

UFRRJ

INSTITUTO DE TECNOLOGIA

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**

DISSERTAÇÃO

Adequação e apresentação de parâmetros de validação intralaboratorial de um ensaio para a quantificação de Aflatoxinas em Castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa* Bonpl.) através de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.

Alessandra da Silva Teixeira

2008



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

**ADEQUAÇÃO E APRESENTAÇÃO DE PARÂMETROS DE
VALIDAÇÃO INTRALABORATORIAL DE UM ENSAIO PARA A
QUANTIFICAÇÃO DE AFLATOXINAS EM CASTANHA-DO-
BRASIL (BERTHOLLETIA EXCELSA BONPL.) ATRAVÉS DE
CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA.**

ALESSANDRA DA SILVA TEIXEIRA

Sob orientação do Professor
Dr. Ronoel Luiz de Oliveira Godoy

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos**, no Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Área de Concentração em Ciência de Alimentos.

Seropédica, RJ.

Agosto de 2008.

<p>634.575 T266a T</p>	<p>Teixeira, Alessandra da Silva, 1980- Adequação e apresentação de parâmetros de validação intralaboratorial de um ensaio para a quantificação de aflatoxinas em Castanha-do-Brasil (Bertholletia Excelsa Bonpl.) através de cromatografia líquida de alta eficiência/ Alessandra da Silva Teixeira. - 2008. 57f. : il.</p> <p>Orientador: Ronoel Luiz de Oliveira Godoy.</p> <p>Dissertação (mestrado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Programa de Pós- Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Bibliografia: f. 44-53.</p> <p>1. Castanha-do-Pará - Análise - Teses. 2. Aflatoxina - Amostragem - Teses. 3. Cromatografia líquida de alta eficiência - Teses. 4. Micotoxinas - Teses. 5. Frutas - Contaminação - 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.</p>
--------------------------------	---

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

ALESSANDRA DA SILVA TEIXEIRA

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos**, no Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Área de Concentração em Ciência de Alimentos.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 29/08/2008

Ronoel Luiz de Oliveira Godoy. Dr., Embrapa/CTAA
Orientador

Helena de Souza Torquillo. Dr^a., CEFETQ - Nilópolis
Membro externo

Marcelo Elias Fraga. Dr., UFRRJ
Membro interno

Verônica Lobato. Dr^a., UFRRJ
Membro interno

AGRADECIMENTOS

A Deus, o que seria de mim sem a fé que eu tenho nele.

Ao meu pai (*in memoriam*), minha mãe, minhas irmãs, meu marido Felipe, meu filho Pedro Henrique, que é a luz da minha vida, e a toda minha família que, com muito carinho e apoio, não mediram esforços para que eu chegasse até esta etapa de minha vida.

Ao pesquisador Dr. Ronoel Luiz de Oliveira Godóy pela orientação e paciência, por me amparar nos momentos de dúvidas e incertezas e acima de tudo por acreditar na minha capacidade, minha sempre eterna admiração.

Ao pesquisador Otniel Freitas-Silva pelo incentivo e pelo auxílio na correção deste trabalho, que tornaram possível a conclusão desta dissertação.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Micotoxinas e Cromatografia Líquida, ambos da Embrapa – CTAA, Marianna, Manuela, Sidney e Jeane pelo carinho e apoio.

À Kátia, Elga e Simone pela amizade e cumplicidade sempre, além do incentivo e pelo apoio constante.

Aos estagiários do Laboratório de Micotoxinas da Embrapa – CTAA, Alessandra, Diego e Felipe por toda a ajuda que eles dedicaram à elaboração deste trabalho.

E a todos que colaboraram para tornar este trabalho uma realidade.

À CAPES pela bolsa de estudos concedida.

RESUMO

TEIXEIRA, Alessandra da Silva. **Adequação e apresentação de parâmetros de validação intralaboratorial de um ensaio para a quantificação de Aflatoxinas em Castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa* Bonpl.) através de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.** 2008. p. 57. Dissertação de Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Instituto de Tecnologia, Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2008.

As aflatoxinas são metabólitos secundários produzidos por fungos do gênero *Aspergillus*, sobretudo *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*. São conhecidos, atualmente, 17 compostos similares designados pelo termo aflatoxinas, porém, os principais tipos de interesse médico-sanitário são identificados como AFB₁, AFB₂, AFG₁ e AFG₂. Devido ao potencial risco à saúde humana, os níveis de aflatoxinas são monitorados em muitos países. Mais de 50 países já estabeleceram níveis máximos de contaminação em alimentos e rações animais. Portanto, para o controle e monitoramento eficientes dos alimentos susceptíveis à contaminação são necessárias técnicas analíticas com sensibilidade, especificidade, rapidez, facilidade de uso, exatidão e precisão. No presente trabalho foi realizada a adequação de um ensaio analítico constituído por uma extração baseada no método preconizado por RODRIGUEZ AMAYA e VALENTE SOARES (1989), seguida de quantificação por CLAE, para a determinação das aflatoxinas AFB₁, AFB₂, AFG₁ e AFG₂, em amostras de castanha-do-brasil fortificadas. As amostras foram contaminadas com 5,3 µg·kg⁻¹ de AFG₁; 6,9 µg·kg⁻¹ de AFB₁; 4,8 µg·kg⁻¹ de AFG₂ e 5,0 µg·kg⁻¹ de AFB₂. Foram determinados os seguintes parâmetros de validação encontrados para o ensaio desenvolvido: Seletividade, Recuperação, Linearidade da Curva de Calibração, Limite de Detecção, Limite de Quantificação, Efeito de Matriz, Robustez e Precisão, através do Desvio Padrão Relativo (DPR). Realizou-se também a comparação de métodos de extração e de quantificação das aflatoxinas AFB₁, AFB₂, AFG₁ e AFG₂ usando Cromatografia em Camada Delgada (CCD) e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Foi feita análise de variância de Tukey a 5% de significância entre os 4 métodos testados e calculada a recuperação dos mesmos. Os valores de recuperação para AFG₁, AFB₁, AFG₂ e AFB₂ foram de 101,89; 100,25; 86,63 e 93,42%, respectivamente. A metodologia constituída por extração pelo método modificado baseado no método preconizado por RODRIGUEZ AMAYA e VALENTE SOARES (1989), seguida de quantificação por CLAE, foi aquela que mostrou melhores resultados de recuperação, revelando-se estatisticamente melhor que as demais metodologias testadas. A curva de calibração apresentou coeficientes de correlação variando entre 0,9936 e 0,9997, confirmando a sua linearidade, o Limite de Detecção determinado foi de 0,263; 0,345; 0,241 e 0,254 µg·kg⁻¹ de amostra para AFB₁, AFB₂, AFG₁ e AFG₂, respectivamente.

Palavras-chave: aflatoxinas, castanha-do-brasil, cromatografia líquida de alta eficiência, validação, toxicologia, controle de qualidade.

ABSTRACT

TEIXEIRA, Alessandra da Silva. **Adequacy and presentation of parameters of intralaboratorial validation of an assay for the Aflatoxin in brazil nut through the High Performance Liquid Chromatography. 2008.** p. 57. Dissertation, Master in Science and Technology for Food. Instituto de Tecnologia, Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2008.

The aflatoxins are secondary metabolites produced by fungi of the *Aspergillus* sort, over all for *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* and in lesser amount for *Aspergillus nomius*. They are known, currently, 17 similar composites assigned by the term aflatoxins, however, the main types of interest doctor-bathroom are identified as AFB₁, AFB₂, AFG₁ and AFG₂. Had to the potential risk to the health human being, the aflatoxin levels are monitored in many countries. More than 50 countries already had established maximum levels of contamination in foods and animal rations. However, for the efficient control and monitoramento of susceptiveis foods to the contamination they are necessary analytical techniques with sensitivity, specificity, rapidity, easiness of use, exactness and precision. In the present work an analytical assay consisting by an extraction based on the method praised for RODRIGUEZ AMAYA & VALENTE SOARES (1989) was developed, followed of quantification for CLAE, for the determination of aflatoxins AFB₁, AFB₂, AFG₁ and AFG₂, in samples of chestnut-do-Brazil artificially contaminated. The samples had been with 5,3 µg/ kg of AFG₁, 6,9µg/ kg of AFB₁, 4,8µg/ kg of AFG₂ e 5,0µg/ kg of AFB₂.The following found parameters of validation for the developed method had been determined: Selectivity, Recovery, Linearity of the Curve of Calibration, Limit of detention, Limit of Quantification, Effect of Matrix, Robustness and Precision, through the Shunting line Relative Standard (RSDr). The comparison of methods of extraction and quantification of aflatoxins AFB₁, AFB₂, AFG₁ and AFG₂ using Thin Layer Chromatography (TLC) and and High performance Liquid Chromatography (HPLC). Analysis of variance of Tukey was made 5% significance between the 4 tested methods and calculated the recovery of the same ones. The values of recovery had been of 101,89; 100,25; 86,63 and 93.42%, respectively for AFG₁, AFB₁, AFG₂ and AFB₂. The methodology consisting of extraction for the method modified based in the method praised for RODRIGUEZ AMAYA & VALENTE SOARES (1989), followed of quantification for CLAE, was that one that it showed better resulted of recovery, showing statistical better that the too much tested methodologies. The calibration curve presented correlation coefficients varying between 0,9936 and 0,9997, confirming its linearity, the Limit of Detention defined was of 0,263; 0,345; 0,241 and 0,254µg·kg⁻¹, respectively.

Keywords: aflatoxins, brazil nuts, high performance liquid chromatography, validation, toxicologia, quality control.

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Tabela 1. Níveis máximos permitidos para aflatoxinas em alimentos para consumo humano.	8
Tabela 2. Aflatoxinas – Características físico-químicas.	11
Quadro 1. Ordenação das modificações realizadas para ensaio de robustez.	29
Quadro 2. Resultados obtidos da análise de aflatoxinas em casca, amêndoa e castanha integral ($\mu\text{g}\cdot\text{Kg}^{-1}$).	30
Quadro 3. Valores médios de extração e quantificação de aflatoxinas em amostras de castanha-do-brasil, artificialmente contaminadas.	31
Quadro 4. Valores médios de recuperação de aflatoxinas em amostras de castanha-do-brasil, artificialmente contaminadas.	31
Quadro 5. Valores de C calculado para o Teste de Cochran.	32
Quadro 6. Coeficientes de correlação da curva de calibração.	33
Quadro 7. Concentração das aflatoxinas nos seis pontos da curva de calibração ($\mu\text{g}/\text{mL}$).	33
Quadro 8. Concentração das diluições testadas para determinação do LD ($\mu\text{g}/\text{mL}$).	35
Quadro 9. Média dos tempos de retenção encontrados para as quatro aflatoxinas.	37
Quadro 10. Resultados de média ($\mu\text{g}/\text{mL}$) \pm desvio padrão relativo- DPR (%).	40
Quadro 11. Coeficientes de correlação da curva do padrão e da matriz adicionada do padrão.	41
Quadro 12. Resultados do Teste F e do Teste t.	41
Quadro 13. Resultados médios do ensaio para verificação da robustez do método.	42

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estruturas químicas das aflatoxinas AFB ₁ , AFB ₂ , AFM ₁ , AFM ₂ , AFG ₁ e AFG ₂ .	5
Figura 2. Estruturas químicas das aflatoxinas AFB ₁ e AFG ₁ derivatizadas.	16
Figura 3. Metodologias de preparo e quantificação das amostras	27
Figura 4. Curvas de calibração para determinação da linearidade.	34
Figura 5. Cromatogramas das quatro concentrações testadas para determinação do LD.	36
Figura 6. Cromatogramas típicos da curva padrão e da amostra contaminada nos seis pontos da curva de calibração.	38
Figura 7. Cromatogramas típicos da curva padrão e da amostra contaminada nos seis pontos da curva de calibração.	39
Figura 8. Representação gráfica das curvas analíticas dos padrões em solvente e na matriz para as aflatoxinas AFG ₁ , AFB ₁ , AFG ₂ e AFB ₂ .	41

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 Micotoxinas	4
2.2 Aflatoxinas	5
2.2.1 Natureza química	5
2.2.2 Mecanismos de toxicidade da aflatoxina AFB1	6
2.2.3 Carcinogenicidade para a espécie humana	6
2.2.4 Aflatoxinas em alimentos	7
2.2.5 Legislação sobre aflatoxinas	7
2.3 Castanha-do-brasil	8
2.3.1 Importância econômica	9
2.3.2 Realidade da produção hoje	9
2.4 Amostragem	10
2.5 Métodos de Análise de Micotoxinas em Alimentos	11
2.5.1 Extração	11
2.5.2 Limpeza	12
2.5.3 Detecção e quantificação	12
2.5.4 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) Detector de Fluorescência X Detectores de UV	14
2.5.5 Confirmação	15
2.6 Ocorrência das Aflatoxinas em Alimentos	16
2.7 Validação	18
2.7.1 Parâmetros analíticos para validação de métodos	18
A) Seletividade	18
B) Linearidade e faixa de aplicação	19
C) Precisão	20
D) Repetitividade	20
E) Ensaio de recuperação	20
F) Limite de Detecção (LD)	21
G) Limite de Quantificação (LQ)	21
H) Robustez	21
I) Efeito de Matriz	21
2.7.2 Estabilidade dos padrões e das amostras	22
3 MATERIAL E MÉTODOS	23
Localização dos Experimentos	23
3.1 Material	23
3.1.1 Amostras	23
3.1.2 Preparo das amostras	23
3.1.3 Reagentes e Padrões	23
3.2 Métodos	23
3.2.1 Preparo das Amostras	23
3.2.2 Padrão de aflatoxinas	24
Preparo das soluções padrões de aflatoxinas.	24
Preparo das soluções padrões de contaminação de aflatoxinas (Pool).	24

Determinação da concentração das soluções padrões de aflatoxinas.	24
3.2.3 Metodologia desenvolvida	24
Extração das Aflatoxinas	24
Derivatização das Amostras	25
Curva de Calibração	25
Derivatização dos Padrões	25
Análise cromatográfica	25
3.2.4 Metodologia segundo Valente Soares e Rodriguez-Amaya (1989)	25
Extração das Aflatoxinas	25
Identificação e Quantificação das Aflatoxinas	26
3.2.5 Comparação entre os métodos	26
3.2.6 Determinação dos parâmetros de validação para metodologia desenvolvida.	27
Linearidade	27
Recuperação	27
Limite de detecção (LD)	28
Limite de quantificação (LQ)	28
Seletividade	28
Precisão ou Desvio Padrão Relativo (RSDr)	28
Efeito de Matriz	28
Robustez	28
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
4.1 Ensaio Preliminares	30
4.2 Comparação entre os métodos	30
4.3 Validação da metodologia modificada com quantificação por CLAE.	32
4.3.1 Linearidade	32
4.3.2 Limite de detecção (LD)	34
4.3.3 Limite de quantificação (LQ)	36
4.3.4 Seletividade	37
4.3.5 Precisão ou Desvio Padrão Relativo (DPR ou RSDr)	40
4.3.6 Efeito de matriz	40
4.3.7 Robustez	42
5. CONCLUSÕES	43
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44
ANEXOS	54
ANEXO A – Gráficos de Resíduos para a Curva 1.	55
ANEXO B – Gráficos de Resíduos para a Curva 2.	56
ANEXO C – Gráficos de Resíduos para a Curva 3.	57

1 INTRODUÇÃO

As micotoxinas constituem-se em um grupo de compostos tóxicos produzidos por fungos que crescem sob condições favoráveis em substratos orgânicos variados. Cereais e sementes oleaginosas são freqüentemente expostos à contaminação fúngica e por sua vez por seus metabólitos secundários, durante a colheita, armazenamento e industrialização.

As aflatoxinas são metabólitos secundários produzidos por fungos do gênero *Aspergillus*, sobretudo *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*. São passíveis de causarem efeitos tóxicos em animais e humanos. A exposição por ingestão de aflatoxinas pode levar ao desenvolvimento de sérias condições clínicas que variam consideravelmente dependendo da espécie animal, dose, estado nutricional, idade e gênero. São conhecidos, atualmente, 17 compostos similares designados pelo termo aflatoxinas, porém, os principais tipos de interesse médico-sanitário são identificados como AFB₁, AFB₂, AFG₁ e AFG₂. A aflatoxina AFB₁ é a que apresenta maior poder toxigênico, seguida de AFG₁, AFB₂ e AFG₂.

Os fungos toxigênicos podem desenvolver-se nos alimentos durante a sua produção, processamento, transporte ou estocagem e, uma vez produzidas, as aflatoxinas podem ser ingeridas, inaladas ou absorvidas pela pele, causando patologias e morte do homem ou de animais. São altamente mutagênicas, carcinogênicas e teratogênicas. Dentre as condições favoráveis para a produção de aflatoxinas, destacam-se a temperatura, a atividade de água e o teor de umidade, o pH, a composição química do alimento, a taxa de oxigenação, o período de armazenagem, o grau de contaminação fúngica, as condições físicas dos grãos ou sementes e a interação microbiana. Os fungos desenvolvem-se em produtos cuja atividade de água varia de 0,65 a 0,90 unidades de aw e teor de umidade dos grãos na faixa de 14 a 22 %. No que se refere à atividade de água, o mínimo para o desenvolvimento dos fungos toxigênicos é de 0,76 unidades de aw. Portanto, quando possível, os alimentos devem estar abaixo destas faixas para serem considerados seguros.

Devido ao potencial risco à saúde humana, os níveis de aflatoxinas são monitorados em muitos países. Mais de 50 países já estabeleceram níveis máximos de contaminação em alimentos e rações animais. O controle das aflatoxinas é atualmente realizado através dos processos de controle de qualidade de alimentos e procedimentos reguladores.

Os produtos mais afetados pelas aflatoxinas são: amendoim e subprodutos, milho, farelo de algodão, castanhas em geral, sementes oleaginosas, feno, sorgo e feijão.

A castanheira-do-brasil (*Bertholletia excelsa*) é uma das mais importantes árvores amazônicas conhecidas e sua exploração tem um papel fundamental na organização sócio-econômica de grandes áreas extrativistas da floresta. A colheita e o beneficiamento das sementes constitui importante atividade econômica das populações amazônicas. As sementes da castanha-do-brasil são objeto de intenso comércio, tendo cotação nas bolsas mundiais sob as designações de Brazil nuts ou Para nuts. É exportada para Inglaterra, França, Alemanha, Estados Unidos e Japão.

Embora o produto seja um dos componentes da renda de mais de 15 mil famílias na região norte do Brasil, a presença da toxina, além de ser um risco à saúde da população, prejudica o desenvolvimento de alimentos que agregam valor à matéria-prima, como farinhas de grande valor protéico e óleos finos. A amêndoa, além de ser muito

calórica, é rica em selênio, um elemento de grande importância à saúde do homem, quando atua em conjunto com a vitamina E, as células de todo o organismo ficam protegidas contra danos oxidativos. A castanha-do-brasil possui também cálcio, fósforo, magnésio, potássio, cobre e as vitaminas A, B1, B2 e C, além de proteínas. O consumo do produto é feito de forma **In Natura** e através de derivados, como biscoitos, farinha, paçoca e óleo.

Uma vez que a presença do fungo não implica necessariamente na presença de toxinas, as determinações analíticas são necessárias para fiscalização, monitoramento e pesquisa. Porém, para o controle e monitoramento eficientes dos alimentos susceptíveis à contaminação são necessárias técnicas analíticas com sensibilidade, especificidade, rapidez, facilidade de uso, exatidão e precisão. A distribuição não uniforme das aflatoxinas nos lotes contaminados, baixas concentrações em alimentos, matrizes complexas com muitos interferentes, necessitando de uma fase de limpeza e a natureza variada das amostras, as quais requerem diferentes procedimentos na extração, são alguns dos fatores que contribuem para a falta de exatidão de resultados analíticos para micotoxinas, dificultando este tipo de análise. As técnicas mais usadas para a quantificação de micotoxinas são as cromatográficas, incluindo Cromatografia em Camada Delgada (CCD), Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massa (CG/MS). A mais simples é a CCD, porém os outros métodos têm maior sensibilidade e precisão.

Portanto, a necessidade de decisões rápidas leva ao desenvolvimento de novos métodos de triagem e com vistas ao conhecimento de micotoxinas em alimentos, estudos visando aprimorar a metodologia para sua detecção e quantificação são sem dúvida necessários.

Desta forma, o presente trabalho teve os seguintes objetivos: (a) Desenvolvimento de um método analítico para a determinação de aflatoxinas por cromatografia líquida de alta eficiência em castanha-do-brasil; (b) Comparação entre as técnicas de quantificação de aflatoxinas por CCD com quantificação visual e CLAE, em amostras de castanha-do-brasil artificialmente contaminadas; (c) Apresentação dos parâmetros de validação encontrados para o método desenvolvido: Seletividade, Recuperação, Linearidade da Curva de Calibração, Limite de detecção, Limite de Quantificação, Efeito de Matriz, Robustez e Precisão, através do Desvio Padrão Relativo (DPR).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Micotoxinas

As micotoxinas são um grupo de metabólitos secundários produzidos por alguns fungos que são tóxicos para seres humanos e animais, os quais não são necessários para o crescimento e provavelmente possuem a função de limitar a competição, podendo ainda estar associadas a mudanças na natureza física do alimento no sabor, odor e aparência (BOEING, 1999). O termo micotoxinas deriva da palavra grega Mikes, que significa fungo, e da palavra latina toxicum, que significa veneno (SCUSSEL, 1998).

As toxinas destes fungos podem estar contidas nos esporos e micélios, ou serem excretadas como exotoxinas no substrato de crescimento (COLE; COX, 1981).

