

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS – ICEx

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA



Avaliação da eficiência de colunas de imunoafinidade reutilizadas para determinação de aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂ baseada na avaliação da homogeneidade de amostras de amendoim utilizadas na produção de material de referência

Monografia apresentada como pré-requisito para a obtenção do título de Bacharel em Química pelo Departamento de Química da Universidade Federal de Minas Gerais.

Orientador: Prof. Dr. Wellington Ferreira de Magalhães

Aluno: Gabriel Barros de Oliveira

Belo Horizonte, Novembro de 2011

Agradecimentos

Primeiramente , à Deus, por todo o possível e impossível que eu venho conquistado em toda minha vida

Aos meus pais, pelo apoio incondicional, paciência e afeto em toda minha vida

À vovó Terezinha, pela caridade e paciência em todos esses anos

Às minhas irmãs amadas, Lígia e Camila, por acreditarem sempre em um futuro promissor na minha vida

À amiga e companheira de trabalho Kátia, pela imensa boa vontade e pela enorme contribuição à minha formação

À amiga e companheira de trabalho Giovana, pela sabedoria , bom humor e receptividade desde o primeiro momento

Ao amigo e companheiro Nilton, por auxiliar com muita prontidão e eficiência todo o meu trabalho no laboratório

Ao amigo de todas as horas Marco Túlio, pela genialidade, sabedoria e humildade ao longo desses anos

Ao amigo inquestionável Mateus Fernandes, pela paciência, pelo conhecimento e pela descontração proporcionada até nós tempos mais difíceis

Ao amigo sem igual Fernando Jardim, pelas oportunidades de aprendizagem e presença em todo momento

Ao grande e melhor amigo Bruno Saldanha, por toda uma vida de companheirismo, sabedoria, determinação e paciência como um verdadeiro irmão desde sempre

Ao LACQSA, pela imensa oportunidade de aprendizagem e formação profissional que levarei por toda minha vida

Ao Prof. Wellington, pela prontidão imediata e pela imensa bagagem de conhecimento transmitida

Aos amigos da Universidade por toda uma história de luta, erros, conquistas e risadas

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	ABREVIACÕES	7
3	OBJETIVOS	8
	3.1 OBJETIVO GERAL	8
	3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	8
4	MATERIAL	9
	4.1 MATERIAL DE REFERÊNCIA	9
	4.2 APARATOS	9
	4.3 EQUIPAMENTOS	10
	4.4 REAGENTES E SOLUÇÕES	11
	4.4.1 <i>Preparo de soluções reagentes</i>	12
5	MÉTODOS	13
6	PROCEDIMENTOS PARA PREPARO DE AMOSTRAS E DETERMINAÇÃO DE AFBG	14
	6.1 PREPARO DE AMOSTRAS	15
	6.2 EXTRAÇÃO	15
	6.3 PURIFICAÇÃO E ELUIÇÃO UTILIZANDO COLUNA DE IMUNOAFINIDADE COM O PURIFICADOR AUTOMÁTICO DE AMOSTRAS (ASPEC)	15
	6.4 DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA	16
	6.4.1 <i>Cálculos</i>	18
7	TRATAMENTO DE DADOS	19
	7.1 TESTE DE COCHRAN PARA RESULTADOS DUPLICADOS	20
	7.2 TESTE PARA A NÃO-HOMOGENEIDADE SIGNIFICATIVA	21
8	RESULTADOS E DISCUSSÃO	22
9	CONCLUSÃO	34
10	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	35
	ANEXO I – TABELAS DE CÁLCULOS ESTATÍSTICOS PARA A AVALIAÇÃO DA HOMOGENEIDADE DAS AMOSTRAS ANALISADAS VIA COLUNAS DE IMUNOAFINIDADE NOVAS E REUTILIZADAS.	37

