Espectrometria de massas ESI-Q-TOF	13
2.4.2 Métodos de quantificação	16
2.4.3 Validação de métodos analíticos	17
2.4.4 Critérios analíticos segundo a União Europeia	18
3 MATERIAIS E MÉTODOS	20
3.1 Materiais	20
3.1.1 Padrões, reagentes e solventes	20
3.1.2 Equipamentos e utensílios	20
3.1.3 Matrizes	20
3.2 Métodos de Preparo de Amostras e de Soluções	20
3.2.1 Preparação de soluções	20
3.2.2 Preparação da curva de calibração em solvente	22
3.2.3 Preparação da curva de calibração em matriz	22
3.2.4 Método de extração das amostras em amendoim	23
3.3 Método Cromatográfico	23
3.4 Método Analítico por Espectrometria de Massas	24
3.5 Parâmetros de Validação	24
3.6 Análise de Amostras	26
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
4.1 Teste do Grau de Pureza dos Solventes Analíticos Disponíveis	27
4.2 Estabelecimento de Parâmetros Primários de Detecção	27
4.3 Estabelecimento do Método Cromatográfico	28
4.4 Estabelecimento do Método Espectrométrico	32
4.5 Determinação da Seletividade	36
4.6 Construção das Curvas de Calibração	37

4.6.1 Escolha da faixa de trabalho	37
4.6.2 Avaliação da sensibilidade	38
4.6.3 Determinação do limite de detecção	39
4.7 Avaliação da Recuperação e Linearidade	39
4.8 Análise de Amostras	41
4.9 Oscilação da Sensibilidade	44
4.9.1 Fatores que afetam a sensibilidade	45
4.9.2 Análise de dados experimentais quanto à oscilação da sensibilidade	46
4.9.3 Parâmetros analíticos não calculados	52
5 CONCLUSÃO	54
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	55
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56
ANEXOS	61
A. Tabelas 7, 8 9 e 10 exibindo valores utilizados para análise de pontos discrepantes (teste de Grubbs) e homogeneidade de variâncias (teste de Cochran) das curvas de calibração utilizadas nos ensaios de recuperação (Experimento I).	61
B. Tabelas 11, 12, 13 e 14 exibindo valores utilizados para análise de pontos discrepantes (teste de Grubbs) e homogeneidade de variâncias (teste de Cochran) das curvas de calibração utilizadas nas análises das 10 amostras adquiridas em feira livre do Rio de Janeiro (Experimento II).	58

1 INTRODUÇÃO

O risco da ocorrência de doenças associadas ao consumo de alimentos contendo aditivos, pesticidas, hormônios, toxinas naturais ou ainda outros tipos de substâncias, tem contribuído para gerar insegurança e despertar um vasto rol de preocupações do consumidor (SPERS e KASSOUF, 1996). Entre as toxinas naturais, destacam-se as micotoxinas, metabólitos tóxicos secundários produzidos por fungos. As micotoxinas mais estudadas atualmente são as aflatoxinas (AF), produzidas por algumas espécies de *Aspergillus* e *Penicillium* e que podem ser encontradas em diversos cultivos agrícolas como sorgo, algodão, nozes e, principalmente, milho e amendoim. São classificadas pela Organização Mundial da Saúde como carcinogênicas para humanos e sua ingestão causa diversos danos à saúde, variando de toxicidades agudas com lesões de fígado ao carcinoma hepatocelular (KENSLETER et al., 2011). A aflatoxina B₁ é considerada o mais potente carcinogênico natural conhecido (FDA, 2012). Esta preocupação levou muitos países a estabelecerem uma regulamentação destes contaminantes na legislação.

A União Europeia é uma das comunidades mais críticas em relação à segurança alimentar. Possui uma rígida legislação não apenas em relação aos limites máximos permitidos de AF em alimentos, mas também em relação à qualidade dos métodos analíticos utilizados para medir tais contaminantes. Neste contexto, o Regulamento nº 1881/2006/CE preconiza um limite máximo de 2 µg/kg para AFB₁ e de 4 µg/kg para a soma das 4 principais aflatoxinas encontradas nos vegetais – AFB₁, AFB₂, AFG₁ e AFG₂. Estabelece ainda, na *Commission Decision 2002/657/EC*, que um método analítico para resíduos orgânicos ou contaminantes deve prover informação sobre a estrutura química do analito, ou seja, métodos baseados apenas em análise cromatográfica sem o uso de detecção espectrométrica não são suficientes por si só como método de confirmação. No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) publicou a resolução RDC Nº 7 de 18 de fevereiro de 2011, estabelecendo que o limite de aflatoxinas em amendoim é de 20 µg/kg para a soma AFB₁, AFB₂, AFG₁ e AFG₂.

O Brasil, até o início dos anos 70 do século passado, foi importante produtor de amendoim, chegando a produzir 970 mil toneladas em 1972, destinadas ao suprimento interno de óleo vegetal e a exportação de subprodutos. A partir de 1974, o preço do produto nos mercados interno e externo caiu devido, entre outros fatores, à contaminação por aflatoxinas (SUASSUNA, 2006). A incidência de contaminação do amendoim brasileiro é alta e fica evidente quando levamos em consideração o número de alertas rápidos que o Brasil vem sofrendo pela UE em relação a este produto. No ano de 2009 foram 29 notificações devido à presença de AF e no ano de 2010 foram 21, inserindo o Brasil na lista de países sujeitos à controle especial (RASFF, 2010).

Métodos analíticos usuais para análise de aflatoxinas como Cromatografia de Camada Delgada (CCD) e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detecção por Fluorescência (HPLC-DF) requerem etapas de derivatização da amostra previamente à análise, consomem maior tempo e volume de solventes tóxicos e submetem o analista a uma maior exposição ao risco químico. Além disso, estes métodos não fornecem informação sobre a estrutura do analito, podendo gerar respostas equivocadas.

A disponibilidade de uma técnica de análise de AF com maior seletividade, sensibilidade e rapidez possibilita um estrito controle de sua presença, contribuindo para a elevação de critérios e padrões para garantia da segurança do alimento. A cromatografia líquida de ultra eficiência (UPLC) emprega colunas de tamanho reduzido em relação à HPLC

resultando em uma técnica analítica mais rápida e com menor gasto de solventes orgânicos. O acoplamento a um espectrômetro de massas de alta resolução permite que se obtenha informações precisas sobre a estrutura do analito proporcionando sua identificação inequívoca. Desta forma, poderá ser lançada a base para uma nova, mais rígida e mais ampla legislação alimentar, equiparando o Brasil aos padrões internacionais. O elevado nível de proteção à saúde do consumidor não deve ser privilégio da Europa.

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivo principal

O presente trabalho visa desenvolver um método analítico utilizando a Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência acoplada a Espectrometria de Massas (UPLC-MS) para determinação de aflatoxinas em amendoim e avaliar parâmetros analíticos de validação.

1.2.2 Objetivos específicos

Estabelecer um método analítico para determinação de aflatoxinas em amendoim utilizando a Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência acoplada a Espectrometria de Massas com Ionização por Eletrospray e Híbrido Quadrupólo Tempo de Voo (UPLC-MS-ESI/QToF).

Calcular alguns parâmetros para validação de ensaio de análise de traços (elementos em concentração abaixo de 0,01%), de acordo com o documento de orientação do INMETRO DOC CGCRE-008 (revisão 4 – julho de 2011). Tais parâmetros analisados serão:

- Faixa de trabalho,
- Especificidade e Seletividade,
- Linearidade,
- Sensibilidade,
- Limites de detecção e de quantificação e
- Exatidão e precisão

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Segurança Alimentar

A cada dia intensificam-se as exigências do consumidor para adquirir alimentos isentos de riscos, ou seja, um alimento seguro (SPERS e KASSOUF, 1996). Segundo os autores, quando se trata de alimentos, o consumidor, principalmente nos países desenvolvidos, é invariavelmente irredutível quanto à qualidade do produto que irá comprar.

A segurança alimentar com ênfase nos aspectos qualitativos pode ser entendida como a aquisição pelo consumidor de alimento de boa qualidade, livre de resíduos e contaminantes de natureza química (pesticidas e micotoxinas), biológica (organismos patogênicos), física (vidros, pedras), ou qualquer substância que possa acarretar risco à saúde (SPERS e KASSOUF, 1996).

Devido ao seu caráter multidisciplinar e a complexidade de fatores que o influenciam, o conceito de segurança alimentar deve ser adotado em todo o sistema agroalimentar, ou seja, as práticas inerentes à segurança devem ser incorporadas em todas as fases da cadeia, desde a produção primária até o consumidor final, envolvendo, portanto, toda a cadeia alimentar. Desse modo, é fundamental disponibilizar no mercado interno orientações e procedimentos para a produção de alimentos seguros, além de intensificar a fiscalização e o controle de qualidade e, assim, contribuir para a expansão do consumo por meio da confiança do consumidor brasileiro (SPERS e KASSOUF, 1996). Garantir que alimentos de qualidade cheguem à população brasileira faz parte da segurança alimentar.

O impacto dessas ações contribui para a sustentabilidade e também para o aumento da participação do Brasil no mercado externo de alimentos, uma vez que implica na melhoria da capacidade de sobrepôr as barreiras fitossanitárias impostas por países importadores.

Os acordos *Sanitary and Phytosanitary Agreement* (SPS) e *Agreement on Technical Barriers to Trade* (TBT) da Organização Mundial do Comércio (OMC) visam diminuir inconsistências entre as exigências das medidas sanitárias e fitossanitárias e as necessidades comerciais dos países filiados à OMC (MIRANDA *et al.*, 2004). Para o tanto, o TBT determina, entre outras medidas, o estabelecimento de um ponto de investigação e notificação de segurança alimentar em cada país membro. No Brasil, o Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO) atua como ponto focal do acordo TBT. Na Europa, foi criado um sistema de alerta rápido para alimentos e rações - *Rapid Alert System for Food and Feed* (RASFF), que é gerido pela comissão europeia para segurança alimentar e abrange todos os países membros. Neste sistema, a política estabelecida foi exigir um elevado nível de proteção à saúde como princípio básico da legislação alimentar e impor a retirada do mercado de qualquer gênero alimentício ou de rações para animais, que apresentem risco grave direto ou indireto à saúde humana (Regulamento nº 178/2002 do Parlamento Europeu e do Conselho).

Durante muitos anos o Brasil foi inadimplente no que diz respeito ao regulamento de monitoramento de resíduos químicos em alimentos de origem vegetal e animal da UE e, desse modo, tem enfrentado inúmeras barreiras técnicas. Somente em 2007, o Brasil sofreu 58 alertas rápidos. Entre eles, cinco notificações de contaminação de amendoim por aflatoxinas. No ano de 2008, subiram para 62 os alertas rápidos, sendo 17 sobre contaminação de amendoim por aflatoxinas. Em 2009, as notificações deste tipo foram de 16 num total de 86 (RASFF, 2010).

O Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), visando garantir a segurança alimentar e diminuir ao máximo a perda de confiança internacional nos produtos agroindustriais brasileiros e também o fechamento de nichos de mercado importantes, como a UE, criou em 2003 o Plano Nacional de Segurança e Qualidade dos Produtos de Origem Vegetal (PNSQV), que utiliza como ferramenta os sistemas de análise, rastreamento e cadastramento para certificação dos produtos vegetais. Para atender a demanda referente à análise destes produtos o PNSQV conta com o Sistema de Análise Laboratorial e Pesquisa (SIALP). Entre as principais ações previstas nesse sistema estão a padronização e validação de metodologias analíticas e implantação de redes de laboratórios credenciados para análises de controle de qualidade. Neste contexto, o MAPA estabeleceu metas para implantação de métodos mais precisos e modernos. Tais métodos utilizam sistemas avançados de análise, criando e adaptando técnicas de maior sensibilidade e rapidez, alinhadas com o estado da arte e com as demandas de suporte tecnológico necessárias para superar as barreiras técnicas e sanitárias e garantir alimentos mais seguros no mercado doméstico e internacional.

2.2 Aflatoxinas: Um Desafio à Qualidade de Grãos e Produtos Correlatos

2.2.1 O que são aflatoxinas

As micotoxinas são toxinas produzidas por fungos, que podem se desenvolver no período de colheita, transporte ou armazenamento de produtos agrícolas quando realizados de maneira inadequada. Tais metabólitos produzem diversos efeitos toxigênicos e mutagênicos, devido à exposição crônica ou aguda, causando danos na saúde de animais e de humanos. Provocam grandes perdas econômicas na cadeia produtiva agrícola, tratando-se de questão sócio-econômica e também de saúde pública .

As aflatoxinas fazem parte de um grupo de aproximadamente 20 diferentes metabólitos secundários que podem ser produzidos por diferentes espécies de fungos. As espécies *Aspergillus flavus* e *A. parasiticus* são as mais representativas dentre as produtoras de aflatoxinas (RODRIGUES et al., 2012) e novas espécies continuam sendo descritas. Em estudo recente, Soares et al (2012) identificaram três novas espécies de *Aspergillus* produtoras de aflatoxinas, *A. mottae*, *A. sergii* e *A. transmontanensis*, todas pertencentes à seção Flavi, isoladas de amostras milho e amêndoas em Portugal. Varga e outros (2011) identificaram a espécie *A. pseudocaelatus*, isolada amostras de folhas de *Arachis burkatii* na Argentina, capaz de produzir AFB e AFG e a espécie *A. pseudonomius*, isolada de amostras de solo e insetos nos EUA, capaz de produzir AFB₁. Dentre as aflatoxinas existentes as mais importantes são as AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂ e AFM₁. Os *A. parasiticus* produzem AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂, todas naturalmente encontradas em alimentos vegetais, enquanto que os *A. flavus* produzem tipicamente AFB₁ e AFB₂. As designações B e G provêm da cor de fluorescência destas em inglês *blue* e *green*, respectivamente, sob luz ultravioleta; e seus índices referem-se à mobilidade relativa destas em uma placa cromatográfica. A designação M provêm do inglês *milk*, alimento onde a M₁ é mais incidente. Suas estruturas químicas correspondem a radicais dihidrofurano ou tetrahydrofurano fundidos a um anel cumarínico. O grupo B possui um anel ciclopentanona e o grupo G possui uma lactona insaturada (SCUSSEL,1998) como se pode observar na Figura 1 (HUSSEIN; BRASEL, 2001).

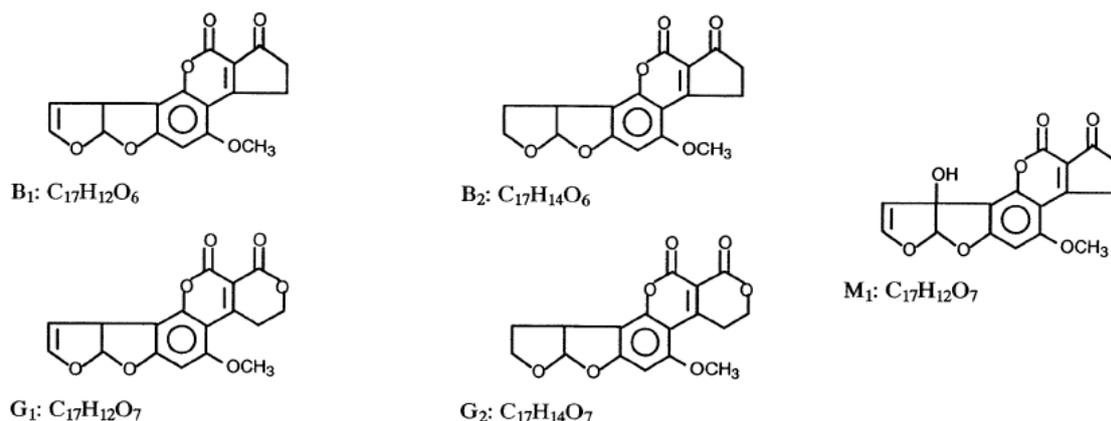


Figura 1. Estruturas químicas das principais aflatoxinas (B₁, B₂, G₁, G₂ e M₁) encontradas em alimentos

2.2.2 Contaminação de produtos agrícolas e acúmulo na cadeia alimentar

Os *Aspergillus* e *Penicillium* crescem como saprófitas nas raízes ou partes das plantas deixadas sobre o solo (REDDY, 2012). Alguns dos produtos alimentícios onde são encontradas contaminações por aflatoxinas incluem cereais (milho, sorgo, arroz e trigo), especiarias (pimenta, pimenta preta, coentro, açafrão), nozes (amendoim, castanha, amêndoa, pistache e nozes) e óleos vegetais (de amendoim, milho, soja e algodão) (REDDY, 2012). Isto porque o processamento de grãos contaminados através de aquecimento, trituração, processos extrusivos para produção de farelos e farinhas ou extração para produção de óleos não garante a eliminação da toxina e resulta em produtos contaminados que serão inseridos na cadeia alimentar. Tais produtos, além de servirem de alimento ao homem, podem também ser utilizados para a elaboração de rações animais. Bovinos, aves, suínos alimentados com ração contaminada convertem a toxina B₁ em metabólitos tóxicos (o metabólito majoritário é a aflatoxina M₁) que se acumulam no organismo e são então repassados ao seu leite, carne e ovos (MASRI, 1967; PURCHASE, 1972; LÖTZSCH; LEISTNER, 1977). Desta maneira, a contaminação é repassada a produtos lácteos como queijo e iogurte.

O crescimento do fungo acontece tanto no campo quanto nos silos de estocagem dos grãos e sementes, em condições de umidade e temperatura favoráveis. O conteúdo de umidade mínima para o crescimento do *Aspergillus* e desenvolvimento de aflatoxinas no produto agrícola está entre 16-17% (ROMO et al, 1986; TRENK; HARTMAN, 1970; FONSECA, 2012). As condições que favorecem uma umidade elevada com conseqüente proliferação de fungos são clima chuvoso, colheita de grãos com umidade elevada, estocagem com pouca ventilação, quebra dos grãos por ação mecânica ou de roedores e insetos (MAGAN; ALDRED, 2007).

No caso específico do amendoim no Brasil, a contaminação é decorrência das práticas tradicionais de colheita, secagem e armazenamento utilizadas pelos produtores. Na hora do arranquio o amendoim contém cerca de 40% de umidade ou mais. A partir de então, de acordo com o clima e a maneira como a planta é disposta no chão para secar - se deitada ou embandeirada (com as vagens para cima) - o amendoim gradativamente perde umidade. Enquanto esta estiver acima de 20-22% a atividade metabólica da vagem oferece resistência à penetração do fungo e o risco de contaminação é praticamente nulo (FONSECA, 2012). Abaixo de 11% (no amendoim em casca) não há umidade suficiente para os fungos crescerem e também não há perigo de contaminação. O intervalo de 22-20 até 11% de umidade é,

portanto, o período crítico e se houver demora da secagem nesta fase, a probabilidade de contaminação do amendoim será muito grande. Abaixo de 20% de umidade o amendoim deve ser seco o mais rapidamente possível, até 11%, e só então ser batido ou despencado e ensacado, para se evitar o desenvolvimento de fungos aflatoxigênicos e, conseqüentemente, que haja contaminação com a aflatoxina (FONSECA, 2012). Nem sempre esta secagem rápida pode ser conseguida porque, na hora da colheita da safra de maior volume, que é chamada "das águas", e que acontece nos meses de janeiro/fevereiro, ocorrem dias seguidos de chuva ou nublados. Além disso, na colheita tradicional, é prática comum espalhar as vagens deitadas para secagem ou ensacar o amendoim ainda úmido. Quando deitadas, além de secarem muito lentamente, as vagens correm o risco de serem enterradas por chuvas. Dentro do saco o amendoim demora muito para secar e o calor gerado pela própria atividade do grão, somado ao ambiente úmido da sacaria, são extremamente favoráveis à contaminação. Da mesma forma, o amendoim que, embora seco, for mal armazenado pode, em época chuvosa (devido à elevada umidade relativa do ar), ganhar umidade e dar condições de crescimento ao fungo, possibilitando a contaminação por aflatoxina (FONSECA, 2012).

A mudança das velhas práticas na colheita e na pós-colheita pelos produtores pode trazer bons resultados. Contudo, isto é complexo e um persistente trabalho de extensão agrícola é necessário porque o produtor, muitas vezes, se recusa a aceitar novas práticas, especialmente quando há um aumento no trabalho e nos custos, sem uma política de melhor preço para um amendoim de melhor qualidade, por parte dos cerealistas ou beneficiadores (FONSECA, 2012).

2.2.3 Via metabólica e mecanismos de ação

A biotransformação da aflatoxina B₁ (AFB₁) começa pela ação de enzimas oxidases do citocromo P450, encontrados em diferentes concentrações em diferentes tecidos e especialmente abundantes no fígado. Tais enzimas realizam sua metabolização para diversas formas, como aflatoxicol, aflatoxina Q1, aflatoxina P1, aflatoxina M1 e a forma bioativa AFB1-8,9-epóxido (HUSSEIN; BRASEL, 2001; BOMMAKANTI; WALIYAR, 2012). A forma metabolizada depende da predisposição genética da espécie, e a quantidade de AFB1-8,9-epóxido formada determina o grau de suscetibilidade da espécie. Esta forma molecular é altamente reativa e instável e pode interagir covalentemente com DNA, RNA além de aminoácidos (metionina, cisteína e histidina), tornando proteínas biologicamente inativas e interferindo no funcionamento normal da célula (ARAÚJO, 1999). A reação com o DNA ocorre através da ligação com guaninas, ao nível do códon 249, do gene supressor de tumores p53 do fígado e leva à mutação e ao câncer (BOMMAKANTI; WALIYAR, 2012).

2.2.4 Danos à saúde

Desde sua descoberta, em 1960, as aflatoxinas têm demonstrado possuir efeitos tóxicos e carcinogênicos em muitas espécies animais, incluindo roedores, aves, primatas não humanos e peixes. Nestes animais, há evidências da associação da aflatoxina B₁ (AFB₁) com a formação de carcinoma hepatocelular, que é mundialmente um dos tipos mais comuns de câncer. Exerce efeito mesmo quando ingerida em quantidades muito baixas, o que permite considerá-la como um dos mais potentes hepatocarcinógenos naturais (OLIVEIRA; GERMANO, 1997).

A susceptibilidade aos efeitos toxigênicos e mutagênicos das aflatoxinas em animais varia entre as espécies (HUSSEIN; BRASEL, 2001), com a idade (quanto mais novos mais

sensíveis), com o sexo (o feminino é mais susceptível) e com o estado nutricional. Causam distúrbios e lesões em diversos órgãos, principalmente no fígado, com proliferação do duto biliar e fibrose, mas podem afetar também o rim, baço e pâncreas e causar reações na pele (SCUSSEL, 1998).

Os efeitos adversos das aflatoxinas em animais foram classificados pela *Food and Drug Administration* em duas categorias gerais, de acordo com a dose e tempo de exposição (FDA, 2012), a saber

I Aflatoxicose aguda, quando níveis moderados ou altos de aflatoxina são consumidos. Episódios agudos específicos podem incluir sintomas como hemorragia, lesões no fígado, edema, alterações na digestão, absorção ou metabolismo de nutrientes e, possivelmente, morte;

II Aflatoxicose crônica, que resulta da ingestão de baixos ou moderados níveis de aflatoxinas por período de tempo prolongado. Os efeitos são muitas vezes subclínicos e difíceis de serem reconhecidos. Alguns dos sintomas comuns são baixas taxas de crescimento sem a manifestação de uma síndrome evidente.

O carcinoma hepatocelular apresenta uma acentuada variação geográfica no que concerne à incidência, com predomínio em alguns países da África, Ásia e ilhas do Pacífico. Entre os países com maior incidência, destacam-se Moçambique, Zimbabwe, Etiópia, China (costa sudoeste) e Taiwan. Os países com incidência intermediária incluem Suazilândia, Transkei, Japão e os da parte central e sudoeste da Europa (OLIVEIRA; GERMANO, 1997). Durante os anos 60 e 70, diversos estudos foram conduzidos na África e na Ásia para investigar a correlação da exposição da aflatoxina e câncer de fígado nos seres humanos. Nestes estudos, para determinar os níveis de exposição à aflatoxina, foram analisadas amostras de alimento coletadas aleatoriamente em determinadas regiões e foram correlacionados com a incidência ou as taxas de mortalidade e de carcinoma hepatocelular. Por exemplo, em um estudo na Suazilândia baseado em estimativas do consumo da aflatoxina de uma amostragem definida dos alimentos em 11 áreas designadas no país, foi relatada correlação significativa entre incidências do câncer de fígado e a exposição às aflatoxinas totais e aflatoxina B1 (SUN; CHEN, 2003).

O primeiro relato de aflatoxicose aguda ocorreu em Taiwan em 1967 (SUN; CHEN, 2003). Em duas vilas foi registrada a intoxicação de 26 pessoas com sintomas que variavam entre edema nas pernas, dor abdominal, vômito e fígado dilatado, tendo ocorrido 3 mortes em 3 famílias. Após investigações as intoxicações foram atribuídas à ingestão de arroz contaminado com *A. flavus* contendo 200µg/Kg de AFB1 (SCUSSEL, 1998). Epidemias de envenenamento por aflatoxinas documentadas em 4 países ilustram a taxa de mortalidade resultante de surtos: na Índia, em 1974, milho contaminado com até 15mg/kg de aflatoxinas levou ao adoecimento de 397 pessoas com 108 mortes; no Kenya, em 1982, foram registradas 20 admissões hospitalares com 60% de mortalidade cujos pacientes estavam intoxicados com 38µg/Kg de aflatoxina por peso corpóreo; ainda no Kenya, entre 2004 e 2005, um surto recorde de aflatoxicose ocorrido na região rural resultou no adoecimento de 317 pessoas, com 125 mortes. A causa do surto foi atribuída ao milho contaminado com 453µg/Kg de aflatoxinas (FDA, 2012).

De acordo com publicação da *World Health Organization – International Agency for Research on Cancer* (WHO-IARC) as aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂ são classificadas como sendo carcinogênicas para humanos, enquanto que a M₁ como possivelmente carcinogênica. A aflatoxina B1 é o carcinogênico natural mais potente que se tem conhecimento (FDA, 2012). A iminência de tais efeitos levou diversos países a estabelecerem legislações específicas para esses contaminantes em diversas classes de alimentos para consumo humano

e animal. De acordo com o compêndio *Worldwide Regulations for Mycotoxins 2003* publicado pela *Food and Agriculture Organization* (FAO) mais de 76 países possuem legislações determinando limites máximos de aflatoxinas permitidos em alimentos, variando de 0 a 35µg/kg.

2.2.5 Legislação sobre limites máximos admissíveis

A União Européia possui um dos limites mais rígidos quanto à contaminação por aflatoxinas, definido no Regulamento (CE) nº 1881/2006, sendo este de no máximo 2 µg/Kg de B₁ e de 4 µg/Kg da soma B₁, B₂, G₁ e G₂ em amendoim.