A exposição humana a micotoxinas pelo consumo de alimentos contaminados é questão de saúde pública no mundo todo (BRERA *et al.*, 1998). Além do que, são enormes os prejuízos econômicos que elas causam em toda a cadeia de produção, desde a produção primária, passando pelos processadores e comerciantes de alimentos. Essas toxinas são responsáveis por prejuízos de milhões de dólares anuais em saúde humana, animal e produtos agrícolas (HUSSEIN; BRASEL, 2001). A Organização Mundial para a Alimentação e Agricultura (FAO), estimou entre 5 e 10 % o total de alimentos perdidos no mundo anualmente por fungos e micotoxinas e que 40% da redução na expectativa de vida em países pobres está relacionada com a existência de micotoxinas na dieta destas populações (FAO, 2006). Em 1993, a Agência Internacional para pesquisa do câncer da Organização Mundial da Saúde (WHO – IARC 1993), avaliou o potencial cancerígeno de algumas micotoxinas, entre elas as aflatoxinas, as ocratoxinas, os tricotecenos, a zearalenona e as fumonisinas. Nesta avaliação, somente as aflatoxinas foram classificadas como cancerígenos para humanos (grupo 1), enquanto as ocratoxinas e as fumonisinas foram classificadas como possíveis agentes cancerígenos (grupo 2B). Tricotecenos e zearalenona, no entanto, não estão classificados como carcinógenos humanos. Daí a importância e preocupação maior para as aflatoxinas. Algumas micotoxinas são importantes em alimentos, entre elas as aflatoxinas, ocratoxina A, zearalenona, fumonisinas, patulina e verruculogeno.

Doenças em humanos e animais resultantes do consumo de micotoxinas são chamadas de micotoxicoses. Os surtos de micotoxicoses são normalmente sazonais, devido a condições climáticas particulares que favorecem o crescimento de fungos potencialmente produtores e/ou a produção de toxinas. A umidade e a temperatura são dois fatores críticos. Fatores geográficos, susceptibilidade da variedade e condições de armazenamento também interferem na produção de micotoxinas, sendo que várias toxinas podem ser produzidas simultaneamente (BULLERMAN *et al.*, 1984; VALENTE SOARES, 1987). As interações entre micotoxinas apresentam pelo menos um efeito tóxico aditivo senão sinérgico (CHAMBERLAIN *et al.*, 1993; MILLER; WILSON, 1994).

Os sinais e sintomas das micotoxicoses vão desde lesões de pele, sintomas de hepatotoxicidade, nefrotoxicidade, neurotoxicidade, hematotoxicidade ou genitotoxicidade, podendo chegar à morte. As micotoxinas podem ainda apresentar efeitos mutagênicos, teratogênicos, carcinogênicos ou imunossupressores (COLE; COX, 1981; JECFA, 1995, 1998, 2001).

O desenvolvimento de fungos não implica na presença de micotoxinas no substrato e mesmo dentro de um gênero potencialmente toxigênico, nem todas as espécies produzem toxinas (CHELKOWSKI; LEW, 1992; BULLERMAN; TSAI, 1994; CASTRO *et al.*, 1995). Também é importante esclarecer que a presença do fungo no alimento não implica, obrigatoriamente, em produção de micotoxina, assim como a toxina pode estar presente no alimento mesmo na ausência do fungo. Tanto para o crescimento do fungo quanto para a produção da toxina são necessárias condições especiais que favoreçam seu desenvolvimento e, por conseguinte, a produção da toxina (PEREIRA *et al.*, 2002).

Cerca de 25% do suprimento alimentar mundial é contaminado por micotoxinas. Entre os fatores ambientais que determinam a contaminação destacam-se o excesso de umidade no campo e no armazenamento, temperaturas extremas, estiagem, práticas de colheita e infestação por insetos (www.setor1.com.br, 2008).

A possível existência de micotoxinas nos alimentos tem sido objeto, desde sua descoberta, de uma intensa investigação com o intuito de detectá-las e prevenir sua ocorrência. No Brasil se verifica um aumento significativo na pesquisa de micotoxinas na última década. O número de artigos de pesquisa sobre micotoxinas (128 artigos) publicados por pesquisadores brasileiros entre 1991 a 2000 superou a soma de artigos (85 artigos) publicados nas três décadas anteriores (1961-1990), sendo que 30% das publicações foram sobre a ocorrência de micotoxinas em alimentos e rações (RODRIGUEZ-AMAYA; SABINO, 2002).

2.2 Aflatoxinas

As aflatoxinas são um grupo de micotoxinas estruturalmente semelhantes que contaminam grãos, leite e seus produtos. Podem ser produzidas por três espécies de *Aspergillus*, *A. flavus*, *A. parasiticus* e eventualmente, *A. nomius*. O *A. flavus* produz apenas aflatoxinas do grupo B, enquanto as outras duas espécies produzem aflatoxinas dos grupos B e G (CREPPY, 2002; BAPTISTA *et al.*, 2002). Duas outras substâncias denominadas M1 e M2 são detectadas no leite, urina e fezes de mamíferos, resultantes do metabolismo das B1 e B2 (FONSECA, 2006).

A aflatoxina B₁ é considerada atualmente como a mais tóxica e com maior poder carcinogênico dentre as micotoxinas (IARC, 1997), além de ser também a mais freqüentemente encontrada em alimentos. A sua toxicidade pode ser aguda para o fígado, e alguns dos efeitos nocivos da exposição as aflatoxinas podem ser a hepatocarcinogênese, teratogênese, mutagênese, imunossupressão, efeito anticoagulante, anemia e diminuição da fertilidade.(BUTLER, 1974).

Os efeitos da intoxicação aguda por aflatoxinas caracterizam-se por danos hepáticos, tais como ascite, degeneração hepática, proliferação do ducto biliar e necrose hepática causados em várias espécies animais (CULLEN; NEWBERNE, 1994). Estima-se que cerca de 35% dos casos de câncer humano estejam diretamente relacionados à dieta, e a presença de aflatoxinas em alimentos é considerada um fator importante na produção de câncer hepático, principalmente em países tropicais (DOLL; PETO, 1981; CALDAS *et al.*, 2002).

As aflatoxinas formam o grupo de toxinas fúngicas mais estudadas até hoje, sendo sua importância originária dos anos 60 quando uma grande mortalidade de perus na Inglaterra, denominada “doença X dos perus” foi relacionada com o farelo de amendoim contaminado importado do Brasil.

Através de estudo de prevalência concluiu-se que a contaminação de grãos por fungos aflatoxigênicos como *A. flavus* é predominante sobre o *A. parasiticus* e sua produção é favorecida por temperaturas entre 23-26°C e umidade relativa do ar acima de

75%, sendo que a umidade relativa do ar acima de 85% e temperatura em torno de 27° C favorece o crescimento e a produção de aflatoxinas. (PEREIRA *et al.*, 2002).

As aflatoxinas têm ponto de fusão alto, são estáveis ao calor sendo decompostas à temperatura de cerca de 220 °C (SCUSSEL, 1984).

2.2.1 Natureza química

As aflatoxinas são bisfuranocumarinas derivadas de um decacetídeo, pela via biosintética dos policetídeos, no qual a unidade C2 é perdida durante a formação dos anéis bisfuranos (SMITH; MOSS, 1985).

Estes compostos heterocíclicos são caracterizados como aflatoxinas AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂ e são distintos cromatograficamente por suas fluorescências azuis (B de “Blue”) para aflatoxinas AFB₁ e AFB₂ e verdes (G de “Green”) para aflatoxinas AFG₁ e AFG₂ quando observados sob luz ultravioleta a 365 nm. A Figura 1 apresenta as estruturas químicas das aflatoxinas AFB₁, AFB₂, AFM₁, AFM₂, AFG₁, AFG₂.

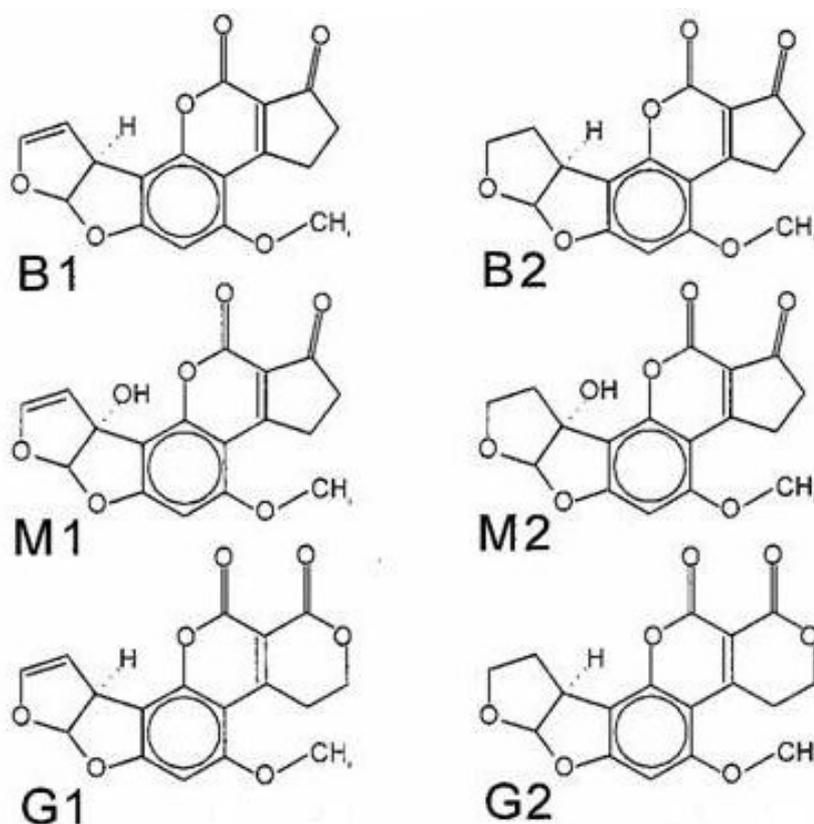


Figura 1 - Estruturas químicas das aflatoxinas AFB₁, AFB₂, AFM₁, AFM₂, AFG₁ e AFG₂.
Fonte: BROGERAS, 2006.

A série G das aflatoxinas difere quimicamente da série B pela presença de um anel 3-lactona, no lugar do anel ciclopentanona. Uma dupla ligação 8, 9 é encontrada na forma de um éter vinil no anel terminal furano nas aflatoxinas AFB₁ e AFG₁, mas não em AFB₂ e AFG₂. Essas variações que diferem as aflatoxinas estruturalmente estão associadas também a suas atividades, sendo as aflatoxinas B₁ e G₁ carcinogênicas e consideravelmente mais tóxicas que B₂ e G₂ (JAIMEZ *et al.*, 2000).

A aflatoxina M₁ é um biotransformado da aflatoxina B₁, formada através do processo de hidroxilação, produzindo assim um derivado hidrossolúvel, o que possibilita a sua excreção por fluidos corporais. É considerado um potente hepatocarcinogênico e sua contaminação em leite para consumo humano tem recebido grande importância em saúde pública.

2.2.2 Mecanismos de toxicidade da aflatoxina AFB1

A absorção das aflatoxinas ocorre no trato gastro-intestinal e sua biotransformação ocorre primariamente no fígado (OGIDO, 2003). A biotransformação da AFB1, particularmente, tem sido estudada com maior interesse, uma vez que guarda estreita relação com seus mecanismos de ação tóxica.

Existe atualmente consenso entre grande número de especialistas, de que a AFB1 é, na verdade, um pró-carcinogênico, o qual requer ativação metabólica para manifestar seus efeitos tóxicos (OLIVEIRA; GERMANO, 1997; OGIDO, 2003).

2.2.3 Carcinogenicidade para a espécie humana

Os efeitos que as aflatoxinas podem causar dependem da dose e da frequência com que são ingeridas e podem ser agudos (letais ou não) ou subagudos.

O efeito agudo é de manifestação e percepção rápidas, podendo levar o animal à morte, porque causa alterações irreversíveis, e é resultante da ingestão de doses geralmente elevadas. O efeito subagudo é o resultado da ingestão de doses não elevadas que provoca distúrbios e alterações nos órgãos do homem e dos animais, especialmente no fígado. Ambos os casos dependem da espécie animal (umas são mais susceptíveis que outras), da idade (os mais jovens são mais afetados), do estado nutricional e, também, do sexo. Sabe-se, também, que ela pode provocar cirrose, necrose do fígado, proliferação dos canais biliares, síndrome de Reye (encefalopatia com degeneração gordurosa do cérebro), hemorragias nos rins e lesões sérias na pele, pelo contato direto. Além disso, os produtos do seu metabolismo, no organismo (principalmente o 2,3 epóxi-aflatoxina), reagem com DNA e RNA, a nível celular, interferindo com o sistema imunológico da pessoa ou do animal. Isto faz com que a resistência às doenças diminua.

Além dos problemas já citados, já está comprovada a sua relação com a incidência da **hepatite B** e do "**kwashiorkor**". O "**kwashiorkor**" é uma afecção que mata milhões de crianças nos países subdesenvolvidos, e pode ser causado por uma inadequação proteico-calórica da dieta. Todavia, pesquisadores têm apresentado a hipótese de que o "**kwashiorkor**" pode ser resultado da intoxicação aguda por aflatoxinas. Todos estes problemas, obviamente, dependem da quantidade e frequência da ingestão de produtos com aflatoxina e da idade da pessoa.

KOBACAS *et al.* (2003) pesquisaram os efeitos da aflatoxina AFB1 no desenvolvimento do "**kwashiorkor**" em camundongos e concluíram que deve haver contribuição da aflatoxina B1 no desenvolvimento do kwashiorkor.

Há, também, o risco do desenvolvimento de câncer primário do fígado. A Organização Mundial da Saúde já concluiu que a aflatoxina pode desenvolver câncer primário no fígado do homem. Isto, evidentemente, não significa que, ingerindo aflatoxina, a pessoa fatalmente contrairá câncer, mas sim, a ingestão representa um risco. Em países da África e da Ásia, como Moçambique, por exemplo, onde ocorre o consumo regular de alimentos contaminados com aflatoxina, a incidência de câncer no fígado é de aproximadamente, 13 casos por 100.000 habitantes por ano (FONSECA, 2006).

O carcinoma hepatocelular (CHC) é uma das neoplasias malignas mais comuns em todo o mundo (CARREIRO, 2004), apresentando, porém, uma acentuada variação geográfica no que concerne à incidência, com predomínio em alguns países da África, Ásia e ilhas do Pacífico. A incidência do CHC é maior nos homens do que nas mulheres, predominantemente na faixa etária de 30 - 50 anos.

Aproximadamente 250.000 mortes são causadas por CHC anualmente na China e na África sub-saariana e são atribuídas aos fatores de risco entre os quais as aflatoxinas e o vírus da hepatite B (HUSSEIN; BRASEL, 2001). As diferenças extremas observadas na incidência do CHC entre os diversos países sugerem o envolvimento de fatores ambientais em sua etiologia (HARRIS, 1991).

2.2.4 Aflatoxinas em alimentos

A exposição humana a micotoxinas pelo consumo de alimento contaminado é questão de saúde pública no mundo todo. Programas de monitoramento dos níveis de contaminação de alimentos por micotoxinas são essenciais para estabelecer prioridades em ações de vigilância sanitária. No Brasil, as aflatoxinas são as únicas micotoxinas cujos níveis máximos em alimentos estão previstos na legislação. Este limite é comparável aos estabelecidos por outros países e recomendado pela Organização Mundial da Saúde e pela Organização para Alimentação e Agricultura (CALDAS *et al.*, 2002).

Níveis elevados de contaminação têm sido encontrados em amendoim e derivados. Por ultrapassarem os níveis máximos permitidos pela legislação brasileira, podem significar fator de risco para a população que os consome regularmente.

A alta incidência de aflatoxinas em amendoim e outros produtos agrícolas encontrada no Brasil se deve principalmente às tradicionais práticas de colheita, secagem e armazenamento utilizado pelos produtores. A contaminação por aflatoxinas continua um problema sério no Brasil principalmente devido às condições climáticas (umidade e altas temperaturas), às práticas de agricultura e as condições de estocagem.

Condições de alta umidade e temperatura aumentam a probabilidade de desenvolvimento do *Aspergillus* e produção de aflatoxinas, situação agravada no período chuvoso. A biodeterioração de sementes e grãos, no campo e durante o armazenamento, limita o acondicionamento seguro e o valor nutricional desses alimentos.

Os fungos e insetos são provavelmente os mais importantes organismos que provocam deterioração. Eles podem afetar cor, odor, sabor, valor nutricional, bem como produzir micotoxinas, como as aflatoxinas (SABINO, 1996).

A presença de aflatoxinas em alimentos tem sido reportada no mundo todo, principalmente em amendoim, nozes, milho, frutas secas, temperos, figo, cacau, arroz e algodão (JECFA, 1998).

2.2.5 Legislação sobre aflatoxinas

Desde a descoberta das aflatoxinas, em 1960, diversos países adotaram limites de tolerância para essas toxinas em produtos destinados ao consumo humano. O Brasil, com base nos conhecimentos então disponíveis, estabeleceu, em 1977, o limite de $30\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ para a soma das frações B1 e G1 em qualquer tipo de alimento, porém, a Portaria nº 183 de 1996 do Ministério da Agricultura e do Abastecimento estabelece um limite de $20\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ para Aflatoxinas AFB₁ + AFB₂ + AFG₁ + AFG₂ e, um limite máximo de $50\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ para ração animal. (BRASIL, 1977, 1996).

A tabela 1 apresenta os limites máximos para aflatoxinas permitidos em alimentos para consumo humano em vários países.

Tabela 1 - Níveis máximos permitidos para aflatoxinas em alimentos para consumo humano.

PAÍS	NÍVEL MÁXIMO ($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)	ALIMENTO	FONTE
União Européia	2 (B1); 4 (total)	Cereais e produtos processados	(3)
Austrália	5 (total)	Todos os alimentos	
Brasil	20 (total)	Amendoim e derivados de milho	(1)
Índia	30 (total)	Todos os alimentos	
Japão	10 (total)	Todos os alimentos	
Singapura	0	Todos os alimentos	
África do Sul	5 (B1) 10 (total)	Todos os alimentos	
Suécia	5 (Total)	Todos os alimentos	
Estados Unidos	20 (total)	Todos os alimentos	(2)
Alemanha	2 (B 1); 4 (Total)	Todos os alimentos	
	0,05 (Total)	Alimentos infantis	

Fonte: FONSECA (2006)

- (1) Resolução RDC nº 274, da ANVISA, de 15 de outubro de 2002.
Portaria nº.183 de 21 de março de 1996 Ministério da Agricultura
(2) FAO: WORLDWIDE REGULATIONS FOR MYCOTOXINS 1995
(3) Directiva n.º 2005/9/CE de 28 de Janeiro de 2003.

Desconhece-se, contudo, se estes valores ainda representam ou não risco significativo para o desenvolvimento do câncer hepático. Pelas sérias implicações para a saúde humana e animal que a presença de micotoxinas em grãos e outros gêneros alimentícios possuem, muitos países já elaboraram leis estipulando as quantidades máximas de micotoxinas permissíveis em alimentos e rações (FONSECA, 2006).

2.3 Castanha-do-brasil

Planta nativa da Amazônia, a castanheira está entre as mais altas da região, podendo atingir facilmente 50 metros. A maioria das árvores tem uma idade estimada entre 800 e 1.200 anos. O ouriço, que pesa aproximadamente um quilo e pode conter de 15 a 24 sementes, é como se chama o fruto da castanha (www.folhadoamapá.com.br, 2005).

A castanheira (*Bertholletia excelsa* H.B.K) é conhecida também como castanha-do-brasil e castanha-do-Pará e Brazil nut ou Para nut. Na 3ª Convenção mundial de Frutos Secos ocorrida 1992 em Manaus, com a participação de mais de 300 empresários, convencionou-se chamá-la de castanha-da-amazônia (LOCATELLI, 2006).

A castanha-do-brasil é considerada uma das maiores riquezas na região dos castanhais amazônicos, é cada vez mais valorizada no mercado por seu alto valor nutritivo e sua relação com a conservação ambiental; é a única semente comercializada internacionalmente que tem que ser coletada na floresta. Tem sua origem na região amazônica brasileira - basicamente no Pará, mas encontra-se também nos Estados de Rondônia, Acre, Amazonas e norte de Goiás e Mato Grosso. Mas, também é encontrada na Amazônia peruana e boliviana. Sua amêndoa, além de ser muito calórica, é rica em selênio, um metal de grande importância à saúde do homem. Quando ele atua em conjunto com a vitamina E, as células de todo o organismo ficam protegidas contra danos oxidativos. A castanha-do-brasil possui também cálcio, fósforo, magnésio, potássio, cobre e as vitaminas A, B1, B2 e C, além de proteínas. O consumo do produto é feito de forma **In Natura** e através de derivados, como biscoitos, farinha, paçoca e óleo (www.folhadoamapá.com.br, 2005).

Altamente nutritiva, a castanha tem tanto valor protéico e calorias que é considerada por muitos como uma carne vegetal. Possui de 12 a 17% de proteínas nas castanhas e 46% de proteínas na farinha sem gordura, enquanto a carne de gado tem de 17 a 22% de proteínas. A proteína da castanha é quase equivalente à do leite da vaca, contendo aminoácidos completos. A proteína contida em apenas duas amêndoas equivale à de um ovo de galinha

A castanheira apresenta várias aplicações: a) "ouriços" como combustível ou na confecção de objetos, mas o maior valor é a amêndoa, alimento rico em proteínas, lipídios e vitaminas podendo ser consumida ou usada para extração de óleo; b) do resíduo da extração do óleo obtém-se torta ou farelo usada como misturas em farinhas ou rações; c) "leite" de castanha, que é de grande valor na culinária regional; c) madeira com boas propriedades, sendo indicada para reflorestamento e empregada tanto na construção civil como naval.

O beneficiamento pode ou não ser feito. As castanhas com casca podem ser vendidas desidratadas ou semi desidratadas ou ainda a granel (sem beneficiamento). As castanhas sem casca (amêndoas) são obtidas quebrando-se manualmente e podem ser vendidas com ou sem película. O armazenamento e a conservação da castanha-do-pará constituem os problemas mais importantes para sua comercialização. Quando os "ouriços" amadurecem (de dezembro a março), eles despencam do alto da castanheira, devendo ser apanhados no chão. Por seu peso e pela altura das castanheiras, esses frutos, muitas vezes, alcançam o chão com tal força e velocidade que, dependendo do tipo de terreno, afundam no solo (LOCATELLI, 2006).

2.3.1 Importância econômica

A amêndoa da castanha-do-brasil vem ocupando, desde 1911, um lugar de destaque na pauta das exportações de produtos da Floresta Amazônica. Após a decadência da borracha, a castanha-do-Brasil passou a constituir o principal produto extrativo para exportação da Região Norte do Brasil, na categoria de produtos básicos. A castanheira-do-Brasil é uma das mais importantes árvores amazônicas conhecidas e sua exploração tem um papel fundamental na organização sócio-econômica de grandes áreas extrativistas da floresta. A colheita, que ocorre de janeiro a julho, e o beneficiamento das sementes constituem importante atividade econômica das populações amazônicas. Em alguns países da Amazônia central, como a Bolívia, a amêndoa da castanheira é a matéria-prima principal para as indústrias de beneficiamento, representando em até 70% da economia total das regiões produtoras (Folha do Amapá, 2005).