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – ESTRUTURA QUÍMICA DAS AFLATOXINAS B ₁ , B ₂ , G ₁ E G ₂	2
FIGURA 2 - PRINCÍPIO DAS COLUNAS DE IMUNOAFINIDADE.....	5
FIGURA 3 - CROMATOGRAMA DA SOLUÇÃO PADRÃO DE AFLATOXINAS G ₂ , G ₁ , B ₂ E B ₁ COM OS TEMPOS DE RETENÇÃO DE 10,6 MIN, 12,8 MIN, 14,1 MIN E 17,2 MIN, RESPECTIVAMENTE.	18
FIGURA 4 – CURVA DE CALIBRAÇÃO PARA AFLATOXINA B ₁	25
FIGURA 5 – CURVA DE CALIBRAÇÃO PARA AFLATOXINA B ₂	26
FIGURA 6 – CURVA DE CALIBRAÇÃO PARA AFLATOXINA G ₁	26
FIGURA 7 – CURVA DE CALIBRAÇÃO PARA AFLATOXINA G ₂	27
FIGURA 8 – RESULTADOS OBTIDOS UTILIZANDO COLUNAS DE IMUNOAFINIDADE NOVAS E REUTILIZADAS PARA AFLATOXINA B ₁ EM AMENDOIM	30
FIGURA 9 – RESULTADOS OBTIDOS UTILIZANDO COLUNAS DE IMUNOAFINIDADE NOVAS E REUTILIZADAS PARA AFLATOXINA B ₁ EM AMENDOIM CORRIGIDOS PELA RECUPERAÇÃO	30
FIGURA 10 – RESULTADOS OBTIDOS UTILIZANDO COLUNAS DE IMUNOAFINIDADE NOVAS E REUTILIZADAS PARA AFLATOXINA B ₂ EM AMENDOIM	31
FIGURA 11 – RESULTADOS OBTIDOS UTILIZANDO COLUNAS DE IMUNOAFINIDADE NOVAS E REUTILIZADAS PARA AFLATOXINA B ₂ EM AMENDOIM CORRIGIDOS PELA RECUPERAÇÃO	31
FIGURA 12 – RESULTADOS OBTIDOS UTILIZANDO COLUNAS DE IMUNOAFINIDADE NOVAS E REUTILIZADAS PARA AFLATOXINA G ₁ EM AMENDOIM	32
FIGURA 13 – RESULTADOS OBTIDOS UTILIZANDO COLUNAS DE IMUNOAFINIDADE NOVAS E REUTILIZADAS PARA AFLATOXINA G ₁ EM AMENDOIM CORRIGIDOS PELA RECUPERAÇÃO	32
FIGURA 14 – RESULTADOS OBTIDOS UTILIZANDO COLUNAS DE IMUNOAFINIDADE NOVAS E REUTILIZADAS PARA AFLATOXINA G ₂ EM AMENDOIM	33
FIGURA 15 – RESULTADOS OBTIDOS UTILIZANDO COLUNAS DE IMUNOAFINIDADE NOVAS E REUTILIZADAS PARA AFLATOXINA G ₂ EM AMENDOIM CORRIGIDOS PELA RECUPERAÇÃO	33

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - ESTIMATIVAS DE CUSTO PARA O PROCESSO DE EXTRAÇÃO E LIMPEZA DE AFLATOXINAS UTILIZANDO COLUNA DE IMUNOAFINIDADE. (RAMOS, 2008).....	6
TABELA 2 - CRITÉRIOS DE DESEMPENHO DOS MÉTODOS ANALÍTICOS PARA DETERMINAÇÃO DE AFLATOXINAS B ₁ , B ₂ , G ₁ E G ₂	8
TABELA 3 - FAIXAS DE CONCENTRAÇÕES APROXIMADAS PARA O PREPARO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO DE AFLA BG – CLAE.....	17
TABELA 4 - VALORES CRÍTICOS DE COCHRAN	21
TABELA 5 - TABELA DE FATORES F PARA O TESTE PARA A NÃO-HOMOGENEIDADE SIGNIFICATIVA	22
TABELA 6 – DADOS DE CONCENTRAÇÃO E ÁREA DOS PICOS CROMATOGRÁFICOS PARA A CONSTRUÇÃO DAS CURVAS DE CALIBRAÇÃO PARA AS AFLATOXINAS ANALISADAS.	24
TABELA 7 – RESULTADOS DA ANÁLISE DA AMOSTRA CONTROLE COM COLUNAS REUTILIZADAS.....	28
TABELA 8 – RESULTADOS DA ANÁLISE DA AMOSTRA CONTROLE COM COLUNAS NOVAS	28
TABELA 9 - RESULTADOS DA ANÁLISE DAS AMOSTRAS PARA PRODUÇÃO DE MATERIAL DE REFERÊNCIA UTILIZANDO COLUNAS REUTILIZADAS.....	28
TABELA 10 - RESULTADOS DA ANÁLISE DAS AMOSTRAS PARA PRODUÇÃO DE MATERIAL DE REFERÊNCIA UTILIZANDO COLUNAS NOVAS	29
TABELA 1A - TESTE DE COCHRAN PARA RESULTADOS DUPLICADOS DAS SUBAMOSTRAS DE AMENDOIM EM RELAÇÃO À AFLATOXINA B ₁	37
TABELA 2A - TESTE PARA NÃO-HOMOGENEIDADE SIGNIFICATIVA DAS SUBAMOSTRAS DE AMENDOIM EM RELAÇÃO À AFLATOXINA B ₁	38
TABELA 3A - TESTE DE COCHRAN PARA RESULTADOS DUPLICADOS DAS SUBAMOSTRAS DE AMENDOIM EM RELAÇÃO À AFLATOXINA B ₂	39
TABELA 4A - TESTE PARA NÃO-HOMOGENEIDADE SIGNIFICATIVA DAS SUBAMOSTRAS DE AMENDOIM EM RELAÇÃO À AFLATOXINA B ₂	40
TABELA 5A - TESTE DE COCHRAN PARA RESULTADOS DUPLICADOS DAS SUBAMOSTRAS DE AMENDOIM EM RELAÇÃO À AFLATOXINA G ₁	41
TABELA 6A - TESTE PARA NÃO-HOMOGENEIDADE SIGNIFICATIVA DAS SUBAMOSTRAS DE AMENDOIM EM RELAÇÃO À AFLATOXINA G ₁	42
TABELA 7A - TESTE DE COCHRAN PARA RESULTADOS DUPLICADOS DAS SUBAMOSTRAS DE AMENDOIM EM RELAÇÃO À AFLATOXINA G ₂	43
TABELA 8A - TESTE PARA NÃO-HOMOGENEIDADE SIGNIFICATIVA DAS SUBAMOSTRAS DE AMENDOIM EM RELAÇÃO À AFLATOXINA G ₂	44
TABELA 1B - TESTE DE COCHRAN PARA RESULTADOS DUPLICADOS DAS SUBAMOSTRAS DE AMENDOIM EM RELAÇÃO À AFLATOXINA B ₁	45