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) publicou a resolução RDC Nº 7 de 18 de fevereiro de 2011, dispondo sobre limites máximos tolerados de micotoxinas em alimentos. Essa resolução fixa limites de aflatoxinas, ocratoxina A, desoxinivalenol, fumonisinas, patulina e zearalenona em alimentos prontos para consumo e matérias primas, estabelecendo metas para que a cada 2 anos os limites dessas toxinas sejam cada vez menores, tendendo a uma maior rigidez, assim como a União Européia. O limite de aflatoxinas em amendoim estabelecido nessa resolução é de 20µg/Kg para a soma de B₁, B₂, G₁ e G₂. O Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), através da Portaria nº183/96, adotou o Regulamento Técnico MERCOSUL sobre Limites Máximos de Aflatoxinas Admissíveis no Leite, Amendoim e Milho, aprovado pela Resolução nº 56/94, de 12 de janeiro de 1995, do Grupo Mercado Comum do Sul. Este regulamento apresenta os mesmos valores que a resolução da ANVISA. Dessa maneira, fica estabelecido que no Brasil o limite máximo para a soma das aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂ em amendoim é de 20µg/Kg.

2.3 Contaminação do Amendoim por Aflatoxinas

2.3.1 Panorama econômico do amendoim

O amendoim é uma leguminosa de origem sul-americana, rico em óleo, proteínas, vitaminas do complexo B e E e minerais. É um produto conhecido e apreciado em praticamente todos os países pelo seu incomparável sabor e versatilidade de uso em pratos salgados, doces e na indústria. O Brasil, até o início dos anos 70 do século passado, foi importante produtor de amendoim, chegando a produzir 970 mil toneladas em 1972, destinadas ao suprimento interno de óleo vegetal e a exportação de subprodutos. A partir de 1974, o preço do produto nos mercados interno e externo caiu desestimulando o plantio devido, entre outros fatores, à contaminação por aflatoxinas, a mais comum das micotoxinas encontradas em alimentos (SUASSUNA, 2006). A crescente preocupação com a saúde pública e com as perdas econômicas geradas estimulou o investimento em pesquisas na área buscando contornar o problema. A adoção de novas técnicas de manejo visando à prevenção do desenvolvimento de fungos e novas tecnologias de produção e processamento possibilitou, a partir dos anos 2000, a gradativa melhoria na qualidade do produto e a retomada de sua comercialização.

A partir dos anos 2000, ocorreu grande expansão da área cultivada, produção e, principalmente, aumentos consistentes em produtividade. Da produção de 142 mil toneladas em 1995 chegou-se aos atuais 300 mil toneladas em 2005, enquanto que a produtividade passou de 1.740 kg/ha em 1994-96 para 2.330 kg/ha em 2005.

Acompanhando esse processo de expansão da produtividade, foram criados programas e publicadas resoluções para orientação de boas práticas visando a melhoria da qualidade do amendoim e controle da contaminação por aflatoxinas.

Em 2001, representantes das indústrias de amendoim, juntamente com a Associação Brasileira das Indústrias de Chocolates, Cacau, Amendoim, Balas e Derivados (ABICAB), criaram o Programa de Auto-regulamentação e Expansão do Consumo de Amendoim (Pró-amendoim), cujo objetivo é o monitoramento da presença de aflatoxina no amendoim processado, através do selo de Qualidade do Amendoim ABICAB e de medidas de incentivo ao consumo de amendoim.

Entre as ações governamentais para a solução do problema destaca-se a publicação, em junho de 2003, da Resolução RDC 172 pela ANVISA, que dispõe sobre o regulamento técnico de boas práticas de fabricação para estabelecimentos industriais de amendoins processados e derivados.

Em 2004, o MAPA publicou a Portaria 65 que aprova um regulamento técnico de boas práticas agrícolas para o controle de aflatoxinas na cadeia produtiva do amendoim e referente ao método de amostragem e análise para sua determinação.

Os últimos 10 anos marcaram a construção de novas possibilidades para a produção brasileira de amendoim. Em simples comparação entre os anos que iniciam e os que encerram esse período, é possível verificar os resultados alcançados. Assim, de acordo com dados da Secretaria de Comercio Exterior (MARTINS, 2011), especificamente no período de 2002 a 2004, foram produzidas 582 mil toneladas de amendoim em casca para 277 mil hectares plantados, exportadas 53 mil toneladas de amendoim descascado e 10 mil toneladas de óleo bruto de amendoim; já no período de 2008 a 2010, foram produzidas 830 mil toneladas de amendoim em casca para 314 mil hectares, exportações de 148 mil toneladas de amendoim descascado e 73 mil toneladas de óleo bruto de amendoim.

A tendência de elevação da produção seguiu em menor intensidade em 2010 e 2011, quando a produção brasileira fica em torno de 227 mil toneladas e a área plantada em 85 mil hectares (Figura 2).

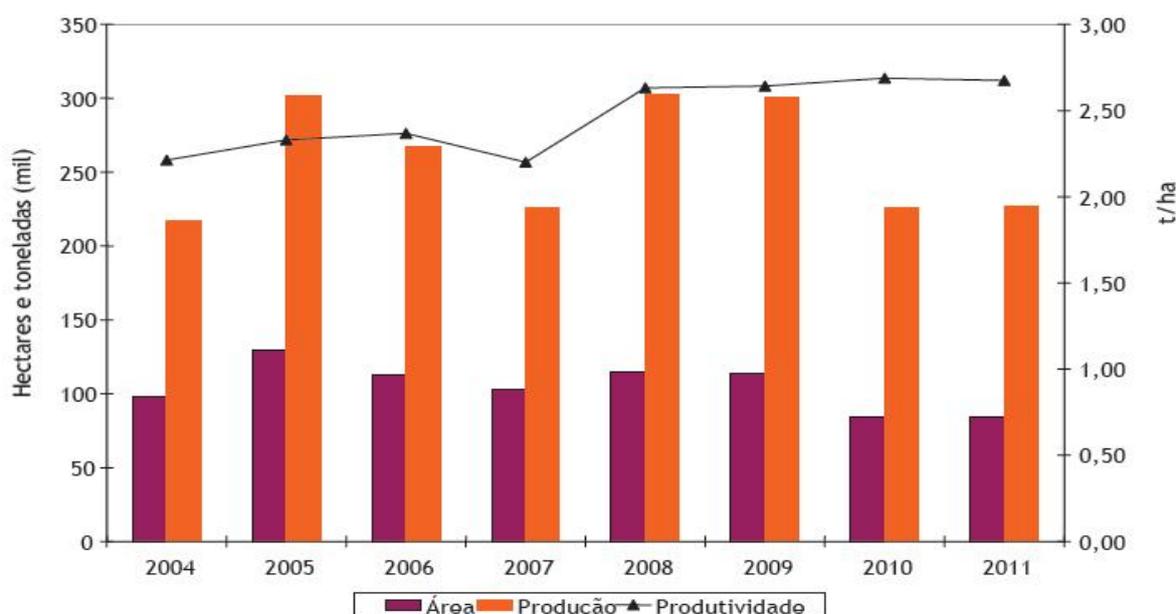


Figura 2. Área plantada, Produção, Produtividade de Amendoim, Brasil, 2004-2011. Fonte: MARTINS, 2011.

Entretanto, observa-se na figura 2 que a produtividade manteve ganhos crescentes estabelecidos durante os anos 2000 e evidenciados pela comparação entre 2004, quando a produtividade média ficou em torno de 2.200 kg/ha, e 2011 quando atingiu 2.670 kg/ha (MARTINS, 2011).

Ainda de acordo com a Secretaria de Comercio Exterior, para as exportações do amendoim descascado, o principal produto do amendoim, observa-se que nos anos de 2009 e 2010 foram exportadas em torno de 50 mil toneladas, correspondendo ao aumento entre 10% e 37% em relação aos anos de 2006 e 2007, quando, conforme a figura 3, registra-se a menor relação entre valores e volumes ou um produto de menor valor (MARTINS, 2011). Por outro lado, no ano de 2008 foram exportadas 44 mil toneladas que correspondem a US\$51 milhões, situação que em 2011 foi ainda mais favorável, pois para os mesmos valores exportou-se em torno de 38 mil toneladas. Dessa forma, ao se considerar os preços médios mensais recebidos pelos produtores nos últimos anos, nota-se a tendência de valorização do produto.

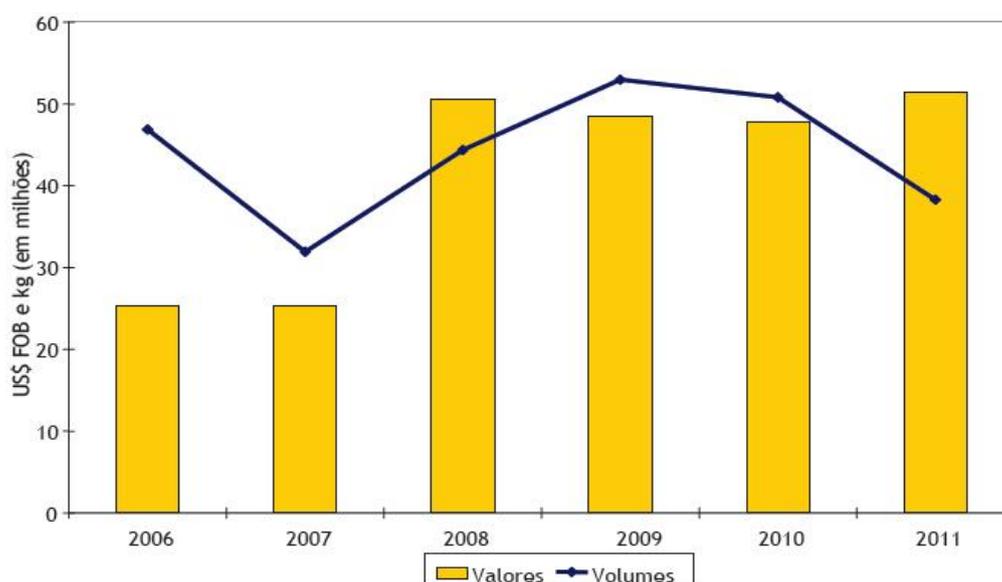


Figura 3. Exportações Brasileiras de Amendoim Descascado, Janeiro de 2006 a Setembro de 2011. Fonte: MARTINS, 2011.

2.3.2 Colheita e pós colheita: prevenção e controle da contaminação por aflatoxinas no Amendoim

De maneira geral, para evitar a contaminação por aflatoxinas devem ser seguidas Boas Práticas Agrícolas (BPA) tanto durante o plantio no campo como nos silos de armazenagem e durante o transporte e processamento do produto agrícola.

O estresse nutricional da planta e, principalmente, o estresse hídrico, são fatores que predispõem os produtos agrícolas à contaminação com micotoxinas. O bom estado hídrico da planta lhe dá mais resistência à invasão por fungos. Desta forma, se houver um período de seca antecedendo a colheita, recomenda-se fazer um boa irrigação dois ou três dias antes. Deve ser feita rotação de cultura e realizar-se um eficiente programa de controle de pragas. A colheita do amendoim deve ser realizada sempre no ponto de maturação e não se deve deixar o amendoim pernoitar no campo. As plantas devem ser colocadas para secar em posição

embandeirada e o amendoim deve ser recolhido apenas quando estiver seco abaixo de 10% de umidade. Nunca deve ser ensacado enquanto a umidade ainda estiver acima deste valor (FONSECA, 2012).

Os grãos devem ser transportados para o local próprio de armazenamento ou processamento logo após a secagem. Os vagões, containers, caminhões devem estar limpos, secos e livres de insetos e roedores, sem crescimento visível de fungos antes de serem utilizados ou reutilizados. Durante o transporte, é essencial evitar flutuações de temperatura, para não condensar água em torno da carga e causar o re-umedecimento dos grãos (MAGAN; ALDRED, 2007; SUASSUNA, 2006).

Durante o armazenamento, o ponto-chave para prevenir contaminação por aflatoxinas é evitar a reidratação dos grãos. Para o tanto o local deve ser ventilado, seco, com boa cobertura, de preferência com paredes duplas, e piso de concreto. Deve ter estruturas de ventilação, ser protegido de chuva e de insetos, pássaros e roedores, com flutuação mínima de temperatura. As regiões dos silos de armazenagem que apresentam concentração de umidade e elevação de temperatura representam influência positiva no desenvolvimento de fungos (HOELTZ, et al., 2009). Os grãos devem ser distribuídos de maneira uniforme, favorecendo a dispersão do calor e umidade. O armazém deve ser mantido limpo, eliminando-se a terra e impurezas que possam vir do campo (FONSECA, 2012). Dessa forma, há redução das áreas favoráveis a proliferação de insetos, que causam picos de aquecimento e umidade, favorecendo o crescimento de fungos que produzem as aflatoxinas. Umidade relativa do local menor que 70% e temperatura entre 0 e 10°C propiciam ótimas condições de armazenamento (MAGAN; ALDRED, 2007; SUASSUNA, 2006).

Dever haver rastreabilidade entre os silos de armazenagem e o local de processamento para que se possa fazer o correto acompanhamento de cada lote e o monitoramento das etapas de colheita, transporte, estocagem e distribuição. Esse monitoramento é essencial para que, no caso de uma contaminação, se possa determinar em qual dessas etapas houve falha, para que assim se possam tomar medidas corretivas.

2.4 Considerações Sobre Metodologias Analíticas

2.4.1 Cromatografia e análise por espectrometria de massas

O acoplamento de um instrumento cromatográfico a um espectrômetro de massas consiste em uma técnica analítica para identificação e quantificação precisa e específica. De maneira geral, o procedimento da análise ocorre como descrito a seguir.

Um extrato da amostra que se deseja analisar é injetado em um cromatógrafo, que separa os componentes dessa mistura através de diferenças de afinidade por fase estacionária (coluna cromatográfica) e fase móvel (solvente ou mistura de solventes utilizados na eluição dos compostos). O tempo de retenção obtido para cada composto eluído é um primeiro parâmetro utilizado para sua identificação. O composto é então injetado em um espectrômetro de massas, onde é primeiramente ionizado. Os íons formados são separados na base da razão massa/carga (método de separação dos íons) e o número de íons que corresponde a cada “unidade” de massa/carga é registrado na forma de um espectro. No caso de compostos conhecidos, uma busca computadorizada compara o espectro de massas do composto em questão com uma biblioteca de espectros de massas. A coincidência dos espectros de massas é mais uma evidência utilizada para a identificação (SMITH, 2004).

2.4.1.1 Cromatografia líquida de alta e ultra eficiência

Nos últimos 40 anos, a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) tem sido a técnica analítica mais desenvolvida, difundida, e empregada em laboratórios de análise de indústrias químicas e farmacêuticas, em áreas médicas e em muitos outros campos da ciência. Associada a essa expansão, na última década, o desenvolvimento da HPLC tem sido direcionado à necessidade de análises mais rápidas, porém, sem o comprometimento do desempenho cromatográfico (MALDANER; JARDIM, 2009). Esse direcionamento se ocorreu através de novas tecnologias para produção das partículas de recheio de colunas cromatográficas. A primeira evolução nesta tecnologia diz respeito ao tamanho das partículas. No início da cromatografia líquida em 1950 usavam-se colunas recheadas com partículas irregulares de 100-200 μm que alcançavam eficiência de apenas 200 pratos/15cm (pratos é uma medida de eficiência de separação). Ao redor dos anos 60, foram introduzidas colunas com partículas de 40-50 μm que ofereciam maior eficiência, atingindo 1000 pratos/15cm. A transição para partículas menores, com diâmetros em torno de 10 μm ocorreu por volta dos anos 70 atingindo a eficiência de 6000 pratos/15cm. Nos anos 80 foram introduzidas partículas de 3,3-5 μm e finalmente, no ano de 1996, as primeiras partículas de 1,6 μm com eficiências superiores a 22000pratos/15cm (MALDANER; JARDIM, 2009). Paralelamente à redução no tamanho das partículas, a tecnologia evoluiu no desenvolvimento de partículas de formato esférico, que, quanto menores, formam um leito cromatográfico mais compacto, homogêneo e permitem enchimentos mais reprodutíveis. Após 50 anos de desenvolvimento, surgiram as partículas esféricas porosas de 2,5 μm com as quais são obtidas colunas com eficiência de 25000 pratos/15cm. A porosidade das partículas aumenta a área superficial e aumenta a capacidade de amostra. Visando atender à necessidade de análises mais rápidas, a alternativa mais simples seria o uso de colunas mais curtas associadas a vazões mais elevadas de fase móvel. Esta alternativa foi aplicada empregando-se partículas de 3-3,5 μm , porém as separações apresentaram perda de resolução e menor desempenho cromatográfico (MALDANER; JARDIM, 2009).

A evolução dos materiais de recheio é orientada pela equação de van Deemter, que descreve a relação entre eficiência, velocidade de fase móvel e tamanho de partícula. Esta equação descreve que utilizando-se partículas menores que 2 μm pode-se utilizar colunas de menor comprimento com altas velocidades lineares de fase móvel sem perda na eficiência de separação da coluna. Uma vez que o tempo de retenção é proporcional ao comprimento da coluna, uma coluna menor permitiria separações mais rápidas utilizando-se o mesmo fluxo de fase móvel, gastando-se uma menor quantidade de solvente, de amostra e de fase estacionária (MALDANER; JARDIM, 2009).

A redução do tamanho da partícula com maior empacotamento da coluna tem como consequência um grande aumento na pressão. A redução do tamanho da coluna pode suavizar esse aumento de pressão, mas ainda assim a pressão permanece alta e incompatível com um sistema convencional de HPLC. Para tornar possível o uso de colunas empacotadas com partículas menores que 2 μm , uma vez que a atual instrumentação (bombas, injetores e detectores) disponível para HPLC não era projetada para trabalhar em altas pressões, um novo equipamento foi introduzido em 2004 pela Waters Corporation (MALDANER; JARDIM, 2009). Este primeiro equipamento comercial capaz de operar em pressões de até 15000 psi foi denominado de *AcquityTM ultra performance liquid chromatography system* (UPLCTM). O termo foi traduzido em português para Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (UPLC).

As vantagens alcançadas com o sistema de UPLC vêm sendo testadas por inúmeros grupos de pesquisa e a economia de tempo e de solventes já se fez evidente. Nováková e

outros (2006) compararam o uso de diversos sistemas de HPLC e um sistema de UPLC em uma análise de formulação farmacêutica de diclofenaco. Entre os sistemas HPLC, testaram as colunas Zorbax Eclipse XDB-C18 (75 x 4,6 mm, 3,5 μm), Zorbax Eclipse SB-C18 (50 x 4,6 mm, 1,8 μm), Purospher RP18e (125 x 4,0 mm, 5,0 μm) e Chromolith Performance RP18e (100 x 4,6 mm). No sistema UPLC empregaram colunas Acquity BEH C18 (50 x 2,1 mm, 1,7 μm). Os melhores resultados de tempo de análise e consumo de solvente foram obtidos com as colunas Acquity, tendo sido gastos 1,08 mL de fase móvel em uma análise realizada em 2,4 minutos. Utilizando-se a coluna Purospher o tempo de análise foi de 13 minutos gastou-se 11,9 mL de fase móvel. Com as colunas Zorbax de 1,8 μm os tempos de análise foram semelhantes ao obtido com a coluna Acquity, porém todas apresentaram um maior consumo de solvente. Nguyen e outros (2006) compararam colunas recheadas com partículas menores que 2 μm usando um sistema de UPLC com colunas convencionais recheadas com partículas de 3,5 e 5,0 μm usando um sistema de HPLC na análise de uma mistura de 4 alquilparabenos. As colunas recheadas com partículas de 1,7 μm apresentaram eficiências três vezes maiores e as análises foram oito vezes mais rápidas que as colunas recheadas com partículas de 5 μm .

2.4.1.2 Espectrometria de massas ESI-Q-ToF

Um espectrômetro de massas consiste em três principais setores, esquematizados na Figura 4: fonte (etapa de ionização), analisador (etapas de seleção, fragmentação e separação para determinação da massa exata) e detector (etapa de contagem dos íons) (SMITH, 2004). O espectrômetro de massas utilizado para a análise de aflatoxinas desenvolvida no presente projeto (Q-TOF) trabalha com um método de ionização por evaporação, chamado ionização por electrospray (ESI – *Electrospray Ionization*), que pode operar em modo positivo ou modo negativo. Essa fonte de ionização é uma das interfaces utilizadas no modo de ionização à pressão atmosférica (API – *Atmospheric Pressure Ionization*). Outra interface é a ionização química a pressão atmosférica (APCI – *Atmospheric Pressure Chemical Ionization*).

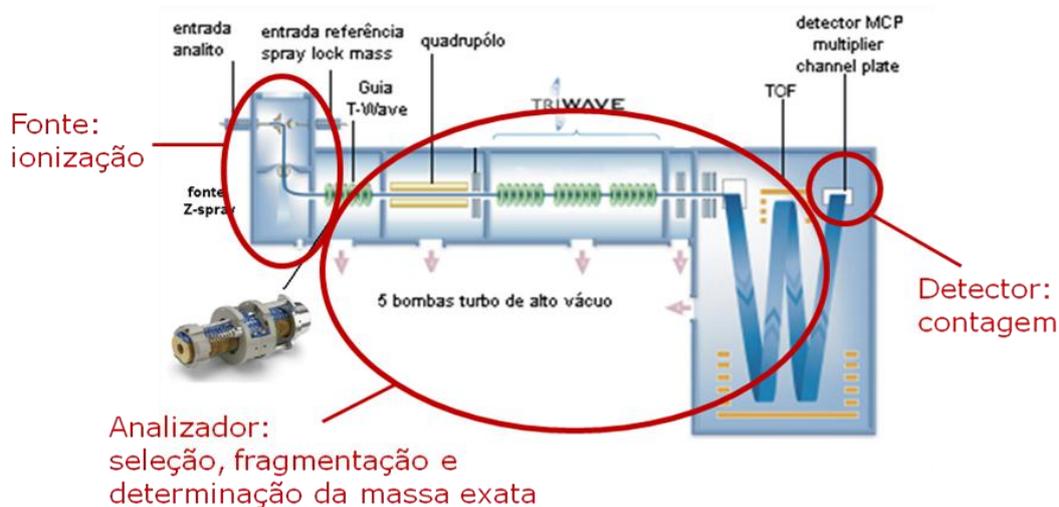


Figura 4. Representação dos três setores do espectrômetro de massas QTOF (fonte: adaptado de Waters Corporation, 2009).

A amostra em solução entra na fonte de ionização através de um tubo capilar de aço inoxidável envolvido por um fluxo coaxial de nitrogênio. Na operação em modo positivo, este

tubo capilar é carregado positivamente, atraindo ânions para sua parede e deixando a solução com um excesso de cargas positivas (Figura 5).

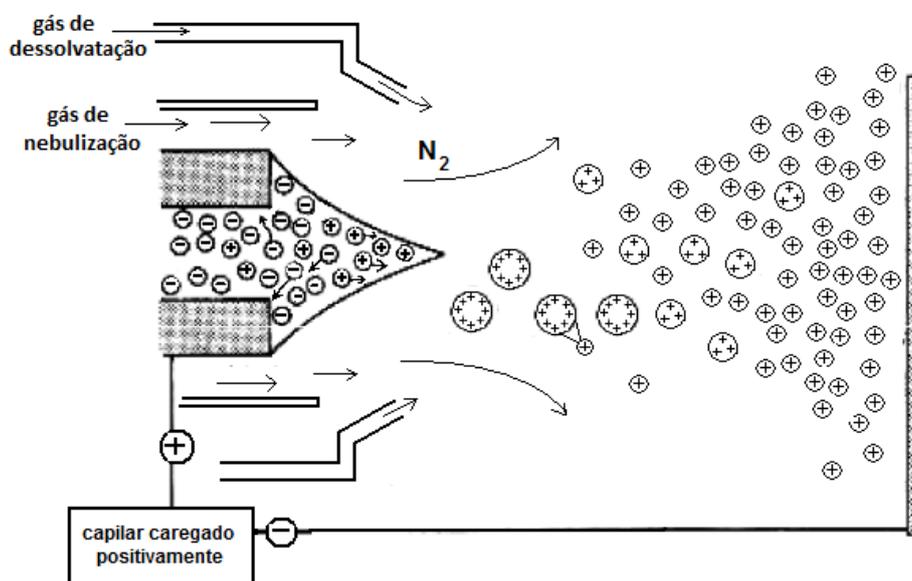


Figura 5. Representação de uma fonte de ionização por eletrospray (ESI) operando em modo positivo (Fonte: adaptado de Waters Corporation, 2009).

Quando a solução deixa o tubo capilar, o nitrogênio funciona como gás nebulizador, induzindo a formação de um aerossol de gotículas carregadas. O nitrogênio também é utilizado como gás de dessolvatação, que auxilia a evaporação do solvente, as gotículas do aerossol diminuem de volume, concentrando, dessa forma, os íons de carga positiva. Quando a repulsão eletrostática dos íons da amostra atinge um ponto crítico, a gotícula sofre a chamada “explosão coulômbica”, que libera os íons para a fase vapor. Já na fase vapor, os íons são arrastados pelo gás nebulizador, focalizados através de orifícios e passam para o espectrômetro de massas (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2007). É um método de ionização suave que utiliza baixas voltagens e dificilmente induz fragmentação. No modo positivo, a molécula do analito adquire carga positiva pela adição de um próton e aparece um pico em $[M+1]^+$. Esse pico é o chamado íon molecular. No modo negativo, as voltagens são invertidas, a molécula do analito ioniza-se com carga negativa e esse íon molecular apresenta um pico em $[M-1]^-$ (SMITH, 2004).

A separação da mistura de íons formados durante a etapa de ionização segundo seus m/z é realizada pelo analisador de massas, considerado o “coração” do espectrômetro. No Acquity/Synapt[®] o analisador de massas é composto de um quadrupolo seguindo de um setor de células de colisão e de um setor por tempo de voo (TOF – *Time of Flight*). Um arranjo de quadrupolo é formado por quatro tubos cilíndricos paralelos, montados segundo os vértices de um quadrado (Figura 6). Uma voltagem de corrente direta modificada por uma voltagem de radiofrequência é aplicada nos tubos, de modo que as barras paralelas apresentem os mesmos pólos e as barras adjacentes pólos diferentes. Os íons entram em um “tubo” formado pelos quatro cilindros do quadrupolo. Para cada combinação de voltagem aplicada ao quadrupolo, somente íons com certo valor de m/z apresentam uma trajetória estável ao longo do quadrupolo, o atravessam e chegam até as células de colisão e o setor TOF. Os demais íons,

com valores diferentes das m/z selecionadas, têm oscilações erráticas e colidem com um dos tubos ou saem do quadrupolo (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2007). Dessa maneira, pode-se considerar o quadrupolo como um filtro de massas ajustável.