2.3.2 Realidade da produção hoje

No âmbito das exportações, a amêndoa de castanha-do-brasil sofreu uma retração significativa. O balanço comparativo ente 2000 e 2001 registrou uma queda nas exportações brasileiras de castanha com casca, que chegou perto de 60% (FARIA, 2002).

Uma das explicações para a crise provocada pela queda das exportações de castanha-do-brasil nos estados da Amazônia foi o ingresso da Bolívia no mercado internacional em 1996, e a alta incidência de aflatoxinas registrada nas castanhas desse país e também do Brasil. Até 1990 a maior parte da produção da Bolívia era comercializada pelo Acre e chegava a Belém, onde era beneficiada, industrializada e exportada. A importação de castanha pela Bolívia se deu principalmente, devido aos subsídios financiados pelo Banco Mundial e à baixa tributação, provocando maior oferta do produto com preços inferiores aos praticados pelo mercado, provocando uma retração do exportador brasileiro, que preferiu aguardar o fim do estoque boliviano para poder vender seus produtos.

A crise ainda pode ser justificada pelas barreiras não-tarifárias impostas pela Comunidade Européia que, desde 1998, reduziu o limite máximo de aflatoxinas totais para 4µg/kg em castanha-do-brasil e rejeitou lotes contaminados vindos do Brasil. Além disso, o mercado interno absorve apenas 10% da produção de castanha-do-brasil, devido a baixa qualidade do produto que chega nas redes de supermercados e também pelo desconhecimento do valor nutritivo e protéico da castanha (VILHENA, 2004).

A maioria dos países desenvolvidos não autoriza importações de produtos com quantidades acima dos limites especificados. Por isso, as micotoxinas têm também implicações para o comércio internacional.

No Brasil, as aflatoxinas são as únicas micotoxinas cujos níveis máximos em alimentos estão previstos na legislação. O Ministério da Saúde, através da Resolução RDC n. 274, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), de 15 de outubro de 2002, estabelece o limite de 20µg/ kg para aflatoxinas totais em amendoim, pasta de amendoim e milho, e 0,5 e 5,0µg/ L para aflatoxina M₁ no leite fluido e em pó respectivamente (BRASIL, 2002). Este limite é comparável aos estabelecidos por outros países e recomendado pela Organização Mundial da Saúde e pela Organização para Alimentação e Agricultura (FONSECA, 2004).

2.4 Amostragem

O objetivo da amostragem é obter porção representativa do lote de grãos, com o intuito de indicar sua natureza, qualidade e tipo. Essa amostra deverá ter características similares, em todos os aspectos, às médias do lote do qual foi retirada, pois a quantidade de grãos a ser analisada é, em geral, muito pequena em relação ao tamanho do lote que se supõe representar (CASEMG, 2005).

A contaminação de produtos agrícolas com micotoxinas não está presente de maneira uniforme no mesmo lote. Por esta razão existe variação na determinação de micotoxinas de amostras do mesmo lote, fato este que dificulta a concentração atual destas em um mesmo lote (PIEDEDE *et al.* 2002). Pelo fato das partículas contaminadas não serem distribuídas de maneira uniforme por todo o lote, as amostras devem ser resultado de um acúmulo de várias pequenas porções tomadas de diferentes locais por todo o lote.

O procedimento para teste de micotoxinas geralmente consiste de 4 passos conforme preconizado por WHITAKER, SLATE e JOHANSON (2005): colheita da amostra, moagem, sub-amostragem da amostra moída e análise.

Para determinação das aflatoxinas nos alimentos é de suma importância a correta colheita da amostra do substrato a ser examinado (MALLMAN; SANTÚRIO e WENTZ, 1994). As amostras deverão ser tomadas aleatoriamente da quantidade total do substrato, isto é, após sub-amostragem de todo o lote de grãos ou rações estas são misturadas e retirada uma amostra para análise (FONSECA, 1991).

2.5 Métodos de Análise de Micotoxinas em Alimentos

Vários métodos têm sido usados para análise de aflatoxinas, mas a análise individual de micotoxinas é um trabalho difícil, pois é comum uma toxina estar presente em concentrações mínimas em uma matriz orgânica complexa. (SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2002).

As metodologias analíticas para a determinação de micotoxinas em alimentos geralmente são compostas pelas etapas de extração, limpeza, separação, detecção, quantificação e confirmação (SCOTT, 1991). As etapas vão diferir dependendo dos equipamentos, reagentes disponíveis e dos requerimentos analíticos (sensibilidade, exatidão, precisão, tempo de análise e custo).

O desempenho dos métodos analíticos também pode ser influenciado pela matriz do alimento, ou seja, pela composição química do alimento. Portanto, um grande número de métodos para triagem, inspeção e controle de micotoxinas em alimentos tem sido proposto. Métodos para determinação de aflatoxinas, esterigmatocistina, fumonisinas, patulina, ocratoxina A, tricotecenos e zearalenona (AOAC, 1997) em alguns tipos de alimentos já foram validados interlaboratorialmente em estudos colaborativos promovidos por organizações como AOAC International (Association of Official Analytical Chemists), AOCS (American Oil Chemists' Society), AACC (American Association of Cereal Chemists) e IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry).

Tabela 2 - Aflatoxinas – Características físico-químicas.

<i>Micotoxina</i>	<i>Fórmula Molecular</i>	<i>Peso Molecular (g·mol⁻¹)</i>	<i>λ Máx. (nm)</i>
Aflatoxina B ₁	C ₁₇ H ₁₂ O ₆	312,06	Absorção 223, 265, 362 (etanol) Emissão 425
Aflatoxina B ₂	C ₁₇ H ₁₄ O ₆	314,08	Absorção 220, 265, 363 (etanol) Emissão 425
Aflatoxina G ₁	C ₁₇ H ₁₂ O ₇	328,06	Absorção 243, 257, 264 (etanol) Emissão 450
Aflatoxina B ₂	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	330,07	Absorção 217, 245, 265 (etanol) Emissão 450

Fontes: COLE; COX (1981), SCOTT (1993).

Como as micotoxinas são um grupo de substâncias que apresentam certa variabilidade nas características físico-químicas (Tabela 2), o desenvolvimento de métodos para a determinação simultânea tem sido um desafio para os analistas.

2.5.1 Extração

A eficiência na extração da micotoxina depende do bom contato interno entre o solvente e a amostra. Muitas micotoxinas são facilmente solúveis em vários solventes orgânicos, mas poucas são solúveis em água. A extração é frequentemente aumentada pela água, que no caso de cereais, por exemplo, “dilata e amolece” as células, facilitando a penetração e a extração pelos solventes orgânicos (SABINO, 1996).

As aflatoxinas são solúveis em solventes levemente polares e insolúveis em solventes completamente apolares, normalmente são extraídas usando-se uma mistura, sob agitação de solventes orgânicos entre os quais metanol, acetonitrila, acetato de etila, acetona, clorofórmio e diclorometano sob agitação. Dentre estes os mais aceitos como solventes extratores são, em geral o clorofórmio e o diclorometano, exceção feita aos métodos imunoquímicos, que não são sensíveis aos solventes clorados (BETINA, 1985; SCOTT, 1991; JAIMEZ, 2000).

O objetivo desta etapa é a separação da micotoxina de interesse dos demais componentes da amostra através da sua solubilização com um solvente adequado. A escolha do solvente extrator dependerá também do tipo de matriz e do sistema de limpeza a ser utilizado posteriormente (VAN EGMOND, 1996).

2.5.2 Limpeza

Na etapa de extração várias substâncias presentes na matriz são co-extraídas, portanto posteriormente é necessária uma etapa de limpeza para remoção dos possíveis interferentes. Os principais procedimentos para limpeza são a partição líquido-líquido, a precipitação com adição de sais metálicos, o uso de colunas de extração em fase sólida e as colunas de imunoafinidade (BETINA, 1985; GILBERT, 1993; SCOTT, 1995). Quando os imunoensaios são utilizados para a determinação da micotoxina geralmente esta etapa não é necessária, porém quando são empregados métodos físico-químicos, os procedimentos são extensivos (SCOTT, 1993).

A limpeza do extrato para análise de aflatoxinas AFB₁, AFB₂, AFG₁ e AFG₂, ocratoxina A e zearalenona pode incluir colunas de sílica e/ou partições utilizando combinações de solventes, com ou sem desengorduramento prévio. Amostras ricas em lipídios exigem normalmente a retirada dos mesmos. Isso pode ser feito antes, durante ou após a extração para evitar a formação de emulsão. Hidrocarbonetos alifáticos como o hexano ou o isoctano são solventes adequados para tal (BETINA, 1985; VALENTE SOARES, 1987; SCOTT, 1991; SABINO, 19956).

2.5.3 Detecção e quantificação

As técnicas mais utilizadas para separação de micotoxinas são basicamente cromatográficas (camada delgada, líquida de alta eficiência e gasosa) e imunoensaios. Destas, a cromatografia em camada delgada é a mais simples, mas como para todas as outras técnicas físico-químicas, as etapas de amostragem, extração e limpeza são fundamentais, tendo grande participação na exatidão e precisão dos resultados (WHITAKER *et al.*, 1998).

No caso da análise de micotoxinas, essencialmente podemos empregar métodos de triagem ou métodos quantitativos. Os métodos de triagem foram desenvolvidos devido à necessidade de rapidez de resultados, amostras negativas podem ser liberadas, eliminando-se os procedimentos de análise quantitativa e de confirmação da micotoxina.

Os métodos de triagem não quantitativos, com o objetivo apenas de indicar preliminarmente a presença de micotoxinas têm sido realizados com minicolunas,

Cromatografia em Camada Delgada (CCD) e ensaios imunológicos. As minicolunas e ensaios imunológicos têm a desvantagem de focar uma única toxina de cada vez. As minicolunas exploram a fluorescência nativa de algumas toxinas e são utilizadas principalmente para aflatoxinas, apesar do emprego de minicolunas também para ocratoxina A e zearalenona. O limite de detecção fica entre 10-15 ng/g, porém depende também do tratamento da amostra pré-coluna (HOLADAY, 1981). A cromatografia em camada delgada tem sido freqüentemente empregada em métodos de triagem e também na separação para a quantificação de micotoxinas e vários procedimentos têm sido propostos para análises multi-toxinas (VALENTE-SOARES; RODRIGUEZ-AMAYA, 1989). Os ensaios imunológicos são de simples aplicação, extremamente rápidos e específicos, porém alguns detectam a micotoxina indiretamente e são mais propensos a erros (SCOTT, 1995; WHITAKER *et al.*, 1994). Entre os métodos imunológicos utilizados na dosagem de aflatoxinas os mais comuns são o ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) aprovado como método oficial da AOAC (Assotiation of Official Analytical Chemist's) para triagem de aflatoxinas (SCOTT, 1991), RIA (radio-imuno-assay) e IAC (immunoaffinity chromatography). As duas técnicas RIA e ELISA, são baseadas na competição de ligação entre a toxina não marcada proveniente da amostra e a toxina marcada sobre os locais específicos do anticorpo; a imunoafinidade é uma técnica cromatográfica baseada diretamente na ligação antígeno (toxina) com o anticorpo fixado numa coluna (FREMY e CHU, 1989).

Esses ensaios utilizam anticorpos específicos para isolar e/ou detectar micotoxinas nos alimentos. A base destes métodos é a interação entre antígenos (micotoxinas) e anticorpos específicos, produzidos num organismo animal, geralmente o coelho, pelos linfócitos B (BERGERE, 1991). Segundo SCOTT (1991), este método tem sido posto em causa devido a possíveis interferências de outros componentes da amostra e variabilidade devida às condições do teste. Outro problema possível é a especificidade e seletividade desse método (AMADO, 1999). De fato, muitas micotoxinas têm estruturas químicas estreitamente afins e por isso, existe a possibilidade de poderem ocorrer reações cruzadas entre os anticorpos produzidos para uma determinada aflatoxina, contra outras toxinas que podem aparecer ao mesmo tempo, dentro do mesmo grupo (LINO *et al.*, 1998). Em alguns dos equipamentos comerciais para aflatoxinas, pode acontecer que o anticorpo mostre uma certa reatividade cruzada com outras aflatoxinas. Daqui que o resultado considerado positivo possa não dar informação seletiva no que se refere à concentração das aflatoxinas separadas. VAN PETEGHEM (1992) refere que o ELISA pode conduzir a resultados falso-positivos, devido quer à sua sensibilidade para com os compostos interferentes da matriz quer, por vezes, à "deficiente" especificidade dos anticorpos.

A cromatografia em camada delgada é a mais simples e mais econômica das técnicas cromatográficas quando se pretende separação rápida e identificação visual. Tradicionalmente é um método de análise qualitativa, mas pode ser utilizada como um método quantitativo de análise, utilizando-se a técnica visual de UV, que consiste em determinar a área e intensidade da mancha e a fluorescência, para substâncias que apresentarem estas características (COLLINS; BRAGA; BONATO, 1995).

Um parâmetro freqüentemente usado em cromatografia é o "índice de retenção" de um composto (Rf). Na cromatografia de camada fina, o Rf é função do tipo de suporte (fase fixa) empregado e do eluente. Ele é definido como a razão entre a distância percorrida pela mancha do componente e a distância percorrida pelo eluente.

Portanto:

$$R_f = d_c / d_s$$

Onde:

d_c = distância percorrida pelo componentes da mistura.

d_s = distância percorrida pelo eluente.

Quando as condições de medida forem completamente especificadas, o valor de Rf é constante para qualquer composto dado e correspondente a uma propriedade física. Este valor deve apenas ser tomado como guia, já que existem vários compostos com o mesmo Rf.

Sob uma série de condições estabelecidas para a cromatografia de camada delgada, um determinado composto percorrerá sempre uma distância fixa relativa à distância percorrida pelo solvente. Estas condições são:

1- sistema de solvente utilizado;

2- adsorvente usado;

3- espessura da camada de adsorvente;

4- quantidade relativa de material (FONSECA, 2008).

Para a determinação quantitativa de micotoxinas, a cromatografia em camada delgada tem sido muito utilizada (CROSBY, 1984), mas está sendo superada pela cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detecção por ultravioleta ou fluorescência, a cromatografia gasosa com detecção por captura de elétrons, ionização de chama ou espectrometria de massas (EM) e a cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por espectrometria de massas que facilitam a confirmação de resultados analíticos (GILBERT, 1993).

2.5.4 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Entre os métodos de análise, a cromatografia ocupa um lugar de destaque devido a sua facilidade em efetuar a separação, identificação e quantificação das espécies, por si mesma ou em conjunto com outras técnicas instrumentais de análise, como, por exemplo, a espectrometria de massas (COLLINS; BRAGA; BONATO, 1995).

A cromatografia é um método físico-químico de separação. Ela está fundamentada na migração diferencial dos componentes de uma mistura, que ocorre devido a diferentes interações entre duas fases imiscíveis, a fase móvel e a fase estacionária. A grande variedade de combinações entre fases móveis estacionárias torna-a uma técnica extremamente versátil e de grande aplicação. A principal característica da CLAE é a utilização de fases estacionárias com micropartículas (10, 5 ou 3 μ) esféricas, de preferência. Estas fases, por serem muito menos permeáveis, tornaram necessária a utilização de bombas para a eluição da fase móvel. A utilização destas novas fases estacionárias, associada ao desenvolvimento de instrumentação, levou esta técnica a uma melhor performance em termos de resolução, quantificação e detecção em um menor tempo de análise (CASS e DEGANI, 2001).

Várias pesquisas têm avaliado a fase normal da CLAE para análise de aflatoxinas, porém, outras investigações têm usado a fase reversa da CLAE que produz maior reprodutibilidade nas separações por que o sistema de solventes não é afetado por mudanças ambientais (BEEBE, 1978).

Uma pesquisa sobre o uso de um sistema automático utilizando limpeza em colunas de imunoafinidade e CLAE/fluorescência para a análise de aflatoxina B1 e fumonisina B1 confirmou a reprodutibilidade da técnica (JORDAN *et al.*, 1994).

DETECTOR DE FLUORESCÊNCIA X DETECTORES POR ABSORBÂNCIA NO ULTRAVIOLETA E NO VISÍVEL (UV)

A espectroscopia de fluorescência é um método de detecção dos mais sensíveis da atualidade, específico para compostos que fluorescem. (COLLINS; BRAGA; BONATO, 1995). O funcionamento desse tipo de detector se dá através da emissão de energia fluorescente por um soluto que foi excitado por radiação UV. Baseando-se no fato de que, quando uma molécula absorve luz e um elétron é promovido a um estado de maior energia, existe uma série de caminhos pelos quais esta energia pode ser dissipada. Normalmente, esta energia é perdida por sua transferência às moléculas vizinhas. Entretanto, algumas moléculas podem perder apenas parte da energia indo ao mais baixo nível vibracional do estado excitado. A energia restante pode ser perdida pela emissão de um fóton, sendo este processo denominado de fluorescência. É um detector seletivo, para moléculas que fluorescem, ou seja, sistemas aromáticos policíclicos ou que contenham duplas ligações conjugadas múltiplas. Devido ao seu princípio de operação (emissão de luz), é muito mais sensível e seletivo que o UV (absorção) (CASS e DEGANI, 2001). Em boas condições é possível detectar quantidades da ordem de picogramas (10^{-12} g), o que é comparável aos detectores por captura de elétrons em Cromatografia Gasosa. Uma alta intensidade de fluorescência é esperada de compostos que sejam conjugados simetricamente ou que não podem produzir estruturas fortemente iônicas. A fase móvel empregada nos detectores de fluorescência deve ser cuidadosamente selecionada, pois a intensidade de emissão depende do meio em que se encontra a amostra. Isto dificulta algumas de suas aplicações, tais como análise quantitativa e eluição por gradiente, nas quais deve-se selecionar os componentes da fase móvel para não atrapalhar a fluorescência (COLLINS; BRAGA; BONATO, 1995). Podem ser feitas reações de derivação pré ou pós-coluna, para que o analito se torne fluorescente (CASS e DEGANI, 2001).

Nos detectores espectrofotométricos (**UV - detectores por absorbância no ultravioleta e no visível**) o seu funcionamento baseia-se na absorbância de luz por parte da amostra ao passar através dela qualquer radiação eletromagnética; normalmente isto ocorre no ultravioleta até o infravermelho, em um dado comprimento de onda. Existem dois tipos de detectores de luz ultravioleta: o de comprimento de onda variável (espectrofotômetros), que não só é de aplicação mais variada e sensível, mas também é mais caro, e o chamado fotométrico que funciona com um ou dois comprimentos de onda fixos. Este último é sensível, econômico e mais que suficiente para se conseguir bons resultados com todos os compostos que absorvem luz no comprimento de onda em que ele funciona. Este tipo de detector é normalmente insensível a variações de vazão e temperatura. A maioria dos detectores de comprimento de onda fixo, oferecidos no mercado, operam em um comprimento de onda de 254 nm e um de 280 nm, resultado da absorbância de luz em 254 nm e da emissão de luz em 280 nm por uma substância fosforescente. Em ótimas condições, pode-se atingir sensibilidades de até 0,001 unidades de absorbância e, se o composto absorve intensamente na faixa de UV, é possível detectar quantidades de amostras da ordem de nanogramas (10^{-9} g) (COLLINS; BRAGA; BONATO, 1995).

2.5.5 Confirmação

A etapa final da determinação de micotoxinas é a confirmação. A confirmação da identidade pode ser realizada com derivações químicas, espectrometria de massas ou infravermelho. Outras técnicas como o uso de colunas de imunoafinidade na limpeza ou detecção por fluorescência já são consideradas confirmatórias (DE RUIG *et al.*, 1989; SCOTT, 1991; VALENTE SOARES, 2001).

A separação cromatográfica em fase reversa e tratamento pré-coluna com ácido trifluoroacético ou derivação pós-coluna com iodo tem sido utilizadas para aumentar a fluorescência de aflatoxinas em fases móveis aquosas (PESTKA, 1988; JAIMEZ, 2000). Enquanto na cromatografia em fase normal a fase estacionária é mais polar que a fase móvel, no modo reverso a fase móvel é mais polar que a fase estacionária. A cromatografia em fase reversa é a mais utilizada em HPLC, uma vez que permite a separação de uma grande variedade de solutos e o uso de fases móveis aquosas. A fase móvel mais comumente utilizada é uma mistura de acetonitrila/água, sendo a acetonitrila, quando necessário, substituída por metanol ou tetrahidrofurano (THF). O uso de apenas esses três solventes deve-se à pequena quantidade de solventes orgânicos miscíveis com água (CASS e DEGANI, 2001). As aflatoxinas AFB₁ e AFG₁ dão origem às estruturas AFB_{2a} e AFG_{2a}, quando derivatizadas com o ácido trifluoroacético, conforme demonstrado na figura 2.

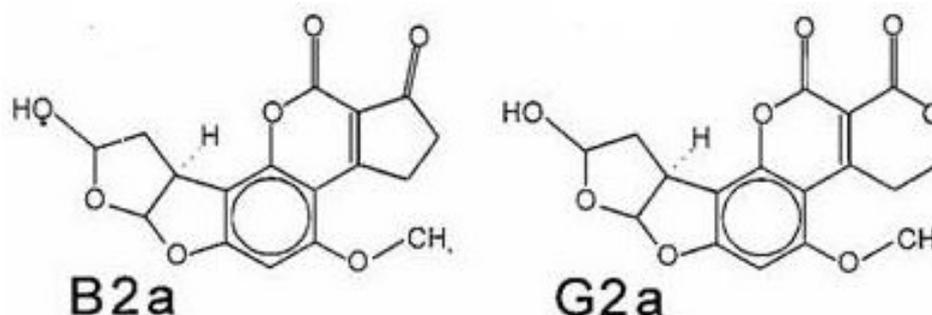


Figura 2- Estruturas químicas das aflatoxinas AFB₁ e AFG₁ derivatizadas.
Fonte: BROGERAS, 2006.