TABELA 2B - TESTE PARA NÃO-HOMOGENEIDADE SIGNIFICATIVA DAS SUBAMOSTRAS DE AMENDOIM EM RELAÇÃO À AFLATOXINA B ₁	46
TABELA 3B - TESTE DE COCHRAN PARA RESULTADOS DUPLICADOS DAS SUBAMOSTRAS DE AMENDOIM EM RELAÇÃO À AFLATOXINA B ₂	47
TABELA 4B - TESTE PARA NÃO-HOMOGENEIDADE SIGNIFICATIVA DAS SUBAMOSTRAS DE AMENDOIM EM RELAÇÃO À AFLATOXINA B ₂	48
TABELA 5B - TESTE DE COCHRAN PARA RESULTADOS DUPLICADOS DAS SUBAMOSTRAS DE AMENDOIM EM RELAÇÃO À AFLATOXINA G ₁	49
TABELA 6B - TESTE PARA NÃO-HOMOGENEIDADE SIGNIFICATIVA DAS SUBAMOSTRAS DE AMENDOIM EM RELAÇÃO À AFLATOXINA G ₁	50
TABELA 7B - TESTE DE COCHRAN PARA RESULTADOS DUPLICADOS DAS SUBAMOSTRAS DE AMENDOIM EM RELAÇÃO À AFLATOXINA G ₂	51
TABELA 8B - TESTE PARA NÃO-HOMOGENEIDADE SIGNIFICATIVA DAS SUBAMOSTRAS DE AMENDOIM EM RELAÇÃO À AFLATOXINA G ₂	52

1 INTRODUÇÃO

A agricultura do Brasil é uma das bases mais potentes da economia do país, que garante o fornecimento contínuo de insumos baseados em cereais, oleaginosas, hortaliças, frutas e derivados oriundos de processamento. (HAYASHI, 2007)

A contaminação fúngica e a produção de metabólitos tóxicos constituem fatores inevitáveis e de difícil controle, que repercutem na qualidade de matéria-prima e saúde do consumidor sendo que as toxinas mais comuns e maléficas tanto para o ser humano quanto para alguns animais são as aflatoxinas. (HAYASHI, 2007)

A presença de aflatoxinas nos alimentos e rações tem sido objeto de grande preocupação no mundo científico, desde a sua descoberta. As aflatoxinas são conhecidas por serem substâncias tóxicas, mutagênicas, teratogênicas, carcinogênicas e são apontadas como agentes causadores de câncer hepático, e outros tipos de câncer, em humanos, além das perdas econômicas que causam na agricultura (RUSTOM, 1997). Tais toxinas ocorrem amplamente em produtos vegetais, especialmente milho, trigo, farinha de trigo, cevada, nozes, amêndoa, pistache, arroz, feijão, coco, semente de algodão, pimenta-malagueta, gengibre, pimenta, pimentão-doce, frutas, incluindo respectivos derivados, a exemplo de frutas secas, cerveja, ração, assim como produtos de origem animal devido à ingestão de ração contaminada. (HAYASHI, 2007)

As aflatoxinas são produzidas por fungos do gênero *Aspergillus* spp, espécies *A. flavus*, *A. parasiticus* e *A. nominus* (MOSS, 1998). A incidência das aflatoxinas é relativamente maior em países de clima tropical ou subtropical, onde a temperatura e a umidade são favoráveis para o crescimento dos fungos (MOSS, 1998).

Há mais de 20 tipos de moléculas de aflatoxinas e seus derivados isolados, porém os principais tipos estudados continuam sendo a B₁, B₂, G₁ e G₂ (HUSSEIN e BRASEL, 2001). A estrutura química das aflatoxinas é muito semelhante, dado que são compostos químicos simples e de baixo peso molecular, sendo que todas apresentam um núcleo central cumarínico ligado a uma estrutura bi-furanóide (Figura 1). As aflatoxinas B apresentam anel ciclopentona na molécula, enquanto que as da série G apresentam anel lactona.