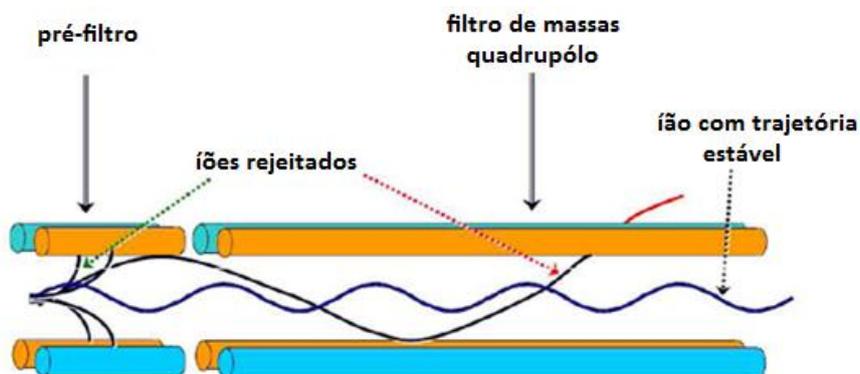


Figura 6. Representação de um setor quadrupolo (Fonte: adaptado de Waters Corporation, 2009).

Nas células de colisão, são aplicadas voltagens aos íons selecionados pelo quadrupolo, induzindo à sua fragmentação. O quadrupolo permite que se analisem o que chamamos de transição massa/massa, ou seja, a quebra de um íon molecular para seus fragmentos. Essa transição é altamente específica, sendo considerada um valioso ponto de identificação.

No setor TOF, os íons (incluem-se, nesse caso, os íons moleculares e fragmentos iônicos gerados nas células de colisão) que atravessaram os setores anteriores são acelerados por uma voltagem e passam por um tubo até um detector. Íons de m/z diferentes apresentam velocidades diferentes (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2007). Se todos os íons tiverem a mesma energia, aqueles de menor massa terão maior velocidade (Figura 7). Através do tempo gasto para atravessar o TOF, é calculada a m/z de cada íon.

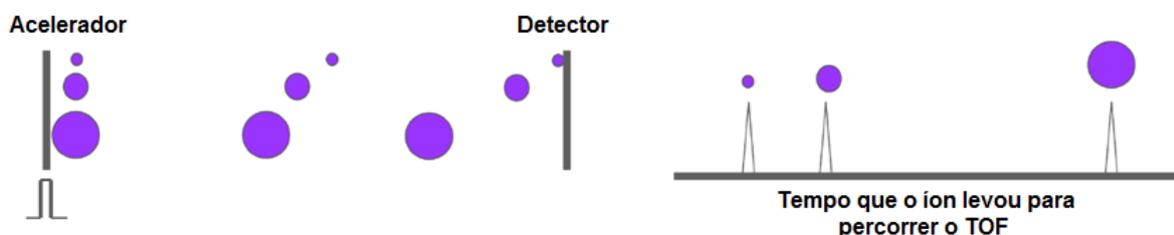


Figura 7. Representação de íons atravessando o setor TOF (Fonte: adaptado de Waters Corporation, 2009).

O TOF é um instrumento de altíssima resolução, sendo capaz de identificar a m/z de cada íon com exatidão até a quarta casa decimal (SMITH, 2004). Para tanto, é necessário que se faça sua calibração antes de utilizá-lo. Utiliza-se uma solução de um composto cujas m/z dos fragmentos gerados sejam estabelecidas até a 4ª casa e estejam registradas em uma biblioteca do TOF. O composto é inserido através de infusão direta e o TOF localiza seus picos e estabelece uma relação entre o valor m/z da biblioteca e tempo que cada um desses picos requereu para atravessá-lo. É feita uma calibração antes de se iniciar uma análise e, ao longo desta, pode se calibrá-lo continuamente através da função *lockspray*. A calibração contínua (função *lockspray*) consiste em inserir-se, através da entrada infusão, um pequeno volume de solução de calibração a intervalos de tempo programados ao longo da corrida. São utilizados para confirmação da identidade da molécula o tempo de retenção do composto, a

m/z do íon molecular (molécula protonada, considerada o íon precursor), a m/z dos fragmentos iônicos gerados (íon produto) e a exatidão desses valores m/z .

Existem espectrômetros de massa que possuem apenas setores quadrupolo (como o triplo quadrupolo – QqQ) ou apenas o setor tempo de voo (TOF). Estes instrumentos estão há mais tempo no mercado e são de uso mais difundido, de modo que já existem hoje metodologias de análise estabelecidas para estes aparelhos, reconhecidas internacionalmente. No entanto, utilizar um aparelho Q-TOF é mais vantajoso do que utilizar um QqQ, uma vez que este não é capaz de fornecer a massa exata. Essa habilidade é útil para verificar se existem interferentes na matriz com m/z muito próximas a do seu analito, que poderiam ser confundidos com o composto de interesse se analisados através de um QqQ. Utilizar um Q-TOF é da mesma maneira mais vantajoso do que utilizar um TOF, pois este não é capaz de acompanhar as transições massa/massa. O Q-TOF trata-se de um instrumento que combina as habilidades individuais de cada um destes setores, aumentando as chances de se conseguir uma identificação precisa durante a análise (HERNANDEZ, 2004). O Q-TOF, quando comparado ao QqQ e ao TOF, apresenta maior potencial confirmatório (GRIMALT et al, 2010). A única ressalva é que este tipo de equipamento requer um cuidado extra em procedimentos de quantificação para que se consiga uma boa linearidade na resposta do detector.

2.4.2 Métodos de quantificação

Todos os métodos cromatográficos de quantificação partem do mesmo princípio básico: utiliza-se um padrão da(s) substância(s) em questão para se construir uma curva dose-resposta, a qual é utilizada como parâmetro de comparação durante a análise de uma amostra. A curva de calibração deve ser linear (de acordo com os critérios de validação analítica do INMETRO) e a análise da amostra deve ser feita exatamente dentro das mesmas condições estabelecidas para construção da curva para que a resposta seja verdadeira e reproduzível. A construção de tal curva pode ser feita de duas formas: padronização externa ou interna. A mais comum é a externa na qual se constrói a curva de calibração correlacionando o valor absoluto da resposta obtida com a concentração do padrão. Acontece que, durante qualquer análise, pode ocorrer que não se consiga reproduzir exatamente as mesmas condições que haviam sido utilizadas na construção da curva. Alguns fatores são difíceis de controlar, e quando se trata de uma metodologia sensível como a análise por espectrometria de massas de alta resolução, essas pequenas variações podem interferir na resposta. Fatores como o grau de pureza dos solventes da fase móvel ou a quantidade de sal presente na amostra podem influenciar na ionização, causando sub ou superestimação na quantificação do analito. Quando isso acontece, uma maneira de se compensar estas pequenas variações é trabalhar com padronização interna. Nesta forma de curva de calibração, não se relaciona a concentração com o valor absoluto da resposta, mas sim com um valor que corresponde à razão entre esse valor absoluto e o valor de outra substância considerada padrão interno. Para que uma substância possa ser utilizada como padrão interno em uma análise, ela deve ter estrutura molecular parecida com a do analito em questão, para que se comporte de maneira semelhante a ele frente a pequenas influências externas. Dessa forma, se durante a quantificação de uma amostra acontecer de, por exemplo, o excesso de sal causar supressão iônica e o analito for subestimado em 10%, o padrão interno também será subestimado em 10% e a razão entre os valores se manterá. É importante que o padrão interno seja adicionado na mesma quantidade em todos os pontos da curva de calibração. O Quadro 1 exemplifica uma quantificação por padronização interna.

Quadro 1. Exemplo hipotético de quantificação por padronização interna onde a utilização da razão analito/PI compensa variações evitando sub ou superestimações de resultados.

Condições da análise		Valor absoluto do analito	Valor absoluto do padrão interno (PI)	Razão
Analito C = 10ppm + Padrão interno C = 2ppm	Durante o estabelecimento da curva de calibração	150	30	$150/30 = 5$
	Se influência externa causar subestimação em 10%	135	27	$135/27 = 5$
Analito C = 20ppm + Padrão interno C = 2ppm	Durante o estabelecimento da curva de calibração	300	30	$300/30 = 10$
	Se influência externa causar subestimação em 10%	270	27	$270/27 = 10$

Existem disponíveis no mercado padrões de aflatoxinas marcadas com carbono 13 especialmente desenvolvidas para serem utilizadas como padrão interno em métodos de quantificação. Contudo, trata-se de um produto cerca de cinco vezes mais caro que um padrão de aflatoxinas de carbono 12 e sua utilização aumenta o custo do projeto e inclusive o custo da análise, pois, toda vez que se for analisar uma amostra o padrão interno terá que ser adicionado. O alto custo muitas vezes faz com que este seja um procedimento de segunda escolha, uma alternativa quando não se consegue desenvolver a análise por padronização externa.

2.4.3 Validação de métodos analíticos

Cada vez mais, empresas, revistas científicas e órgãos reguladores do Brasil e outros países exigem a validação de metodologias analíticas e, para isso, a maioria deles tem estabelecido documentos oficiais com diretrizes a serem adotadas no processo de validação (PEREZ, 2010). Um processo de validação oferece às agências reguladoras a confirmação, através de evidências objetivas documentadas, de que os métodos e os sistemas de medição são adequados para o uso pretendido, ou seja, é o processo que comprova adequação ao uso e atesta a confiabilidade dos resultados. No processo de validação se estabelecem as características de desempenho e limitações do método e se identificam os fatores que as afetam e em que extensão (JUNQUEIRA; SOUZA, 2005). Todos os dados relevantes no estudo, como planejamento, experimentos e resultados obtidos, devem ser registrados de forma a possibilitar a rastreabilidade de todo o processo (PEREZ, 2010).

Algumas definições de validação por diferentes agências reguladoras encontram-se a seguir:

“A validação deve garantir, através de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados” (ANVISA).

“Validação é o processo de definir uma exigência analítica e confirmar que o método sob investigação tem capacidade de desempenho consistente com o que a aplicação requer” (Eurachem Working Group).

“Confirmação por testes e apresentação de evidências objetivas de que determinados requisitos são preenchidos para um dado uso intencional” (ISO/IEC 17025).

“A validação de métodos assegura a credibilidade destes durante o uso rotineiro, sendo algumas vezes mencionado como o ‘processo que fornece uma evidência documentada de que o método realiza aquilo para o qual é indicado para fazer’” (USP).

“Avaliação sistemática de um procedimento analítico para demonstrar que está sob as condições nas quais deve ser aplicado” (WHO).

Um processo de validação pode ser dividido em duas etapas. A primeira é a validação no laboratório que, como o nome sugere, são avaliadas todas as etapas de validação dentro de um único laboratório, sem verificar a reprodutibilidade. A segunda é a validação completa, que envolve todas as características de desempenho e um estudo interlaboratorial que é utilizado para verificar a reprodutibilidade da metodologia e a incerteza expandida associada à metodologia como um todo. Só assim esta pode ser aceita como uma metodologia oficial para uma determinada aplicação.

A validação deve ser feita toda vez que se pretender utilizar um método não normalizado, como métodos desenvolvidos no laboratório, métodos recomendados pelo fabricante, métodos publicados em revistas ou um método normalizado modificado. Quando se for utilizar um método normalizado (aquele desenvolvido por um organismo de normalização ou outras organizações como Associação Brasileira de Normas Técnicas - ABNT - e cujos métodos são aceitos pelo setor técnico em questão), deve-se verificar se o desempenho documentado deste método pode ser alcançado. São utilizadas as mesmas ferramentas da validação para avaliar parâmetros como precisão e tendência.

É importante ressaltar que a validação custa caro, porém, deve ser considerada um investimento e não uma despesa. O custo da validação é justificado por algum interesse, seja por exigência de clientes, de fiscalização ou para reduzir custos de reanálise. Segundo Perez (2010), não ter validação das análises é apenas mais um número, não um resultado.

No Brasil, há duas agências credenciadoras para verificar a competência de laboratórios de ensaios, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e o Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO), que disponibilizam guias para o procedimento de validação de métodos analíticos. A ANVISA disponibiliza a resolução RE nº899 de 2003 e o INMETRO disponibiliza o DOQ-CGCRE-008 com última revisão em julho de 2011 e que é um documento de caráter orientativo sendo, portanto, aberto para interpretação.

2.4.4 Critérios analíticos segundo a União Europeia

A União Europeia possui uma das mais rígidas legislações não apenas em relação aos limites máximos permitidos de aflatoxinas em alimentos, mas também em relação à qualidade dos métodos analíticos utilizados para medir tais contaminantes.

A *Commission Decision 2002/657/EC* determina critérios de performance e de procedimentos para validação de métodos analíticos para garantir a qualidade e a comparabilidade de resultados gerados por laboratórios oficiais. Tais critérios devem ser comuns na interpretação desses resultados para harmonizar os diferentes métodos. Nessa decisão ficou estabelecido que um método confirmatório para resíduos orgânicos ou contaminantes deve prover informação sobre a estrutura química do analito. Dessa forma, métodos baseados apenas em análise cromatográfica sem o uso de detecção espectrométrica não são suficientes por si só como método de confirmação. Devem então ser utilizadas combinações de procedimentos, como limpeza da amostra, separação cromatográfica e detecção espectrométrica.

Entre os critérios de desempenho relativos a métodos cromatográficos, estabeleceu-se que “no caso de o método recorrer à utilização de um padrão interno apropriado, este deve ser adicionado ao ensaio no início do processo de extração. Em função da disponibilidade, usar-se-ão formas estáveis isotopicamente marcadas da substância a analisar, particularmente adequadas para a detecção por espectrometria de massa, ou compostos que apresentem uma relação estrutural com a substância a analisar. Quando não se puder usar nenhum padrão interno adequado, a identificação da substância deve ser confirmada através de co-cromatografia. Neste último caso, deve obter-se apenas um pico, cujo incremento na altura (ou área) deverá ser equivalente à quantidade de substância a analisar adicionada. No caso da cromatografia gasosa (GC) ou da cromatografia líquida (LC), a largura do pico a metade da sua altura máxima deverá estar compreendida entre 90 e 110 % da largura inicial, e os tempos de retenção deverão ser idênticos, com um desvio de 5 %”. Além disso, o tempo de retenção mínimo aceitável para a substância a analisar deve ser o dobro do tempo de retenção correspondente ao volume morto da coluna.

O tempo de eluição do volume morto da coluna (SNYDER, 2010) pode ser calculado pela fórmula:

$$t_{vo} = \frac{r^2 \times 31416}{210910 \times \text{fluxo}}$$

onde:

t_{vo} = tempo de retenção do volume morto da coluna

r = raio da coluna

C = comprimento da coluna em mm

fluxo = fluxo da análise em questão em mL/min

Os critérios de desempenho relativos à detecção por espectrometria de massas variam de acordo com o tipo de método espectrométrico. “Quando a determinação por espectrometria de massa for efetuada através do registo de espectros de varrimento total, é obrigatória a presença, no espectro de referência do padrão de calibração, de todos os íons de diagnóstico medidos (íon molecular, aductos característicos do íon molecular, íons fragmentados característicos e íons isótopos) com intensidades relativas superiores a 10 %. Devem encontrar-se presentes, no mínimo, quatro íões com intensidades relativas à 10 % do pico de base. Sempre que os fragmentos forem medidos com outra técnica que não a do varrimento total, deve-se usar um sistema de pontos de identificação para interpretar os dados”. Essa determinação de um sistema de classificação de “pontos de identificação” para diversos tipos de resultados foi uma das ferramentas para harmonização estabelecidas nessa decisão. Nesse sistema, foi arbitrado que, em uma espectrometria de massa de baixa resolução, a presença do íon precursor vale 1 ponto e de um fragmento vale 1,5 ponto. Já em uma espectrometria de massa de alta resolução, a presença de um íon precursor vale 2 pontos e de um fragmento vale 2,5 pontos. Foi estabelecido ainda que para análise de micotoxinas são necessários um mínimo de 3 pontos de identificação por micotoxina.

Visto que o elevado nível de proteção à saúde do consumidor não deve ser privilégio da Europa, deve-se cada vez mais buscar equiparar os critérios das metodologias desenvolvidas no Brasil aos critérios das metodologias europeias para que se disponha de métodos analíticos de qualidade.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais

3.1.1 Padrões, reagentes e solventes

Foram utilizados padrões das aflatoxinas AFB₁, AFB₂, AFG₁ e AFG₂ Biopure[®] Romer labs diluídos em acetonitrila e dois materiais de referência certificados (MRCs) da *Food Analysis Performance Assessment Scheme* (FAPAS[®]).

Utilizou-se ácido fosfórico PA, ácido fórmico 96% PA Tedia, formiato de amônio “*for Mass Spectroscopy puriss*” PA Fluka, metanol grau MS Tedia, acetonitrila grau MS Tedia, acetonitrila grau MS JTBaker, acetonitrila grau CL Tedia, água ultra pura obtida de sistema Milli-Q[®] da Millipore, água LC-MS Chromasolv[®] Fluka.

3.1.2 Equipamentos e utensílios

O método analítico foi desenvolvido em um Cromatógrafo Líquido de Ultra Eficiência (UPLC) Acquity[®] da Waters Corporation (Inglaterra) acoplado a um espectrômetro de massas híbrido de quadrupolo com setor tempo de voo (QToF) Synapt[®] da Waters Corporation (Inglaterra). Testaram-se uma coluna cromatográfica C₁₈ 2,1 x 150mm, 1,7 µm Acquity UPLC BEH da Waters e uma coluna cromatográfica C₁₈ 2,1 x 50mm, 1,7 µm Acquity UPLC BEH da Waters. Utilizou-se seringa Microliter[™] #750 da Hamilton para calibração do Synapt[®].

Para preparação das amostras e soluções de trabalho foram utilizados: mini-moinho IKA[®], balança analítica Marte[®], agitador (*shaker*) Gyromax[®] da Amerex Instruments, filtros de papel qualitativos Whatman[®], erlenmeyers, provetas, funis de vidro e beakers da Biocristal[®], colunas para purificação de extrato Mycosep[®] 224 Aflazon da Romer Labs, Nitrogênio líquido 5.0, *vial* âmbar de 1,8 mL da Waters, *vial* âmbar de 5 mL da Waters, homogenizador (vórtex) Mistral[®] da Lab-Line, pipeta calibrada de 100 a 1000 µL Transferpette[®] Brand e pipeta calibrada de 10 a 100 µL Transferpette[®] Brand.

3.1.3 Matrizes

Utilizou-se amendoim cru, sem casca, com pele, industrializado, adquirido em supermercado; 10 amostras de amendoim cru, sem casca, com pele, adquiridas em feira livre do Rio de Janeiro e amostra de amendoim cru, sem casca, com pele, naturalmente contaminado, disponibilizado pelo Laboratório de Micotoxinas da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz da Universidade de São Paulo (ESALQ/ USP).

3.2 Métodos de Preparo de Amostras e Soluções

3.2.1 Preparação de soluções

- Solução padrão estoque (*pool*) de aflatoxinas AFB₁, AFB₂, AFG₁ e AFG₂

Os padrões Biopure de AFB₁, AFB₂, AFG₁ e AFG₂ adquiridos apresentavam concentrações de 2,03; 0,5; 2,02 e 0,5 µg/mL respectivamente. Misturou-se 2 mL de cada padrão em frasco âmbar, utilizando-se pipeta calibrada (1 mL). Obteve-se um *pool* na concentração de 1262,5 µg/L que foi mantido sob refrigeração a -5 °C.

- A solução padrão de trabalho

Utilizando-se pipeta calibrada (1 mL), mediu-se 1 mL do *pool*, colocou-se em balão volumétrico calibrado de 10 mL, completou-se o volume com acetonitrila grau MS e passou-se para frasco âmbar. Obteve-se uma solução de trabalho na concentração de 126,25 µg/L que foi mantida sob refrigeração a -5° C. Esta solução foi utilizada para preparo das curvas de calibração e procedimento de fortificação realizado nos ensaios de recuperação.

- Solução de calibração ácido fosfórico 1%

Mediu-se 100 mL de acetonitrila MS e 100 mL de água ultra pura em balões volumétricos calibrados e misturou-se em frasco. Pesou-se 1,0g de ácido fosfórico em balança analítica previamente descontada a tara e dissolveu-se com 100 mL de solução acetonitrila:água 50:50 (v/v) medidos em balão volumétrico calibrado.

- Solução aquosa formiato de amônio 4M

Pesou-se 2,522g de formiato de amônio em balança previamente descontada a tara, transferiu-se quantitativamente para balão volumétrico de 10 mL e completou-se o volume com água ultra pura.

- Solução para diluição dos pontos da curva

Mediu-se 60 mL de acetonitrila MS e 140 mL de água ultra pura em provetas separadas e misturou-se, obtendo-se uma solução acetonitrila:água 30:70 (v/v).

- Soluções de fase móvel

Solução X:

Mediu-se 500 mL de acetonitrila MS em proveta de 1 L e transferiu-se para frasco âmbar de 1 litro.

Solução Y:

Mediu-se 450 mL de metanol MS e 550 mL de água ultra pura em provetas separadas de 1 litro e misturou-se um frasco âmbar de 1 L. Obteve-se assim uma solução metanol:água 45:55 (v/v).

Solução A:

Mediu-se 1 L de acetonitrila MS em balão volumétrico de 1 L e transferiu-se para frasco âmbar. Utilizando-se pipeta volumétrica calibrada (1 mL), retirou-se 2 mL de acetonitrila e adicionou-se 1 mL de ácido fórmico e 1 mL de solução aquosa formiato de amônio 4M. Preparou-se assim uma solução ácido fórmico 0,1% (v/v) e formiato de amônio 4mM em acetonitrila MS.

Solução B:

Mediu-se 1 L de água ultra pura em balão volumétrico de 1 L e transferiu-se para frasco âmbar de 1 litro. Utilizando-se pipeta volumétrica calibrada (1 mL), retirou-se 2 mL de água e adicionou-se 1 mL de ácido fórmico e 1 mL de solução aquosa formiato de amônio 4M. Preparou-se assim uma solução aquosa de ácido fórmico 0,1% (v/v) e formiato de amônio 4mM.

- Solução de extração de aflatoxinas

Mediu-se 840 mL de acetonitrila LC e 160 mL de água ultra pura em provetas separadas e misturou-se em frasco de 1 L, resultando em solução de extração acetonitrila:água 84:16 (v/v).

3.2.2 Preparação da curva de calibração em solvente

A partir da solução padrão de trabalho (de concentração 126,25 µg/kg de aflatoxinas totais) foram preparados (Tabela 1) os 6 pontos da curva, nas concentrações de 4, 10, 15, 20, 25 e 30 µg/kg de aflatoxinas totais. As diluições foram feitas em triplicata, utilizando-se acetonitrila:água 30:70 (v/v), diretamente nos “vials” e posicionados na bandeja para injeção.

Tabela 1. Alíquotas de padrão e solução de diluição utilizadas para o preparo da curva de calibração em solvente.

	Ponto 1	Ponto 2	Ponto 3	Ponto 4	Ponto 5	Ponto 6
Alíquota de solução padrão de trabalho	16 µL	40 µL	60 µL	80 µL	100 µL	120 µL
Alíquota de solução de diluição	489 µL	465 µL	445 µL	425 µL	405 µL	385 µL
Volume total	505 µL					

3.2.3 Preparação da curva de calibração em matriz

Todo o conteúdo de amendoim isento de contaminação (amendoim industrializado, adquirido em supermercado do Rio de Janeiro, analisado durante ensaio de seletividade, conforme descrito no item 3.5) foi triturado em mini moinho, homogeneizado em saco plástico e estocado sob refrigeração a -18 °C. A matriz foi submetida ao mesmo procedimento de extração e purificação utilizado para a análise das amostras, que foi adaptado do procedimento indicado pelo fabricante. Foram pesadas 25g de amendoim em 6 erlenmeyers em balança previamente descontada a tara e, em cada, adicionados de 100 mL de solvente de extração (acetonitrila:água 84:16 v/v) medidos com proveta. Os erlenmeyers foram agitados (*shaker*) por 30 minutos. Em seguida, foram filtrados para beakers utilizando-se papel-filtro qualitativo com a ajuda de um funil. Cinco mililitros de cada filtrado foram passados pelas colunas Mycosep para purificação. Estes extratos purificados foram utilizados para preparação dos pontos da curva em matriz. As diluições foram feitas em triplicata,

diretamente em vials âmbar de 5 mL, a partir da solução padrão de trabalho. Foram preparados 2 mL de cada ponto (Tabela 2), nas concentrações de 1; 2,5; 3,75; 5; 6,25 e 7,5 µg/kg de aflatoxinas totais. Cada solução foi seca sob fluxo nitrogênio, ressuspensa em 500 µL de acetonitrila:água 30:70 (v/v) e homogenizada (vórtex) por 2 minutos. Foram transferidos os 500 µL de solução para vial âmbar de 1,8 mL e posicionados na bandeja do cromatógrafo líquido para injeção. O processo de secagem concentrou as soluções em 4 vezes resultando em soluções nas mesmas concentrações utilizadas para o preparo da curva de calibração em solvente.

Tabela 2. Alíquotas de padrão e extrato purificado utilizados para o preparo da curva de calibração em matriz.

	Ponto 1	Ponto 2	Ponto 3	Ponto 4	Ponto 5	Ponto 6
Solução padrão de trabalho	16 µL	40 µL	59 µL	79 µL	99 µL	119 µL
Extrato purificado	1984 µL	1960 µL	1941 µL	1921 µL	1901 µL	1881 µL
Volume total	2000 µL					

3.2.4 Método de extração das amostras de amendoim

Cada amostra de amendoim adquirida no mercado foi triturada em mini moinho, homogeneizada em saco plástico e estocada sob refrigeração a -18 °C. Foram pesadas 25g de cada em erlenmeyers em balança previamente descontada a tara e adicionados de 100 mL de solvente de extração (acetonitrila:água 84:16 v/v) medidos com proveta. Os erlenmeyers foram agitados (shaker) por 30 minutos. Em seguida, foram filtrados para beakers utilizando-se papel-filtro qualitativo com a ajuda de um funil. Cinco mililitros de cada filtrado foram passados pelas colunas Mycosep® para purificação. Utilizando-se pipeta volumétrica calibrada (1mL) pipetou-se 2 mL de cada extrato purificado em vials de 5 mL. Cada vial foi seco sob fluxo nitrogênio, ressuspensa em 500 µL de acetonitrila:água 30:70 (v/v) e homogenizado (vórtex) por 2 minutos. Foram transferidos os 500 µL de solução para vial âmbar de 1,8 mL e posicionados na bandeja do cromatógrafo líquido para injeção.