2.6 Ocorrência das Aflatoxinas em Alimentos

No Brasil, as aflatoxinas têm sido relatadas principalmente em amendoim (OLIVEIRA *et al.*, 1991; COLAÇO *et al.*, 1994; ARAÚJO *et al.*, 1994; MARTINS-MACIEL *et al.*, 1996), mas vários trabalhos descrevem também contaminação de milho no Sudeste do Brasil (SABINO *et al.*, 1989; VALENTE-SOARES; RODRIGUEZ-AMAYA, 1989; VALENTE-SOARES; FURLANI, 1992; GLÓRIA *et al.*, 1997). A contaminação de milho por aflatoxinas tem sido descrita principalmente para milho em grãos e com baixa frequência.

Entretanto, alguns estudos indicam uma maior incidência, HENNIGEN e DICK (1995) relataram que 35% das amostras de milho analisadas apresentaram contaminação por aflatoxinas no Estado do Rio Grande do Sul. Contaminação por aflatoxinas foi encontrada em 60 das 110 amostras de milho recém-colhido analisadas (54,5%) por MACHINSKI JR *et al.* (2001) no Estado de São Paulo, com concentrações de aflatoxina B1 variando de 6 a 1600 µg·kg⁻¹. CORRÊA *et al.* (2000) encontraram 56% das 600 amostras de milho provenientes do Paraná, Goiás, Mato Grosso do Sul, da Argentina e do Paraguai contaminadas com aflatoxinas. Em outro estudo, 98% das 264 amostras de milho em grão de vários estados brasileiros estavam contaminadas por aflatoxinas (AMORIM *et al.*, 2000). Alta frequência de contaminação (60% das amostras) também foi encontrada por CALDAS *et al.* (2002), apesar do número limitado de amostras analisadas (5 amostras).

PIEIDADE *et al.* (2002) pesquisaram a distribuição em frações de milho segregadas visualmente por defeitos e concluíram que a fração de grãos não sadios contribuiu com 84% da contaminação estimada das amostras e que a separação dos grãos não sadios poderá favorecer uma redução na contaminação dos lotes de milho.

GLÓRIA *et al.* (2004) analisaram a distribuição da contaminação com aflatoxinas em amostras de milho entre quatro frações. As frações que continham grãos ardidos, mofados, queimados e brotados continham níveis mais altos de aflatoxinas.

Um estudo colaborativo foi realizado por AOAC / IUPAC em 1994 para avaliar a eficácia de uma coluna para a determinação de aflatoxinas. A amostra é extraída com acetonitrila-água (9 + 1), o extrato é filtrado, e o filtrado é passada através da coluna. As aflatoxinas da fase eluída são determinadas por cromatografia líquida de fase reversa após derivatização com ácido trifluoracético. Amostras de milho, amêndoas, castanhas-do-brasil, amendoim, nozes e pistáchios com total aflatoxinas em 5, 10, 20, e 30 ng·g⁻¹ foram enviadas a 12 colaboradores nos Estados Unidos, Dinamarca, França, Japão e Suíça. Onze colaboradores concluíram o estudo. A recuperação do total de aflatoxinas em cada nível de contaminação para as várias amostras (excluindo as castanhas-do-brasil em 5 ng·g⁻¹), foram 93, 97, 95, e 95%, para AFG₁, AFB₁, AFG₂ e AFB₂, respectivamente, o Desvio Padrão Relativo (DPR) variou de 6,0 a 23,2%. O uso de coluna multifuncional associado à cromatografia líquida foi, então, adotado como método oficial para determinação de aflatoxinas em milho, amêndoas, castanhas-do-brasil, amendoim, nozes e pistáchios, como uma primeira ação da AOAC International.

FURLANI e SOARES (1996) analisaram 100 amostras de frutos de casca rija em relação as aflatoxinas AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂, ocratoxina A, zearalenona e com o objetivo de verificar a situação deste tipo de produtos oferecidos aos consumidores na cidade de Campinas, Estado de São Paulo. As amostras foram adquiridas embaladas industrialmente e também em lojas de varejo nos anos de 1991 e 1995. Em 1991, as amostras (56) foram compostas de castanhas-de-caju (11), avelãs (4), e pecans (12) e em 1995, as amostras foram compostas de castanhas-de-caju (17), amêndoas (10), nozes de macadâmia (3), castanhas-do-brasil (9), nozes (3), avelãs (4), pecans (2) e pistáchios (6). A análise multitoxina em cromatografia de camada delgada foi o método empregado para a detecção simultânea das micotoxinas. A ocratoxina A, zearalenona e esterigmatocistina não foram detectados nas amostras. Aflatoxinas foram encontradas em duas amostras, uma de castanha-de-caju com níveis de 10 ng·g⁻¹ de aflatoxina AFB₁, e 15 ng·g⁻¹ de aflatoxina AFG₁, e outra de castanha-do-brasil com 26 ng·g⁻¹ de aflatoxina AFB₁.

MALLMANN *et al* (1998) em um trabalho que preconiza uma purificação automatizada, seguida de derivatização com ácido trifluoracético (TFA) e quantificação por CLAE utilizando detetor de fluorescência para aflatoxinas em nozes, castanhas e frutos secos encontraram tempos de eluição para as aflatoxinas AFG₁, AFB₁, AFG₂ e AFB₂ de 5, 7, 12 e 17 minutos, além de limites de quantificação (LQ) de 0,7; 0,4 ; 1,3 e 0,4 µg·kg⁻¹ de amostra e valores de recuperação de 101,2; 93,2; 58,9 e 63,2%, respectivamente. MALLMANN *et al* (1998) também obtiveram uma curva de calibração com coeficientes de correlação variando entre 0,9940 e 0,9991.

FREIRE *et al* (2000) determinaram a população fúngica presente em amostras de castanha-do-Brasil, o acompanhamento foi realizado desde o campo até o armazenamento. Foram determinadas também a presença de aflatoxinas nas amostras e sua concentração. *A. flavus* foi a espécie dominante seguida por *A. niger*. *P. citrinum* e *P. glabrum* foram os únicos *Penicilliums* isolados. As aflatoxinas foram extraídas em fase sólida e quantificadas por CCD. Foram detectadas as aflatoxinas AFB₁ e AFB₂ em concentrações de 27,1 e 2,1 µg·kg⁻¹, respectivamente.

A metodologia oficial da AOAC (AOAC 994.08 - 2005) para quantificação de aflatoxinas em castanha-do-brasil, que é determinada por extração em fase sólida e quantificação por CLAE, indica valores de recuperação de 82,0; 117,0; 125,0 e 90,5% e

precisão (RSDr) de 13,0; 9,0; 16,0 e 10%, respectivamente para, AFG₁, AFB₁, AFG₂ e AFB₂.

XAVIER e SCUSSEL (2008) desenvolveram uma metodologia através de LC-MS/MS para determinação simultânea das aflatoxinas AFB₁, AFB₂, AFG₁ e AFG₂ em castanha-do-brasil. A separação das toxinas foi realizada em uma coluna C8, utilizando-se como fase móvel água: metanol (25 mM acetato de amônio) em modo gradiente, com um tempo total de execução de 5,0 min. A toxina foi extraída com acetonitrila: água (80: 20) e não foi necessário nenhum clean-up para as amostras. Os valores de LD e LQ encontrados para AFB₁, AFB₂, AFG₁ e AFG₂ foram de 0,04; 0,045; 0,050 e 0,06 µg·kg⁻¹, e 0,08; 0,09; 0,10 0,12 µg·kg⁻¹, respectivamente. A recuperação variou entre 92 e 100%. As amostras apresentaram nível de contaminação variando entre 1,2 e 11,5 µg·kg⁻¹.

2.7 Validação

A necessidade de se mostrar a qualidade de medições químicas, através de sua comparabilidade, rastreabilidade e confiabilidade, está sendo cada vez mais reconhecida e exigida. Dados analíticos não confiáveis podem conduzir a decisões desastrosas e prejuízos financeiros irreparáveis. Para garantir que um novo método analítico gere informações confiáveis e interpretáveis sobre a amostra, ele deve sofrer uma avaliação denominada validação. A validação de um método é um processo contínuo que começa no planejamento da estratégia analítica e continua ao longo de todo o seu desenvolvimento e transferência. Um processo de validação bem definido e documentado oferece às agências reguladoras evidências objetivas de que os métodos e sistemas são adequados para o uso desejado. No Brasil, há duas agências credenciadoras para verificar a competência de laboratórios de ensaios, a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) e o INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial). Estes órgãos disponibilizam guias para o procedimento de validação de métodos analíticos, respectivamente, a Resolução ANVISA RE no 899, de 29/ 05/2003 e o documento INMETRO DOQ-CGCRE-008 (Revisão 02), de junho/2007 (RIBANI *et al.*, 2004).

2.7.1 Parâmetros analíticos para validação de métodos

Os parâmetros analíticos normalmente encontrados para validação de métodos de separação são: seletividade; linearidade e faixa de aplicação; precisão; exatidão; limite de detecção; limite de quantificação e robustez. Estes termos são conhecidos como parâmetros de desempenho analítico (SWARTZ; KRULL, 1998), características de desempenho (THOMPSON *et al.*, 2002, INMETRO, 2007) e, algumas vezes, como figuras analíticas de mérito (SWARTZ; KRULL, 1998).

A) Seletividade

A seletividade de um método instrumental de separação é a capacidade de avaliar, de forma inequívoca, as substâncias em exame na presença de componentes que podem interferir com a sua determinação em uma amostra complexa. A seletividade avalia 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. A seletividade garante que o pico de resposta seja exclusivamente do composto de Interesse (VESSMAN *et al.*, 2001). Se a seletividade não for assegurada, a linearidade, a exatidão e a precisão estarão seriamente comprometidas (RIBANI *et al.*, 2004).

A seletividade pode ser obtida de várias maneiras. Uma forma de se avaliar a seletividade é comparando a matriz isenta da substância de interesse e a matriz adicionada com esta substância (padrão), sendo que, nesse caso, nenhum interferente deve eluir no tempo de retenção da substância de interesse, que deve estar bem separada dos demais compostos presentes na amostra (CODEX, 1995; ICH, 1995; SWARTZ; KRULL, 1998).

O método de adição padrão também pode ser aplicado para os estudos de seletividade (JENKE, 1998), porém este método é utilizado quando não é possível obter a matriz isenta da substância de interesse. Neste caso é feita uma curva analítica com adição da substância de interesse na amostra e comparada com uma curva analítica sem a presença da matriz. Comparam-se então as duas curvas analíticas e caso elas sejam paralelas, pode-se dizer que não há interferência da matriz na determinação da substância de interesse, portanto o método é seletivo.

B) Linearidade e faixa de aplicação

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). Pode ser expressa, muitas vezes, como uma equação de reta chamada de curva analítica (BARROS NETO *et al.*, 2002). Embora somente dois pontos definam uma reta, na prática as linhas devem ser definidas por no mínimo cinco pontos que não incluam o ponto zero na curva, devido aos possíveis erros associados (THOMPSON *et al.*, 2002).

Matematicamente, a estimativa dos coeficientes de uma curva analítica a partir de um conjunto de medições experimentais pode ser efetuada usando o método matemático conhecido como regressão linear (CUSTODIO *et al.*, 1997). Além dos coeficientes de regressão **a** e **b**, também é possível calcular, a partir dos pontos experimentais, o coeficiente de correlação **r** (CHUI *et al.*, 2001). Este parâmetro permite uma estimativa da qualidade da curva obtida, pois quanto mais próximo de 1,0, menor a dispersão do conjunto de pontos experimentais e menor a incerteza dos coeficientes de regressão estimados. Para verificar se a equação de regressão é estatisticamente significativa podem ser efetuados os testes de ajuste do modelo linear, validade da regressão, sua eficiência e sua eficiência máxima (CHUI *et al.*, 2001; BARROS NETO *et al.*, 2001). Um coeficiente de correlação maior que 0,999 é considerado como evidência de um ajuste ideal dos dados para a linha de regressão (SHABIR, 2003; JENKE, 1998; GREEN, 1996). A ANVISA (2003) recomenda um coeficiente de correlação igual a 0,99 e o INMETRO (2007) um valor acima de 0,90.

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. Este intervalo de massas ou concentrações, no qual se pode construir uma curva analítica linear, é a faixa linear dinâmica (AUGUSTO *et al.*, 2006).

Para resíduos, o GARP (Associação Grupo de Analistas de Resíduos de Pesticidas) (GARP, 1999) recomenda uma faixa de concentração com valores variando entre a metade e o quádruplo da concentração do limite de quantificação. A IUPAC especifica que os pontos da curva analítica devem ser igualmente espaçados sobre a faixa de concentração de interesse e que esta faixa compreenda 0 – 150% ou 50 – 150% do

valor esperado, dependendo de qual destas duas opções for mais adequada (THOMPSON *et al.*, 2002).

As diretrizes da ICH (International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use) (1995) e da ANVISA (2003) especificam um mínimo de cinco níveis de concentração, juntamente com certos mínimos de variação especificados. O GARP também sugere cinco concentrações que devem ser injetadas em ordem crescente de concentração, no mínimo três vezes cada, com estimativa do desvio padrão relativo (DPR) entre as injeções inferior a 5%. A IUPAC recomenda seis ou mais níveis de concentração (THOMPSON *et al.*, 2002).

C) Precisão

Representa a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, sob condições definidas (INMETRO, 2007) Na prática, em validação de métodos, o número de determinações é geralmente pequeno e o que se calcula é a estimativa do desvio padrão absoluto (s).

Outra expressão da precisão é através da estimativa do desvio padrão relativo (RSD), também conhecido como coeficiente de variação (CV). Em métodos de análise de traços ou impurezas, são aceitos RSD de até 20%, dependendo da complexidade da amostra (HUBER, 1998).

D) Repetitividade

A repetitividade representa a concordância entre os resultados de medições sucessivas de um mesmo método, efetuadas sob as mesmas condições de medição, chamadas condições de repetitividade: mesmo procedimento; mesmo analista; mesmo instrumento usado sob as mesmas condições; mesmo local; repetições em um curto intervalo de tempo. O termo repetitividade é adotado pelo Vocabulário Internacional de Metrologia (2000), sendo utilizado pelo INMETRO. Por outro lado, a ANVISA utiliza o mesmo conceito para o termo repetibilidade. A repetitividade envolve várias medições da mesma amostra, em diferentes preparações e pode ser expressa através da estimativa do desvio padrão relativo (DPR) (INMETRO, 2007).

Para a repetitividade, o INMETRO (2007) recomenda sete ou mais repetições para o cálculo da estimativa do desvio padrão. A ICH (1995) e ANVISA (2003) sugerem que a repetitividade seja verificada a partir de um mínimo de nove determinações cobrindo o limite especificado do procedimento (ex.: três níveis, três repetições cada um), ou a partir de um mínimo de seis determinações a uma concentração similar ao valor esperado.

E) Ensaio de recuperação

A recuperação (ou fator de recuperação), R, é definida como a proporção da quantidade da substância de interesse, presente ou adicionada na porção analítica do material teste, que é extraída e passível de ser quantificada (THOMPSON *et al.*, 1999).

A informação de recuperação pode ser estimada de CRM (em que a quantidade de substância é previamente conhecida), quando disponíveis (CUADROS- RODRÍGUEZ *et al.*, 2001).

F) Limite de Detecção (LD)

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).

Complementando este conceito, na visão da EURACHEM (1998), o LD refere-se à “menor concentração de um analito em uma amostra, que pode ser detectada por um procedimento analítico ao qual se associa um nível de confiança especificado, mas não necessariamente quantificado”.

De forma mais ampla, o LD pode, alternativamente, ser calculado por método visual, permitindo a distinção entre ruído e sinal analítico pela visualização da menor concentração detectável; método relação sinal-ruído, pela comparação entre a medição dos sinais de amostras em baixas concentrações conhecidas do composto de interesse na matriz e um branco e método baseado em parâmetros da curva analítica, cujo valor do limite de detecção é calculado pelo produto do fator 3,3 pelo quociente entre o desvio padrão da resposta cromatográfica e o coeficiente angular da curva analítica (LIMA e FROTA, 2007).

Essa fórmula é baseada em uma distribuição normal centrada em 90% (curva de gauss), com 5% dos dados com -1,645 desvio padrão e os outros 5% com +1,645 desvio padrão (são as pontas da curva de gauss). Os 3,3 que constam da fórmula são resultado de $2 \times 1,645$ (MARQUES, 2005).

G) Limite de Quantificação (LQ)

O limite de quantificação (LQ) representa a menor concentração da substância em exame que pode ser medida, utilizando um determinado procedimento experimental (ICH, 1995; INMETRO, 2007). O LD é estabelecido pela confirmação de que o método apresenta exatidão, precisão e linearidade adequados quando aplicados a amostras contendo quantidades de substâncias dentro do intervalo especificado (ANVISA, 2003).

H) Robustez

De acordo com o INMETRO (2007), a robustez de um método mede a sensibilidade que este apresenta face a pequenas variações. Diz-se que um método é robusto quando ele não é afetado por uma modificação pequena e deliberada em seus parâmetros. A robustez de um método cromatográfico é avaliada, por exemplo, pela variação de parâmetros como a concentração do solvente orgânico, pH e força iônica da fase móvel em CLAE, programação da temperatura, natureza do gás de arraste em GC, bem como o tempo de extração, agitação, etc. As mudanças introduzidas refletem as alterações que podem ocorrer quando um método é transferido para outros laboratórios, analistas ou equipamentos (HEYDEN, 1994).

Para determinar a robustez de um método, o INMETRO recomenda o teste de Youden (INMETRO, 2007). Trata-se de um teste que permite não só avaliar a robustez do método, como também ordenar a influência de cada uma das variações nos resultados finais, indicando qual o tipo de influência de cada uma dessas variações. Por este teste são realizados oito ensaios com uma combinação fatorial dos efeitos e verifica-se qual o efeito ou combinação de efeitos que apresentam variações.

Se estas mudanças estiverem dentro dos limites de exatidão, precisão e seletividade aceitáveis, então o método possui robustez e tais variações podem ser incorporadas ao procedimento.

I) Efeito de Matriz

O efeito da resposta cromatográfica acentuada e induzida pela matriz ou efeito da matriz é um fator avaliado de grande magnitude neste parâmetro já que pode afetar acentuadamente as concentrações da amostra. Ele pode causar um aumento ou diminuição da resposta do detector de um analito presente no extrato da amostra comparado ao mesmo analito em solvente orgânico (HAJŠLOVÁ *et al.*, 1998; BRUCE *et al.*, 1998; ZROSTLÍKOVÁ *et al.*, 2001, THOMPSON *et al.*, 2002; SANCO, 2006; INMETRO, 2007).

THOMPSON *et al.* (2002) indicam a necessidade de avaliar se os coeficientes angulares das curvas analíticas obtidas para o solvente e para matriz são significativamente diferentes através do teste t (*Student*). Para esse caso indica-se avaliar primeiramente se as variâncias residuais das duas curvas são significativamente diferentes, através do teste F para em seguida aplicar o teste t mais apropriado (SNEDECOR; COCHRAN, 1989; BRUCE *et al.*, 1998; INMETRO, 2007).

2.7.2 Estabilidade dos padrões e das amostras

Para gerar resultados confiáveis e reprodutíveis, as amostras, os padrões e reagentes usados devem ser estáveis por um período razoável (por ex. um dia, uma semana, um mês, dependendo da necessidade) (SHABIR, 2003). A estabilidade das amostras e padrões é importante em termos de temperatura e tempo. Se uma solução não for estável em temperaturas ambientes, a diminuição da temperatura pode aumentar a estabilidade das amostras e padrões. Com relação ao tempo, estabilidade de dias ou meses é mais desejável, entretanto em alguns casos, as soluções precisam ser preparadas cada vez que forem realizadas as análises (SNYDER *et al.*, 1997).

3 MATERIAL E MÉTODOS

Localização dos Experimentos

As análises foram realizadas nos Laboratórios de Micotoxinas e de Cromatografia Líquida do Centro Nacional de Pesquisa de Tecnologia Agroindustrial de Alimentos-CTAA, da Embrapa Agroindústria de Alimentos situada em Guaratiba -Rio de Janeiro / RJ.

3.1 Material

3.1.1 Amostras

As amostras de castanha-do-brasil verde (não beneficiadas) foram provenientes de um castanhal comercial em Tomé-Açu, Pará, safra de 2007.

Preparou-se uma amostragem de aproximadamente 9,6 kg da castanha-do-brasil in natura.

3.1.2 Reagentes e Padrões

Para a realização dos experimentos foram necessários os seguintes materiais:

- ✓ Água destilada e purificada pelo sistema Milli-Q Plus (Millipore, EUA).
- ✓ Padrões de aflatoxinas AFB₁, AFB₂, AFG₁ e AFG₂ da marca Sigma Chemical Company (EUA), lotes 120K14020, 58H4054, 79H3608 e 58H4088, respectivamente.
- ✓ Coluna: X-Terra da Waters, 150 x 4,6 mm, partículas de 5 µm –RP18
- ✓ Pré-coluna Shim-pack G-ODS 5 mm x 4,6 x 25 mm
- ✓ Metanol grau analítico
- ✓ Clorofórmio grau analítico
- ✓ Acetonitrila grau analítico
- ✓ Acetato de etila grau analítico
- ✓ Ácido acético
- ✓ Acetona grau analítico
- ✓ Ácido trifluoracético (TFA)
- ✓ Tolueno grau analítico
- ✓ Cloreto de Potássio
- ✓ Sulfato de cobre
- ✓ Gás nitrogênio
- ✓ Celite
- ✓ Papel de filtro qualitativo
- ✓ Placas de cromatografia de sílica gel 60G (0,25 mm de espessura) da Merck (Alemanha).

3.2 Métodos

3.2.1 Preparo das amostras

A partir da amostragem de 9,6 kg de castanha-do-brasil e após o descascamento em prensa, chegou-se a:

- ✓ 3388,4 g de cascas
- ✓ 2990,8 g de amêndoas

- ✓ 3000,0 g de castanha integral (amêndoa + casca)

A moagem das amostras foi realizada em moinho de facas e martelos da marca TREU S.A. com potência de 7,5 cV, sendo usada para as amêndoas uma peneira de 3,15 mm e para as cascas e a castanha integral uma peneira de 2,00 mm.