As aflatoxinas, assim como outros compostos heterocíclicos, são substâncias fluorescentes com características próprias. Tanto a aflatoxina B₁ (AFB₁) como a aflatoxina B₂ (AFB₂) apresentam uma fluorescência azul, enquanto que a G₁ (AFG₁) e a aflatoxina G₂ (AFG₂) apresentam uma fluorescência verde amarelada sob luz ultravioleta (HUSSEIN e BRASEL, 2001).

Apesar das semelhanças estruturais, as aflatoxinas apresentam diferentes graus de atividade biológica. A AFB₁, além de ser a mais freqüentemente encontrada em cereais, é a que apresenta maior poder toxigênico, seguida de AFG₁, AFB₂ e AFG₂ (COULOMBE, 1991). TERAO e UENO

(1978) demonstraram que a magnitude da toxidez da AFG₂, AFB₂ e AFG₁ correspondem a 10%, 20% e 50% da AFB₁, respectivamente.

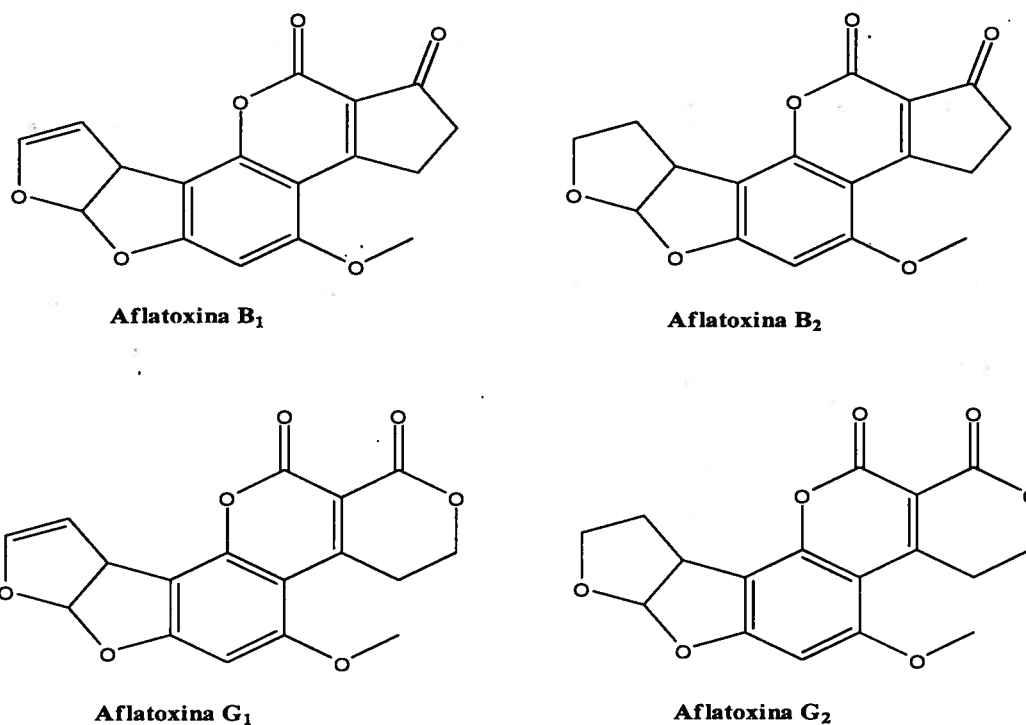


Figura 1 – Estrutura química das aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂ (FONTE: HUSSEIN e BRASEL, 2001.)

As técnicas analíticas para a detecção de micotoxinas estão sendo continuamente aprimoradas. Embora os custos analíticos possam constituir uma restrição à realização dos testes, esses custos são insignificantes se comparados às conseqüências econômicas causadas por quebras de produção e doenças associadas à contaminação por micotoxinas (BARNI, 2001).

Um método ideal – eficiente e adequado – para análise de micotoxinas deve ser simples, rápido, preciso, verídico, barato, automatizado, sensível e seletivo. Contudo, nenhum método satisfaz a todos esses requisitos. Conseqüentemente, o método adequado deve ser escolhido pelo objetivo da análise que se quer realizar o trabalho, de rotina ou em pesquisa (BARNI, 2001).

A seqüência analítica básica para o procedimento usado em análise de aflatoxinas é: (EIZENDEHER, 2005)

- preparo das amostras;
- extração;
- limpeza (purificação);
- detecção e quantificação e
- confirmação.

O trabalho foi realizado utilizando os recursos e o espaço físico do Laboratório de Controle de Qualidade e Segurança Alimentar – LACQSA – afiliado ao Laboratório Nacional Agropecuário de Minas Gerais (LANAGRO-MG) do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. O LACQSA apresenta infra-estrutura adequada e moderna, bem como profissionais qualificados e o eficiente sistema de gestão da qualidade na análise de alimentos.