3.3 Método Cromatográfico

Utilizou-se uma coluna C₁₈ 2,1 x 50 mm, 1,7 µm aquecida a 40 °C. O fluxo da fase móvel foi 0,45 mL/min em modo de eluição gradiente. O gradiente começou com 5% de Solução A que foram mantidos até 0,5 minutos. De 0,5 a 3,5 minutos a proporção de solução A aumentou linearmente, de 5 para 45%. De 3,5 para 4,0 minutos a proporção de solução A aumentou linearmente de 45 para 95%, representando um incremento mais abrupto na força da fase. A Solução A foi mantida em 95% até os 4,5 minutos de corrida, e foi então abaixada para 5% aos 4,51 minutos de corrida. Foi mantida com 5% até os 5 minutos de corrida para reequilíbrio das condições iniciais. Foi utilizado um volume de injeção de 10 µL e as amostras foram mantidas resfriadas a 5 °C.

3.4 Método Analítico por Espectrometria de Massas

Utilizou-se ionização por eletrospray no modo positivo, o ToF operou em modo V e a faixa de aquisição foi entre 50 e 600 m/z. A temperatura e fluxo do gás de dessolvatação foram de 500 °C e 750 L/h, respectivamente, o fluxo do gás do cone foi de 50 L/h, a temperatura da fonte foi de 150 °C, a voltagem do cone 38, a voltagem de capilar 3 kV, voltagem do cone de extração 7,0 V. Utilizou-se uma função 1 com energia de colisão do *trap* e *transfer* 6,0 V e 4,0 V, respectivamente, uma função 2 com energia de colisão do *trap* de 6,0eV e do *transfer* de 20, 25 e 30 eV e uma função 3 para utilização do *lockspray* (calibração contínua). A voltagem de operação do detector MCP foi de 1650.

3.5 Parâmetros de Validação

- Determinação da especificidade e seletividade do ensaio

Um método que produz resposta para apenas um analito é chamado específico. Um método que produz respostas para vários analitos, mas que pode distinguir a resposta de um analito da de outros, é chamado seletivo (INMETRO, 2011). São propriedades que garantem que o pico de resposta seja exclusivamente do composto de interesse (VESSMAN *et al.*, 2001).

Após ter-se estabelecido os métodos cromatográfico e espectrométrico utilizando-se os padrões de aflatoxinas, analisou-se a amostra comercial de amendoim industrializado adquirida em supermercado do Rio de Janeiro e verificou-se ausência de contaminação, sendo esta matriz considerada como “branco”. Avaliou-se a seletividade comparando-se os cromatogramas obtidos nas análises desta matriz isenta de contaminação, dos padrões de aflatoxinas e da matriz adicionada com padrões. Utilizou-se os tempos de retenção e os espectros de massas das aflatoxinas para avaliar se interferentes da matriz que tivessem mesma m/z das aflatoxinas coeluíam com as mesmas.

- Determinação da faixa de trabalho

Foi determinada de modo a cobrir a faixa de aplicação para a qual o ensaio foi usado. Foram incluídas as concentrações mais esperadas da amostra, referentes aos limites estabelecidos pelas legislações da União Européia e do Brasil, de 4µg/Kg e 20µg/Kg, respectivamente, para a soma das aflatoxinas AFB₁, AFB₂, AFG₁ e AFG₂. Foi montada uma curva de calibração em matriz dentro desta faixa (conforme descrito no item 3.2.3) e assegurada sua linearidade através do ensaio descrito abaixo.

- Determinação da sensibilidade do ensaio

A sensibilidade é um parâmetro que demonstra a variação da resposta em função da concentração do analito (INMETRO, 2011). Foi avaliada através da inclinação (coeficiente angular) das retas de regressão (obtidas pelas curvas de calibração dos itens 3.2.2 e 3.2.3) e acompanhada durante todos os ensaios analíticos realizados.

- Determinação do limite de detecção

O limite de detecção (LD) representa a menor concentração da substância em exame que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, utilizando um determinado procedimento experimental (ICH, 1995; INMETRO, 2007). Foi avaliada experimentalmente,

considerada como o nível em que a detecção do analito pode ser distinguida do sinal do branco (matriz isenta de contaminação).

- Determinação da linearidade

A linearidade corresponde à capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância em exame, dentro de uma determinada faixa de aplicação (ICH; 1995; SWARTZ; KRULL, 1998). Em qualquer técnica instrumental, a relação linear simples, descrita pela equação $y = ax + b$, só é válida em um determinado intervalo de massa ou concentração da espécie medida. Neste intervalo de massas ou concentrações se pode construir uma curva analítica linear (PASCHOAL *et al.*, 2008).

Preparou-se uma curva de calibração com cinco níveis de concentração, espaçados igualmente, em matriz (amendoim isento de contaminação), partindo de uma solução padrão de aflatoxinas (item 3.2.3). As replicatas em cada nível de concentração foram iguais a três, número de replicatas utilizado na rotina do laboratório. As curvas foram construídas através de regressão linear sem forçar sua passagem pela origem, usando o método dos mínimos quadrados e sem descartar nenhum dos níveis. Gerou-se a curva de calibração e verificou-se a ausência de pontos discrepantes pelo teste de Grubbs e a homocedasticidade, isto é, a homogeneidade da variância dos resíduos, pelo teste de Cochran. A seguir foram avaliados os quadrados dos coeficientes de correlação linear. O coeficiente de correlação linear (r) é frequentemente usado para indicar o quanto pode ser considerada adequada a reta como modelo matemático. Este parâmetro permite uma estimativa da qualidade da curva obtida, pois quanto mais próximo de 1, menor a dispersão do conjunto de pontos experimentais e menor a incerteza dos coeficientes de regressão estimados. A fórmula do teste de Cochran consiste no quadrado da maior variância dividido pela soma de todas as variâncias, conforme abaixo:

$$C_{calc} = \frac{S_{má}^2}{\sum S^2}$$

onde $C_{calculado}$ deve ser menor do que $C_{tabelado}$ para que se considere as variâncias homogêneas. A fórmula de Grubbs para detecção de pontos discrepantes consiste em:

$$G_{calc} = \frac{|\bar{x} - x|}{DF}$$

onde:

DP = desvio padrão

\bar{x} = média dos valores de área

x = valor de cada área

Obtém-se um $G_{calculado}$ para cada valor de x e, se este for maior do que $G_{tabelado}$, o valor de x é considerado um ponto discrepante.

- Determinação da recuperação e precisão intermediária

A exatidão de um método é definida como sendo a concordância entre o resultado de um ensaio e o valor de referência aceito como convencionalmente verdadeiro (INMETRO, 2007). A exatidão pode ser expressa em função da recuperação e da precisão. Foram realizados ensaios de recuperação (Experimento I) com dois níveis de fortificação e dois níveis de materiais de referência certificados (MRCs) com os níveis de contaminação descritos na Tabela 3.

Tabela 3. Descrição do nível de contaminação das amostras utilizadas para os ensaios de recuperação.

Amostras	Concentrações ($\mu\text{g}/\text{kg}$) de aflatoxinas				
	B1	B2	G1	G2	totais
Fortificação 1	4	0,99	4,02	0,99	10
Fortificação 2	8	1,98	8,039	1,98	20
MRC 1	1,77	0,71	1,86	0,71	4,75
MRC 2	18,59	4,15	2,39	4,15	26,61

Estas amostras foram extraídas conforme método descrito no item 3.2.4 e analisadas conforme os itens 3.3 e 3.4. A recuperação é a relação percentual entre o valor observado e o valor esperado e foi calculada de acordo com a equação:

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{X_{lab}}{X_v} \cdot 100$$

$$\text{Erro relativo (\%)} = \frac{X_v - X_{lab}}{X_v} \cdot 100$$

X_{lab} = valor obtido experimentalmente ou média aritmética de valores obtidos

X_v = valor aceito como verdadeiro (valor certificado do material de referência ou valor usado na fortificação)

3.6 Análise de amostras

Foram analisadas 10 amostras adquiridas no comércio varejista do Rio de Janeiro (Experimento II) e uma amostra naturalmente contaminada (disponibilizada pelo Laboratório de Micotoxinas da ESALQ/ USP, que reportou a contaminação) analisada juntamente com o Experimento I. Estas amostras foram extraídas conforme método descrito no item 3.2.4 e analisadas conforme os itens 3.3 e 3.4.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Teste do Grau de Pureza dos Solventes Analíticos Disponíveis

Todos os solventes analíticos de diferentes marcas disponíveis no laboratório de Cromatografia Líquida da Embrapa Agroindústria de Alimentos foram avaliados quanto à presença de contaminantes e interferentes. A avaliação foi realizada através de infusão direta do solvente com observação da contagem de íons totais e dos espectros de massas obtidos. Primeiramente, certificou-se a ausência de interferentes com mesma m/z das aflatoxinas em todos os solventes testados. Em seguida, comparou-se a água CL-EM Chromasolv[®] Fluka com a água ultra pura obtida do sistema Milli-Q[®] da Millipore. A água da Fluka apresentou maior contagem de íons totais e observou-se no seu espectro a presença de íons m/z 149, indicando contaminação por anidrido ftálico, e íons m/z 301 indicando contaminação por dibutilftalato. Comparou-se também a acetonitrila grau EM Tedia com a acetonitrila grau EM JTBaker, que, embora ambas tenham apresentado interferentes, apresentou menor contagem de íons totais. Optou-se então pela água milli-Q e a acetonitrila JTBaker para o trabalho no QToF.

4.2 Estabelecimento de Parâmetros Primários de Detecção

As soluções padrão de aflatoxinas AFB₁, AFB₂, AFG₁ e AFG₂ foram inseridas separadamente no Synapt através de infusão direta (sem separação cromatográfica) para que se pudesse estabelecer os melhores parâmetros para sua detecção. Trabalhou-se com fonte de ionização por eletrospray no modo positivo, analisador em modo V, faixa de aquisição do TOF de 50 a 600 m/z . Testou-se diferentes tempos de *scanning* e verificou-se que obtinha-se melhor resolução cromatográfica utilizando-se *scanning* a cada 0,1s. Valores de temperatura e voltagem para os diferentes setores do Synapt foram testados através tentativa e erro. Partiu-se dos menores valores aceitos pelo software no intuito de conseguir-se a ionização das moléculas sem fragmentá-las. Para detecção primária, utilizou-se o sinal m/z das aflatoxinas ionizadas positivamente. A resposta a cada combinação de valores foi avaliada observando-se o “cromatograma de infusão” formado (um cromatograma de infusão não é um cromatograma real, pois não há separação cromatográfica logo não são formados picos e sim uma linha contínua, cujo nível pode subir ou descer conforme a sensibilidade atingida através das modificações das voltagens e temperaturas). Foi utilizado um fluxo de 0,45mL/min de solvente (simulando o fluxo da corrida cromatográfica que se pretendia utilizar) ao fluxo da infusão (que é muito menor) utilizando-se um conector em formato “T”. Desta maneira, os parâmetros que resultaram em maior sensibilidade para as formas ionizadas foram: temperatura e fluxo do gás de dessolvatação a 500°C e 750L/h, fluxo do gás do cone a 50L/h, temperatura da fonte a 150°C, voltagem do cone 38, voltagem de capilar 3kV, voltagem do cone de extração 7.0V, energia de colisão do trap e transfer 6.0V e 4.0V, respectivamente (Tabela 4). A voltagem de operação do detector MCP foi de 1650. Observaram-se no espectro da infusão os picos m/z 313, 315, 329 e 331 respectivos às aflatoxinas AFB₁, AFB₂, AFG₁ e AFG₂ ionizadas positivamente.

Tabela 4. Descrição dos parâmetros MS utilizados para detecção primária do sinal das aflatoxinas.

Parâmetros MS	
faixa m/z adquirida	50 – 600 Da
ionização eletrospray	Positiva
temperatura da fonte	150° C
gás de dessolvatação	500° C, 750 L/h
voltagem do cone	38
capilar voltagem do capilar	3kV
energia de colisão do trap	6.0 eV
energia de colisão do transfer	função 1: 4.0 eV

4.3 Estabelecimento do Método Cromatográfico

Uma vez estabelecida uma forma de detectar a aflatoxinas, trabalhou-se no método de separação. O primeiro método cromatográfico testado (método cromatográfico I) baseou-se em uma análise desenvolvida por Borguini et al (2011) onde utilizou-se diferentes colunas cromatográficas na análise de aflatoxinas em amendoim por CLAE. Neste método utilizou-se como fase móvel uma mistura de acetonitrila, metanol e água e uma coluna cromatográfica C₁₈, com 2.1 x 150mm e partículas de tamanho 1.7µm aquecida a 40°C. Foi utilizado um volume de injeção de 10µL e as amostras foram mantidas resfriadas a 5°C. Foi utilizada fase móvel a um fluxo de 0,4mL/min em modo de eluição isocrático, constituída de 18% de solução X e 82% de solução Y. Conseguiu-se completa separação dos compostos (Figura 5) e os tempos de retenção obtidos para as aflatoxinas AFG₂, AFG₁, AFB₂ e AFB₁ foram de 1,63; 1,81; 2,01 e 2,26 minutos, respectivamente (Figura 8). De acordo com a Comissão Decision 2002/657/EC, o tempo de retenção mínimo aceitável para a substância em análise deve ser o dobro do tempo de retenção correspondente ao volume morto da coluna. O tempo de retenção do volume morto da coluna para este método cromatográfico testado foi de 0,71 minutos e os tempos de retenção das aflatoxinas situaram-se acima de 1,42 minutos, logo dentro dos parâmetros aceitáveis.

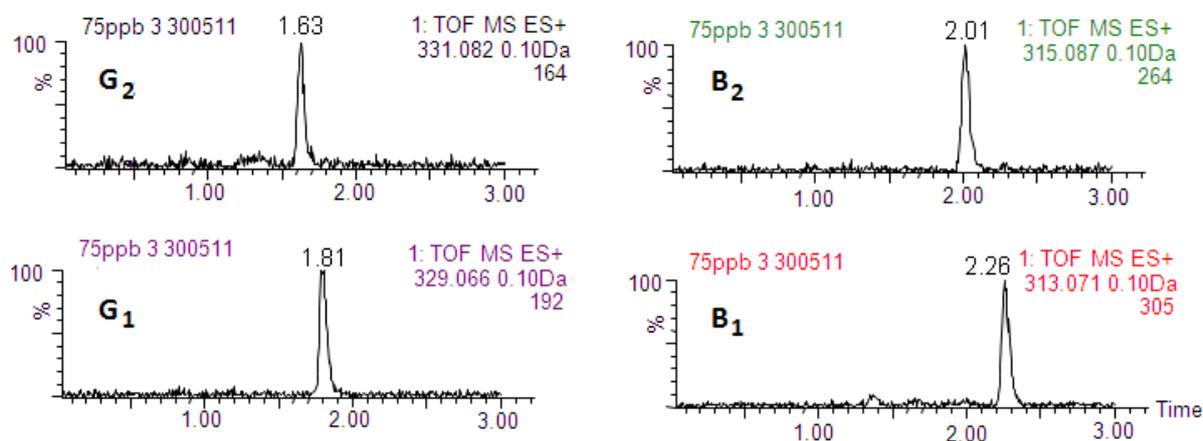


Figura 8. Cromatogramas das aflatoxinas AFG₂, AFG₁, AFB₂ e AFB₁ utilizando-se o método cromatográfico I.

Contudo, o condicionamento da coluna cromatográfica com esta fase móvel foi problemático. A pressão interna atingiu um nível maior que de 14000 psi, muitas vezes ultrapassando o limite de 15000 psi e exigindo a paralização do sistema. Decidiu-se, então, trabalhar em um novo método cromatográfico, utilizando-se como fase móvel apenas acetonitrila e água e uma coluna menor.

No método cromatográfico II utilizou-se uma coluna C₁₈, com 2.1 x 50mm e partículas de tamanho 1.7µm aquecida a 40°C. Foi utilizado um volume de injeção de 10µL e as amostras foram mantidas resfriadas a 5°C. Foi utilizada fase móvel a um fluxo de 0,45mL/min em modo de eluição gradiente, constituída de acetonitrila com 0,1% de ácido fórmico (solução A) e água com 0,1% ácido fórmico (solução B). Iniciou-se o gradiente com uma fase fraca, com apenas 5% de solvente orgânico (solução A), aumentando-se a força da fase linear até 95% em 4 minutos. Esse gradiente abrange uma grande faixa de polaridade garantindo que sejam eluídas da coluna a maior quantidade de compostos possível, contribuindo assim para a quantificação dos analitos, além de manter a coluna limpa. Observou-se a eluição das aflatoxinas em tempos de retenção próximos a 2 minutos, momento em que a porcentagem de solvente orgânico era de 50%. Ocorreu a co-eluição dos picos das AFB₂ e AFG₁ e sobreposição da base dos picos das 4 aflatoxinas. Para aumentar a retenção dos compostos e melhorar a separação, alterou-se o método cromatográfico para que a força da fase móvel aumentasse de maneira mais gradativa, atingindo 45% apenas aos 3,5 minutos de corrida (Tabela 5).

Tabela 5. Gradiente de eluição da fase móvel utilizada no método cromatográfico II.

Tempo (min)	Fluxo (mL/min)	Solução A (%)	Solução B (%)
0	0,45	5	95
0,5	0,45	5	95
3,5	0,45	45	55
4,0	0,45	95	5
4,5	0,45	95	5
4,51	0,45	5	95

Os novos tempos de retenção das aflatoxinas AFG₂, AFG₁, AFB₂ e AFB₁ podem ser observados na Figura 9 e foram de 2,64, 2,81, 2,82 e 2,99 minutos, respectivamente.

A coeluição das AFB₂ e AFG₁ persistiu, contudo, Q-TOF apresenta recurso para que se extraiam cromatogramas referentes especificamente à razão m/z das substâncias de interesse, sendo altamente seletivo mesmo sem a completa separação cromatográfica, logo, o gradiente testado foi considerado efetivo. O tempo de retenção do volume morto da coluna para o método cromatográfico II foi de 0,19 minutos, os tempos de retenção obtidos para os compostos situaram-se muito acima do dobro, logo dentro dos parâmetros aceitáveis.

A utilização de ácido fórmico teve como intuito favorecer a ionização positiva das aflatoxinas representando, assim, um aumento na sensibilidade do método. Observou-se aumento do sinal dos picos m/z 313, 315, 329 e 331, estando este resultado de acordo com o obtido por Beltrán et al (2009) em espectrômetro triplo quadrupólo.

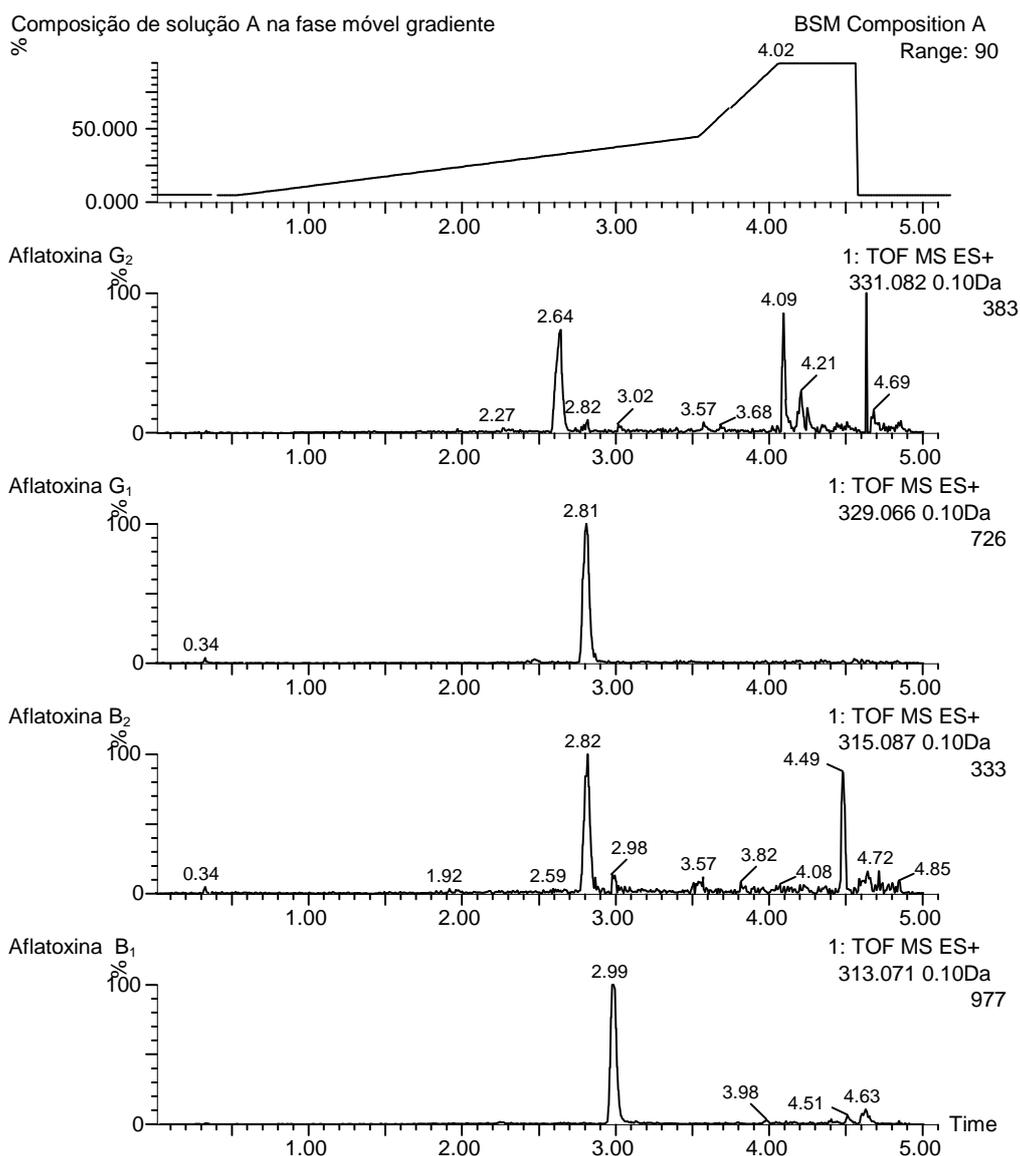


Figura 9. Gráfico de força do gradiente de fase móvel e cromatogramas das aflatoxinas AFG₂, AFG₁, AFB₂ e AFB₁, respectivamente, utilizando-se o método cromatográfico II.

Observou-se a formação de adutos de sódio $[M+Na]^+$, restando cerca de apenas a metade das aflatoxinas na forma positivamente ionizada $[M+H]^+$. Isto causa diminuição da sensibilidade do método, uma vez que esta última forma é a que se utiliza para quantificação. Além disso, adutos de sódio possuem grande estabilidade, sendo de difícil fragmentação. Adicionou-se, então, sal de amônio que, de acordo com Beltrán et al. (2009), favorece a formação de adutos de amônio $[M+NH_4]^+$ em detrimento dos adutos de sódio. A vantagem consiste que adutos de amônio são menos estáveis e mais fáceis de se fragmentar. A adição de formiato de amônio na concentração 4mM na fase móvel acarretou um aumento na proporção de $[M+H]^+$ em relação a $[M+Na]^+$ (Figura 10B), aumentando assim a sensibilidade do método. Não se pode observar a formação de $[M+NH_4]^+$. Uma possível explicação seria que o NH_3 se desprenda do íon $[M+NH_4]^+$ por volatilização, restando apenas $[M+H]^+$.

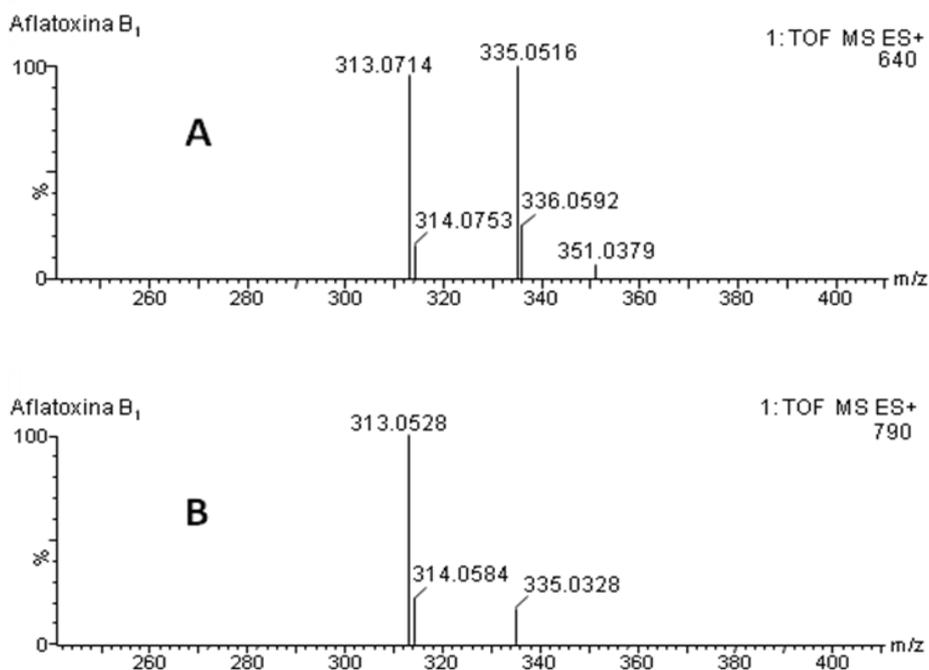


Figura 10. (A) Espectro da AFB₁ onde se pode observar o pico m/z 313 da molécula ionizada e o pico m/z 335 da molécula sodiada, ambos na mesma intensidade relativa. (B) Espectro da AFB₁ após a adição de formiato de amônio na fase móvel, onde se pode observar o aumento da intensidade relativa do pico m/z 313 em relação ao m/z 335.

Em cromatografia de fase reversa, o ideal é que as amostras sejam solubilizadas em soluções iguais ou mais fracas que as condições iniciais do gradiente. Três composições de solução de diluição para os padrões foram avaliadas em relação ao perfil cromatográfico. Foram testadas as composições de 30, 40 e 50% de ACN para diluição de padrões na concentração de 4 µg/kg de aflatoxinas totais. O gradiente estabelecido começa com apenas 5% de solvente orgânico, porém, uma solução mais fraca do que isso conferiu menor homogeneidade e estabilidade aos extratos de amendoim. Os cromatogramas dos padrões diluídos em 50% de acetonitrila apresentaram alargamento de pico, perdendo em altura e se aproximando do ruído da linha de base (Figura 11) e foram os que apresentaram menor contagem de íons entre as 3 composições testadas. Conforme esperado, os padrões diluídos em solução 30% apresentaram picos mais finos e com maior resolução, aumentando a sensibilidade e a contagem de íons.