Em seguida, foi realizada a uniformização das amostras com água destilada em liquidificador industrial, verificando-se a quantidade de água adicionada e a textura da massa formada, segundo metodologias preconizadas por FRANCA *et al* (2006) e BANKS *et al* (2007), chegando-se às seguintes proporções:

- ✓ Amêndoa : água destilada → (1 : 0,8)
- ✓ Castanha integral : água destilada → (1 : 0,8)
- ✓ Casca : água destilada → (1 : 1,1)

As amostras foram acondicionadas em frascos de vidro e armazenadas em freezer até o momento das análises.

3.2.2 Padrão de aflatoxinas

Preparo das soluções padrões de aflatoxinas.

O preparo dos padrões foi realizado conforme preconiza a AOAC (2000) e MAPA (1999). Foram retiradas alíquotas de 250 µL de cada frasco de padrão de aflatoxinas. As alíquotas foram levadas à secura e cada padrão foi re-suspendido com 8 mL de tolueno:acetona (9:1), formando a solução-estoque. As soluções foram acondicionadas em freezer hermeticamente fechadas.

Preparo das soluções padrões de contaminação de aflatoxinas (Pool).

As soluções padrões de contaminação foram preparadas conforme AOAC (2000) e MAPA (1999) com concentrações que se assemelhem às esperadas nas amostras a serem analisadas ($B_1 = 0,15 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; $B_2 = 0,05 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; $G_1 = 0,10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; $G_2 = 0,05 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$).

Determinação da concentração das soluções padrões de aflatoxinas.

A determinação da concentração dos padrões foi realizada conforme preconiza a AOAC (2000) e MAPA (1999). A metodologia baseia-se na medida da absorbância dos padrões de aflatoxinas contra uma solução de Dicromato de Potássio em espectrofotômetro utilizando comprimento de onda de 350 nm.

3.2.3 Metodologia desenvolvida

Extração das Aflatoxinas

Adicionou-se 25 g de amostra em blender contaminando-a com o volume do padrão de aflatoxinas adequado, a mesma foi extraída com 7,5 mL de solução de KCl 4% e 67,5 mL de metanol, a mistura foi misturada no blender em velocidade 4, por 5 minutos, adicionou-se 75 mL de CuSO_4 10% e 7,5 g de celite. Após filtração em papel de filtro qualitativo, foi retirada uma alíquota de 50 mL, este extrato foi levado para um funil de separação, previamente adicionado de 50 mL de água destilada, onde foi particionado

duas vezes com 10 mL de diclorometano. O extrato foi levado à secura em banho-maria a 40 °C sob atmosfera de nitrogênio e armazenado em geladeira até o momento da análise.

Derivatização das Amostras

Ressuspendeu-se a amostra com 600 µL de acetonitrila e adicionou-se 1,2 mL do agente derivatizante (35 mL de Água Milli-Q: 5 mL de Ácido Acético Glacial : 10 mL Ácido trifluoracético), segundo AOAC (2005). O meio reacional foi mantido à 65 °C por 9 min. As amostras derivatizadas foram analisadas no sistema de cromatografia líquida de alta eficiência com detector de fluorescência (CLAE-DFL).

Curva de Calibração

A solução-mãe da mistura das quatro aflatoxinas (*POOL*) que deu origem aos 6 pontos da curva de calibração, foi preparada com os padrões individuais da Sigma-Aldrich, segundo AOAC (2000). A concentração dos padrões da curva de calibração variou de 0,002 µg·mL⁻¹ à 0,16 µg·mL⁻¹ aproximadamente. Foram injetadas três curvas de calibração.

Derivatização dos Padrões

Adicionou-se 300 µL de cada *pool* da curva de calibração dos padrões de aflatoxinas a um frasco de derivatização e adicionou-se 600 µL do agente derivatizante ao mesmo. Após esse ponto, a metodologia foi a mesma utilizada na derivatização das amostras.

Análise cromatográfica

Utilizando o sistema CLAE-DFL, foram injetados 10 µL tanto dos padrões quanto das amostras. A análise cromatográfica ocorreu no modo isocrático, tendo como fase Móvel: 1,5 metanol: 1,5 acetonitrila: 6,0 água Milli-Q, coluna: X-Terra da Waters, 150x4,6mm, partículas de 5 µm –RP18, Detetor: Waters W2475 – Fluorescência Excitação: 360 nm, Emissão: 440 nm, Bomba: Shimatzu LC-10AD, Injetor Automático: Waters W717.

3.2.4 Metodologia segundo Valente Soares e Rodriguez-Amaya (1989)

Extração das Aflatoxinas

Aflatoxinas AFB₁, AFB₂, AFG₁ e AFG₂ foram determinadas segundo o método de VALENTE SOARES; RODRIGUEZ-AMAYA (1989) por cromatografia em camada delgada, sendo previamente contaminadas com o volume do padrão de aflatoxinas adequado. Cinquenta gramas de amostra adicionadas de 270 mL de metanol e 30 mL de solução de cloreto de potássio 4% foram homogeneizadas em liquidificador por 5 minutos em velocidade 4. Após filtração em papel de filtro qualitativo, a 150 mL do filtrado foram adicionados 150 mL de solução clarificante (sulfato de cobre 10%) e 15 g de celite. Após 5 min., a mistura foi novamente filtrada em papel de filtro qualitativo e 100 mL do filtrado (extrato clarificado) foram transferidos para um funil de separação, previamente adicionado de 150 mL de água destilada e seqüencialmente foram realizadas 2 partições com 50 mL de hexano, agitando manualmente por 1 minuto. Recolheu-se a fração aquosa

(inferior) e descartou-se a hexânica (superior). Realizou-se 2 partições com 10 mL de clorofórmio, agitando em shaker por 5 minutos. Recolheu-se a camada clorofórmica (inferior) de cada partição e evaporou-se à secura em banho a 40 °C em atmosfera de nitrogênio. O resíduo foi ressuspenso em 300 µL de solução tolueno:acetonitrila (9:1) com agitação em vórtex por 30 segundos.

Identificação e Quantificação das Aflatoxinas

Cortou-se uma placa de sílica gel ao meio (10 x 20 cm), realizando-se as marcações na placa. A mesma foi ativada em estufa a 80 °C por 1 hora.

Aplicou-se 5 µL e 10 µL do extrato purificado e volumes de 1 µL a 9 µL da solução-padrão trabalho de aflatoxinas AFB₁, AFB₂, AFG₁ e AFG₂, nos respectivos pontos da placa.

Eluiu-se a placa em cuba não-saturada com solução de éter: metanol: água (96: 3: 1 v/v), sem ultrapassar o limite da corrida (Corrida da placa “deitada”), aguardou-se a placa secar na capela por alguns minutos, protegida de umidade, luz fluorescente e solar.

Eluiu-se a placa em cuba não-saturada com solução de clorofórmio: acetona (90: 10 v/v), sem ultrapassar o limita da corrida (Corrida da placa “em pé”).

Repetiu-se a corrida anterior para o outro lado “em pé” da placa ainda não-eluído.

Levou-se a placa ao cromatovisor-câmara de ultravioleta, a leitura foi realizada em 365nm, identificando-se as aflatoxinas AFB₁, AFB₂, AFG₁ e AFG₂ e confirmando-se visualmente pela presença de *plots* com fluorescência na cor azul (blue) e verde (green) similares a dos padrões aplicados como referência.

A quantificação de aflatoxinas foi determinada pela intensidade de fluorescência quando comparada com diferentes quantidades de padrões aplicados na placa.

3.2.5 Comparação entre os métodos

Foram preparadas amostras, em dois níveis de concentração com quatro replicatas segundo a metodologia preconizada por VALENTE SOARES e RODRIGUEZ-AMAYA (1989) e segundo a metodologia desenvolvida neste trabalho. As amostras depois de extraídas foram analisadas tanto por CCD quanto por CLAE-DFL. Dessa forma, podemos nomear 4 metodologias de análise:

Codificação da Metodologia	Método de Extração	Método de Quantificação
Metodologia 1	Metodologia Desenvolvida	CCD
Metodologia 2	Metodologia preconizada por RODRIGUEZ AMAYA e VALENTE SOARES	CCD
Metodologia 3	Metodologia Desenvolvida	CLAE
Metodologia 4	Metodologia preconizada por RODRIGUEZ AMAYA e VALENTE SOARES	CLAE

Dessa forma, pode-se observar que para cada nível de concentração estudado, foram utilizados os seguintes procedimentos:

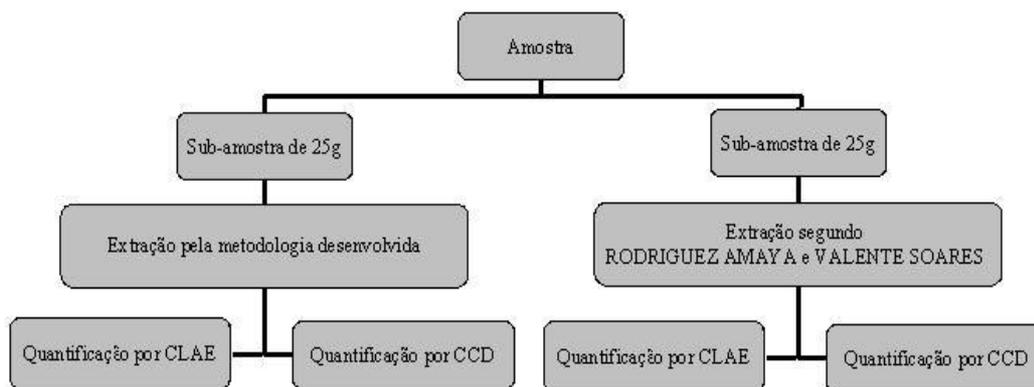


Figura 3 – Metodologias de preparo e quantificação das amostras.

Os resultados fornecidos pelas duas metodologias de extração e pelos dois métodos de quantificação testados foram comparados através da recuperação e da análise de variância (ANOVA).

3.2.6 Determinação dos parâmetros de validação para metodologia desenvolvida.

Linearidade

A linearidade foi avaliada em seis níveis de concentração com três replicatas nas faixas de 0,625 a 33,752 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ para AFB₁; 0,376 a 25,073 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ para AFB₂; 0,396 a 28,809 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ para AFG₁ e 0,362 a 24,5314 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ para AFG₂ a partir das soluções padrão intermediárias de aflatoxina AFB₁ de 31,25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; AFB₂ de 4,18 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; AFG₁ de 6,38 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ e AFG₂ de 5,84 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ e calculada a partir da equação da regressão linear, determinada pela ferramenta análise de dados do programa Excel. Foi utilizado o coeficiente de correlação linear (r^2) como indicador da reta como modelo matemático. A homocedasticidade foi verificada através do Teste de Cochran, que compara as variâncias obtidas para cada ponto da curva de calibração comparando um valor de C calculado com o valor de C tabelado. Se, C calculado < C tabelado, pode-se dizer que as variâncias são estatisticamente equivalentes e que pode-se determinar a curva de calibração através da regressão linear.

Recuperação

Os estudos de recuperação foram realizados após fortificação de amostras brancas com soluções padrão de aflatoxinas AFB₁, AFB₂, AFG₁ e AFG₂ em tolueno: acetonitrila (9:1 v/v) em dois níveis de concentração com quatro replicatas.

A recuperação foi calculada pela relação entre a quantidade de toxina quantificada e a adicionada no início do procedimento analítico executado de forma completa.

Limite de detecção (LD)

O limite de detecção foi determinado visualmente e, dessa forma, foi considerado como sendo a menor concentração de cada aflatoxina que o método distingue, com segurança, como sendo a resposta. A partir da solução padrão de menor concentração da curva de calibração de cada aflatoxina foram realizadas quatro diluições, que foram derivatizadas e analisadas cromatograficamente. A análise dos cromatogramas deu origem ao LD, que foi determinado pela visualização da menor concentração visível (detectável) para cada aflatoxina.

Foram preparadas quatro soluções nas concentrações das aflatoxinas consideradas como sendo os LDs e injetadas para a confirmação através dos picos visualizados.

Limite de quantificação (LQ)

O limite de quantificação representa a menor concentração do analito que pode ser determinado com um nível aceitável de exatidão e precisão. O LQ foi determinado a partir do LD, preparando-se quatro soluções de concentração três vezes o valor do LD e injetando-as no sistema cromatográfico. Os picos de todas as aflatoxinas foram visualizados.

Seletividade

A seletividade foi avaliada em seis níveis de concentração com três replicatas. Foram determinados os tempos de retenção médios para cada uma das aflatoxinas e comparados visualmente os cromatogramas típicos da curva padrão e da amostra contaminada para verificar se houve variação nos tempos de retenção.

Precisão ou Desvio Padrão Relativo (RSDr)

A precisão foi avaliada em seis níveis de concentração com três replicatas. Foi calculado o desvio padrão relativo (RSDr) para cada nível de concentração.

Efeito de Matriz

O efeito de matriz foi avaliado em seis níveis de concentração com três replicatas de duas formas: curvas somente com o solvente e curvas da matriz com o solvente. A linearidade das duas curvas foi calculada a partir da equação da regressão linear, determinada pela ferramenta análise de dados do programa Excel, comparando-se o coeficiente de correlação linear (r^2) de cada uma das curvas. Foram realizadas também a comparação visual dos cromatogramas obtidos, a verificação da homocedasticidade das duas curvas pelo teste F e a comparação entre as inclinações das curvas pelo teste T.

Robustez

Para avaliação da robustez do método foram realizadas modificações nos seguintes parâmetros: massa de amostra, velocidade de rotação do blender, volume de

metanol e sulfato de cobre adicionados na extração, tempo de agitação no blender, volume de diclorometano e tempo de agitação utilizados na partição, sendo utilizado o teste de Youden para ordenar a influência de cada uma das variações nos resultados finais, segundo mostra o quadro 1. Foi utilizado somente um nível de contaminação. Foram calculados a média e o desvio padrão.

Quadro 1- Ordenação das modificações realizadas para ensaio de robustez.

Ensaio	1	2	3	4	5	6	7	8
Massa (g)	25	25	25	25	50	50	50	50
Velocidade Blender	4	4	6	6	4	4	6	6
Volume metanol (mL)	67,5	70	67,5	70	67,5	70	67,5	70
Tempo de Agitação Blender (min)	5	5	6	6	6	6	5	5
Volume de CuSO ₄ 10% (mL)	75	80	75	80	80	75	80	75
Volume de Diclorometano (mL)	2 x 10	1 x 20	1 x 20	2 x 10	1 x 20	2 x 10	2 x 10	1 x 20
Tempo de Agitação Partição (min)	5	3	3	5	3	5	5	3

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Ensaios Preliminares

Foram realizadas análises de aflatoxinas nas amostras de casca, amêndoa e castanha integral, para que se pudesse determinar de que forma a matriz seria mais bem analisada, cada matriz foi analisada em duplicata e média dos resultados obtidos para cada aflatoxina pode ser observada no Quadro 2:

Quadro 2. Resultados médios obtidos da análise em quadruplicata de aflatoxinas em casca, amêndoa e castanha-do-brasil integral ($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$).

<i>Aflatoxina</i>	<i>Casca^a</i>	<i>Amêndoa^a</i>	<i>Castanha Integral^a</i>
AFG ₁	1,656 ± 0,016	21,457 ± 0,015	0,504 ± 0,028
AFB ₁	1,782 ± 0,023	35,281 ± 0,051	0,486 ± 0,037
AFG ₂	n.d.	1,728 ± 0,025	n.d.
AFB ₂	n.d.	3,330 ± 0,031	n.d.

n.d. => não detectado

a_ média de quadruplicata ± desvio padrão

Ao analisar os resultados expostos no Quadro 2, notou-se que a concentração das aflatoxinas AFG₁ e AFB₁ obtida para a amêndoa (castanha sem casca) foi muito superior as concentrações encontradas na casca e na castanha integral (castanha com casca). Também pode ser observado que somente na amêndoa foram detectadas as aflatoxinas AFG₂ e AFB₂. Ainda abordando este ponto, na castanha integral as concentrações de aflatoxinas detectadas foram em menores concentrações que as detectadas na casca.

Esses resultados experimentais podem estar associados a diferentes combinações de matrizes. Ao separar a amêndoa de sua casca são obtidas duas matrizes distintas que, isoladamente, permitem uma melhor avaliação das aflatoxinas, tanto na amêndoa quanto na casca. Ao se trabalhar com as matrizes combinadas, isto é, analisando a castanha integral (com casca) o efeito da matriz é potencializado, reduzindo a eficiência do método de análise. De acordo com AOAC (2007), o desempenho dos métodos analíticos também pode ser influenciado pela matriz do alimento, ou seja, pela composição química do alimento.

4.2 Comparação entre os métodos

Foi realizada a análise de variância (ANOVA) entre as diferentes metodologias propostas, tanto para a extração como para a quantificação. Os resultados mostraram que a metodologia constituída por extração no método modificado seguida de quantificação por CLAE, foi aquela que mostrou melhores resultados. O fator que influenciou mais positivamente o resultado foi a forma de quantificação, uma vez que quando se compara somente a forma de extração e mantém-se a forma de quantificação (CLAE), os resultados encontrados são estatisticamente equivalentes para cada uma das metodologias de extração e quantificação de aflatoxinas.

A concentração de aflatoxinas encontradas nas duas metodologias de extração e nas duas metodologias de quantificação em amostras de castanha-do-brasil encontra-se detalhada no Quadro 3:

Quadro 3. Valores médios de extração e quantificação de aflatoxinas em amostras de castanha-do-brasil, artificialmente contaminadas ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$).

Metodologia	Concentração de Aflatoxinas ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) ^a			
	AFG ₁	AFB ₁	AFG ₂	AFB ₂
Metodologia 1	3,073 ± 0,209 ^A	3,804 ± 0,522 ^C	1,423 ± 0,231 ^E	1,145 ± 0,176 ^G
Metodologia 2	4,881 ± 1,902 ^A	3,607 ± 0,991 ^C	1,607 ± 1,136 ^E	1,352 ± 0,874 ^G
Metodologia 3	5,400 ± 1,105 ^B	6,917 ± 0,567 ^D	4,023 ± 0,795 ^F	4,671 ± 0,444 ^H
Metodologia 4	3,348 ± 0,125 ^A	6,707 ± 0,620 ^D	4,158 ± 0,409 ^F	4,248 ± 0,544 ^H

a_ média de quadruplicata ± desvio padrão

Letras diferentes indicam resultados estatisticamente diferentes entre si com um nível de significância de 5%, segundo teste de Tukey.

Os valores de recuperação encontrados também foram mais adequados para a metodologia constituída por extração pelo método modificado seguida de quantificação por CLAE. MALLMANN *et al* (1998) reportaram recuperações de 101,2; 93,2; 58,9 e 63,2%, respectivamente para AFG₁, AFB₁, AFG₂ e AFB₂ para aflatoxinas em nozes, castanhas e frutos secos. Em um estudo colaborativo realizado por AOAC/IUPAC (1994) foram encontrados valores de recuperação de aflatoxinas de 93, 97, 95, e 95% para AFG₁, AFB₁, AFG₂ e AFB₂ respectivamente em amostras de castanha-do-brasil. A metodologia oficial da AOAC (AOAC 994.08) para quantificação de aflatoxinas em castanha-do-brasil, indica valores de recuperação de 82,0; 117,0; 125,0 e 90,5%, respectivamente para, AFG₁, AFB₁, AFG₂ e AFB₂.

Nos três trabalhos citados anteriormente, os dados referem-se a quantificação por CLAE. Agora, quando foi usada uma metodologia para determinação simultânea das aflatoxinas AFB₁, AFB₂, AFG₁ e AFG₂ em castanha-do-brasil usando o LC-MS/MS, XAVIER e SCUSSEL (2008) encontraram recuperações variando entre 92 e 100%, para amostras com um nível de contaminação entre 1,2 e 11,5 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$.

A metodologia de extração modificada (Quadro 4), apresentou resultados recuperação médios semelhantes a preconizada por RODRIGUEZ AMAYA e VALENTE SOARES (1989). Entretanto, o seu emprego pode ser justificado por apresentar-se como um método menos dispendioso, mais rápido e sujeito a menor perda de massa.

Quadro 4. Valores médios de recuperação de aflatoxinas em amostras de castanha-do-brasil, artificialmente contaminadas em nível de ppb.

Metodologia	Recuperação Média (%) em nível de ppb.			
	AFG ₁	AFB ₁	AFG ₂	AFB ₂
Metodologia 1	57,98	55,13	29,65	22,90
Metodologia 2	63,17	52,28	33,48	27,04

Metodologia 3	107,89	100,25	86,63	93,42
Metodologia 4	92,09	97,20	83,81	84,96

4.3 Validação da metodologia modificada com quantificação por CLAE.

4.3.1 Linearidade

Uma seqüência de ajustes e testes estatísticos foi aplicada aos dados experimentais obtidos. Os dados foram ajustados ao modelo de regressão linear ($y = a + bx$). Em seguida, as curvas de calibração foram submetidas ao teste de Cochran para avaliar o desvio bilateral das variâncias a um nível de significância de 5%. Este teste destina-se a avaliar a homogeneidade das variâncias, o que permite utilizar a curva de calibração obtida com um limite de confiança aceitável. Para verificar a eficiência do modelo de regressão linear proposto foram analisados os gráficos de resíduo das duas curvas de calibração. O resíduo foi calculado através da diferença entre o valor observado e o valor calculado pela equação da reta de regressão para cada valor de concentração de aflatoxina. Esta análise corroborou a conclusão do teste de Cochran, que indicou o método como homocedástico na faixa de concentração estudada. Os valores de Cochran calculados foram inferiores ao valor de Cochran tabelado, mostrando variâncias homogêneas conforme o aumento da concentração. Este resultado indica que ao longo da faixa de concentração estudada o modelo tem um comportamento homocedástico. Como o teste mostrou que as variâncias são estatisticamente equivalentes, as curvas de calibração podem ser determinadas através de regressão linear.

Quadro 5. Valores de C calculado para o Teste de Cochran.

Aflatoxina	AFG ₁	AFB ₁	AFG ₂	AFB ₂
Curva				
1	0,502	0,524	0,640	0,636
2	0,439	0,394	0,697	0,561
3	0,267	0,505	0,661	0,642
C tabelado	0,707			

C calculado = Variância Maior/ Σ Variâncias

C tabelado = Valor de Cochran com 5% de significância

O Quadro 6 apresenta os valores de coeficientes de correlação calculados a partir da equação da regressão linear para as curvas de calibração testadas. As curvas de calibração estão representadas na Figura 3, logo a seguir.