A etapa de preparo de amostras é realizada de acordo com o POP 009, revisão 13 – “Preparo, armazenamento e descarte de amostras”, descrevendo o procedimento para moagem, homogeneização e estocagem das amostras. As etapas de extração, purificação, detecção e quantificação são realizadas de acordo com o POP 055, revisão 03 – “Determinação de aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂ por cromatografia líquida de alta eficiência e em camada delgada” que é a técnica validada e bem estabelecida pelo Laboratório de Controle de Qualidade e Segurança Alimentar – LACQSA - para a determinação de tais toxinas. O procedimento consiste basicamente em extração sólido-líquido, limpeza por coluna de imunoafinidade utilizando um purificador automático de amostras (ASPEC), separação e quantificação por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com derivatização pós-coluna e detecção por fluorescência molecular. A amostragem não é realizada pelo laboratório. A etapa de confirmação consiste na avaliação da qualidade dos resultados quanto perto eles estão do valor real. Esta avaliação é realizada pela análise de amostras artificialmente contaminadas (fortificadas) com o analito, com uma quantidade conhecida, para controle não-cego (ver Nota 1) e comparado com os critérios de aceitabilidade do LACQSA (Tabela 2).

Nota 1: controle não-cego é uma amostra que o técnico conhece a concentração/composição do analito a ser determinado na amostra. Permite avaliar de uma forma contínua o desempenho do laboratório na execução de um procedimento e a qualidade laboratorial como um todo. (POP 004, rev. 5).

Em atendimento aos requisitos gerais da norma para competência de laboratórios de ensaios e/ou calibração, NBR ISO/IEC 17025:2005, o laboratório utiliza métodos e procedimentos validados para todos os ensaios dentro de seu escopo, onde a qualidade do procedimento é avaliada em termos de:

- Tendência, que consiste na estimativa da componente do erro de medição que, em medições repetidas, permanece constante ou varia de maneira previsível – erro sistemático. (VIM, 2009)
- Precisão, que consiste no grau de concordância entre indicações ou valores medidos, obtidos por medições repetidas, no mesmo objeto ou em objetos similares, sob condições especificadas. A precisão de medição é geralmente expressa numericamente por

indicadores de incerteza tais como: dispersão, desvio-padrão, variância ou coeficiente de variação, sob condições de medição especificadas. Tais condições podem ser, por exemplo, condições de repetitividade, condições de precisão intermediária ou condições de reprodutibilidade (VIM, 2009)

- Seletividade, que é definida como propriedade de um sistema de medição, utilizado com um procedimento de medição especificado, segundo a qual o sistema fornece valores medidos para um ou vários mensurandos, tal que os valores de cada mensurando sejam independentes uns dos outros ou de outras grandezas associadas ao fenômeno. corpo ou substância em estudo (VIM, 2009).
- Limites de detecção, definido como valor medido, obtido por um dado procedimento de medição, para o qual a probabilidade de declarar falsamente a ausência de um componente em um material é b , sendo a a probabilidade de declarar falsamente a sua presença. (VIM, 2009)

NOTA : A IUPAC recomenda valores convencionais para α e β iguais a 0,05.

- Incerteza de medição, que consiste em um parâmetro não negativo que caracteriza a dispersão dos valores atribuídos a um mensurando, com base nas informações utilizadas. (VIM, 2009)

A etapa de purificação com o uso de colunas de imunoafinidade é considerada crítica na qualidade dos resultados e dispendiosa sendo necessário um estudo cuidadoso visando redução dos custos sem perder na qualidade dos resultados.

O uso de colunas de imunoafinidade em procedimentos analíticos constitui uma alternativa promissora às técnicas convencionais de limpeza na análise de micotoxinas, conferindo rapidez e especificidade na etapa de limpeza da amostra, eliminando significativamente o efeito de matriz, além de proporcionar simplicidade e boa faixa de recuperação, melhorando limites de detecção e possibilitando análise de variedade de compostos em distintas matrizes complexas. Uma vantagem incontestável também está na utilização de tampão, dispensando emprego de grandes volumes de solventes tóxicos durante o preparo. Outras vantagens constituem em possibilidade de automação da técnica e boa disponibilidade comercial das colunas (HAYASHI, 2007).