Os desvios dos tempos de retenção das aflatoxinas foram menores do que 2% e as larguras dos picos a metade da altura foram superiores a 90% das larguras nas bases dos picos, cumprindo com os critérios analíticos estabelecidos pela UE (*Commission Decision 657, 2002*).

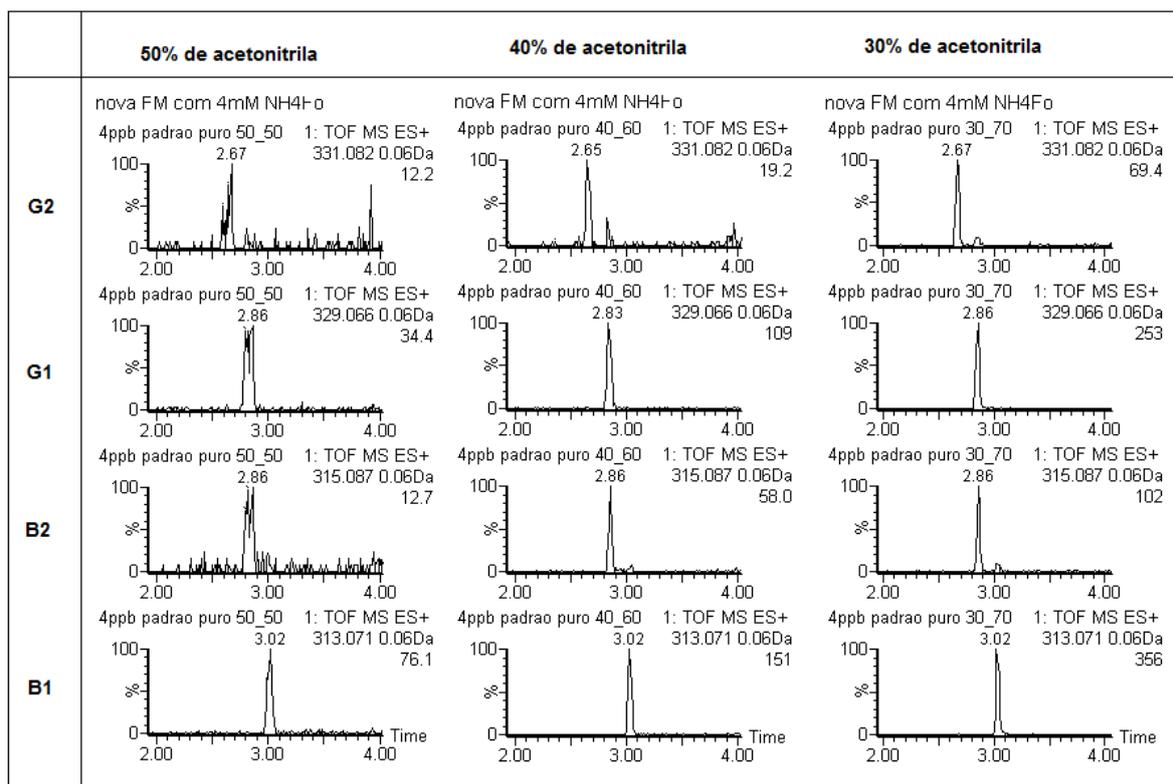


Figura 11. Cromatogramas das aflatoxinas G₂, G₁, B₂ e B₁ obtidos pela diluição de padrões em 3 diferentes soluções: acetonitrila:água 50:50 (v/v), acetonitrila:água 40:60 (v/v) e acetonitrila:água 30:70 (v/v).

4.4 Estabelecimento do Método Espectrométrico

Dependendo do método utilizado para geração do espectro de massas, se atinge níveis diferentes de sensibilidade, parâmetro crítico para análise de substâncias traços. Algumas considerações foram feitas contrapondo os dois principais métodos de aquisição que o Synapt é capaz de realizar: LC-MS-TOF (cromatografia líquida e detecção por massas utilizando-se analisador tempo de vóo) e LC-MSMS QToF (cromatografia líquida e detecção por transição massa-massa utilizando-se analisador híbrido de quadrupolo com tempo de vóo).

O principal atrativo de se utilizar um método LC-MSMS QToF consiste em selecionar o íon de interesse possibilitando a obtenção de melhor relação sinal/ruído, o que resulta em maior sensibilidade. Por outro lado, o filtro quadrupolo não é 100% eficiente e alguns íons são perdidos (PASCHOAL, *et al.* 2009). Outra consideração a ser feita é que no método cromatográfico desenvolvido ocorreu a co-eluição das AFB₂ e AFG₁, o que significa que, para quantificação e análise MSMS destas toxinas, 4 funções teriam de ser alternadas nesta mesma faixa de tempo: uma 1^a função MS com energia de colisão de transfer a 4,0eV para se obter o sinal dos compostos positivamente ionizados (utilizados na quantificação), uma 2^a função MSMS para filtrar a aflatoxina B₂, uma 3^a função MSMS para filtrar a aflatoxina G₁ e uma 4^a função para utilização do *lockspray*. O quadrupolo não aplica estas funções simultaneamente, e sim as alterna dentro da faixa de tempo programada, implicando numa perda de sensibilidade para cada função. Teoricamente, o quadrupolo permanece 1/4 do tempo da faixa em cada função, dividindo a sensibilidade por 4.

Utilizando-se um método LC-MS ToF, faz-se uma varredura total para a análise qualitativa, logo alternariam-se apenas 3 funções: uma 1ª função MS com energia de colisão de transfer a 4,0eV para se obter o sinal dos compostos positivamente ionizados (utilizados na quantificação), uma 2ª função MS^E com altas energias de colisão de transfer para induzir a fragmentação de todos os compostos eluídos e uma 3ª função para utilização do *lockspray*. Dessa maneira, dentro da mesma faixa de tempo programada, o quadrupolo permanece 1/3 do tempo total da faixa em cada função, representando perda menor na sensibilidade.

Ademais, a função de varredura total permite que se acompanhem outros compostos que não os compostos alvo, podendo-se detectar, caso estejam presentes, quaisquer outros contaminantes do amendoim ou outra matriz analisada, fornecendo mais informação em uma única corrida analítica. Torna-se, desta maneira, uma ferramenta muito interessante principalmente em análise de pesticidas em alimentos, pois existem centenas de princípios ativos de pesticidas em uso difundidos no mundo. Em trabalho publicado por Grimalt et al (2010), o potencial da análise por TOF-MS foi investigado para propósitos de varredura (*screening*). Foram analisadas 44 amostras de 9 matrizes de frutas e hortaliças para a análise de 11 pesticidas (compostos alvo) em modo varredura. Posteriormente, essas aquisições de modo varredura foram utilizadas para investigar a presença de 423 pesticidas, que não os compostos alvo, buscando-se as massas exatas de suas formas protonadas [M+H]⁺, sodiadas [M+Na]⁺ ou amoniadas [M+NH₄]⁺. Foram detectados mais de 100 princípios ativos de pesticidas potencialmente positivos.

Considerando-se o advento da co-eluição das aflatoxinas e a possibilidade de uma análise ampliada do conteúdo das amostras, decidiu-se trabalhar em uma função LC-MS ToF de varredura total.

Os parâmetros primários de detecção foram mantidos, variando-se apenas a energia de colisão do transfer, de acordo com os objetivos a serem atingidos. Utilizou-se uma função MS com energia de colisão do transfer a 4,0 eV para obter maior sensibilidade na aquisição do sinal das aflatoxinas ionizadas positivamente (m/z 313, 315, 329, 331) que foram utilizadas para quantificação e montagem da curva. A esta função MS, foi alternada uma outra função MS de alta energia de colisão (MS^E) utilizando energias de colisão do transfer alternadas entre 20, 25, 30, 35 e 40eV para fragmentação e confirmação da identidade dos compostos. Como descrito anteriormente, esta é uma função considerada de varrimento total, pois todos os compostos ionizados presentes na amostra serão transmitidos pelo analisador até o detector (não se utiliza o quadrupolo para filtrar somente os compostos em questão). Foi utilizada ainda uma função *lockspray* para aquisição com massa exata. Com a função MS^E conseguiu-se fragmentar bem as aflatoxinas, exceto a AFG₂, cujo espectro apresentou poucos fragmentos e com baixa intensidade. Fez-se então uma infusão direta de AFG₂ para definir quais seriam os melhores valores de energia de colisão. Verificou-se que valores de energia entre 20 e 25eV produziam fragmentos com boa intensidade e que valores acima de 30eV acarretavam o desaparecimento desses fragmentos. Uma hipótese é que 30eV de energia proporcione maior rompimento das moléculas de aflatoxinas, gerando fragmentos menores do que 50m/z que não puderam ser observados, pois a faixa de aquisição do TOF foi programada para 50 a 600m/z. A função MS^E foi então adaptada para alternar valores de energia entre 20, 25 e 30 apenas (Tabela 6), para que se pudesse preservar os fragmentos da AFG₂ (Figura 12).

Tabela 6. Descrição dos parâmetros MS utilizados no método analítico de aflatoxinas.

Parâmetros MS	
faixa m/z adquirida	50 – 600 Da
ionização eletrospray	Positiva
temperatura da fonte	150° C
gás de dessolvatação	500° C, 750 L/h
voltagem do cone	38
capilar voltagem do capilar	3kV
energia de colisão do trap	6.0 eV
energia de colisão do transfer	função 1: 4.0 eV função 2 MS ^E : 20, 25 e 30 eV
lockspray (calibração contínua)	ácido fosfórico 1%

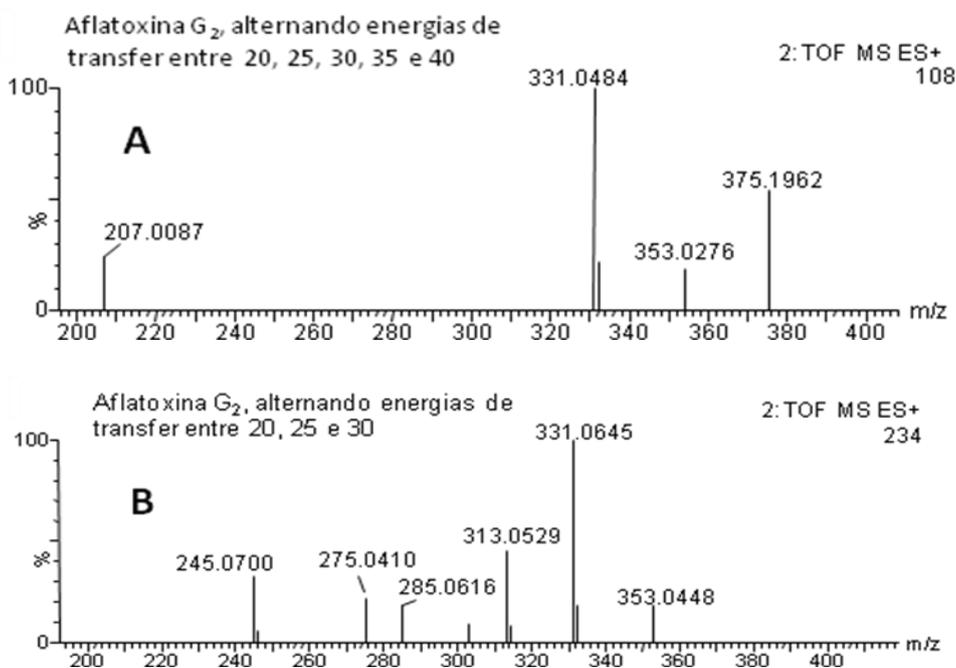


Figura 12. (A) Espectro da aflatoxina G₂ utilizando função MS^E que alterna as voltagens de transfer de 20, 25, 30, 35 e 40. (B) Espectro da mesma aflatoxina, com função MS^E que alterna apenas as voltagens de transfer de 20, 25 e 30 e no qual se podem observar 4 fragmentos com intensidade relativa superior a 10% da altura do pico base.

Com esta função pode-se então identificar de 3 a 7 fragmentos para cada aflatoxina, que foram posteriormente confirmados por MSMS (Figura 13).

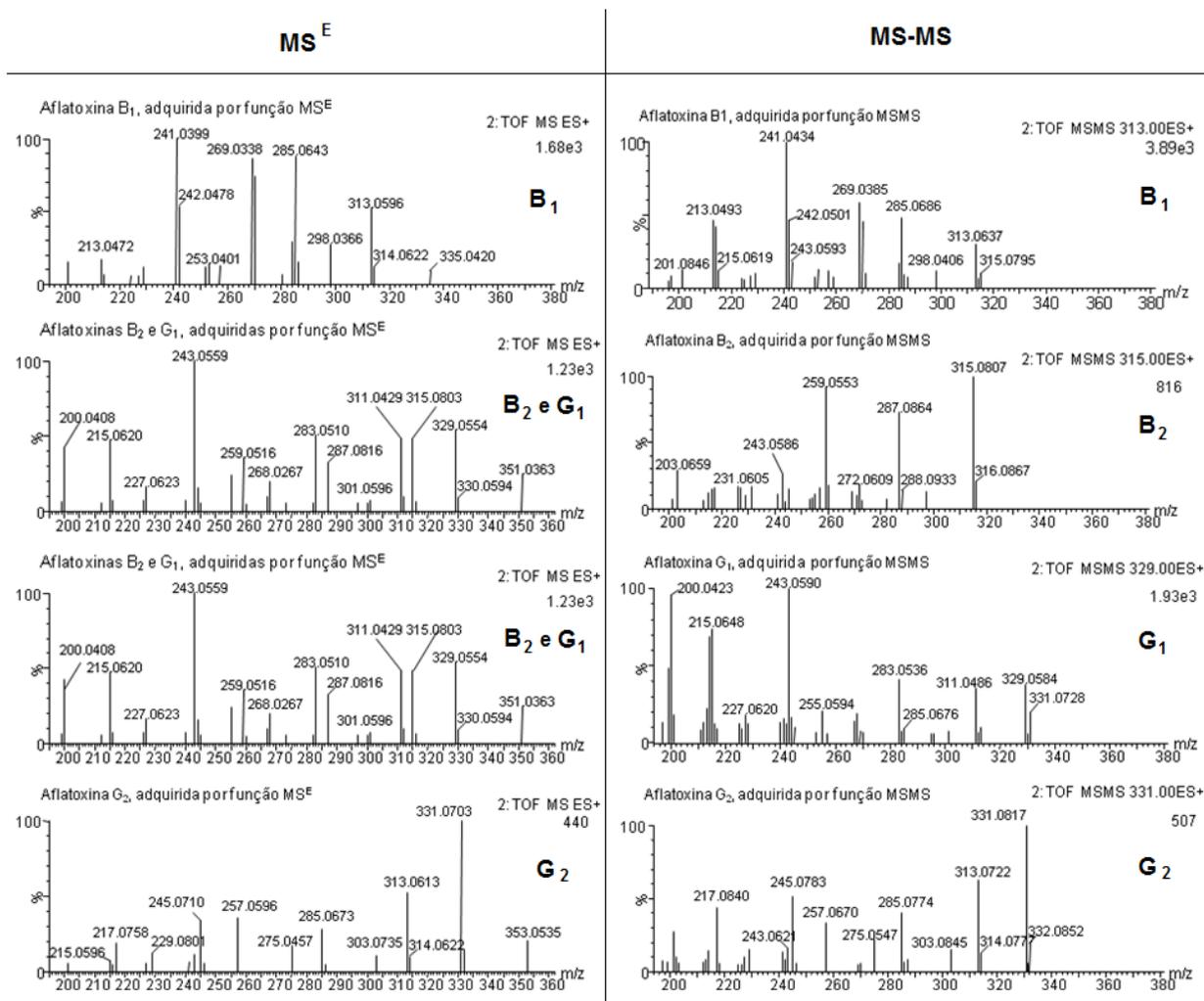


Figura 13. Espectros MS^E das aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂ com os fragmentos encontrados e espectros MSMS das respectivas aflatoxinas, confirmando a origem destes fragmentos.

Na análise da aflatoxina B₁ conseguiu-se identificar os seguintes 5 fragmentos: m/z 298, 285, 269, 241 e 213. Na análise da aflatoxina B₂, identificou-se os m/z 287, 259 e 243. Para a G₁, os m/z 311, 283, 243, 227, 215 e 200. Finalmente, para a G₂, os fragmentos 313, 303, 285, 275, 257, 245, e 217. Todos os fragmentos foram adquiridos com erro menor do que 0,02 Da, valor muito menor do que o obtido com triplo-quadrupólos, e com intensidade relativa superior a 10% do pico base, requisito estabelecido pela UE (*Commission Decision* 657, 2002) para análises de massa no modo varredura total.

Os resultados estão em concordância com trabalhos de diversos autores (Quadro 2) que desenvolveram métodos de análise de aflatoxinas em outros analisadores de massas chegando aos mesmos fragmentos aqui obtidos.

Quadro 2. Fragmentos das aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂ obtidos por diversos autores utilizando analisadores de massas do tipo triplo quadrupólo (QqQ) e híbrido triplo quadrupólo linear ion trap (QqQLIT).

Autores	Análise de massas	Fragmentos obtidos (m/z)			
		B ₁	B ₂	G ₁	G ₂
Grio et al., 2010	QqQ	285, 241	259, 243	243, 311	313, 245
Herebian et al., 2009	QqQ	241, 213	287, 259	243, 200	245, 189
Ferrer et al., 2010	QqQLIT	269, 241	296, 259	311, 283	285, 257
Beltran et al., 2009	QqQ	285, 241	287, 259	243, 128	245, 189
Xavier J. M. M., Scussel V. M., 2008	QqQ	285, 241	287, 259	243, 200	313, 245
Neste trabalho	QToF	298, 285, 269, 241 e 213	287, 259 e 243	311, 283, 243, 227, 215 e 200	313, 303, 285, 275, 257, 245, e 217

Liu et al. (2010) realizaram um estudo de caracterização dos produtos de fotodegradação da aflatoxina B₁ através de um analisador de massas QToF. De acordo com estes autores, o fragmento m/z 285 encontrado para a aflatoxina B₁ consiste na perda de uma carbonila [M – CO]⁺ e o fragmento m/z 241 é proveniente do fragmento m/z 285 e consiste na forma [M – CO – C₂H₄O]⁺.

4.5 Determinação da Seletividade

Para que um método seja seletivo, nenhum interferente da matriz com mesma m/z das substâncias de interesse deve eluir no mesmo tempo de retenção que estas (CODEX, 1995; ICH, 1995; SWART; KRULL, 1998). A especificidade e seletividade de um método cromatográfico de análise comprovam a capacidade de avaliar, de forma inequívoca, as substâncias em exame na presença de componentes que podem interferir na sua determinação no caso de uma amostra complexa. Avaliam o grau de interferência de espécies como outro ingrediente ativo, excipientes, impurezas e produtos de degradação, bem como outros compostos de propriedades similares que possam estar, porventura, presentes.

O equipamento utilizado não é específico, mas é seletivo. Ele é capaz de detectar todas as substâncias ionizáveis presentes na amostra e apresenta recurso de se trabalhar com cromatogramas de íons extraídos. O software de análise de dados utiliza três informações, a m/z, a janela de erro de m/z e o tempo de retenção do composto, para extrair seu cromatograma e integrar o pico referente. Essa capacidade possibilita que o método seja altamente seletivo. A Figura 14A mostra os 4 cromatogramas de íons extraídos, correspondentes às 4 aflatoxinas estudadas, de uma amostra de amendoim sem casca, com pele, industrializado, adquirida em supermercado.

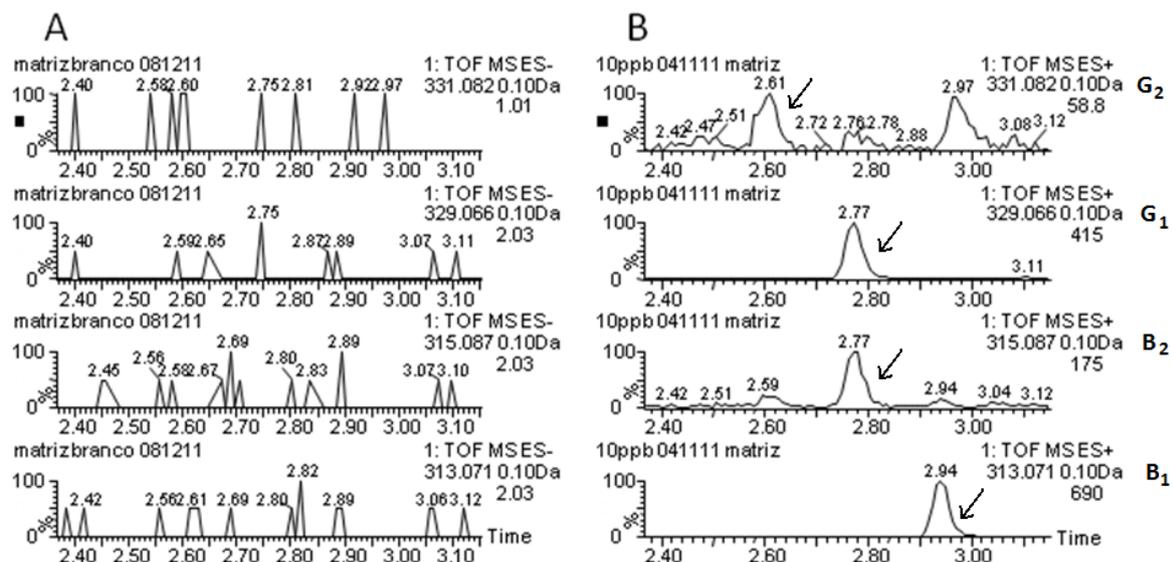


Figura 14. (A) Cromatogramas de íons extraídos da matriz isenta de contaminação. (B) Cromatogramas de íons extraídos da matriz adicionada de padrões de aflatoxinas.

No canto superior direito de cada cromatograma, na terceira linha, são mostrados os valores de contagem de íons para cada m/z extraída no intervalo de tempo exibido. A contagem foi nula, uma vez que os valores 1 e 2 não são significativos, para as amostras de amendoim analisadas (Figura 14A) e o que se observa nos cromatogramas é ruído da linha de base. A Figura 14B mostra os 4 cromatogramas de íons extraídos desta mesma amostra após a adição de padrão de aflatoxinas e pode-se observar a formação de picos cromatográficos com o aumento da contagem de íons para cada aflatoxina. O método foi capaz de discriminar 58 íons de aflatoxina G₂, 415 íons de aflatoxina G₁, 175 íons de aflatoxina B₂ e 690 íons de aflatoxina B₁. A capacidade de discriminar os compostos de interesse na matriz confirmou que o método é seletivo. A matriz, apesar de não representar empecilho na seletividade do método, pode interferir na sensibilidade causando o que se chama de efeito matriz, como explicado adiante no item sensibilidade.

4.6 Construção das Curvas de Calibração

4.6.1 Escolha da faixa de trabalho

Foram construídas 4 curvas de calibração por padronização externa, com 6 pontos em triplicatas. Para as aflatoxinas B₁ e G₁ utilizou-se as concentrações 1,6; 4; 6; 8; 10 e 12 µg/kg. Para as aflatoxinas B₂ e G₂ utilizou-se as concentrações 0,396; 0,990; 1,485; 1,980; 2,475 e 2,97 µg/kg. Dessa maneira, utilizando-se as 4 curvas, pode-se quantificar entre 4 e 30 µg/kg para a soma de aflatoxinas totais (Tabela 7), faixa que inclui os limites máximos permitidos nas legislações europeia e brasileira e dois materiais de referência certificados com as concentrações de 4,75 e de 26,61 µg/kg.

Tabela 7. Concentrações dos pontos das curvas de calibração das aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂.

AFs	Ponto 1 (µg/kg)	Ponto 2 (µg/kg)	Ponto 3 (µg/kg)	Ponto 4 (µg/kg)	Ponto 5 (µg/kg)	Ponto 6 (µg/kg)
B ₁	1,600	4,000	6,000	8,000	10,000	12,000
B ₂	0,396	0,990	1,485	1,980	2,475	2,970
G ₁	1,608	4,020	6,030	8,040	10,050	12,060
G ₂	0,396	0,990	1,485	1,980	2,475	2,970
Totais	4	10	15	20	25	30

4.6.2 Avaliação da sensibilidade

Quanto maior a sensibilidade de um método, maior sua capacidade de fornecer respostas distintas para pontos de concentração próximos, maior também a chance de se obter resposta para concentrações mais baixas, requisito fundamental em um método para análise de substâncias traço. Ao se montar a curva de calibração, analisou-se a sensibilidade do método.

Primeiramente verificou-se o efeito da matriz estudada na sensibilidade do método. Para isso construíram-se duas retas, de 5 pontos em triplicata cada (Tabela 5), injetadas no mesmo dia, sendo uma com padrão em solvente e outra com padrão em matriz e comparou-se visualmente a sensibilidade, por meio da inclinação da reta (representada pelo coeficiente angular). A diminuição da inclinação da reta mostrou que a matriz (amendoim) causou uma supressão do sinal das aflatoxinas, ou seja, diminuiu a sensibilidade (Figura 15).

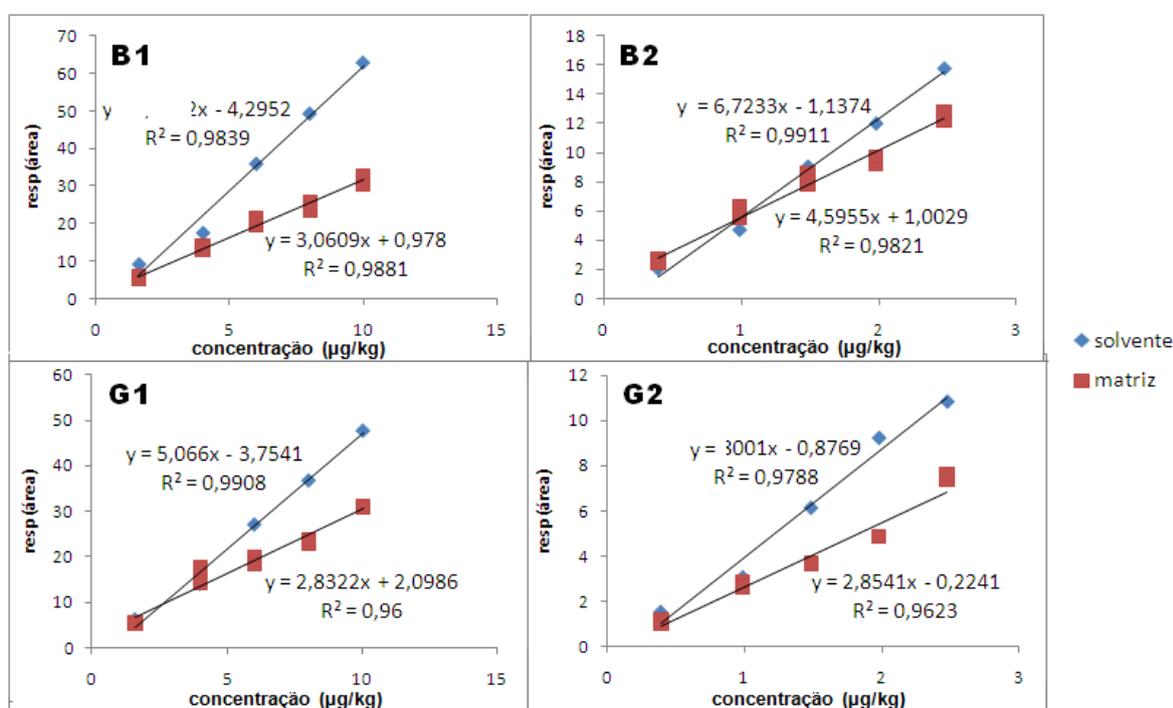


Figura 15. Influência de efeito matriz na sensibilidade das aflatoxinas.