Pode-se observar que a curva de calibração apresentou coeficientes de correlação variando entre 0,9936 e 0,9997, concordando com os valores encontrados na literatura, uma vez que MALLMANN *et al* (1998) obtiveram uma curva de calibração com coeficientes de correlação variando entre 0,9940 e 0,9991. Cabe ressaltar ainda, que a ANVISA (2003) recomenda um coeficiente de correlação igual a 0,99 e o INMETRO (2007) um valor acima de 0,90. Desta forma, os resultados obtidos estão de acordo com ambas as resoluções. Nesse tipo de análise também é imprescindível que a avaliação do gráfico de resíduos, mantendo-se, dessa forma, uma visão crítica dos resultados obtidos. Os gráficos de resíduos encontram-se no Anexo.

O exame dos gráficos de resíduos do modelo, mostrados nos Anexos A, B e C revela que estes se apresentam com uma distribuição aleatória, como já é esperado para

um modelo bem ajustado. Observa-se que não ocorre a existência de uma tendência nos resíduos. Isso confirma a adequação do modelo testado, pois indica que não há a presença de um efeito das variáveis sobre a resposta experimental, ou seja, no método não ocorrem erros sistemáticos.

Quadro 6. Coeficientes de correlação da curva de calibração.

Curva	Coeficiente de Correlação (R ²)			
	AFG ₁	AFB ₁	AFG ₂	AFB ₂
1	0,9984	0,9989	0,9986	0,9987
2	0,9974	0,9967	0,9969	0,9967
3	0,9949	0,9936	0,9996	0,9997
Média	0,9969	0,9964	0,9984	0,9984

Quadro 7. Concentração das aflatoxinas nos seis pontos da curva de calibração (µg·mL⁻¹).

Aflatoxina	AFG ₁	AFB ₁	AFG ₂	AFB ₂
<i>Ponto da Curva</i>				
P1	0,0024	0,0032	0,0022	0,0024
P2	0,0061	0,0080	0,0056	0,0059
P3	0,0244	0,0320	0,0224	0,0236
P4	0,0488	0,0640	0,0448	0,0471
P5	0,0731	0,0959	0,0671	0,0707
P6	0,1219	0,1599	0,1119	0,1178

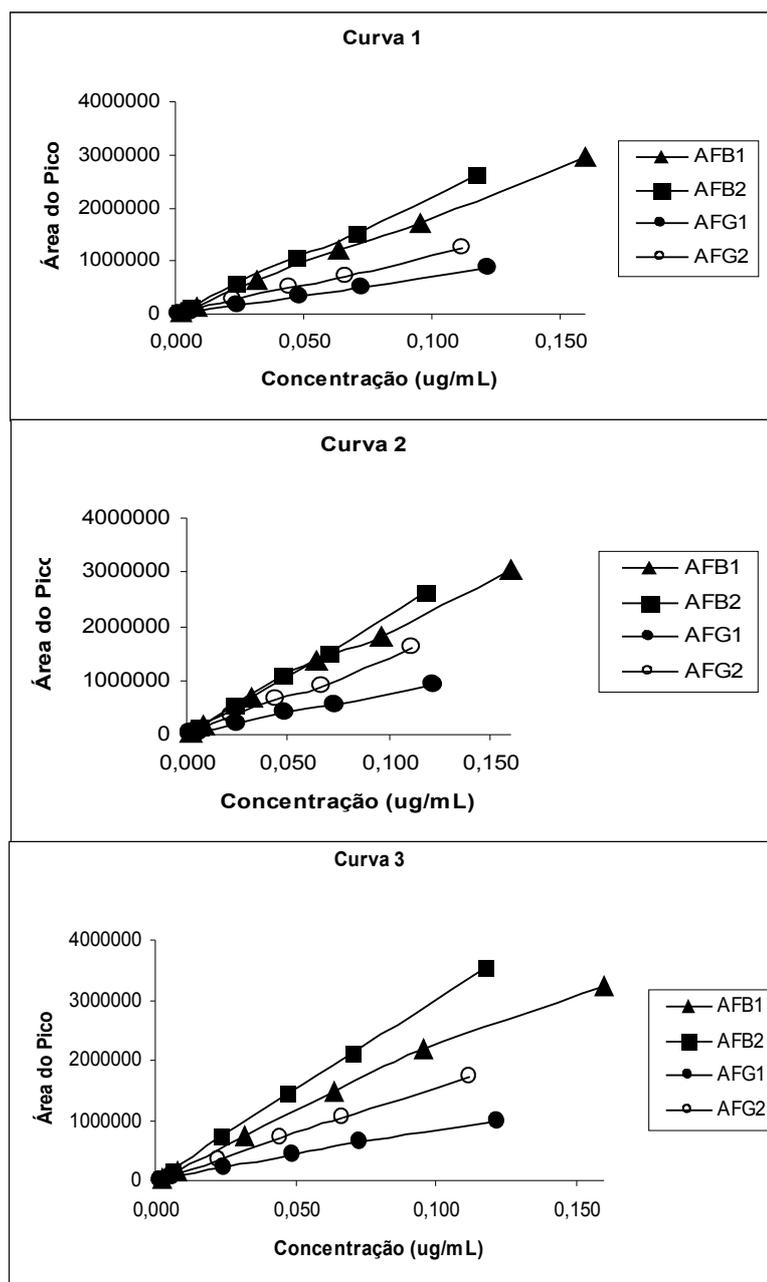


Figura 4. Curvas de calibração para determinação da linearidade.

4.3.2 Limite de detecção (LD)

A partir da solução padrão de menor concentração da curva de calibração de cada aflatoxina foram realizadas quatro diluições, que foram derivatizadas e analisadas cromatograficamente.

Quadro 8-Concentração das diluições testadas para determinação do LD ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$).

Aflatoxina		AFG ₁		AFB ₁		AFG ₂		AFB ₂
<i>Ponto da Curva</i>								
P01		0,00243		0,00319		0,00223		0,002356
	7		8		8			
P02		0,00182		0,00239		0,00167		0,001767
	8		8		9			
P03		0,001218		0,001599		0,001119		0,001178
P04		0,00060		0,00079		0,00056		0,000586
	9		9		0			

O limite de detecção foi determinado visualmente, ou seja, realizou-se a análise de amostras contendo baixas concentrações conhecidas da espécie de interesse. E, dessa forma, considerou-se o LD como sendo a menor concentração que pôde ser detectada com segurança, como sendo a resposta, e que foi distinta do sinal analítico do ruído. Nesse caso, como pode ser observado na Figura 3, o ponto da curva P03, foi determinado como sendo o LD para o método proposto.

A análise dos cromatogramas deu origem ao LD, que foi determinado pela visualização da menor concentração visível (detectável) para cada aflatoxina, sendo de 0,263; 0,345; 0,241 e 0,254 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ de amostra para AFB₁, AFB₂, AFG₁ e AFG₂, respectivamente.

Quando se compara esses resultados com aqueles relatados por XAVIER e SCUSSEL (2008) no desenvolvimento de uma metodologia através de LC-MS/MS para determinação simultânea das aflatoxinas AFB₁, AFB₂, AFG₁ e AFG₂ em castanha-do-brasil, pode-se observar que o LD é menor quando se utiliza equipamentos mais sensíveis, uma vez que estes autores encontraram um limite de detecção de 0,04; 0,045; 0,050 e 0,06 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$, respectivamente.

Os cromatogramas das quatro concentrações testadas encontram-se a seguir:

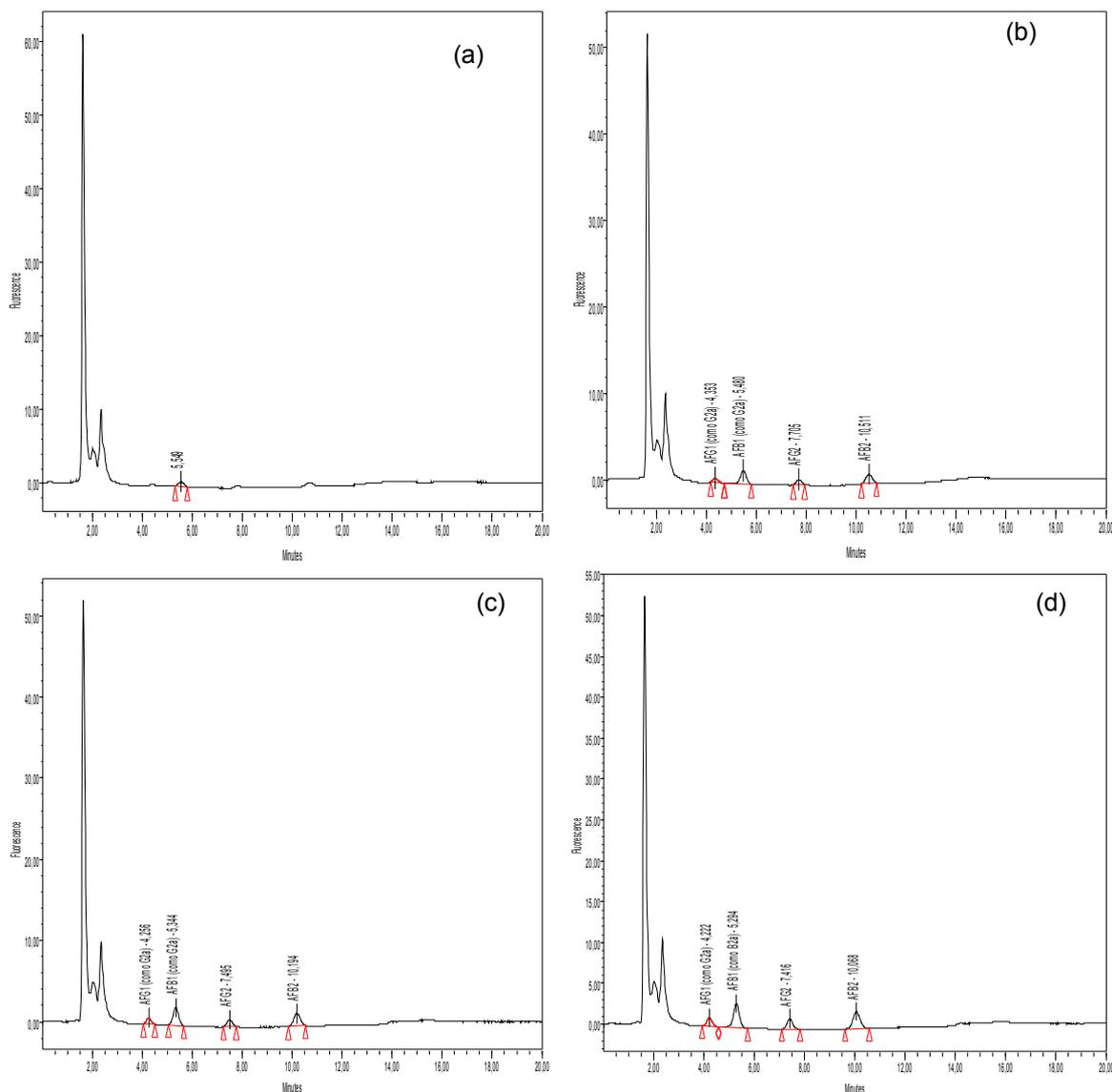


Figura 5. Cromatogramas das quatro concentrações testadas para determinação do LD: (a) P04, (b) P03, (c) P02 e (d) P01.

4.3.3 Limite de quantificação (LQ)

O limite de quantificação foi estabelecido como sendo 3 vezes o limite de detecção e nas condições de trabalho foi de 0,790; 1,036; 0,725 e 0,763 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ de amostra para AFB₁, AFB₂, AFG₁ e AFG₂, respectivamente.

Observando a literatura, vimos que MALLMANN *et al* (1998) encontraram de limites de quantificação de 0,4; 0,4; 0,7 e 1,3 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ de amostra para as aflatoxinas AFB₁, AFB₂, AFG₁ e AFG₂, respectivamente, em nozes, castanhas e frutos secos através da CLAE e que XAVIER e SCUSSEL (2008) encontraram um limite de quantificação de

0,08; 0,09; 0,10 e 0,12 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$, para AFB₁, AFB₂, AFG₁ e AFG₂, respectivamente, em amostras com nível de contaminação variando entre 1,2 e 11,5 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$.

Pode-se observar que os resultados aqui encontrados são em sua maioria superiores àqueles relatados por MALLMANN *et al* (1998), mas ainda suficientes para monitoração da contaminação de amostras nos limites de tolerância determinados pela União Européia.

Mais uma vez, quando se compara esses resultados com aqueles relatados por XAVIER e SCUSSEL (2008) pode-se observar que o LQ encontrado por esses autores é ainda bem menor que aquele encontrado no presente estudo, mas isso ocorre devido ao uso de equipamentos bem mais sensíveis.

4.3.4 Seletividade

Foram determinados os tempos de retenção médios para cada uma das aflatoxinas (Quadro 9) e comparados visualmente os cromatogramas típicos da curva padrão e da amostra contaminada para verificar se houve variação nos tempos de retenção.

Quadro 9. Média dos tempos de retenção encontrados para as quatro aflatoxinas.

Aflatoxina	Tempo de Retenção (min)	Desv pad	Intervalo do tempo de retenção	
			Mínimo	Máximo
AFG1	4,274	0,122	4,152	4,396
AFB1	5,366	0,169	5,197	5,535
AFG2	7,474	0,270	7,204	7,744
AFB2	10,189	0,391	9,798	10,580

A partir da análise do intervalo do tempo de retenção e dos cromatogramas, que se encontram a seguir (Figuras 5 e 6), pode-se observar que não há presença de interferentes nos tempos de retenção das aflatoxinas. Desta forma, pôde-se assegurar que os picos nos cromatogramas das amostras são das aflatoxinas correspondentes aos padrões adicionados.

MALLMANN *et al* (1998) encontraram tempos de eluição para as aflatoxinas AFG₁, AFB₁, AFG₂ e AFB₂ de 5, 7, 12 e 17 minutos em amostras de nozes, castanhas e frutos secos, utilizando como fase móvel acetonitrila: metanol: água (15:10:75 v/v). Quando comparamos os tempos de retenção encontrados no presente trabalho com aqueles encontrados por MALLMANN *et al* (1998), podemos observar que os resultados foram bastante satisfatórios, uma vez que foram determinados tempos de retenção bem menores e que ocasionarão um menor tempo de corrida, e conseqüentemente, um menor tempo de análise, além de uma melhor limpeza da coluna para a injeção de amostras posteriores e menor gasto de solvente da fase móvel para a corrida cromatográfica de cada amostra.

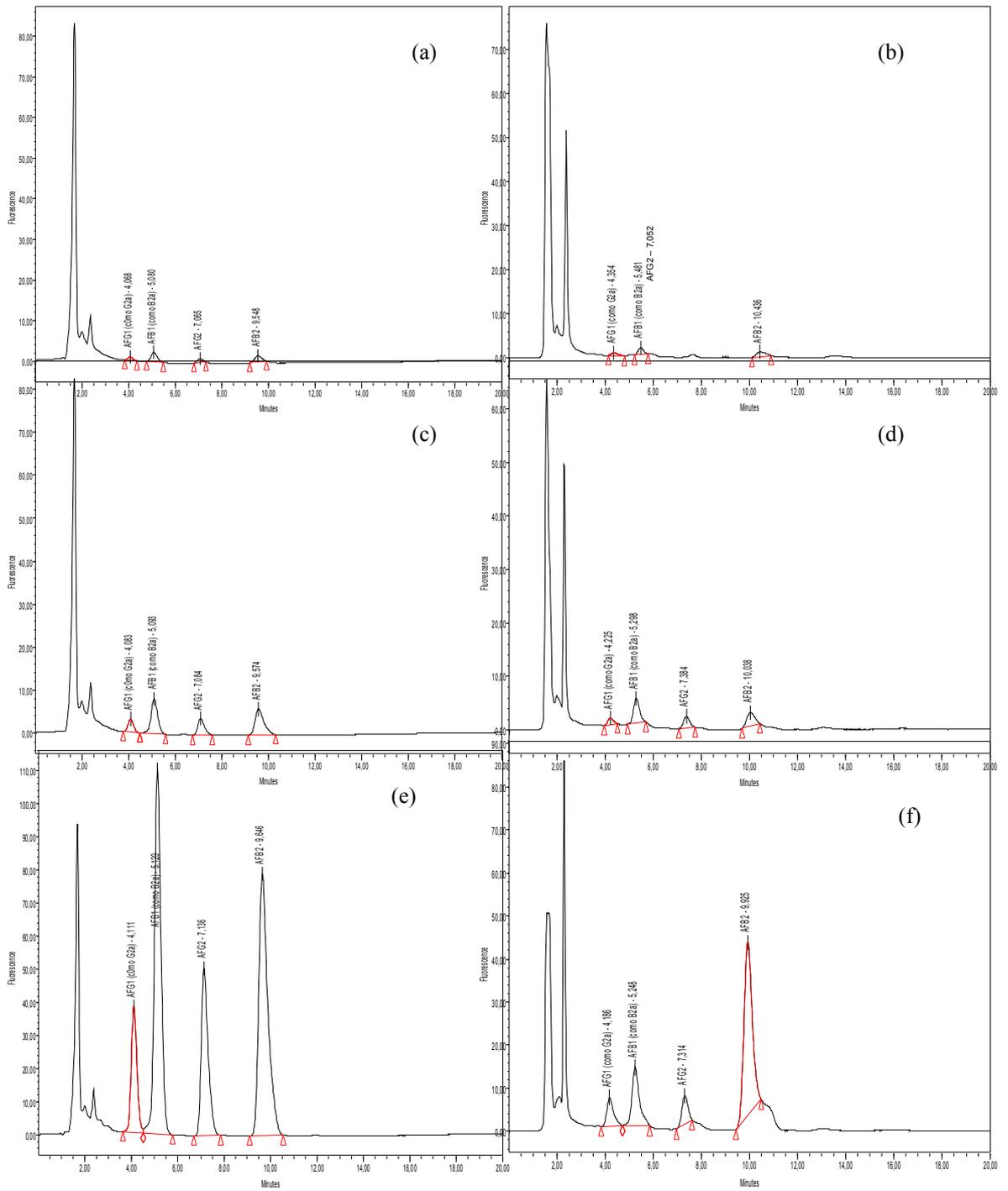


Figura 6. Cromatogramas típicos da curva padrão e da amostra contaminada nos seis pontos da curva de calibração: (a) P1, padrão, (b) P1, amostra, (c) P2, padrão, (d) P2, amostra, (e) P3, padrão, (f) P3, amostra.

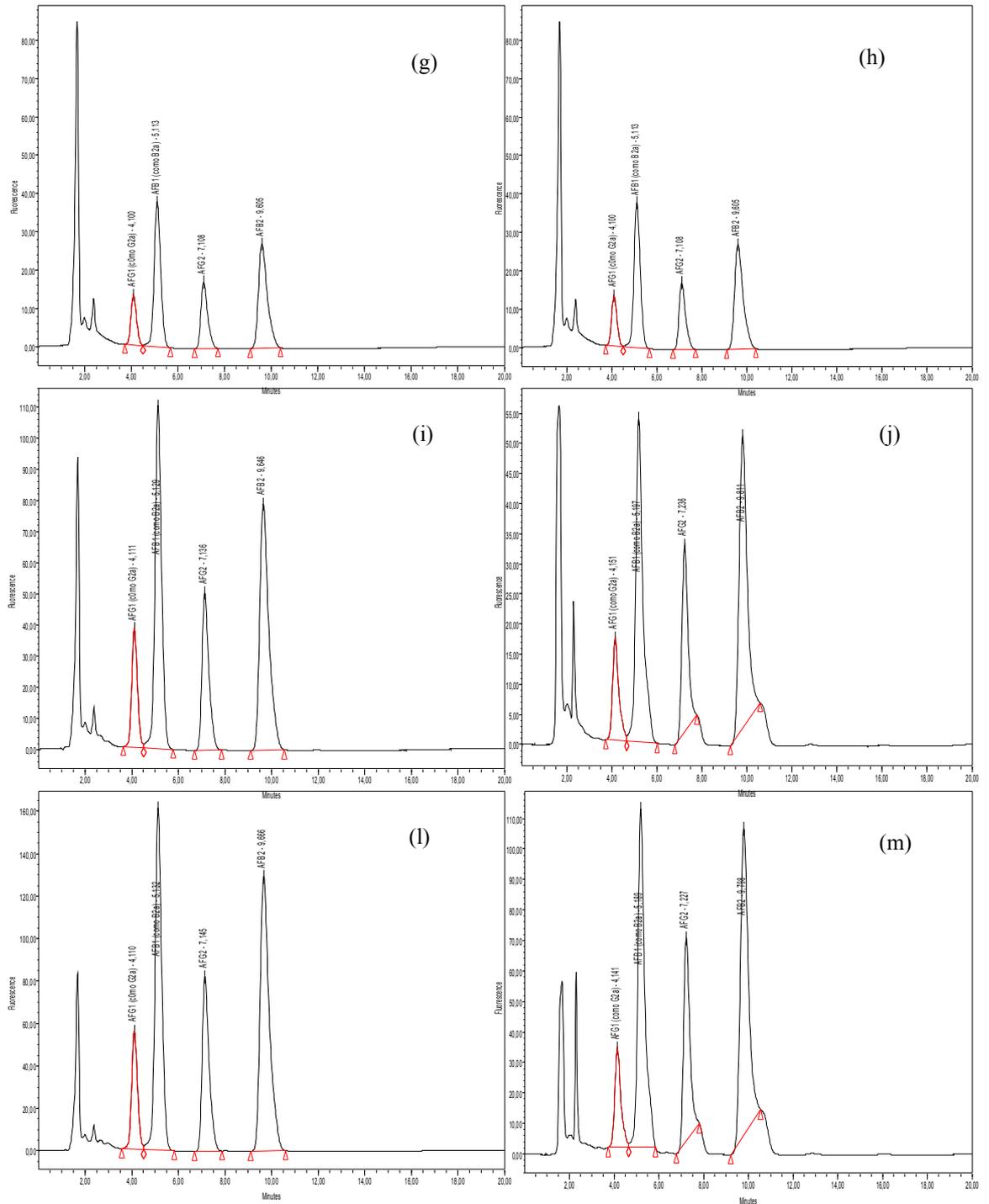


Figura 7. Cromatogramas típicos da curva padrão e da amostra contaminada nos seis pontos da curva de calibração: (g) P4, padrão, (h) P4, amostra, (i) P5, padrão, (j) P5, amostra, (l) P6, padrão, (m) P6, amostra.