Basicamente, as colunas de imunoafinidade compõem-se de suporte de fase sólida ativada onde se imobilizam os anticorpos específicos contra determinada micotoxina. Esses anticorpos ficam em contato constante com uma solução tampão fosfato-salina (PBS) que tem como finalidade manter um valor de pH praticamente constante, quando adicionados a diferentes meios. A concentração salina presente no PBS se iguala à do meio natural onde os anticorpos são produzidos. O processo de limpeza consiste na ligação seletiva da micotoxina presente no extrato

aos anticorpos da coluna, seguido de eluição com solvente apropriado (Figura 2). A imobilização dos anticorpos à matriz da coluna e a afinidade do analito ao anticorpo específico durante a limpeza, lavagem e condições de eluição da amostra são fatores determinantes da eficiência e aplicabilidade da coluna (HAYASHI, 2007; WIKIPÉDIA, 2011)

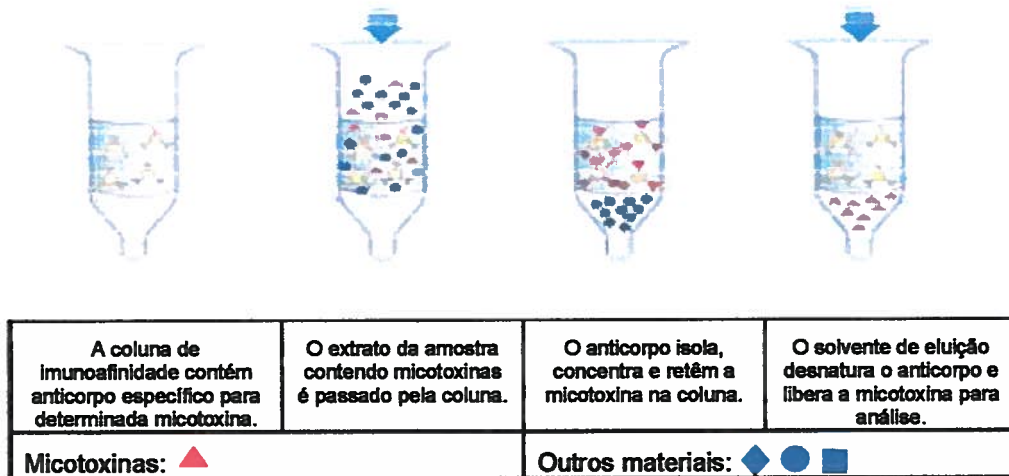


Figura 2 - Princípio das colunas de imunoafinidade (RHÔNE DIAGNOSTICS TECHNOLOGIES LTD, 2004)
Embora exista a disponibilidade comercial de colunas de imunoafinidade para análise de micotoxinas em diferentes matrizes, o alto custo tem exigido novas opções de uso das colunas e tal desvantagem tende a ser minimizada aplicando processo de regeneração adequada à coluna, capaz de permitir reutilização sem perda significativa na atividade, reduzindo o custo da análise (HAYASHI, 2007).

De acordo com Ramos *et. al*, o custo de extração e limpeza utilizando colunas de imunoafinidade é praticamente todo concentrado no custo da coluna (aproximadamente 92% do custo deve-se a coluna de imunoafinidade) como é mostrado na Tabela 1, lembrando que tal estimativa não levou em consideração os gastos referentes à manutenção de equipamentos, à infra-estrutura adequada, ao preparo, armazenamento e descarte de amostras e à outros fatores que não sejam os insumos utilizados na etapa de extração e purificação.

Tabela 1 - Estimativas de custo para o processo de extração e limpeza de aflatoxinas utilizando coluna de imunoafinidade. (RAMOS, 2008)

Material	Descrição	Quantidade	Valor (R\$)
Metanol 80%	200mL de água	100mL	1,80
	800mL de metanol		
Metanol	-	1.5mL	0,14
Papel de Filtro	Whatman nº 4	1 un.	0,12
	8g NaCl		
	1,2g Na ₂ HPO ₄ anidro		
Tampão PBS	0,2g KH ₂ PO ₄	-	0,01
	0,2g KCl		
	990mL de água		
Coluna de imunoafinidade	-	1 un.	30,00
Mão-de-obra	80 amostras/dia/técnico	-	0,38
Total			R\$ 32,45

Com o objetivo diminuir os custos de análise garantindo a confiabilidade e qualidade dos métodos validados pelo LACQSA, este trabalho propõe uma avaliação da atividade das colunas de imunoafinidade reutilizadas pela primeira vez seguindo todo procedimento descrito no POP 055, rev 03 com os requisitos necessários para que o uso destas colunas possa ser incorporado nas análises de rotina do laboratório sem perda significativa na qualidade dos resultados. Para este fim, foi realizada a avaliação da homogeneidade de amostras de amendoim naturalmente contaminadas para produção de material de referência de acordo com o *Protocolo Internacional Harmonizado para Ensaios de Proficiência em Laboratórios de Química Analítica* (ELLISON, 2006) utilizando colunas de imunoafinidade novas e reutilizadas (ver Nota 2), ambas da marca R-Biopharm®, para uma análise comparatória, além da análise de recuperação (veracidade) e desvio padrão relativo (precisão), tanto utilizando colunas novas quanto colunas reutilizadas, de amostras artificialmente contaminadas (fortificadas) com o analito para controle não-cego (ver Nota 1).