Portanto, para o preparo da curva de calibração a ser utilizada no método de quantificação, decidiu-se utilizar padrão adicionado em matriz, para compensar o efeito de supressão de sinal (efeito matriz). A sensibilidade de cada curva foi acompanhada juntamente com as avaliações de linearidade, em cada ensaio realizado.

4.6.3 Determinação do limite de detecção

O limite de detecção é um parâmetro importante quando se faz uma análise de traços de uma determinada substância. O limite de detecção para um procedimento analítico pode variar em função do tipo da amostra, portanto, foi avaliado na presença de matriz e assegurou-se de que todas as etapas de processamento fossem incluídas nessa determinação. Observou-se os cromatogramas das quatro aflatoxinas, formados no primeiro ponto da curva em matriz. Em todos foi possível distinguir um pico da linha de base. A identidade de cada aflatoxina foi confirmada através do tempo de retenção e do espectro de massas de cada pico. Os limites de detecção do método foram de 1,6; 0,396; 1,608 e 1,396 µg/kg para as aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂, respectivamente.

4.7 Avaliação da recuperação e linearidade

Os valores de recuperação obtidos variaram entre 40 e 117% e estão representados na Tabela 8. As recuperações das fortificações de Nível 1 apresentaram a média de 55,795% e foram inferiores às recuperações das de Nível 2, que apresentaram média de 87,362%. Não foi possível calcular as recuperações do MRC nível 1, pois as respostas obtidas foram todas inferiores às dos menores pontos das curvas. As recuperações das fortificações e do MRC nível 2 foram iguais ou superiores ao limite mínimo de 70% considerado pelo INMETRO, exceto para a aflatoxina G₁. Os valores de recuperação para a aflatoxina G₂ foram os que apresentaram maior coeficiente de variação. A curva de calibração desta aflatoxina foi também a que apresentou maior coeficiente de variação entre as replicatas de cada ponto de concentração (anexo A).

Tabela 8. Resultados dos ensaios de recuperação, expressos em percentagem, para as aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂ em amendoim, analisado por UPLC-MS-ESI-QToF.

Recuperação das aflatoxinas (%)*					
Amostras	B1	B2	G1	G2	Média
Fortificação Nível 1	72,05±9,07 (12,58%)	60,81±5,55 (9,12%)	50,32±4,89 (9,72%)	39,99±14,32 (35,81%)	55,79±13,77 (24,68%)
Fortificação Nível 2	83,25±7,54 (9,05%)	76,76±4,00 (5,21%)	78,62±2,99 (3,81%)	110,81±25,06 (22,62%)	87,36±15,87 (18,16%)
MRC Nível 1	ND	ND	ND	ND	ND
MRC Nível 2	117,88±6,43 (5,46%)	87,02±3,40 (3,90%)	57,01±9,73 (17,08%)	84,84±30,66 (36,13%)	86,69±24,88 (28,70%)

*média das triplicatas ± desvio padrão. Os valores do coeficiente de variação (%) estão entre parênteses.
ND: não detectado.

Borguini et al (2010) avaliaram um método analítico de aflatoxinas por CLAE-DF e utilizaram o mesmo método de extração e purificação do presente estudo. Foram feitas fortificações em dois níveis, semelhantes aos do presente trabalhos (6,13 e 12,25µg/kg de aflatoxinas totais), e os valores de recuperação obtidos situaram-se entre 77 e 102%. Tais resultados indicam que a baixa recuperação obtida no método por UPLC-ESI-MS não é devido à ineficiência do método de extração e/ou purificação.

As curvas de calibração utilizadas para os ensaios de recuperação (Experimento I) realizados para determinação da exatidão foram avaliadas quanto à linearidade. As 4 curvas foram preparadas em matriz, fortificando-se um extrato purificado de amendoim isento de contaminação (o mesmo amendoim utilizado para os ensaios de seletividade). Os coeficientes de correlação linear foram de 0,9556 para a aflatoxina B₁; 0,9429 para a aflatoxina B₂; 0,9671 para a aflatoxina G₁ e de 0,9243 para a aflatoxina G₂ (Figura 16). Todos os coeficientes ficaram acima de 0,9, valor mínimo adotado pelo INMETRO para se considerar o método linear.

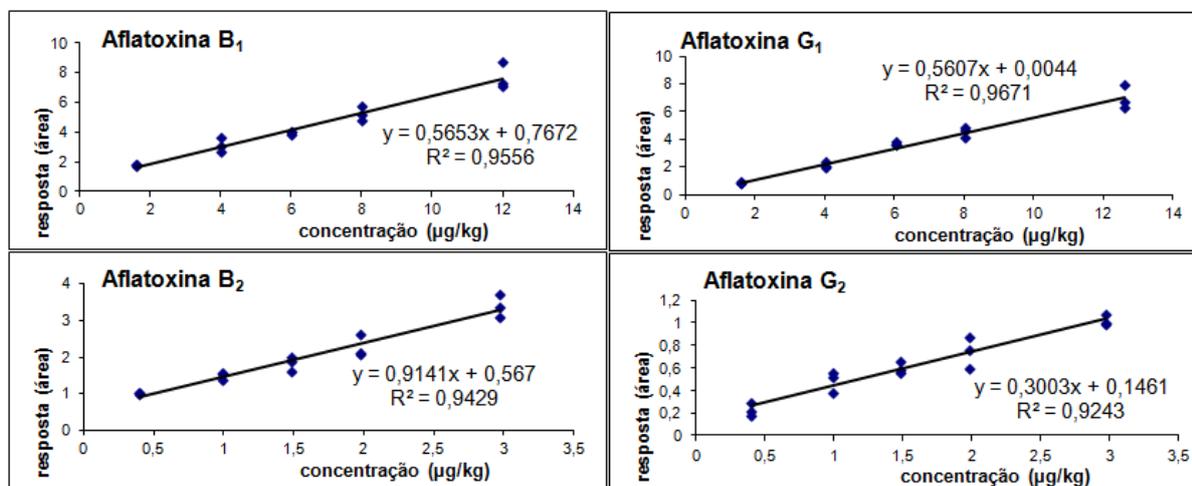


Figura 16. Curvas de calibração das aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂, com seus respectivos coeficientes de correlação linear (R²), utilizadas nos ensaios de recuperação.

A ausência de pontos discrepantes foi analisada através do teste de Grubbs e a homocedasticidade, isto é, a homogeneidade da variância dos resíduos, pelo teste de Cochran. O valor crítico de Grubbs para grupos de 3 replicatas com intervalo de confiança de 95% (valor tabelado) é de $G_{crít}=1,154$. O valor crítico de Cochran para grupos de 3 replicatas com intervalo de confiança de 95% (valor tabelado) é de $C_{crít}=0,746$. Nenhum valor de G foi superior a 1,154 confirmando a ausência de pontos discrepantes nas 4 curvas (Anexo 1). Os valores de Cochran das curvas das aflatoxinas B₁, B₂ e G₂ foram inferiores a 0,746 indicando homogeneidade na variância dos resíduos. Somente a curva da aflatoxina G₁ apresentou valor $C=0,795$ indicando heterogeneidade da variância dos resíduos. As sensibilidades das curvas foram avaliadas pelos coeficientes angulares e foram de 0,56; 0,91; 0,56 e 0,30 para as aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂, respectivamente.

4.8 Análise de Amostras

A análise da amostra naturalmente contaminada obtida junto ao Laboratório de Micotoxinas da ESALQ resultou em $10,098 \pm 0,42 \mu\text{g/kg}$ de B_1 , $3,611 \pm 0,23 \mu\text{g/kg}$ de B_2 , $1,894 \pm 0,18 \mu\text{g/kg}$ de G_1 e $0,618 \pm 0,19 \mu\text{g/kg}$ de G_2 , somando $16,221 \mu\text{g/kg}$ de aflatoxinas totais.

Foram também analisadas 10 amostras de amendoim adquiridas no mercado varejista do Rio de Janeiro, RJ (Experimento II). Nenhuma apresentou níveis de aflatoxinas acima dos limites máximos permitidos pela legislação europeia e brasileira. Duas amostras apresentaram apenas traços de aflatoxinas - uma apresentou traços de B_1 e G_2 (Figura 17), outra apresentou traços de B_1 e G_1 (Figura 18). A identidade destas aflatoxinas foi confirmada através de seus tempos de retenção e dos espectros de massas obtidos, onde observou-se os fragmentos de m/z 285 e 269 e o íon molecular 313 (provenientes da aflatoxina B_1), o fragmento de m/z 287 e o íon molecular m/z 315 (proveniente da aflatoxina B_2) e os fragmentos de m/z 285, 275 e 257 e o íon molecular m/z 331 (proveniente da aflatoxina G_2). Todos os fragmentos apresentaram acima de 10% da altura do pico base (íon molecular). As aflatoxinas identificadas encontraram-se em concentrações menores que os primeiros níveis das curvas de quantificação preparadas, portanto não puderam ser quantificadas.

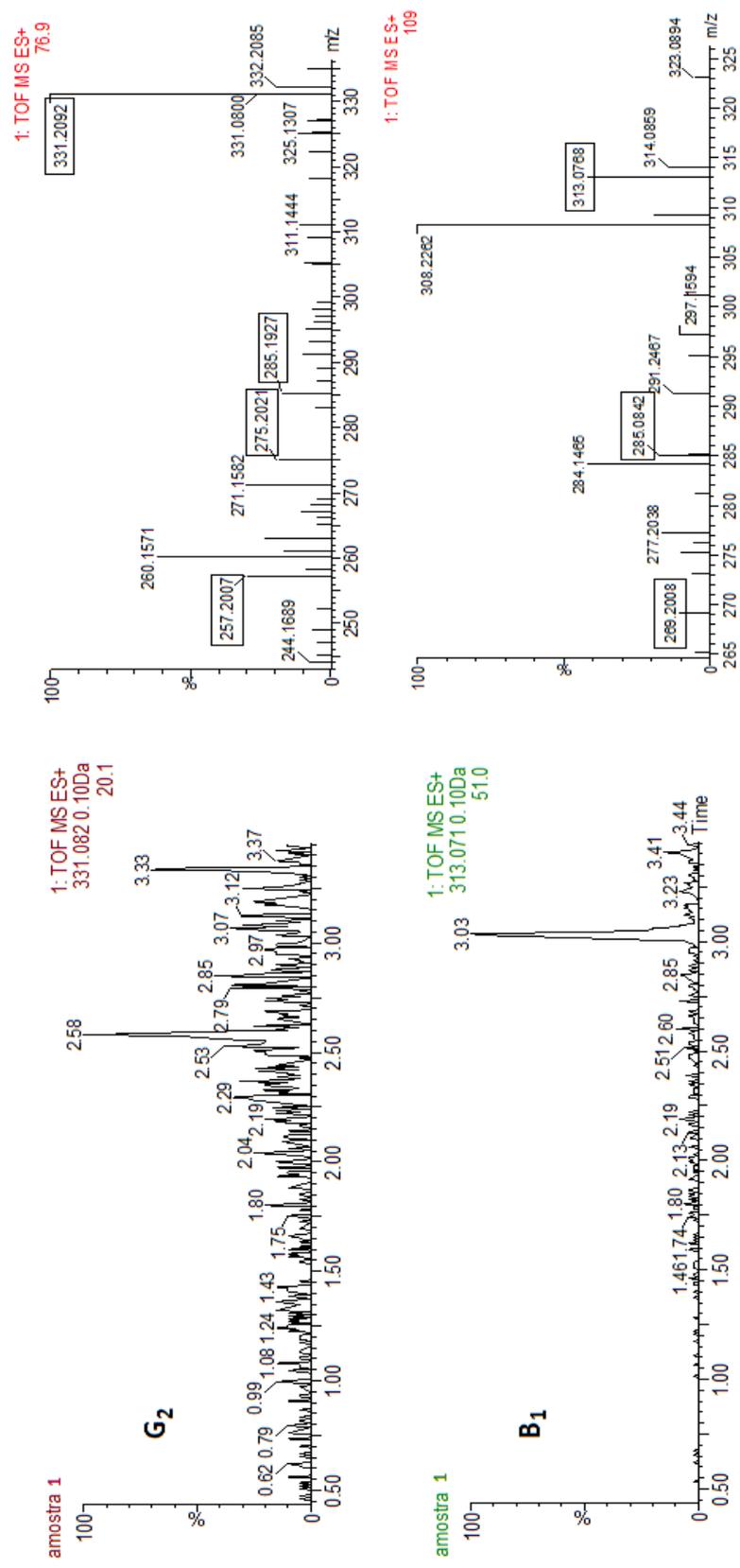


Figura 17. Cromatogramas e espectros MS^E das aflatoxinas G₂ e B₁ encontradas em uma das dez amostras adquiridas em feira livre do Rio de Janeiro.

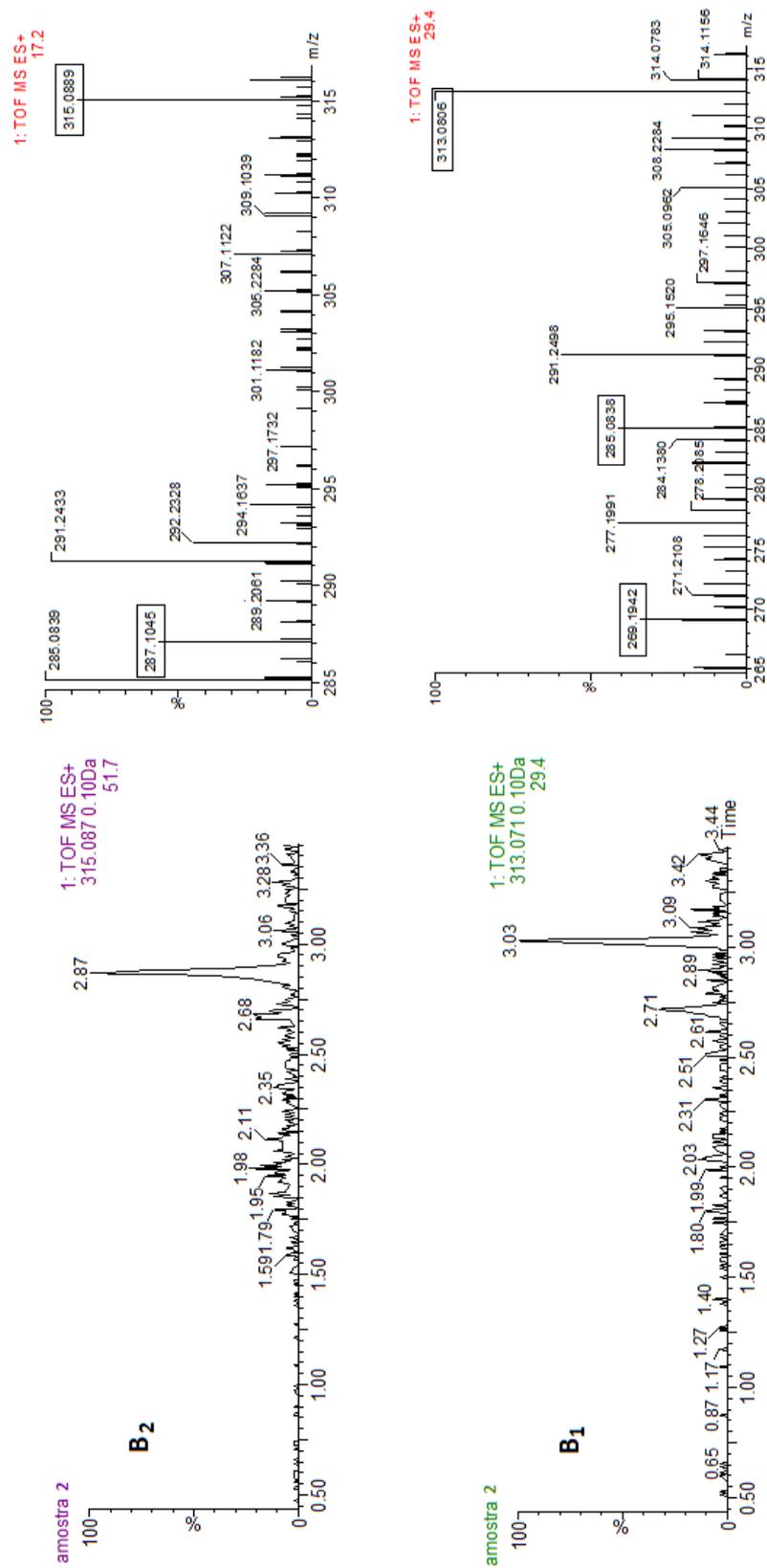


Figura 18. Cromatogramas e espectros MS^E das aflatoxinas B₂ e B₁ encontradas em outra das dez amostras adquiridas em feira livre do Rio de Janeiro.

A Figura 19 mostra as 4 curvas de calibração utilizadas no Experimento II. Estas curvas foram preparadas da mesma maneira que aquelas utilizadas nos ensaios de recuperação.

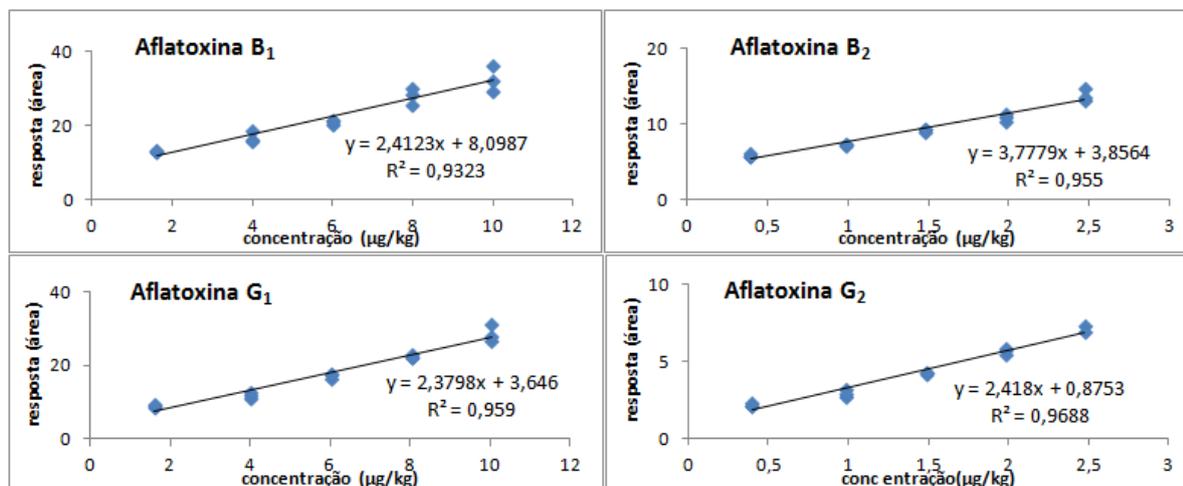


Figura 19. Curvas de calibração das aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂, com seus respectivos coeficientes de correlação linear (R^2), utilizadas nas análises das 10 amostras de amendoim adquiridas no mercado varejista.

Os coeficientes de correlação linear foram de 0,9323 para a aflatoxina B₁; 0,9550 para a aflatoxina B₂, 0,9590 para a aflatoxina G₁ e 0,9688 para a aflatoxina G₂ indicando linearidade aceitável. A ausência de pontos discrepantes foi confirmada através do teste de Grubbs ao verificar-se que todos os valores calculados situaram-se abaixo de $G_{crit}=1,154$ (Anexo B). A homogeneidade da variância dos resíduos foi confirmada para as aflatoxinas B₁, B₂ e G₂ através do teste de Cochran, porém, a curva da aflatoxina G₁ apresentou valor $C=0,776$ indicando heterogeneidade da variância. As sensibilidades das curvas foram de 2,41; 3,78; 2,38 e 2,42 para as aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂, respectivamente. As sensibilidades alcançadas nas análises realizadas no Experimento II foram todas maiores do que as alcançadas no Experimento I.

4.9 Oscilação da Sensibilidade

No Experimento I a sensibilidade observada foi relativamente baixa, quando comparada a sensibilidade obtida no Experimento II, o que fica evidente quando se compara os coeficientes angulares das curvas de calibração apresentados na Figura 14 com os apresentados na Figura 15. Uma supressão de sinal causou diminuição da sensibilidade e diminuição do coeficiente angular. As consequências de uma menor sensibilidade refletem-se na dificuldade de recuperação para os níveis de menor concentração. A curva de calibração da aflatoxina G₁ apresentou heterogeneidade na variância dos resultados, fator que pode também ter contribuído para uma baixa recuperação. Ambos os experimentos foram realizados exatamente sob as mesmas condições e em dias consecutivos. Os procedimentos de extração e purificação foram controlados, realizados pelo mesmo analista e utilizando-se de materiais (filtros, colunas de purificação) do mesmo lote. Foram utilizados os mesmos métodos

cromatográfico, espectrométrico e de quantificação, a mesma coluna e mesmos frascos de solução A, solução B e solução de extração.

Essa variação na sensibilidade foi estudada e avaliada no intuito de contorná-la e de se conseguir reprodutibilidade.

4.9.1 Fatores que afetam a sensibilidade

Análises quantitativas por ESI e APCI podem ser substancialmente afetadas pela ocorrência de supressão ou aumento de sinal, causados pela interferência de compostos da matriz, de interferentes provenientes do processo de extração, ou outros. Este fenômeno é comumente conhecido como efeito matriz e pode afetar significativamente a reprodutibilidade, linearidade e exatidão do método levando a erros de quantificação (KRUIVE *et al.*, 2010; TRUFELLI *et al.*, 2010). Evidências apontam que a interface ESI é mais suscetível ao efeito matriz do que a APCI, o que pode ser explicado pela diferença na maneira que cada interface produz o analito carregado. Na ESI o analito é ionizado na fase líquida e transferido à fase gasosa como uma molécula carregada. Na APCI o analito é transferido à fase gasosa como uma molécula neutra e a ionização ocorre nessa fase, em uma 2ª etapa, por ionização química (TRUFELLI *et al.*, 2010).

A supressão de sinal que ocorre na interface ESI pode ser atribuída a componentes da matriz que co-eluem com as aflatoxinas e que dificultem sua ionização, em uma possível competição pelas cargas disponíveis ou que dificultem acesso à superfície da gotícula onde ocorre a emissão para fase gasosa (TRUFELLI *et al.*, 2010). Componentes solúveis da matriz podem também modificar a densidade e a viscosidade da solução, modificando assim o formato do *spray* formado. A densidade da solução, o fluxo do gás de nebulização e a posição do *probe* (ângulo e protuberância do capilar) combinados determinam o formato do *spray* a ser formado e influenciam na captação dos íons.

Tais interferentes da matriz podem ficar aderidos ao capilar da fonte após uma série de corridas analíticas, deixando a fonte “suja”. Quando isto ocorre, também se observa o efeito de supressão de sinal e conseqüente queda na sensibilidade. A fonte de ionização de um espectrômetro de massas deve ser desmontada para limpeza em intervalos regulares, dependendo da frequência de uso e características das análises. Uma alternativa para diminuir os problemas decorrentes de efeito matriz em uma análises de massas é a diluição da amostra a ser analisada. A diluição da concentração diminui os interferentes de matriz e reduz a supressão de sinal, porém diminui a concentração do analito e reduz a sensibilidade do método. Esta alternativa pode ser útil quando se deseja analisar os constituintes de uma determinada matriz, mas não pode ser utilizada quando se deseja analisar contaminantes que estão presentes em concentrações traço (KRUIVE *et al.*, 2009).

Além do efeito matriz, inúmeros fatores podem causar variação na sensibilidade do ensaio. Alguns compostos sofrem degradação ao longo do tempo devido a fatores como luz ou temperatura, logo, deve-se conhecer e estudar a estabilidade dos padrões antes de se iniciar o trabalho. As aflatoxinas são conhecidas por serem compostos de difícil degradação, informação bastante difundida por inúmeros estudos sobre possíveis formas de eliminação de aflatoxinas em alimentos.

O detector MCP pode também sofrer desgaste. Cada vez que ocorre queda de energia deve-se zerar a voltagem do MCP e fazer uma ventilação gradativa dos setores de vácuo para que se possa desacelerar lentamente as ventoinhas das bombas turbo (uma entrada de ar súbita causaria uma alta força de atrito podendo danificá-las). Para recolocar o equipamento em

operação, deve-se reestabelecer o vácuo até uma pressão da ordem de 10^{-7} psi, processo que pode demorar até 24hs, e somente recondicionar o detector ao se certificar de que toda a umidade foi retirada do interior do TOF. Resquícios de umidade podem danificar o detector diminuindo a sensibilidade do aparelho. Quando isso acontece o detector precisa trabalhar com uma voltagem maior para compensar essa perda de sinal.

4.9.2 Análise de dados experimentais quanto à oscilação da sensibilidade

Na primeira vez que se notou uma variação na sensibilidade comparou-se a intensidade do sinal das aflatoxinas em solvente em três datas, escolhendo-se 2 pontos de concentração e traçando-se uma reta referente a cada data (Figura 20). Comparando-se os dados do dia 1 com os do dia 2 pode ser notada diminuição da intensidade do sinal dos pontos de concentração mais diluídos da curva. As duas análises foram realizadas com padrões de aflatoxinas em solvente, sob as mesmas condições: mesma fase móvel, temperatura, método cromatográfico, método espectrométrico e método de quantificação.