4.3.5 Precisão ou Desvio Padrão Relativo (DPR ou RSDr)

A precisão foi avaliada em seis níveis de concentração com três replicatas. Foi calculado o desvio padrão relativo (RSDr) para cada nível de concentração. Como o

termo precisão fornece a dispersão dos valores medidos em torno de um valor médio, o Quadro 10 indica os resultados médios encontrados e seus respectivos desvios:

Quadro 10. Resultados de média ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) \pm desvio padrão relativo- DPR (%) .

Aflatoxina	AFG ₁		AFB ₁		AFG ₂		AFB ₂	
	Média	RSDr	Média	RSDr	Média	RSDr	Média	RSDr
<i>Ponto da Curva</i>								
P1	0,004	4,88	0,011	0,65	0,003	3,33	0,006	10,88
P2	0,007	10,33	0,006	33,67	0,008	27,71	0,008	30,20
P3	0,024	0,20	0,037	19,21	0,041	8,52	0,088	29,73
P4	0,052	22,18	0,071	16,62	0,037	19,11	0,057	16,92
P5	0,050	14,28	0,079	18,41	0,095	14,32	0,009	0,00
P6	0,103	0,68	0,122	2,89	0,192	0,37	0,140	7,56
Desvio Médio		8,63		14,67		12,27		14,82

A metodologia oficial da AOAC (AOAC 994.08) para quantificação de aflatoxinas em castanha-do-brasil, indica valores de precisão (RSDr) de 13,0; 9,0; 16,0 e 10%, respectivamente para, AFG₁, AFB₁, AFG₂ e AFB₂. Em um estudo colaborativo realizado por AOAC/IUPAC (1994) foram encontrados valores de Desvio Padrão Relativo (RSDr) variando entre de 6,0 a 23,2% para amostras de castanha-do-brasil.

Quando se compara os resultados encontrados com as duas literaturas citadas, pode-se observar que embora ocorram algumas variações quando se observa o valor de DPR para cada uma das aflatoxinas estudadas isoladamente, na média, esses valores encontram-se bem próximos entre si. Além disso, HUBER (1998) afirma que em métodos de análise de traços ou impurezas, são aceitos RSD de até 20%, dependendo da complexidade da amostra. Dessa forma, pode-se observar que a Precisão do método avaliada através do Desvio Padrão Relativo foi satisfatória, uma vez que se trata da análise de traços.

4.3.6 Efeito de matriz

A linearidade das duas curvas foi calculada a partir da equação da regressão linear, determinada pela ferramenta análise de dados do programa Excel, comparando-se o coeficiente de correlação linear (R^2) de cada uma das curvas. Realizou-se a comparação visual dos cromatogramas obtidos (Figuras 4 e 5), de onde se pode observar que não ocorre a existência de nenhum pico interferente nos tempos de retenção das aflatoxinas nas amostras nem nos padrões.

Procedeu-se então, com a verificação da homocedasticidade das duas curvas pelo teste F e a comparação entre as inclinações das duas curvas pelo teste t.

Para esse caso avaliou-se primeiramente se as variâncias residuais das duas curvas eram significativamente diferentes, através do teste F e em seguida aplicou-se o teste t mais apropriado. A estatística utilizada para avaliar esse efeito através da comparação dos coeficientes angulares das duas curvas analíticas é apresentada no Quadro 12. Como para todas as aflatoxinas o valor de F calculado foi menor que o valor de F tabelado, pôde-se considerar que não há diferença significativa entre as variâncias residuais e que as mesmas são iguais. Neste caso, a matriz não tem efeito sobre a precisão do método na faixa de estudo avaliada.

Com isso, avaliou-se também se os coeficientes angulares das curvas analíticas obtidas para o solvente e para matriz são significativamente diferentes através do teste t (*Student*). O valor de t calculado menor que o valor de t tabelado indica que a matriz não afeta o ensaio.

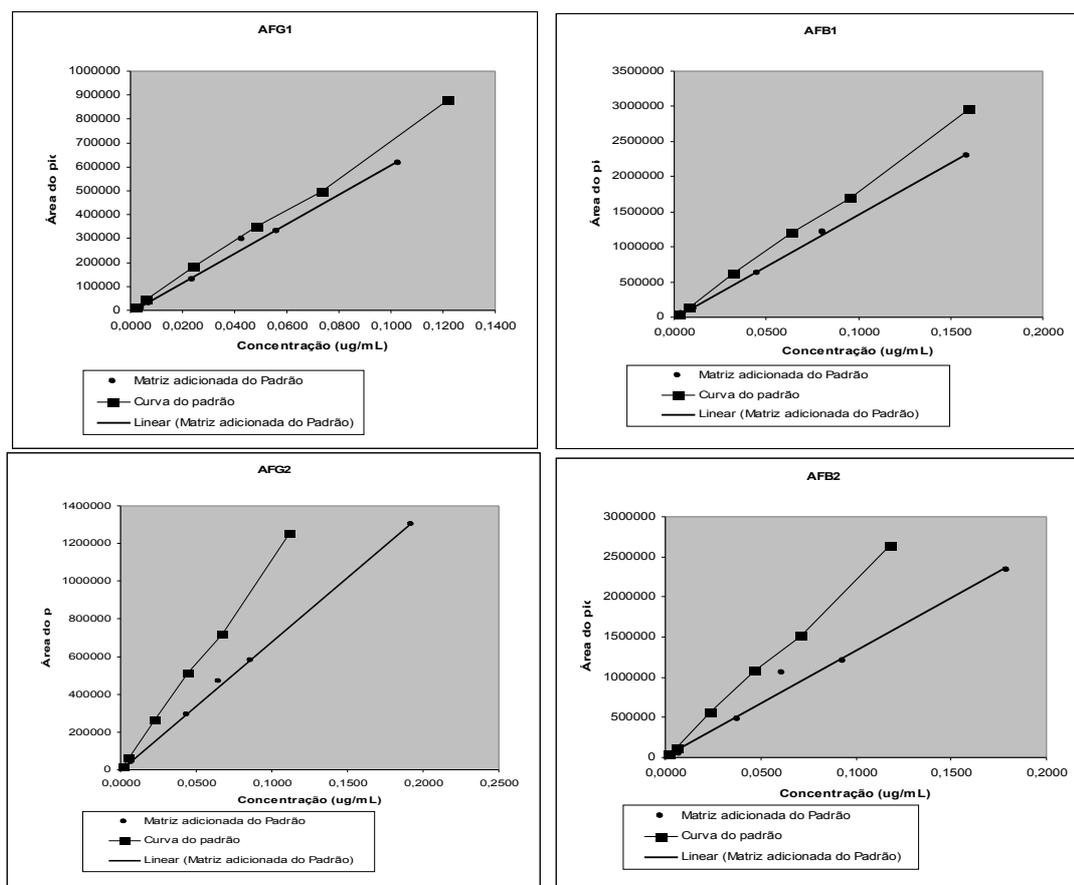


Figura 8. Representação gráfica das curvas analíticas dos padrões em solvente e na matriz para as aflatoxinas AFG₁, AFB₁, AFG₂ e AFB₂.

Quadro 11. Coeficientes de correlação da curva do padrão e da matriz adicionada do padrão.

Aflatoxina	AFG ₁	AFB ₁	AFG ₂	AFB ₂
R ² padrão	0,9984	0,9989	0,9986	0,9987
R ² matriz	0,9915	0,9989	0,9991	0,9829

Quadro 12. Resultados do Teste F e do Teste t.

Aflatoxinas	F calculado	t calculado
AFG ₁	0,652	0,269
AFB ₁	0,902	-0,090
AFG ₂	2,733	-0,721
AFB ₂	2,153	-0,618
F tabelado = Var menor/ Var maior = 5,050		t tabelado = 2,23

4.3.7 Robustez

Para avaliação da robustez do método foram realizadas alterações nos seguintes parâmetros: massa de amostra, velocidade de rotação do blender, volume de metanol e sulfato de cobre adicionados na extração, tempo de agitação no blender, volume de diclorometano e tempo de agitação utilizados na partição. Foram avaliados a média dos 8 resultados obtidos, em somente um nível de contaminação, e o desvio padrão, que teve valor máximo de 1,8% entre estes resultados, de onde pôde-se concluir que o método é robusto para as variações a que foi submetido.

Como a robustez de um método é a sua capacidade de resistir a pequenas variações dos parâmetros analíticos sem alterar significativamente sua exatidão e precisão, podemos admitir que, como obtivemos um desvio padrão pequeno, o método pode suportar, sem perder a confiabilidade, pequenas variabilidades na execução de seu procedimento.

Quadro 13. Resultados médios do ensaio para verificação da robustez do método.

Aflatoxina	Média dos resultados ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	Desvio Padrão
AFG ₁	0,024	1,06
AFB ₁	0,043	1,54
AFG ₂	0,041	1,80
AFB ₂	0,042	1,55

5 CONCLUSÕES

O desenvolvimento de uma metodologia focada especificamente para castanha-do-brasil utilizando uma técnica analítica mais precisa e confiável como a cromatografia líquida de alta eficiência e detector de fluorescência mostrou vantagens significativas na detecção de aflatoxinas quando comparada a técnica de cromatografia em camada delgada.

A abordagem usada na análise de partes da castanha-do-brasil (casca, amêndoa e castanha integral) se mostrou bastante interessante e útil, visto que a análise do fruto integral não retrata a realidade da contaminação deste alimento pelas aflatoxinas.

A metodologia desenvolvida, ou seja, a extração no método modificado seguida de quantificação por CLAE, oferece resultados satisfatórios tanto na etapa de extração quanto na etapa de quantificação de aflatoxinas em castanha-do-brasil, uma vez que os parâmetros de validação levantados mostraram-se adequados quando comparados aos resultados das literaturas citadas.

A curva de calibração apresentou coeficientes de correlação variando entre 0,9936 e 0,9997, sendo superiores aos valores recomendados pela ANVISA e pelo INMETRO.

O exame dos gráficos revelou que não ocorre a existência de uma tendência nos resíduos, confirmando a adequação do modelo testado e demonstrando que no método não ocorrem erros sistemáticos.

O limite de detecção foi determinado visualmente e a análise dos cromatogramas deu origem ao LD, que foi determinado pela visualização da menor concentração visível (detectável) para cada aflatoxina, sendo de 0,263; 0,345; 0,241 e 0,254 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ de amostra para AFB₁, AFB₂, AFG₁ e AFG₂, respectivamente.

O limite de quantificação foi estabelecido como sendo 3 vezes o limite de detecção e nas condições de trabalho foi de 0,790; 1,036; 0,725 e 0,763 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ de amostra para AFB₁, AFB₂, AFG₁ e AFG₂, respectivamente.

O tempo de retenção variou entre 4,2 e 10,6 para as quatro aflatoxinas.

O Desvio Padrão Relativo (DPR) variou entre 8,6 e 14,8, sendo satisfatório para o método, pois trata-se de análise de traços, onde são aceitos DPR de até 20%, dependendo da complexidade da amostra.

A verificação da homocedasticidade das curvas, tanto da amostra como do padrão, através do teste F e a comparação entre as inclinações das duas curvas pelo teste t, revelou que a metodologia não sofre efeito de matriz.

As amostras utilizadas para determinação da robustez do método apresentaram desvio padrão com um valor máximo de 1,8% entre os seus resultados, demonstrando que o método é robusto para as variações a que foi submetido.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMADO, M. A. - **Avaliação da Micoflora Natural e ocorrência de Aflatoxinas B1, B2, G1, e G2 em Amendoim e Amêndoa de Caju.** Viseu: Instituto Politécnico: 1999. Dissertação apresentada em Concurso de Provas Públicas para acesso à categoria de Professor Coordenador.

AMORIM, S.S.; SILVA, C.M.G.; PIRES, R.A.; SANTOS, E.A.; CASTRO, L.; SÁ, T.A. Occurrence of mycotoxins in food and feed in Brazil. In: **Official Program and Abstract Book of the 10th International IUPAC Symposium on Mycotoxin and Phycotoxin.** São Paulo, p. 141, 2000.

AOAC International. Association of Official Analytical Chemists International. **Official Methods of Analysis of AOAC International.** Edited by CUNNIFF, P. 16 th ed., 3 rd rev., 1997.

AOAC. **Official Methods of Analysis** 971.22 – Standards for Aflatoxins, 2000. Chapter 49, p.4.

AOAC. **Official Methods of Analysis.** 994.08 – Derivatization of Standards for aflatoxins, 2005. Chapter 49, p.25.

ARAÚJO, A.C.P; TELLES, D.L.; ALMEIDA, M.G.; NASCIMENTO, E.S. Determinación de aflatoxinas em cacahuets comercializados em Recife-PE, Brasil. **Alimentaria**, 35-37, 1994.

Associação Grupo de Analistas de Resíduos de Pesticidas (GARP); **Manual de Resíduos de Pesticidas em Alimentos** (apostila), 1999.

BAPTISTA, A. S. et al. Formas termolisada e viva de leveduras na redução de toxicidade causada por aflatoxinas. **Scientia agrícola.** v.59, n.2, p.257-260, abr./jun, 2002.

BANKS, J., HASNIP, S.; ANDERSON, S.; LUEBBE, W.; RECK, B. Rapid immunoassays for aflatoxins in Brazil nuts. **XIIth International IUPAC Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins** in Istanbul from May 21 - 25, 2007. Turkey

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E.; **Como Fazer Experimentos: Pesquisa e Desenvolvimento na Ciência e na Indústria**, Editora da Unicamp: Campinas, 2001.

BARROS NETO, B.; PIMENTEL, M. F.; ARAÚJO, M. C. U.; **Quim. Nova** 2002, 25, 856.

BEEBE, R. M. Reverse phase High Pressure Liquid Chromatographic Determination of Aflatoxin in foods. **Journal of Association of Official Analytical Chemists International**, v.61, n.6, p.1347-1352, 1978.

BERGERE, J. L. - **Techniques d'analyse immunochimiques, in Techniques d'analyse et contrôle dans les Industries Agro-Alimentaires**. Linden G. Goord. Paris: Apria. 2 (1991) 343-370.

BETINA, V. Thin layer chromatography of mycotoxins. **Journal of Chromatography**, 334(3), 211-276, 1985.

BOEING, CR. **Micotoxinas: causa de envenenamento alimentar**. Disponível em: <<http://www.crq.org.br/solucao/numero18/noticia1.htm>> Acesso em: 28 jul 2006.

BRASIL. **ANVISA** - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Determina a publicação do "Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos". Disponível em <http://www.anvisa.gov.br>. Acessado em 02 de abril de 2006.

BRASIL. Resolução n.34/76 da Comissão Nacional de Normas e padrões para alimentos.. Fixa padrões de tolerância para as aflatoxinas em alimentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, 19 jan.1977.Seção I, pt.I, p.710

BRASIL. Leis, decretos, etc. Portaria n. 183 do Ministério da agricultura e da reforma agrária. Art I Adotar regulamento técnico do MERCOSUL sobre limites máximos de aflatoxinas admissíveis no leite, amendoim e milho, aprovado pela resolução n. 56/94 do grupo Mercado comum do Sul de 01 de janeiro de 1995. **Diário Oficial da União**, Brasília, 25 mar de 1996.

BRASIL. Resolução RDC nº 274 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Aprova o Regulamento Técnico Sobre Limites Máximos de Aflatoxinas Admissíveis no Leite, no Amendoim, no Milho. **Diário Oficial da União**, Brasília, 16 de out. de 2002

BRERA C; MIRAGLIA M; COLATOSTI, M. Evaluation of the impact of mycotoxins on human health: Sources of errors. **Microchemical Journal**, 59 (1), 45-49, 1998.

BRUCE, P.; MINKKINEN, P.; RIEKKOLA, M. L. Practical method validation: validation sufficient for an analysis method. **Mikrochim Acta**, 128, 93-106, 1998.

Brogeras, L. M^a. G. Disponível em: <http://www.analizacalidad.com/micotoxinas.htm>. Acesso em: 20/07/08.

BULLERMAN, L. B.; SCHOEREDER, L. L.; PARK, K. Y. Formation and control of mycotoxins in food. **Journal of Food Protection**, 47(8), 637-646, 1984.

BULLERMAN, L.B. & TSAI, W.J. Incidence and levels of *Fusarium moniliforme*, *Fusarium proliferatum* and fumonisins in corn and corn-based foods and feeds. **Journal of Food Protection**, 57(6), 541-546, 1994.

BUTLER, W.H. Aflatoxin. In: PURCHASE, I.F.H. (ed.) **Mycotoxins**. Elsevier, 1-28, 1974.

CALDAS, E. D.; SILVA, S.C.; OLIVEIRA, J. Aflatoxinas e ocratoxina A em alimentos e riscos para a saúde humana. **Revista de Saúde Pública**, 36(3), 319-323, 2002.

CARREIRO, G. Hepatite B e Hepatocarcinoma. **Revista Brasileira de Cancerologia**. Rio de Janeiro, v.50, n.2, p.166-169. 2004.

CASS, Q. B.; DEGANI, A. L. G. **Desenvolvimento de Métodos por HPLC: Fundamentos < Estratégias e Validação**. Editora Eduscar. 2001. 77p.

CASTRO, M.F.P.P.M; VALENTE SOARES, L.M.; FURLANI, R.P.Z. Mycoflora, aflatoxigenic species and mycotoxins in freshly harvested corn (*Zea mays* L.): a preliminary study. **Revista de Microbiologia**, 26 (4), 289-295, 1995.

CHAMBERLAIN, W.J.; BACON, C.W.; NORRED, W.P.; VOSS, K.A. Levels of fumonisin B1 in corn naturally contaminated with aflatoxins. **Food and Chemical Toxicology**, 31, 995-998, 1993.

CHELKOWSKI, J. & LEW, H. *Fusarium* species of Liseola section occurrence in cereals and ability to produce fumonisins. **Microbiologie Aliments Nutrition**, 10, 49-53, 1992.

CHUI, Q. S. H.; ZUCCHINI, R. R.; LICHTIG, J.; *Quim. Nova* **2001**, 24, 374.

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

COLAÇO, W.; FERAZ, U.; ALBUQUERQUE, L. R. Incidência de aflatoxinas em amendoim e produtos derivados consumidos na cidade de Recife, no período de 1989 a 1991. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, 54(1), 1-4, 1994.

COLE, R.J. & COX, R.M. In: **Handbook of Toxic Fungal Metabolites**. New York: Academic Press, 937p, 1981.

COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P. S. **Princípios básicos da cromatografia. In: Introdução a métodos cromatográficos**. 6.ed. Campinas: Unicamp, 1995. p. 13-19.

COMPANHIA DE ARMAZENS E SILOS DO ESTADO DE MINAS GERAIS. Disponível em: <http://www.casemg.com.br/serviços/armazem_conv.html> Acesso em 28 jun 2005.

CORRÊA, T.B.S.; RODRIGUES, H.R.; VARGAS, E.A.; ASSAD, E.D.; PRADO, G.; COSTA, P.P. Evaluation of the incidence of mycotoxins in Brazilian maize. In: **Official Program and Abstract Book of the 10th International IUPAC Symposium on Mycotoxin and Phycotoxin**; São Paulo. p.134, 2000.

CREPPY, E.E. Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe. **Toxicol. Lett.**, v. 127, p. 19-28, 2002.

CROSBY, N.T. Review of current and future analytical methods for the determination of mycotoxins. **Food Additives and Contaminants**, 1(1), 39-44, 1984.

CUADROS-RODRÍGUEZ, L.; GÁMIZ-GRACIA, L.; ALMANSA-LÓPEZ, E. M.; BOSQUE- SENDRA, J. M.; **Trends Anal. Chem.** 2001, 20, 620.

CULLEN, J.M. & NEWBERNE, P.M. Acute hepatotoxicity of aflatoxins. In: EATON, D.L.; GROOPMAN, J.D. (eds.) **The Toxicology of aflatoxins: Human health, veterinary, and agricultural significance.** Academic Press Inc., 3-26, 1994.

CUSTODIO, R.; de ANDRADE, J. C.; AUGUSTO, F.; **Quim. Nova** 1997, 20, 219.

DE RUIG, W.G.; STEPHANY, R.W.; DIJKSTRA, G. Criteria for the detection of analytes in test samples. **Journal of Association of Official Analytical Chemists**, 72(2), 487-490, 1989.

DOLL, R. & PETO, R. The causes of cancer: quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today. **Journal of National Cancer Institute**, 66, 1191-1308, 1981.

Embrapa luta para afastar ameaça à castanha-do-brasil. Disponível em: <www.folhadoamapa.com.br>. Publicado em: 23/03/05 | 14:04

EURACHEM; The Fitness for Purpose of Analytical Methods: **A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics**, 1st. ed., Teddington: UK, 1998.

EUROPEAN COMMISSION, DG-SANCO, Quality Control Procedures For Pesticide Residues Analysis, Document No. SANCO/10232/2006, Brussels, 24 March 2006.

FARIA, L. **Otimização do Processo de Beneficiamento e Embalagem de Castanha de Cajú.** Brasil, 2002.

FAO. RELATÓRIO FINAL. Conferência Regional FAO/OMS sobre Inocuidade dos Alimentos em África. 3-6 de Outubro de 2005. Harare, Zimbábue. ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS PARA A AGRICULTURA E A ALIMENTAÇÃO. Roma, FAO (2006).

FAO: **WORLDWIDE REGULATIONS FOR MYCOTOXINS 1995** - A Compendium FAO Food and Nutrition Paper, No. 64, Roma, 1997.

FONSECA, H. Sistema de amostragem para análise de aflatoxinas em grãos. **Revista de Microbiologia.** São Paulo, v. 21, n.2, p.66-70, 1991.

FONSECA, H. **Os fungos e a deterioração de alimentos.** Disponível: <<http://www.micotoxinas.com.br/boletim4.htm>>. Acesso em 05 de maio 2004.