Nota 2: As colunas novas utilizadas pela primeira vez, quando possível, são lavadas com 20 mL de solução tampão de PBS (KH₂PO₄ 0,20 g/L; Na₂HPO₄ 1,20g/L; NaCl 8,0 g/L e KCl 0,2 g/L) e são guardadas a um temperatura de 2 a 8 °C por, no mínimo, 1 mês. Colunas usadas na purificação de matrizes sujas são descartadas (VARGAS, 2002).

A utilização de materiais de referência em análises químicas confere aos resultados uma grande confiabilidade e rastreabilidade analítica devido ao material de referência (MR) ser suficientemente homogêneo e estável em relação a propriedades específicas, preparado para se adequar a uma

utilização pretendida numa medição ou num exame de propriedades qualitativas (VIM, 2009). Os materiais de referência são largamente utilizados para calibração de instrumentos de medição, para a avaliação de métodos de análise ou de ensaio e para a garantia da qualidade de medições. Todavia, ao se empregar um MR, recomenda-se considerar seu custo relativo, sua disponibilidade (acessibilidade) e a técnica de medição (POP 098, rev. 00). Baseados nesses fatores, conclui-se que a produção de MR pelo LACQSA torna-se viável.

Tal produção é realizada com o uso de amostras naturalmente contaminadas suficientemente homogêneas e estáveis para serem analisadas através de procedimentos validados e por diversos laboratórios em programas interlaboratoriais credenciados garantindo confiabilidade e rastreabilidade dos valores de concentração determinados.

2 ABREVIATÕES

- Afla B₁ = Aflatoxina B₁ = AFB₁
- Afla B₂ = Aflatoxina B₂ = AFB₂
- Afla G₁ = Aflatoxina G₁ = AFG₁
- Afla G₂ = Aflatoxina G₂ = AFG₂
- Afla Total = Aflatoxina Total = Afla B₁+Afla B₂+Afla G₁+Afla G₂ = AF_{TOTAL}
- Afla BG = Aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂
- CLAE= Cromatografia líquida de alta eficiência
- LACQSA= Laboratório de Controle de Qualidade e Segurança Alimentar
- MR = Material de referência
- POP = Procedimento Operacional Padrão (elaborados no LACQSA)
- RT= Responsável técnico.
- r = repetitividade
- R = reprodutibilidade
- s =desvio padrão
- x = média dos valores medidos
- rev. = revisão
- DPR= RSD = desvio padrão relativo (relative standard deviation) = $DPR = \frac{s}{x}$

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar o uso de colunas de imunoafinidade reutilizadas pela primeira vez utilizando o procedimento de preparo de amostras descrito no POP 009, rev 13 – “Preparo, armazenamento e descarte de amostras” e os procedimentos de extração, limpeza, separação e quantificação descritos no POP 055, rev 3 - “Determinação de aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂ por cromatografia líquida de alta eficiência e em camada delgada” para a determinação de afla BG em amostras de amendoim naturalmente contaminadas e artificialmente contaminadas (amostras de controle não-cego) baseado nos critérios de aceitabilidade do LAQSA e da estimativa da homogeneidade dessas amostras para produção de material de referência segundo o *Protocolo Internacional Harmonizado para Ensaio de Proficiência em Laboratórios de Química Analítica* (IUPAC, 2006).

3.2 Objetivos específicos

Avaliar o desempenho das colunas reutilizadas comparando os resultados obtidos com os resultados provenientes do uso de colunas novas para os seguintes casos:

- ♦ Avaliação da homogeneidade de amostras de amendoim naturalmente contaminadas para a produção de material de referência de acordo com o *Protocolo Internacional Harmonizado para Ensaio de Proficiência em Laboratórios de Química Analítica* (ELLISON, 2006)
- ♦ Avaliação da exatidão (tendência e precisão) dos resultados obtidos da análise em duplicata de amostras de controle intralaboratorial com contaminação artificial não-cega de acordo com os critérios de desempenho descritos no POP 034, rev. 04 – “Validação de métodos analíticos” que estão resumidos na Tabela 2.

Tabela 2 - Critérios de desempenho dos métodos analíticos para determinação de aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂

Micotoxina	Nível (µg/kg)	Recuperação (%)	DPR _r	DPR _R
Aflatoxinas B ₁ , B ₂ , G ₁ , G ₂	<1	50 a 120	0,66 x DPR _R	Recomendado: valor derivado da equação de Horwitz Máximo: 2 x o valor derivado da equação de Horwitz
	1 - 10	70 a 110		
	>10	80 a 110		
Aflatoxinas B ₁ , B ₂ , G ₁ , G ₂	<1	50 a 120	30%	45%
	1 - 10	70 a 110	24%	36%
	>10	80 a 110	21%	32%

Os valores de recuperação estimam a veracidade do método e a precisão é estimada pela expressão $DPR_R = 2^{(1-0,5/\log C)}$ em que: C é a faixa de concentração (ou seja, 1 = 100g/100g, 0,001

= 1000mg/kg). esta expressão é conhecida como equação Horwitz, que trata-se de uma equação geral referente à precisão, independente do produto e da matriz, dependente apenas da concentração para a maior parte dos métodos de análise.