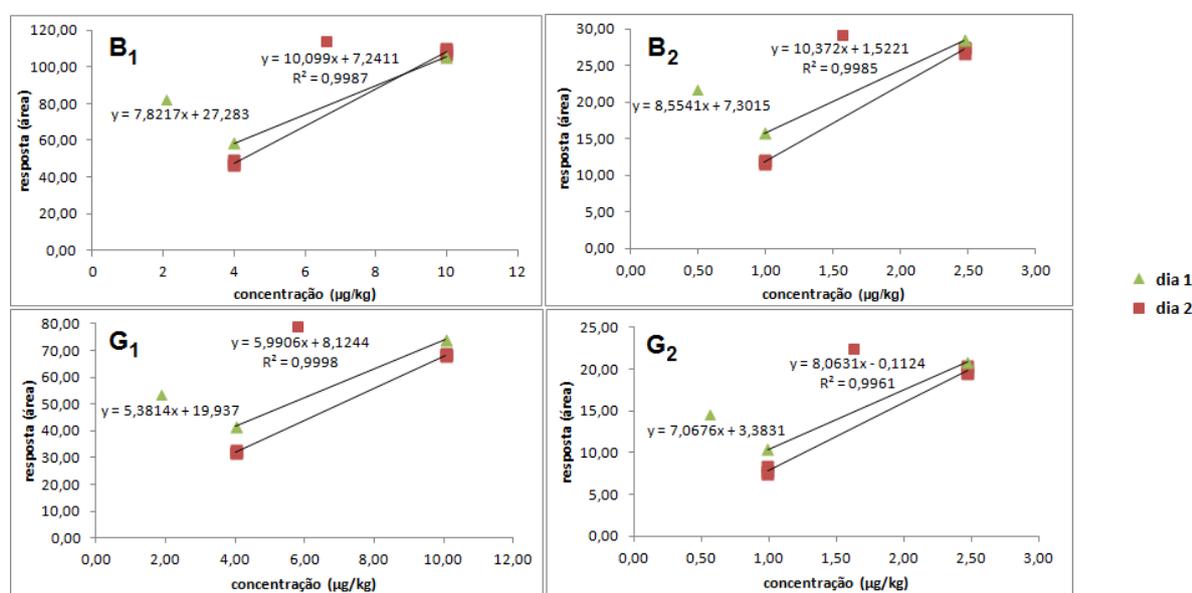


Figura 20. Variação, em intervalo de 2 dias, na sensibilidade do método de análise de aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂ em solvente.

Uma série de testes foram realizados para tentar elucidar qual seria o ponto crítico da análise que estaria resultando nesta diferença de sensibilidade. Primeiramente, o desempenho do detector foi conferido através do teste de ganho. Neste teste a voltagem do detector é aumentada de 1500 a 2000 eV de 1 em 1 minuto durante uma infusão de solução de calibração e o perfil do cromatograma é observado. A voltagem ideal de uso do detector é aquela que corresponde a aproximadamente 70% da intensidade máxima de sinal obtida. Verificou-se que a resposta do detector após o dia 2 (Figura 21B) apresentava o mesmo perfil quando comparada a antes do dia 1 (Figura 21A). A voltagem de 1650V estabelecida para o método mantinha-se adequada indicando que a variação na sensibilidade não era decorrente do desgaste do detector.

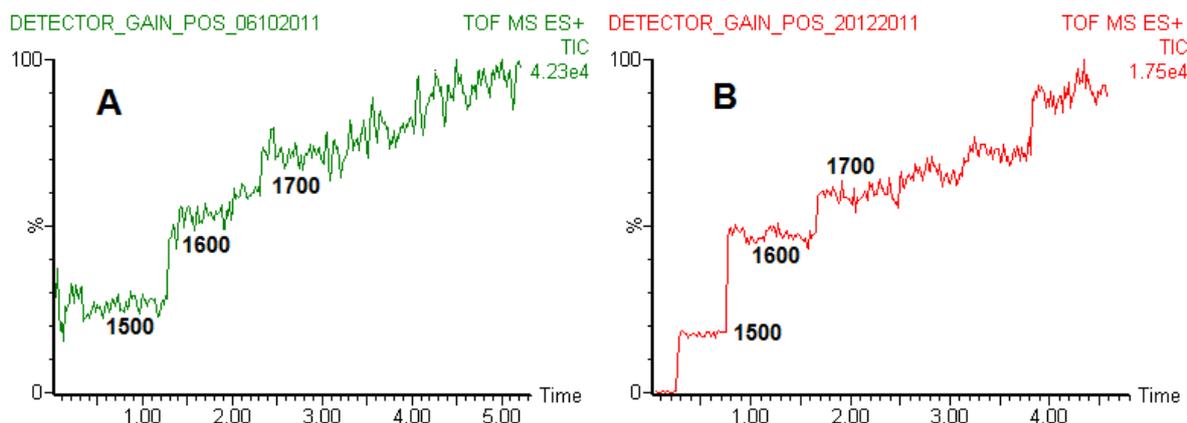


Figura 21. Testes de ganho do detector realizados antes (A) e depois (B) da constatação de variação na sensibilidade de resposta às aflatoxinas.

Paralelamente ao presente trabalho, foram realizados diversos ensaios qualitativos no Synapt, utilizando-se extratos não apenas de amendoim como também de variadas matrizes alimentícias, contendo analitos diversos em diferentes concentrações. Levantou-se a suspeita de que interferentes destas matrizes pudessem estar aderidos à fonte, deixando esta “suja”. O vácuo foi quebrado e a fonte desmontada para que se pudesse realizar sua limpeza completa.

Após limpeza da fonte, realizou-se novo experimento (Experimento III) que consistiu em preparar-se 2 duas curvas de calibração, em dias consecutivos, injetá-las e compará-las. O Synapt não foi utilizado para outras análises entre as injeções destas curvas. Ambas foram preparadas em matriz, com 5 pontos de concentração. O preparo de cada curva envolveu as etapas de extração, purificação do extrato, fortificação do extrato purificado, secagem sob fluxo de nitrogênio e ressuspensão em fase móvel. Ao montar-se o gráfico das curvas, observou-se que a intensidade do sinal de cada ponto de concentração variou de um dia para o outro (Figura 22). Essa variação foi mais percebida nas aflatoxinas B₁ e G₁.

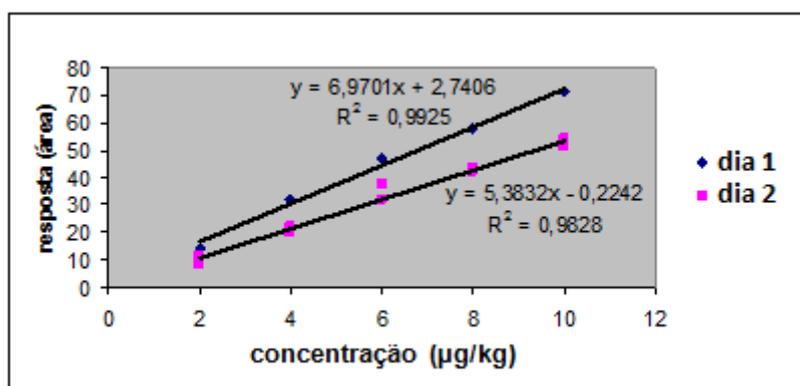


Figura 22. Variação, no intervalo de um dia, da intensidade do sinal da aflatoxina B₁ em amendoim, após realização de limpeza completa da fonte.

O Synapt não foi utilizado para outros ensaios, assegurando que a fonte não continha interferentes provindos de outras análises. Restaram as hipóteses de falha instrumental ou erro durante as etapas de extração e purificação do extrato.

Para averiguar a possibilidade de falha instrumental, foram injetadas novas curvas em outro sistema UPLC Acquity® e QToF Synapt® e comparadas suas sensibilidades. Os métodos cromatográfico e espectrométrico foram repetidos e apresentaram reprodutibilidade

dos tempos de retenção e dos perfis de ionização e fragmentação. A ocorrência de variação na sensibilidade se repetiu (Figura 23) indicando que o problema não era específico do primeiro Acquity® Synapt® utilizado. As curvas de calibração injetadas neste segundo Acquity® Synapt® foram preparadas em padrão diluído em solvente acetonitrila:água 30:70 (v/v) em um intervalo de 7 dias. Uma vez que esta variação ocorreu mesmo nas curvas preparadas em solvente, concluiu-se que esta diferença não foi proveniente de erro durante as etapas de extração.

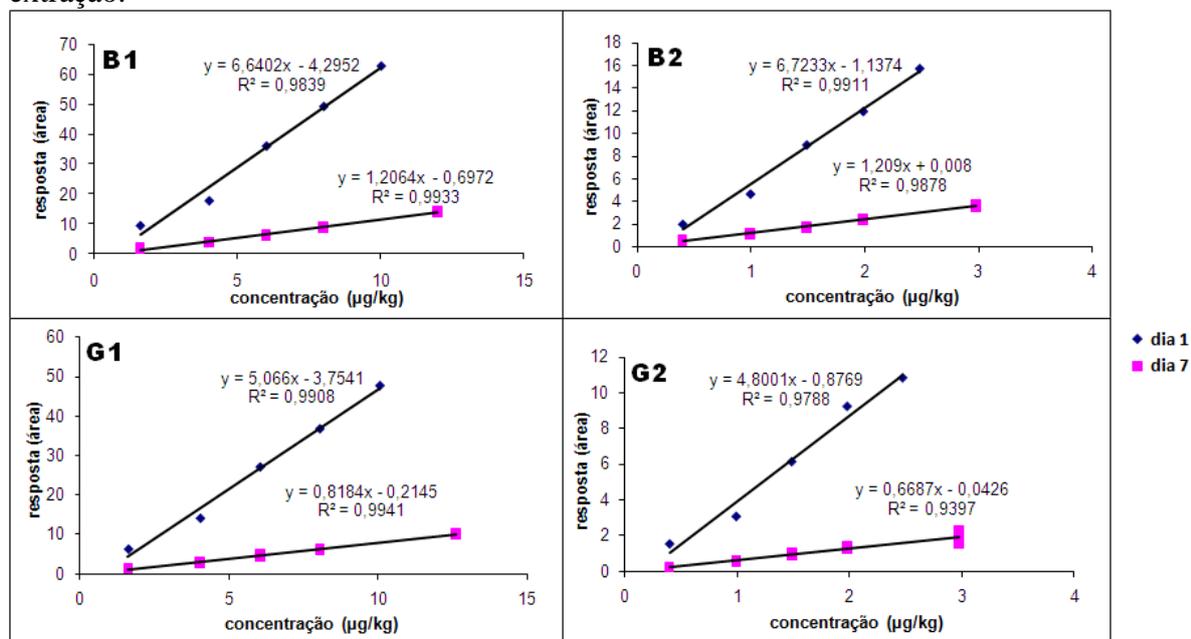


Figura 23. Variação da sensibilidade da análise de aflatoxinas em solvente com o intervalo de 7 dias, em segundo espectrômetro de massas de mesma marca (UPLC Acquity® e QToF Synapt®).

A Figura 24 mostra curvas de calibração das 4 aflatoxinas, construídas em extrato purificado fortificado com padrão, injetadas em três dias consecutivos. Em comparação ao dia 1, a sensibilidade sobe no dia 2 e volta a cair no dia 3, excluindo definitivamente as hipóteses de degradação do padrão e de desgaste do detector.

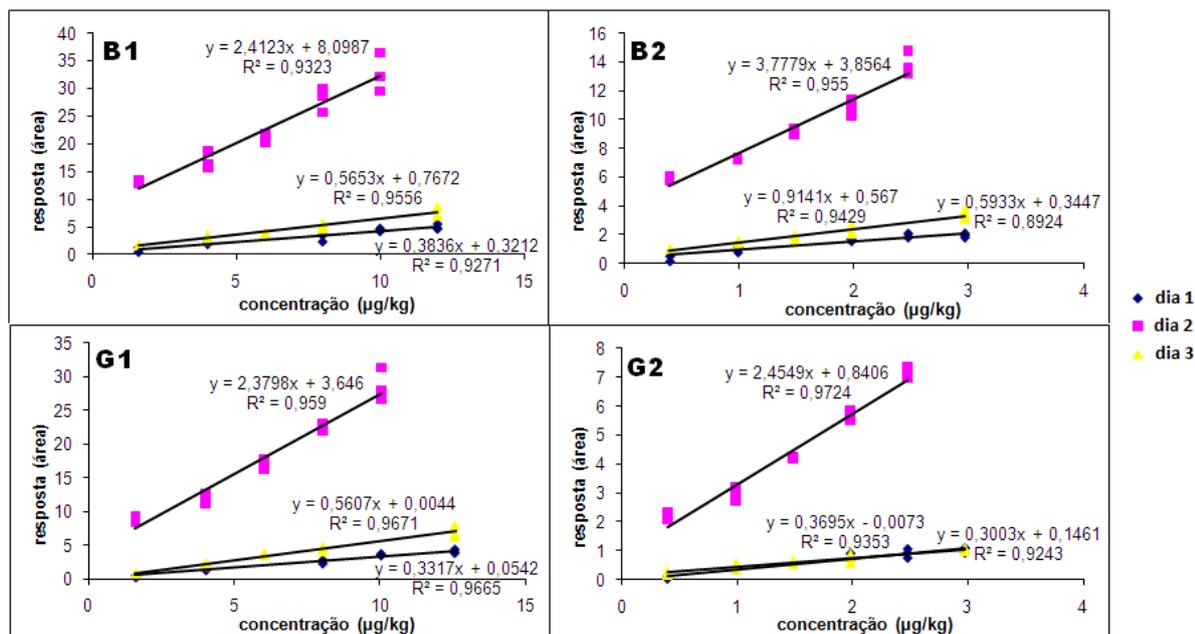


Figura 24. Variação da sensibilidade da análise de aflatoxinas em matriz ao longo de 3 dias consecutivos, em segundo espectrômetro de massas de mesma marca (UPLC Acquity® e QToF Synapt®).

Verificou-se então questões relativas ao método de quantificação. Ao se montar o método, estipula-se a m/z do composto desejado e escolhe-se uma janela de erro de massa para esse composto. Todos os íons cuja m/z esteja compreendida dentro desta janela de erro serão contados na quantificação. Se houver falha na calibração do TOF ou no uso do *lockspray* ao longo das injeções, perde-se a precisão das m/z dos compostos. Desta maneira, a janela de erro de massa precisa ser aumentada para que todos os íons sejam incluídos na quantificação. Criou-se então um novo método de quantificação com uma janela de erro de massa de 0,2 Da (200 mDa), dez vezes maior do que a usada anteriormente (0,02 Da = 20 mDa), porém, não foi observada diferença nas curvas de calibração (Figura 25), exceto pelo aumento do coeficiente de variação de cada ponto de concentração.

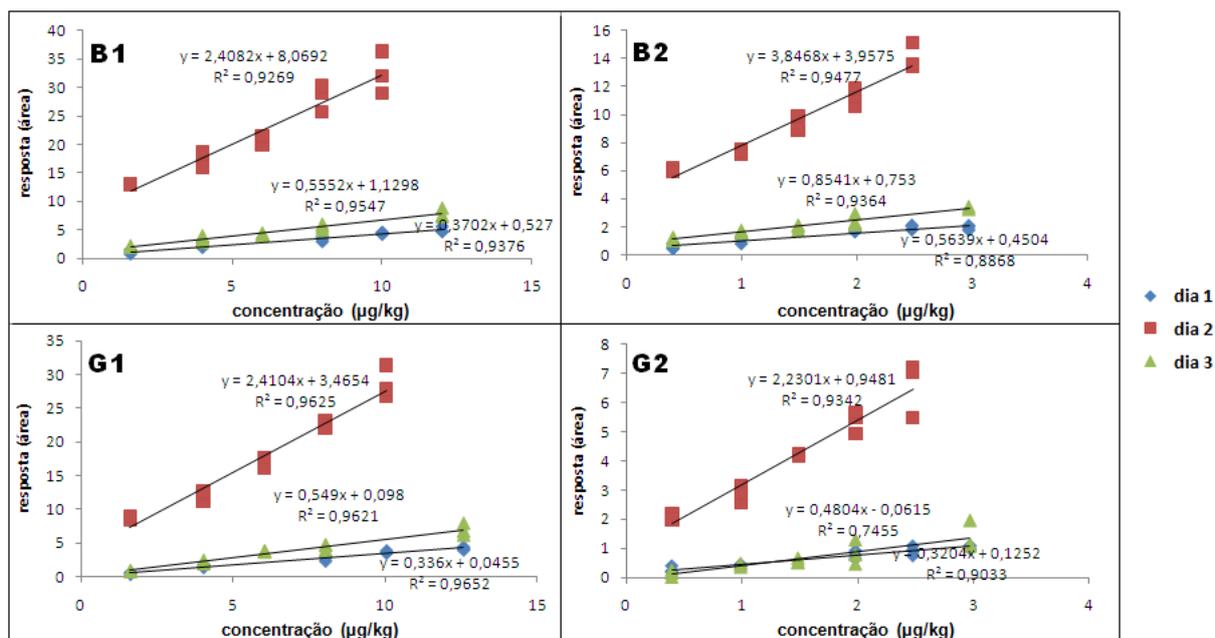


Figura 25. Curvas de calibração de aflatoxinas em matriz (mesmas curvas exibidas na Figura 19) obtidas modificando-se método de quantificação, aumentando-se janela de erro para 0,2Da.

Outro ponto considerado foi que a quantificação é feita através da contagem de moléculas ionizadas positivamente (protonadas) e o balanço entre moléculas protonadas e sodiadas é influenciado pela concentração do sal formiato de amônio adicionado na fase móvel. Este sal é insolúvel em acetonitrila e, para adicioná-lo a este solvente, foi preparada uma solução aquosa concentrada. Levantou-se a hipótese de que esta instabilidade de dissolução pudesse estar causando uma variação na proporção entre moléculas protonadas e sodiadas e, desse modo, influenciando na quantificação dos padrões. Os espectros das aflatoxinas foram analisados e, ao se comparar a razão entre moléculas protonadas (313m/z) e sodiadas (335m/z) da aflatoxina B₁ nos dias 2 e 3, constatou-se que a razão permanecia a mesma (Figura 26). A razão entre moléculas protonadas/sodiadas também permanecia igual para as outras aflatoxinas.

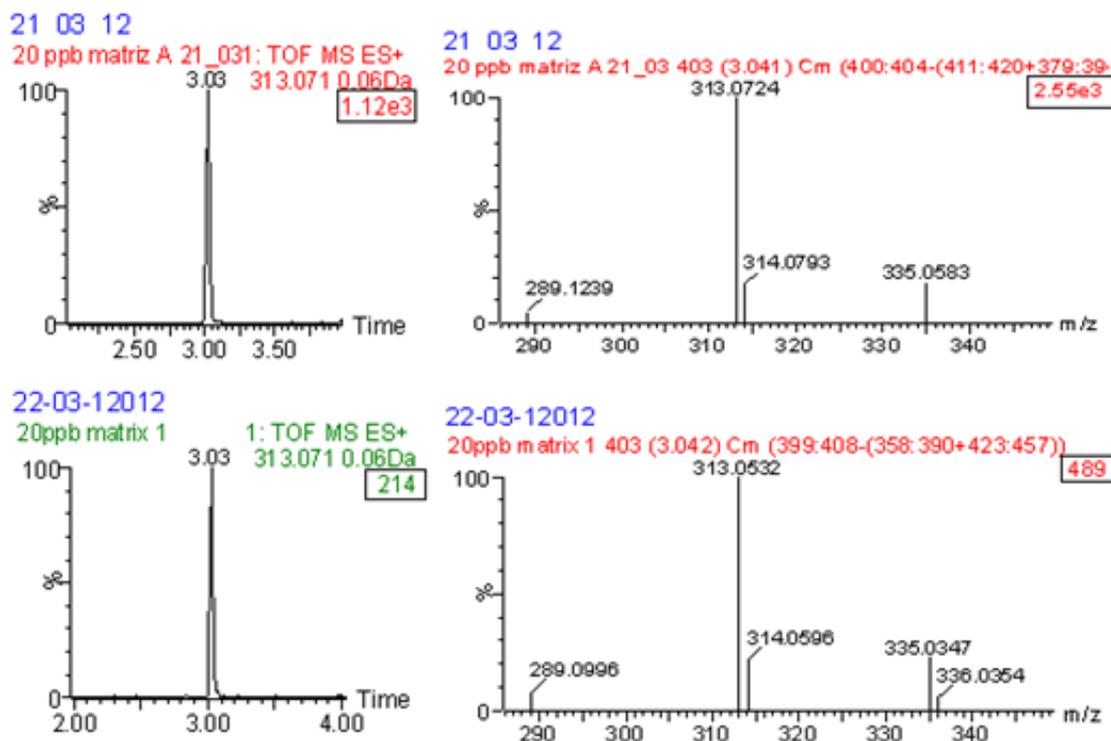


Figura 26. Cromatogramas com a contagem de íons e espectros mostrando a relação entre moléculas protonadas/sodiadas (m/z 313/335) da aflatoxina B₁ (20 μ g/kg) nos dias 2 e 3.

A análise dos dados exibidos nas figuras 23, 24, 25 e 26 excluíram as hipóteses questionadas até então. A figura 23 demonstra que ocorreu variação da sensibilidade para injeções de aflatoxina em solvente num intervalo de 7 dias, porém entre estes dias trabalhou-se com injeções de aflatoxinas em matriz. Levantou-se finalmente uma última hipótese: de que resíduos de matriz provenientes da própria análise em questão tenham se acumulado na fonte, causando supressão iônica durante as análises posteriores. Este problema já foi relatado anteriormente pelos autores Kilcoyne e Fux (2010), em uma análise de toxinas de moluscos onde comparou-se o desempenho de um QqQ com o desempenho de um QToF (ambos da Micromass®) utilizando-se fonte de ionização eletrospray. No referido trabalho, durante a análise da toxina azaspiracid (AZA1) no QqQ, notou-se que a injeção do padrão depois da injeção de um número de extratos de molusco levou a uma resposta menor do que quando injetada após uma curva de calibração em solvente. O fenômeno foi ilustrado na Figura 27, que mostra a resposta de 3 injeções consecutivas de padrão após terem sido realizadas injeções de extratos. As 2 primeiras injeções foram igualmente afetadas pelo efeito matriz de supressão de sinal, enquanto a terceira injeção levou a uma resposta significativamente maior. O grau de supressão de sinal variou com os extratos das diferentes espécies de moluscos, o que pode ser explicado por diferenças na composição destas matrizes (por exemplo, teor de lipídeos). Os autores concluíram que a supressão estava associada a interferentes sendo arrastados e oriundos de injeções prévias. Estes autores concluíram ainda que diferentes instrumentos de massas podem produzir resultados diferentes devido a interferências de matriz.

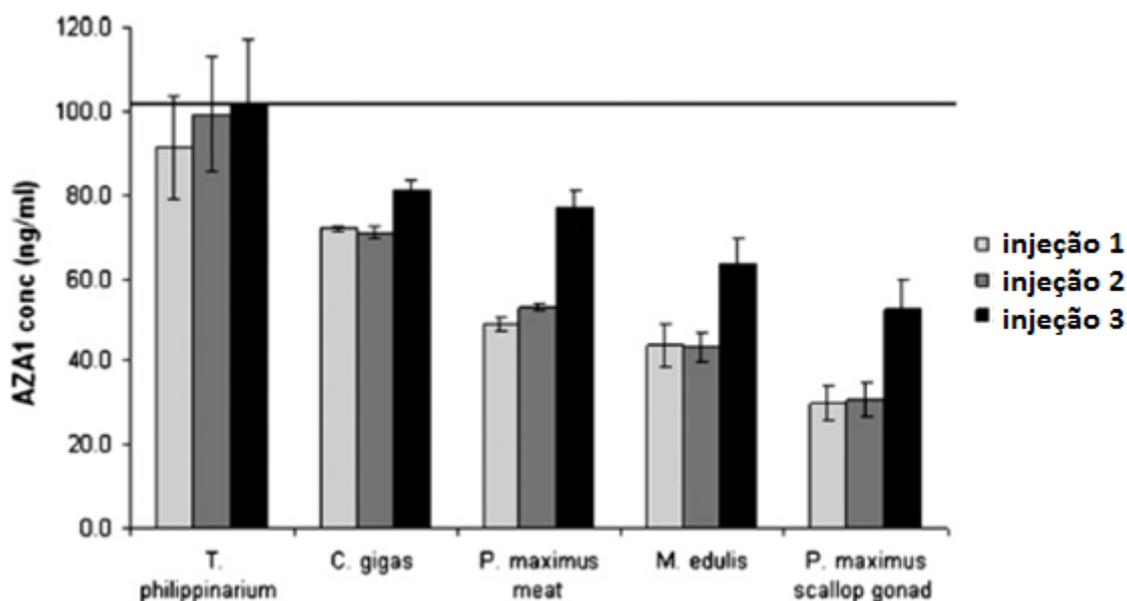


Figura 27. Gráficos de intensidade de resposta a 3 injeções consecutivas de padrão AZA1 após terem sido injetados 5 extratos de 5 diferentes espécies de moluscos (adaptado de Kilcoyne e Fux, 2010).

No presente método de aflatoxinas em matriz, dentro de uma mesma corrida, os coeficientes de variação das replicatas permaneceram abaixo de 15% (Anexos A e B) ao longo de toda a injeção, exceto para a aflatoxina G₂, e a linearidade da curva se manteve. Observou-se diferença significativa de sinal em injeções realizadas em dias posteriores. Entre esses dias, a fonte foi resfriada e o Synapt colocado em *stand by*. Sugere-se que o resfriamento contribua para que os interferentes da matriz tornem-se aderidos a fonte. O aumento de sensibilidade visto no dia 2 da Figura 24 poderia ser explicado por um período maior de condicionamento do método cromatográfico, no qual a fase móvel foi deixada correndo por horas além do período padronizado para estabilização da pressão da coluna, até que as amostras ficassem prontas. Essas horas passando fase móvel teriam realizado uma “lavagem” da fonte, o que talvez seja uma solução para os problemas de sensibilidade.

4.9.3 Parâmetros analíticos não calculados

A exatidão de um método (concordância entre o resultado de um ensaio e o valor de referência aceito como convencionalmente verdadeiro) pode ser expressa em função da recuperação e da precisão.

A precisão representa a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, sob condições definidas (INMETRO, 2007), e pode ser também chamada de reprodutibilidade. A precisão intermediária representa a dispersão de resultados dentro de um mesmo ensaio e pode ser também chamada de repetitividade. É expressa através do desvio-padrão e o coeficiente de variação das medidas (desvio padrão relativo), de acordo com a equação:

$$DPR = \frac{DP}{CMD} \cdot 100$$

onde:

DPR = desvio padrão relativo;

DP = desvio padrão;

CMD = concentração média determinada.

O método cromatográfico desenvolvido foi aplicado em dois aparelhos UPLC Acquity QToF Synapt e os cromatogramas obtidos apresentaram repetibilidade e reprodutibilidade dos tempos de retenção. Porém, nos dois aparelhos ocorreu oscilação da sensibilidade, o que impossibilitou o cálculo da repetibilidade e reprodutibilidade das áreas dos picos cromatográficos. Sem determinar a precisão, a exatidão tampouco pode ser calculada.