FONSECA, H. BOLETIM TÉCNICO No. 13 - <http://www.micotoxinas.com.br/OAMENDOIMEAFLATOXINA>. Acesso em 20/6/2006.

FURLANI, R. P. Z.; SOARES, L. M. V. Survey of aflatoxins, ochratoxin A, zearalenone, and sterigmatocystin in tree nuts commercialized in Campinas, Sao Paulo. **Ciência e Tecnologia de Alimentos.** (1996), 16(3), 238-240.

FREIRE, F. C. O.; KOZAKIEWICZ, Z.; PATERSON, R. R. M. Mycoflora and mycotoxins in Brazilian black pepper, white pepper and Brazil nuts. **Mycopathologia**, v. 149, p. 13–19, 2000.

FREMY, J. M. ; CHU, F. S. - **Immunochemicals methods of analysis for Aflatoxins, in Micotoxins in Dairy Products**. Van Emond ed. New York: Elsevier. (1989) 97-125.

GILBERT, J. Recent advances in analytical methods for mycotoxins. **Food Additives and Contaminants**, 10(1), 37-48, 1993.

GLÓRIA, E.M.; FONSECA, H.; SOUZA, I.M. Occurrence of mycotoxins in maize delivered to the food industry in Brazil. **Tropical Science**, 37, 107-110, 1997.

GLORIA, E.M. et al. Distribution of aflatoxin contamination in maize samples. **Campinas**, v. 24, n.1, p.71-75. jan-mar. 2004.

GREEN, J. M.; **Anal. Chem.** 1996, 68, A305.

HAIŠLOVÁ, J. *et al.* Matriz-induced effects: a critical point in the gas chromatographic analysis of pesticide residues. **Journal of Chromatography A**, 800, 283-295, 1998.

HARRIS, C.C. Chemical and physical carcinogenesis: advances and perspectives for the 1990s. **Cancer Research**, v.51, p. 5023-44, 1991.

HENNIGEN, M.R. & DICK, T. Incidence and abundance of mycotoxins in corn in Rio Grande do Sul, Brazil. **Food Additives and Contaminants**, 12, 677-681, 1995.

HEYDEN, Y. V.; **Analisis** 1994, 22, M27.

HOLADAY, C.E. Minicolumn chromatography: state of the art. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, 58, 931A-934A, 1981.

HUBER, L. **Validation of analytical methods: review and strategy**. LC/GC Int., Feb, 96-105, 1998.

HUBER, L.; **LC-GC Int.** 1998, 11, 96.

HUSSEIN, S.H., BRASEL, J.M. Toxicity, metabolism and impact of micotoxins on humans e animals **Toxicology** , v. 167, n. 2, set, p 101-134, 2001.

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

Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO); **Vocabulário Internacional de Termos Fundamentais e Gerais de Metrologia**, 2ª ed., 2000.

INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial). DOQ-CGCRE-008. **Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos**. Rio de Janeiro: INMETRO, 2007. 24 p.

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

JAIMEZ, J. et al. Application of the assay of aflatoxins by liquid chromatography with fluorescence detection in food analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 882, p.1-10, 2000.

JECFA. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. **Safety evaluation of certain food additives and contaminants**. Geneva: World Health Organization; 1995.

JECFA. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. **Safety evaluation of certain food additives and contaminants – Aflatoxins**. Geneva: World Health Organization; 1998.

JECFA. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. **Safety evaluation of certain food additives and contaminants**. Geneva: World Health Organization; Fifty-sixth meeting, 2001.

Jenke, D. R.; **Instrument. Sci. Technol.** 1998, 26, 1.

JORDAN, L.; HANSEN, T.J.; ZABE, N.A. Automated mycotoxin analysis. **American Laboratory**, 26 (5), 20-24, 1994.

KAWASHIMA, L.M. **Micotoxinas em Alimentos e bebidas nacionais produzidos e comercializados em diferentes regiões do Brasil**. 2004. 110f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo.

KOCABAS, C.N. et al. The effects of Aflatoxin B1 on the development kwashiorkor in mice. **Hum exp Toxicol**, p. 155-153, Mar., 2003.

LOCATELLI, Maria *et al.* **Cultivo da Castanha-do-Brasil em Rondônia**. Disponível em: <http://www.sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Castanha/CultivodaCastanhadoBrasilRO/index.htm>. Acesso em: 20 mar. 2006.

LIMA, I. M. H.; FROTA, M. N. **O enfoque da metrologia química em análises toxicológicas na atividade turfística: validação de método analítico para determinação de cafeína em matrizes biológicas**. Química Nova, Vol. 30, No. 8, S1-S3, 2007.

LINO, C. M. et al - Research on medicinal plants. II. Contamination With aflatoxins B1, B2, G1 and G2. Livro de actas do 1º Encontro Internacional de Plantas aromáticas e medicinais. Ansião, (1998) 112-117

MACHINSKI JR., M. & VALENTE SOARES, L.M. Fumonisin B1 and B2 in Brazilian corn-based food products. **Food Additives and Contaminants**, 17, 875-879, 2000.

MALLMAN, C.A.; SANTÚRIO, J.M.; WENTZ, I. Aflatoxinas – aspectos clínicos e toxicológicos em suínos. **Ciência rural**. Santa Maria, v.24, n.3, p.635- 648, 1994.

MALLMANN, C.A.; HICKMANN, J.L.; ALMEIDA, C. A. A. de ; DILKIN, P. Técnica automatizada de purificação e quantificação de Aflatoxinas. **XIII Jornada Acadêmica Integrada**. Universidade Federal de Santa Maria. Rio Grande do Sul. 1998.

MARQUES, M. R. C. Scientist Information and Standards Development Dept. U. S. **Pharmacopeia**. 2008

MARTINS-MACIEL, E.R.; MACHINSKI JR, M.; PEREIRA, S.R.C. ; TAKAHACHI, G.; KEMMELMEIER, C.; NISHIYAMA, P. Incidence of aflatoxins and *Aspergillus flavus* in peanuts consumed in Maringá city, Brazil. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, 39(4), 807-813, 1996.

MILLER, D.M. & WILSON, D.M. Veterinary diseases related to aflatoxins. In: EATON, D.L. & GROOPMAN, J.D. (eds) **The Toxicology of Aflatoxins: Human Health, Veterinary and Agricultural Significance**, Academic Press, 347-364, 1994.

Ocorrência e métodos analíticos para determinação de micotoxinas em grãos e rações. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE MICOTOXINAS E MICOTOXICOSES EM AVES, 1995, CURITIBA. Características gerais das micotoxinas e micotoxicozes. **Campinas: FACTA**, 1995. p. 35-37

OGIDO, Rony. **Efeitos da exposição prolongada de aflatoxina B1 e fumonisina B1 em codornas: avaliação de parâmetros de desempenho e qualidade dos ovos**. Pirassununga, 2003.109 f. Dissertação (mestrado). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Universidade de São Paulo.

OLIVEIRA, V.; MESQUITA, A.J.; SERAFINI, A.B.; RIBEIRO,J.L.; SILVA, M.R.R. Ocorrência de aflatoxinas B1 e B2 em amendoim comercializado em Goiânia, GO, Brasil. **Revista de Microbiologia**, 23(4), 319-322, 1991.

OLIVEIRA, C. A. F e GERMANO P. M. L. Aflatoxinas: conceitos sobre mecanismos de toxicidade e seu envolvimento na etiologia do câncer hepático celular. **Revista Saúde Pública**, v.31, n.4, p.417-424, ago., 1997.

PEREIRA. M. M. G.; CARVALHO, E. P.; PRADO, G. Crescimento e Produção de Aflatoxinas por *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 20, n. 1 (2002)

PESTKA, J.J. Enhanced surveillance of foodborne mycotoxins by immunochemical assay. **Journal of Association of Official Analytical Chemists**, 71(6), 1075- 1081, 1988.

PIEIDADE, F.S.; FONSECA, H.; GLÓRIA, E.M.; DOMINGUES, M.A.C.; PIEIDADE, S.M.S.; BARBIN, D. Distribution of aflatoxins in corn fraction visually segregated for defects. **Brazilian journal of microbiology**. n.33, p.250-254, 2002.

REDDY,S.V.; FARID, W. PROPERTIES OF AFLATOXIN AND IT PRODUCING FUNGI www.aflatoxin.info/aflatoxin.asp

RIBANI, M; BOTTOLI, C. B. G; COLLINS, C.H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. **Validação em Métodos Cromatográficos e Eletroforéticos.** *Química. Nova*, Vol. 27, No. 5, 771-780, 2004

RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. & SABINO, M. Mycotoxin research in Brazil: the last decade in review. **Brazilian Journal of Microbiology**, 33, 1-11, 2002.

ROSA, MFAP. **Desenvolvimento de metodologia analítica para determinação de aflatoxina B₁, aflatoxicol M₁ e aflatoxicol por Cromatografia por camada delgada e cromatografia líquida de alta eficiência em amostras de patê de fígado industrializado.** ITAGUAÍ, 1995. 60 f. Tese (Mestrado em Microbiologia Veterinária) - INSTITUTO DE VETERINÁRIA, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

SABINO, M.; PRADO, G.; INOMATA, E.I.; PEDROSO, M.O., GARCIA, R.V. Natural occurrence of aflatoxins and zearalenone in maize in Brazil. Part II. **Food Additives and Contaminants**, 6(3), 327-331, 1989.

SABINO, M. Micotoxinas em Alimentos. In: OGA, S. (ed.) **Fundamentos de Toxicologia.** São Paulo: Atheneu Editora, 461-472, 1996.

SCOTT, P.M. Methods of analysis for mycotoxins – an overview. In: ROSSEL, J.B. & PRITCHARD, J.L.R (eds) **Analysis of oilseeds, fats and fatty foods.** Elsevier, 141-184, 1991.

SCOTT, P.M. Fumonisin. **International Journal of Food Microbiology**, 18, 257-270, 1993.

SCUSSEL, V. M. **Micotoxinas em alimentos. Florianópolis:** Insular, 1998. 144 p.

SCUSSEL, V.M. Estudo da incidência de aflatoxinas em amendoim (*Arachis hypogae* l.), milho (*zea mays* L.) e produtos derivados. **Campinas: UNICAMP**, 1984. 138 p.

Setor 1. http://www.setor1.com.br/micotoxinas/mico_toxinas.htm. Micotoxinas. Acesso em: 05/06/08.

Shabir, G. A.; *J. Chromatogr., A* 2003, 987, 57.

SKOOG, D. A.; HOLLER, J. F.; NIEMAN, T. A. **Princípios de análise instrumental.** 5. ed. Bookman, 2002.

SNEDECOR, S. W.; COCHRAN, W. G. **Statistical methods.** Ames: Iowa State University, Sixth edition, 1989. 503p.

SNYDER, L. R. ; Kirkland, J. J.; Glajch, J. L.; **Practical HPLC Method Development**, 2a ed., Wiley: New York, 1997, cap. 15.

SMITH, J.E; MOSS, M.O. **Mycotoxins: formation, analysis and significance.** Chichester: J. Wiley, p.148, 1985.

SWARTZ, M. E.; KRULL, I. S.; **Pharm. Technol.** 1998, 2, 12.

THOMPSON, M.; ELLISON, S. L. R.; FAJGELJ, A.; WILLETTS, P.; WOOD, R.; **Pure Appl. Chem.** 1999, 71, 337.

THOMPSON, M.; ELLISON, S.L.R.; WOOD, R. Harmonized Guidelines for Single Laboratory Validation of Methods of Analysis (IUPAC Technical Report). **Pure and Applied Chemistry**, 74, 835-855, 2002.

TRUCKSESS, M. W.; STACK, M. E.; MICHAEL, E.; NESCHEIM, S.; ALBERT, R. H.; ROMER, T. R. Multifunctional column coupled with liquid chromatography for determination of aflatoxins B1, B2, G1, and G2 in corn, almonds, Brazil nuts, peanuts, and pistachio nuts: collaborative study. **Journal of AOAC International** (1994), 77(6), 1512-21. Publisher: AOAC International.

United States Pharmacopeia Convention; *US Pharmacopeia 24, Validation of Compendial Methods* <1225>, Rockville, 1999.

VALENTE SOARES, L. M. **Micotoxinas: um método para análise simultânea e incidência em alimentos comercializados na região de Campinas** - São Paulo. Tese Doutorado. Faculdade de Engenharia de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 1987.

VALENTE SOARES, L.M. Como obter resultados confiáveis em cromatografia. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, 60(1), 79-84, 2001.

VALENTE SOARES, L.M. & RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Survey of aflatoxins, ochratoxin A, zearalenone, and sterigmatocystin in some Brazilian foods by using multi-toxin thin-layer chromatographic method. **Journal of Association of Official Analytical Chemists**, 72, 22-26, 1989.

VAN EGMOND, H.P. Analytical methodology and regulations for ochratoxin A. **Food Additives and Contaminants**, 13 (supplement), 11-13, 1996.

VAN PETEGHEM, C. - Review of methods for residue analysis. In Vitro toxicological studies and real time analysis of residues in food FLAIR. Concerted. Action n°8. Proceeding of Workshops held in Ghent, May 22-24, 1992, and Thessaloniki, October 30-31, 1992. 41-46.

VILHENA, M. R. **A transformação industrial da Castanha-do-brasil na COMARU - Região Sul do Amapá**. Dissertação apresentada ao Instituto de Geociências como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Política Científica e Tecnológica. Campinas - São Paulo. Fev. 2004

Vessman, J.; Stefan, R. I.; Staden, J. F. V.; Danzer, K.; Lindner, W.; Burns, D. T.; Fajgelj, A.; Müller, H.; **Pure Appl. Chem.** 2001, 73, 1381.

WHITAKER, T.B.; GIESBRECHT, F.G.; WU, J.; WINSTON JR, M.H.; DOWELL, F.E. Predicting the distribution of aflatoxin test results from farmers' stock peanuts. **Journal of Association of Official Analytical Chemists International** 77(3), 659-666, 1994.

WHITAKER, T.B.; TRUCKSESS, M.W.; JOHANSSON, A.S.; GIESBRECHT, F.G.; HAGLER JR, W.M.; BOWMAN, D.T. Variability associated with testing shelled corn for

fumonisin. **Journal of Association of Official Analytical Chemists International**, 81(6), 1162-1168, 1998.

WHITAKER, T.B; SLATE, A.B; JOHANSON, A.S; Sampling feeds for mycotoxin analysis In :DIAZ, D.E. The micotoxin blue book, Nottingham: **Nottingham University Press**, 2005. p. 1-21.

WHO-IARC. Monographs on the evolution of carcinogenic risks to humans, 1993. v. 56, p. 245; 445.

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** (2008), 88(6), 425-433.

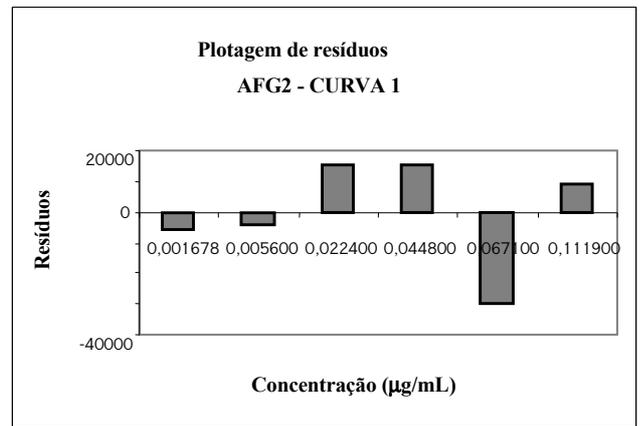
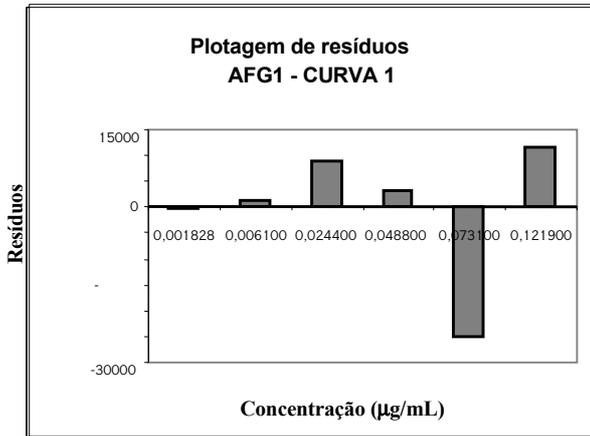
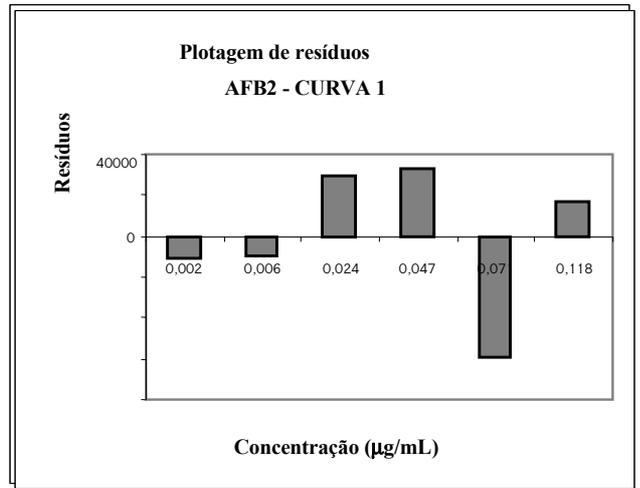
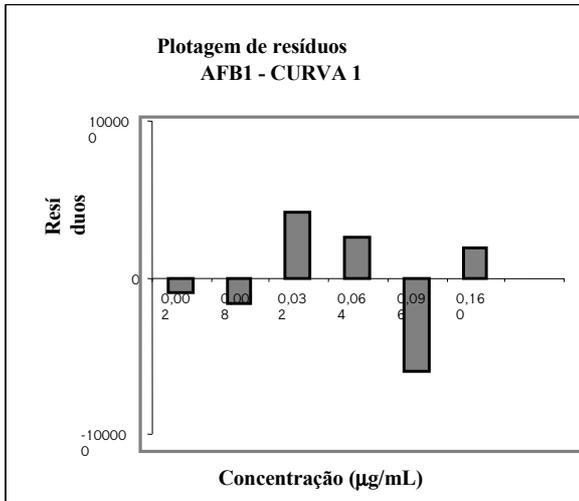
ZROSTLÍKOVA, J.; HAJŠLOVÁ, J.; GODULA, M.; MAŠTOVSKÁ. Performance of programmed temperature vaporizer, pulsed splitless and on-column injection techniques in analysis of pesticide residues in plant matrices. **Journal of Chromatography A**, 937 (1-2), 73-86, 2001.

A – Gráficos de Resíduos para a Curva 1.

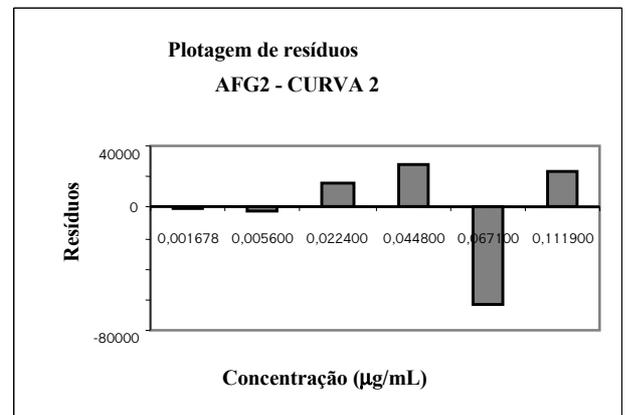
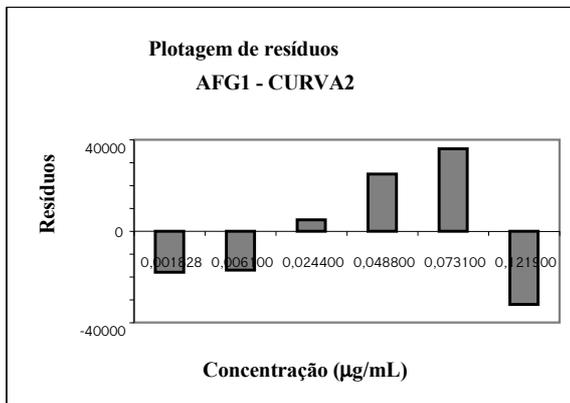
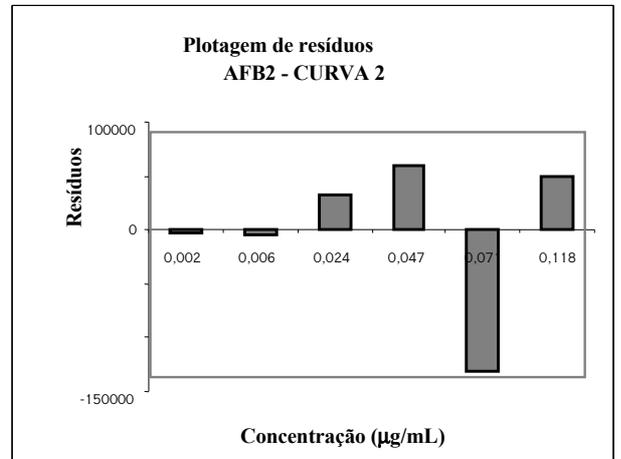
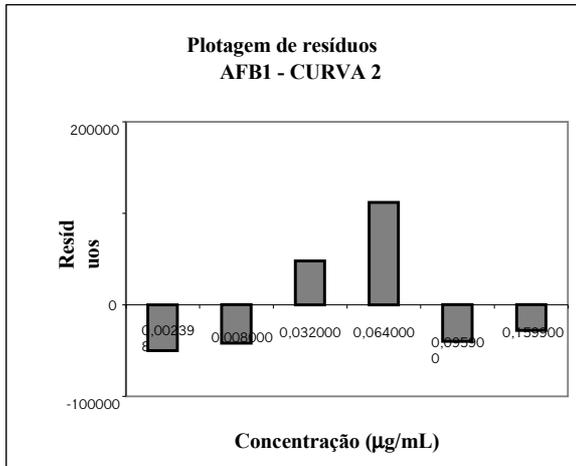
B – Gráficos de Resíduos para a Curva 2.

C – Gráficos de Resíduos para a Curva 3.

Anexo A – Gráficos de Resíduos para a Curva 1.



B – Gráficos de Resíduos para a Curva 2.



C – Gráficos de Resíduos para a Curva 3.