O limite de quantificação (LQ) representa a menor concentração da substância em exame que pode ser medida, havendo a confirmação de que o método apresenta exatidão, precisão e linearidade adequados quando aplicado a amostras contendo quantidades de substâncias dentro do intervalo especificado (ANVISA, 2003). Uma vez que a exatidão do método não foi estabelecida, não foi possível determinar o limite de quantificação.

5 CONCLUSÃO

Os requisitos para uma análise quantitativa foram parcialmente alcançados, no entanto, desenvolveu-se uma análise rápida, econômica e que apresentou excelentes resultados qualitativos.

Foram obtidas curvas de calibração com boa linearidade entre os valores de 1,6 a 12,0 $\mu\text{g/kg}$ (AFB_1 e AFG_1) e 0,396 a 2,97 $\mu\text{g/kg}$ (AFB_2 e AFG_2), faixas estas capazes de abranger os limites máximos permitidos de aflatoxinas estabelecidos nas legislações do Brasil e da União Européia. Entretanto, não foi possível fixar a sensibilidade do método, que embora tenha se apresentado alta em determinados ensaios, oscilou e diminuiu em outros. Nos dias que a sensibilidade se apresentou menor, não alcançou-se os valores de recuperação aceitáveis nas concentrações menores da faixa de trabalho o que limitou o trabalho de quantificação.

A utilização do QToF, um espectrômetro de massas de alta resolução, permitiu a análise qualitativa inequívoca das aflatoxinas B_1 , B_2 , G_1 e G_2 em amendoim. O método desenvolvido permitiu identificar de 3 a 7 fragmentos para cada aflatoxina, adquiridos com erro menor do que 0,02 Da, valor muito menor do que o obtido com triplo-quadrupólos, e com intensidade relativa superior a 10% do pico base, requisito estabelecido pela Commission Decision 2002/657/EC para análises de massa no modo varredura total. Com a análise desenvolvida detectou-se traços de aflatoxinas em 2 amostras de amendoim adquiridas em feira livre do Rio de Janeiro.

Utilizando-se a cromatografia líquida de ultra eficiência elaborou-se um método cromatográfico com uma corrida de 5 minutos e tempos de retenção dos analitos entre 2,6 e 3,0 minutos, resultando em uma análise rápida. O tamanho reduzido das colunas empregadas demandou baixo gasto de solventes quando comparado a uma análise por cromatografia líquida de alta eficiência. Além de rápida e econômica, a técnica de UPLC gerou cromatogramas de alta resolução que cumpriram com os critérios analíticos cromatográficos estabelecidos pela União Européia na Commission Decision 2002/657/EC.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A melhor alternativa para contornar o problema de variação de sensibilidade ocorrido neste método seria a utilização de padronização interna. Considerando-se que a variação da sensibilidade não foi decorrente de erros do processo de extração, o padrão interno poderia ser adicionado em pequena concentração no extrato já purificado, o que significaria menor gasto.

Outra possível alternativa consiste em trabalhar na diminuição do efeito matriz. Isto pode ser conseguido trabalhando-se no método cromatográfico para melhorar a separação entre as aflatoxinas e os interferentes de matriz.

O desenvolvimento e utilização de um novo método MSMS pode aumentar a relação sinal/ruído e com isso melhorar a sensibilidade do método, entretanto esta medida isolada não garante a estabilização da sensibilidade.

O exercício de um estrito controle suportado por uma legislação criteriosa traz a melhoria da qualidade do abastecimento interno de alimentos, diminuindo as perdas e os impactos sócio-econômicos associados ao consumo de alimentos contaminados. Apesar de o número de amostras analisadas ter sido pequeno, nenhuma apresentou contaminação acima dos limites máximos admissíveis pelas legislações brasileira e européia, representando um indicativo de que as medidas de orientação de boas práticas agrícolas e o acompanhamento dos níveis de contaminação através de técnicas analíticas precisas que vêm sendo aplicados principalmente nos últimos 10 anos ao longo da cadeia do agronegócio do amendoim, têm se mostrado efetivas.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABICAB. . **Disponível em:** <<http://www.abicab.com.br>>. Acesso em: mar 2010.

AOAC. Official Method 994.08: aflatoxins in corn, almonds, Brazil nuts, peanuts, and pistachio nuts. AOAC International, p.49.2.19A, 2005.

ARAÚJO, J. M. A. **Química de alimentos: teoria e prática**. Viçosa: UFV, 1999. 416p

BELTRÁN, E., IBÁÑEZ, M., SANCHO, J. V., HERNÁNDEZ, F. Determination of mycotoxins in different food commodities by ultra-high-pressure liquid chromatography coupled to triple quadrupole mass spectrometry. **Rapid Communication in Mass Spectrometry** 23, 1801-1809, Abr 2009.

BOOMAKANTI, A. S., WALIYAR, F. Importance of aflatoxins in human and livestock health. Disponível em <<http://www.icrisat.org/aflatoxin/health.asp>> Acesso em mai, 2012.

BORGUINI, R.G.; GODOY, R.L.O.; PACHECO, S.; ROSA, J.S.; BARRABIN, J.S. Comparison of precolumn and postcolumn derivatization systems for the liquid chromatographic determination of aflatoxins in peanuts. **Proceedings of IV Latin American Congress of Micotoxicology**, Mérida, Yucatan, Mexico, 2010.

BORGUINI, R.G.; GODOY, R.L.O.; PACHECO, S. Comparação entre colunas cromatográficas de diferentes tamanhos e tipos de partícula na análise de aflatoxinas em amendoim. Comunicado Técnico 180, Embrapa Agroindústria de Alimentos, 2011.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Portaria Nº 183, DE 21 DE MARÇO DE 1996**. Adota Regulamento Técnico MERCOSUL sobre seus limites máximos admissíveis no leite, amendoim e milho.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa Nº 29, DE 19 DE JUNHO DE 2001**. Dispõe que a liberação das partidas das mercadorias que menciona oriundas das operações de importação fica condicionada à análise prévia por laboratório, que emitirá Laudo de Análise de Aflatoxinas.

BRASIL. AMinistério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Portaria Nº 65, DE 10 DE SETEMBRO DE 2004**. Regulamento Técnico de Boas Práticas Agrícolas para Controle de Aflatoxinas na Cadeia Produtiva do Amendoim.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Resolução RDC Anvisa nº 172, de 04 de julho de 2003**. Dispõe sobre o Regulamento Técnico de Boas Práticas de Fabricação para Estabelecimentos Industrializadores de Amendoins Processados e Derivados e a Lista de Verificação das Boas Práticas de Fabricação para Estabelecimentos Industrializadores de Amendoins Processados e Derivados.

BRASIL. Secretaria de Defesa Agropecuária. **Instrução Normativa nº 64, de 09/09/2003:** Aprova as Diretrizes Gerais do Plano Nacional de Segurança e Qualidade dos Produtos de Origem Vegetal –PNSQV.

Codex Alimentarius Commission on Methods of Analysis and Sampling; Criteria for Evaluating Acceptable Methods of Analysis for Codex Purposes. CX/MAS 95/3, 1995.

FDA, **BBB BAD BUG BOOK: Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins Handbook Aflatoxins**. Disponível em <<http://www.fda.gov/Food/FoodSafety/FoodborneIllness/FoodborneIllnessFoodbornePathogensNaturalToxins/BadBugBook/ucm071020.htm>> Acesso em Jan, 2012.

FONSECA, H. Prevenção e controle de micotoxinas em produtos agrícolas. Disponível em <<http://pt.engormix.com/MA-micotoxinas/artigos/prevencao-controle-micotoxinas-produtos-t1074/p0.htm>> Acesso em mai, 2012.

GRIMALT, S., SANCHO, J. V., POZO, O. J., HERNÁNDEZ, F. Quantification, confirmation and screening capability of UHPLC coupled to triple quadrupole and hybrid quadrupole time-of-flight mass spectrometry in pesticide residue analysis. **Journal of Mass Spectrometry**, v.45, p.421-436, 2010.

GRÍO, S. J. L., FRENICH, A. G., VIDAL, J. L. M., GONZÁLES, R. R. Determination of aflatoxins B1, B2, G1, G2 and ochratoxin A in animal feed by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Separation Science**, v.33, p.502-508, 2010.

HEREBIAN, D., ZÜHLKE, S., LAMSHÖFT, M., SPITELLER, M. Multi-mycotoxin analysis in complex biological matrixes using LC-ESI/MS: Experimental study using triple stage quadrupole and LTQ-Orbitrap. **Journal of Separation Science**, v.32, p.939-948, 2009.

HERNÁNDEZ F. 2004.

HUSSEIN, S. H, BRASSEL, J. M.. Toxicity Metabolism and Impact of Mycotoxins on Humans and Animals. **Toxicology**, v. 167, n. 2, p. 101-134, set 2001

IAMANAKA, B. T., MENEZES H. C. de, VICENTE E., LEITE R. S. F., TANIWAKI M. H. Aflatoxigenic fungi and aflatoxins occurrence in sultanas and dried figs commercialized in Brazil. **Food Control**, 18, p. 454-457, 2007.

ICH International Conference on Harmonization, **Validation of Analytical Procedures: Methodology**. Q2B (CPMP/ICH/281/95), 1995.

Instituto Nacional de Metrologia Normalização e Qualidade Industrial[INMETRO]. **DOQ-CGCRE-008 Orientação sobre a validação de métodos de ensaios químicos**. Disponível em: Acreditação de Laboratórios. <www.inmetro.gov.br> Acesso em jan 2012.

Instituto Nacional de Metrologia Normalização e Qualidade Industrial [INMETRO]. Barreiras Técnicas às Exportações/Articulação Internacional. Disponível em: <<http://www.inmetro.gov.br/barreirastecnicas>>. Acesso em ago, 2010.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER [IARC]. **Evaluations of carcinogenic risks to humans: some naturally occurring substances: aromatic amines and mycotoxins**. IARC Monographs, 56, 245-395, 1997.

KENSLER, T. W., ROEBUCK, B. D., WOGAN, G. N., GROOPMAN, J. D. Aflatoxin: a 50-year odyssey oh mechanistic and translational toxicology. **Toxicological Sciences**, v.120, p.28-48, 2011.

KILCOYNE, J., FUX, E. Strategies for the elimination of matrix effects in the liquid chromatography tandem mass spectrometry analysis of the lipophilic toxins okadaic acid and azasparacid-1 in molluscan shellfish. **Journal of Chromatography A**, v.1217, p.7123-7130, 2010.

KRUBE, A., LEITO, I., HERODES, K. Combating matrix effects in LC/ESI/MS: the extrapolative dilution approach. **Analytical Chimica Acta**, v.28, n.651, p.75-80, 2009.

KRUBE, A., HERODES, K., LEITO, I. Electrospray ionization matrix effects as an uncertainty source in HPLC/ESI-MS pesticide residue analysis. **Journal of AOAC Internatinal**, v.93, p.306-14, 2010.

LIU, R., JIN, Q., TAO, G., SHAN, L., LIU, Y., WANG, X. LC-MS and UPLC-Quadrupole Time-of-Flight MS for Identification of Photodegradation Products of Aflatoxin B₁. **Chromatographia**, v.71, p.107-112, 2010.

LIU, R., JIN, Q., TAO, G., SHAN, L., HUANG, J., LIU, Y., WANG, X., MAO, W., WANG, S. Photodegradation kinetics and byproducts identification of the Aflatoxin B₁ in aqueous medium by ultra-performance liquid chromatography-quadrupole time-of flight mass spectrometry. **Journal of Mass Spectrometry**, v.45, p.553-559, 2010.

LÖTZSCH, R. & LEISTNER, L. Transmission of aflatoxins into eggs and egg products. **Annals of Nutrition and Metabolism.**, v.31, p.494-508, 1977.

MAGAN, N., ALDRED, D., Post-harvest control strategies: Minimizing mycotoxins in the food chain. **International Journal of Food Microbiology**, v.119, p.131-139, 2007.

MALDANER, L., JARDIM, I. C. S. F. O estado da arte da cromatografia líquida de ultra eficiência. **Química Nova**, São Paulo v.32, n.1, 2009.

MARTINS, R. Amendoim: produção, exportação e safra 2011/2012. **Análise e Indicadores do Agronegócio**, v.6, n.11, 2011.

MASRI, M.S. Crystalline aflatoxin M₁ from urine and milk. **Nature**, v.215, p.753-755, 1967.

MIRANDA, S. H. G. de, CUNHA FILHO, J. H., BURNQUIST, H. L., BARROS, G. S. A. C. Normas Sanitárias e Fitossanitárias: Proteção ou Protecionismo. **Informações Econômicas**, v. 34, n. 2, fev 2004.

NGUYEN, D. T. T., GUILLARME, D., RUDAZ, S., VEUTHEY, J., L. Chromatographic behavior and comparison of column packed with sub-2 µm stationary phases in liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v.1128, p.105, 2006.

NOVÁKOVÁ, L., SOLICHOVÁ, D., SOLICH, P. Advantages of ultra performance liquid chromatography over high performance liquid chromatography: Comparison of different analytical approaches during analysis of diclofenac gel. **Journal of Separation Science**, v.29, n.16, p.2433, 2006.

OLIVEIRA, C. A. F., GERMANO P. M. L., Aflatoxinas: conceitos sobre mecanismos de toxicidade e seu envolvimento na etiologia do câncer hepático celular. **Rev. Saúde Pública**, São Paulo v.31, n.4, Ago. 1997

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DO COMÉRCIO – WORLD TRADE ORGANIZATION. Disponível em www.wto.org. Acesso em jan 2010.

PASCHOAL, J. A. R., RATH, S., AIROLDI, F. P. S., REYES, F. G. R., Validação de métodos cromatográficos para a determinação de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos. **Química Nova**, v. 31, n. 5, p.1190-1198, 2008.

PASCHOAL, J. A. R., RATH, S., REYES, F. G. R., Quantitation and identity confirmation of residues of quinolones in tilapia fillets by LC-ESI-MS-MS QToF. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v.394, n.8, p.2213-2221, 2009.

PURCHASE, I.F.H. Aflatoxin residues in food of animal origin. **Food Cosmet. Toxicol.**, v.10, p. 531-544, 1972.

RASFF. The Rapid Alert System for Food and Feed. Annual Report, 2007.

RASFF Portal. Disponível em: <https://webgate.ec.europa.eu/rasff-window/portal/index.cfm?event=notificationsList>>. Acesso em março, 2012.

REDDY, S. V., WALIYAR, F. Properties of Aflatoxin and it producing fungi. Disponível em: <http://www.icrisat.org/aflatoxin/aflatoxin.asp>> . Acesso em maio, 2012.

RODRIGUES, P., VENÂNCIO, A., LIMA, N., Aflatoxigenic Fungi and Aflatoxins in Portuguese Almonds. **Scientific World Journal**, 2012.

ROMO, M. A. M., CARTAGENA, M. C. R., FERRI, E. F. R., FERNANDEZ G. S., Minimal moisture content for growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus* in mixed feeds. **Mycopathologia**, v.95, n.3, Set, 1986.

- SCUSSEL, V. M. **Micotoxinas em alimentos**. Florianópolis: Editora Insular, 1998.
- SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. Rio de Janeiro, Editora LTC, 2007.
- SMITH, R. M. **Understanding mass spectra. A basic approach**. New Jersey, John Wiley & Sons, 2004.
- SNYDER, L. R., KIRKLAND, J. J., DOLAN, J. W. **Introduction to Modern Liquid Chromatography**. John Wiley & Sons, 2010.
- SOARES, C., RODRIGUES, P., PETERSON, S. W., LIMA, N., VENÂNCIO, A. Three new species of *Aspergillus* section *Flavi* isolated from almonds and maize in Portugal, **Mycologia**, v.104, p.682-697, 2012.
- SPERS, E. E.; KASSOUF, A. L. A segurança dos alimentos: uma preocupação crescente. **Higiene Alimentar**, v.10, n.44, p.18, jul.-ago, 1996.
- SUASSUNA, N. D. et al., Cultivo do amendoim: contaminação por aflatoxina. Embrapa Algodão, **Sistemas de produção**, N°7, ISSN 1678-8710 Versão Eletrônica, 2006.
- SUASSUNA, T. M. F. et al., Cultivo do amendoim: importância econômica. Embrapa Algodão, **Sistemas de produção**, N°7, ISSN 1678-8710 Versão Eletrônica, 2006.
- SWARTZ, M. E., KRULL I. S. **Pharm Technol.** 2. 12., 1998.
- TRENK, H. L., HARTMAN P. A., Effects of Moisture Content and Temperature on Aflatoxin Production in Corn . **Applied Microbiology**. 1970 May; v.19, n.5, p.781–784.
- TRUFELLI, H., PALMA, P., FAMIGLINI, G., CAPPIELLO, A. An overview of matrix effects in liquid chromatography – mass spectrometry. **Mass Spectrometry Reviews**, v.30, n.3, p.491-509, 2011.
- UNIÃO EUROPÉIA. Regulamento (CE) nº 1881/2006 da Comissão de 19 de dezembro de 2006. Fixa os teores máximos de certos contaminantes presentes nos gêneros alimentícios. **Jornal Oficial da União Européia**, L 364 de 20 de dezembro de 2006, p.15.
- VESSMAN J., STEFAN, R. I., STADEN, J. F. V., DANZER K., LINDNER W., BURNS D. T., FAJGELG A., MÜLLER H. **Pure Applied Chemistry**, 73, 1381, 2001.
- VARGA, J., FRISVAD, J. C., SAMSON, R. A. Two new aflatoxin producing species, and an overview of *Aspergillus* section *Flavi*. **Studies in Mycology**, v.69, p. 57-80, 2011.
- WATERS CORPORATION. Treinamento operacional Synapt MS, 2009.
- XAVIER, J. J. M., SCUSSEL, V. M., Development of an LC-MS/MS method for the determination of aflatoxins B₁, B₂, G₁ and G₂ in Brazil nut. **International Journal of Environmental Analytical Chemistry**, v.88, n.6, p.425-433, 2008.

ANEXOS

ANEXO A

Tabelas 7, 8, 9 e 10 exibindo valores utilizados para análise de pontos discrepantes (teste de Grubbs) e homogeneidade de variâncias (teste de Cochran) das curvas de calibração utilizadas nos ensaios de recuperação (Experimento I).

Tabela 7. Dados da curva de calibração da aflatoxina B1 em matriz utilizada no experimento I.

µg/kg	áreas	média	desv pad	coef var	Grubbs	resíduo	variâncias	Cochran
1,6	1,766	1,764	0,035	1,960	0,068	0,094	0,001	0,631
1,6	1,797				0,965	0,125		
1,6	1,728				1,032	0,056		
4	2,661	3,112	0,476	15,285	0,948	0,367	0,226	
4	3,609				1,045	0,581		
4	3,066				0,097	0,038		
6	3,846	3,956	0,096	2,417	1,151	0,313	0,009	
6	4,003				0,492	0,156		
6	4,019				0,659	0,140		
8	5,143	5,187	0,484	9,331	0,090	0,147	0,234	
8	4,726				0,952	0,564		
8	5,691				1,042	0,401		
12	7,105	7,680	0,897	11,673	0,641	0,446	0,804	
12	7,222				0,511	0,329		
12	8,713				1,152	1,162		

Tabela 8. Dados da curva de calibração da aflatoxina B2 em matriz utilizada no experimento I.

µg/kg	áreas	média	desv pad	coef var	Grubbs	resíduo	variâncias	Cochran
0,396	1,008	1,014	0,020	1,984	0,282	0,079	0,000	0,408
0,396	0,997				0,829	0,068		
0,396	1,036				1,111	0,107		
0,99	1,541	1,491	0,096	6,438	0,524	0,069	0,009	
0,99	1,551				0,629	0,079		
0,99	1,38				1,153	0,092		
1,485	1,88	1,825	0,193	10,600	0,284	0,044	0,037	
1,485	1,61				1,111	0,314		
1,485	1,985				0,827	0,061		
1,98	2,122	2,269	0,301	13,256	0,489	0,255	0,090	
1,98	2,07				0,662	0,307		
1,98	2,615				1,150	0,238		
2,97	3,098	3,386	0,308	9,081	0,938	0,184	0,095	
2,97	3,351				0,115	0,069		
2,97	3,71				1,052	0,428		

Tabela 9. Dados da curva de calibração da aflatoxina G1 em matriz utilizada no experimento I.

µg/kg	áreas	média	desv pad	coef var	Grubbs	resíduo	variâncias	Cochran
1,608	0,878	0,837	0,041	4,897	0,992	0,028	0,002	0,795
1,608	0,796				1,008	0,110		
1,608	0,838				0,016	0,068		
4,02	1,947	2,126	0,230	10,814	0,777	0,311	0,053	
4,02	2,385				1,128	0,127		
4,02	2,045				0,351	0,213		
6,029	3,822	3,671	0,139	3,781	1,088	0,437	0,019	
6,029	3,549				0,879	0,164		
6,029	3,642				0,209	0,257		
8,039	4,645	4,514	0,348	7,699	0,377	0,133	0,121	
8,039	4,12				1,134	0,392		
8,039	4,777				0,757	0,265		
12,588	6,722	6,974	0,868	12,452	0,291	0,340	0,754	
12,588	6,26				0,823	0,802		
12,588	7,941				1,113	0,879		

Tabela 10. Dados da curva de calibração da aflatoxina G2 em matriz utilizada no experimento I.

µg/kg	áreas	média	desv pad	coef var	Grubbs	resíduo	variâncias	Cochran
0,396	0,212	0,228	0,059	25,728	0,273	0,053	0,003	0,064
0,396	0,179				0,835	0,086		
0,396	0,293				1,108	0,028		
0,99	0,56	0,486	0,097	19,987	0,762	0,117	0,009	
0,99	0,376				1,132	0,067		
0,99	0,522				0,371	0,079		
1,485	0,66	0,599	0,055	9,266	1,106	0,068	0,003	
1,485	0,584				0,264	0,008		
1,485	0,552				0,841	0,040		
1,98	0,595	0,742	0,138	18,663	1,062	0,146	0,019	
1,98	0,761				0,137	0,020		
1,98	0,87				0,924	0,129		
2,97	0,999	1,025	0,049	4,767	0,525	0,039	0,002	
2,97	0,994				0,628	0,044		
2,97	1,081				1,153	0,043		

ANEXO B

Tabelas 11, 12, 13 e 14 exibindo valores utilizados para análise de pontos discrepantes (teste de Grubbs) e homogeneidade de variâncias (teste de Cochran) das curvas de calibração utilizadas nas análises das 10 amostras adquiridas em feira livre do Rio de Janeiro (Experimento II).

Tabela 11. Dados da curva de calibração da aflatoxina B1 em matriz utilizada no experimento II.

Ppb	áreas	média	desv pad	coef var	Grubbs	resíduo	variâncias	Cochran
1,6	12,896	13,094	0,268	2,047	0,739	11,224	0,072	
1,6	12,987				0,399	11,315		
1,6	13,399				1,138	11,727		
4	16,385	16,921	1,468	8,677	0,365	13,357	2,156	
4	15,796				0,766	12,768		
4	18,582				1,131	15,554		
6	20,243	21,060	0,735	3,490	1,112	16,084	0,540	
6	21,271				0,287	17,112		
6	21,667				0,825	17,508		
8	28,699	28,131	2,217	7,882	0,256	23,409	4,916	
8	25,685				1,103	20,395		
8	30,009				0,847	24,719		
10	36,432	32,690	3,502	10,712	1,069	30,012	12,263	
10	29,492				0,913	23,072		
10	32,146				0,155	25,726		

Tabela 12. Dados da curva de calibração da aflatoxina B2 em matriz utilizada no experimento II.

Ppb	áreas	média	desv pad	coef var	Grubbs	resíduo	variâncias	cochran
0,396	5,799	5,847	0,172	2,943	0,279	4,870	0,030	
0,396	6,038				1,110	5,109		
0,396	5,704				0,831	4,775		
0,99	7,344	7,258	0,082	1,128	1,050	5,872	0,007	
0,99	7,181				0,940	5,709		
0,99	7,249				0,110	5,777		
1,485	9,317	9,182	0,218	2,376	0,620	7,393	0,048	
1,485	8,93				1,154	7,006		
1,485	9,298				0,533	7,374		
1,98	10,246	10,846	0,559	5,153	1,073	7,869	0,312	
1,98	10,939				0,167	8,562		
1,98	11,352				0,906	8,975		
2,475	14,757	13,827	0,827	5,983	1,124	11,928	0,684	
2,475	13,173				0,791	10,344		
2,475	13,551				0,334	10,722		

Tabela 13. Dados da curva de calibração da aflatoxina G1 em matriz utilizada no experimento II.

Ppb	áreas	média	desv pad	coef var	Grubbs	resíduo	variâncias	cochran
1,608	9,015	8,896	0,416	4,677	0,287	8,109	0,173	
1,608	8,433				1,112	7,527		
1,608	9,239				0,825	8,333		
4,02	11,134	11,887	0,787	6,621	0,956	8,876	0,619	
4,02	11,822				0,082	9,564		
4,02	12,704				1,039	10,446		
6,029	17,724	17,169	0,797	4,640	0,697	14,339	0,635	
6,029	16,256				1,146	12,871		
6,029	17,526				0,449	14,141		
8,039	22,922	22,429	0,443	1,977	1,111	18,410	0,197	
8,039	22,304				0,283	17,792		
8,039	22,062				0,828	17,550		
10,049	31,304	28,637	2,375	8,294	1,123	25,665	5,641	
10,049	26,751				0,794	21,112		
10,049	27,855				0,329	22,216		0,776

Tabela 14. Dados da curva de calibração da aflatoxina G2 em matriz utilizada no experimento II.

Ppb	áreas	Média	desv pad	coef var	Grubbs	resíduo	variâncias	cochran
0,396	2,321	2,170	0,131	6,049	1,153	2,056	0,017	
0,396	2,101				0,523	1,836		
0,396	2,087				0,630	1,822		
0,99	2,708	2,947	0,244	8,285	0,979	2,265	0,060	
0,99	3,196				1,020	2,753		
0,99	2,937				0,041	2,494		
1,485	4,167	4,228	0,053	1,257	1,154	3,575	0,003	
1,485	4,261				0,615	3,669		
1,485	4,257				0,539	3,665		
1,98	5,497	5,690	0,175	3,076	1,105	4,756	0,031	
1,98	5,736				0,261	4,995		
1,98	5,838				0,844	5,097		
2,475	7,349	7,153	0,196	2,733	1,004	6,460	0,038	
2,475	6,958				0,996	6,069		
2,475	7,151				0,009	6,262		0,401