4 MATERIAL

4.1 Material de referência

- Soluções padrão de aflatoxinas B₁, B₂, G₁ certificadas SIGMA-ALDRICH (Material de Referência Certificado) e solução de aflatoxina G₂ SIGMA-ALDRICH devidamente padronizadas mensalmente, conforme POP 013, rev. 6 - "Preparo e padronização de soluções padrão de micotoxinas".
- Amostras de amendoim (AFBG não detectadas), para serem utilizadas como branco e fortificadas com solução padrão de afla BG;
- Amostras de amendoim naturalmente contaminadas utilizadas para produção de material de referência.

4.2 Aparatos

- Adaptadores para tubos de 1,3 e 6 mL, tipo bond - elut ou equivalente;
- Aparato para filtração à vácuo com reservatório de 300 mL e base do funil de 47 mm com rolha para conexão ao kitasato;
- Balões volumétricos de 1000 e 2000 mL;
- Béqueres de 50, 100, 400 e 600 mL;
- Bulbos conta-gotas;
- Colunas de imunoafinidade contendo anticorpos específicos para AFLAB₁, AFLAB₂, AFLAG₁, AFLAG₂ com capacidade de 50, 10, 30 e 10 ng e que apresente recuperação maior que 90, 85, 90 e 60% para AFLAB₁, AFLAB₂, AFLAG₁ e AFLAG₂, respectivamente;
- Coluna Shimpack CLC-ODS (M) 250 x 4,6 mm, partículas de 5 µm ou equivalente;
- Espátulas;
- Frascos de vidro com capacidade para 1 L, tipo Mason ou equivalente;
- Frascos para padrão com fundo duplo cônico e tampa de baquelite;
- Frascos para injetor automático para cromatógrafo líquido de 1 ou 2 mL com tampa snap-cap ou equivalente;

- Funil de haste curta com 7 cm de diâmetro;
- Garra para conexão das partes do aparato de filtração;
- Grades para tubos;
- Hélice de aço inoxidável;
- Kitasatos de 500 mL ;
- Membrana filtrante de 0,45 μm ;
- Membrana de fibra de vidro com 55 mm de diâmetro, 1 μm , tipo Whatman GF/B ou equivalente;
- Papel alumínio;
- Papel de filtro qualitativo pregueado com 24 cm de diâmetro, ou equivalente;
- Parafilme;
- Pêra de borracha ou pipetador automático;
- Pipetas de Pasteur;
- Pipetas volumétricas de 5mL;
- Pissetas;
- Ponteiras para micropipetas automáticas;
- Provetas graduadas de 15, 100, 250 e 1000 mL;
- Tubos de ensaio de 5 mL;
- Tubos de prolipileno de 50 mL com tampa de rosca.

Nota 2: Toda vidraria utilizada neste estudo para acondicionar soluções padrão de AFBG ou extratos purificados de amostra deverá passar por tratamento em ácido sulfúrico 2 mol/L (ficar pelo menos duas horas em contato com o ácido conforme POP 015, revisão 05 “Descontaminação e preparo de material”).

4.3 Equipamentos

- Agitador de tubos;
- Agitador magnético;
- Aparelho de ultra-som;

- Balança Analítica;
- Balança;
- Banho de aquecimento com agitação;
- Cromatógrafo líquido de alta eficiência com derivatização pós-coluna;
- Freezer;
- Geladeira;
- Homogeneizador de amostras;
- Micropipetas automáticas;
- Sistema de filtração a vácuo;
- Célula eletroquímica – Kobra Cell;
- Processador automático de amostras – Aspec;
- Maseira;
- Moinho Geiger;
- Moinho Turrax;
- Câmara fria

4.4 Reagentes e soluções

- Acetonitrila grau HPLC ou p.a.r;
- Água deionizada;
- Ácido nítrico, p.a.;
- Brometo de potássio p.a.
- Cloreto de potássio grau p.a.;
- Cloreto de sódio grau p.a.;
- Dihidrogênio fosfato de potássio p.a.;
- Hexano grau p.a.;
- Hidrogênio fosfato dissódio anidro grau p.a.;
- Metanol grau HPLC ou p.a.r;

- Metanol grau p.a.;
- Metanol:água (8:2, v/v);
- Metanol:água (2:3, v/v);
- Solução de água:acetonitrila:metanol (6:2:2, v/v/v) desgaseificada em ultra-som;
- Solução padrão trabalho de AFLAB₁, AFLAB₂, AFLAG₁ e AFLAG₂ em tolueno:acetonitrila (9:1, v/v);
- Soluções padrão para curva de calibração de AFLAB₁, AFLAB₂, AFLAG₁ e AFLAG₂ em metanol:água (2:3, v/v);
- Solução tampão PBS 0,1%;

4.4.1 Preparo de soluções reagentes

- *Água:acetonitrila:metanol (6:2:2, v/v)*

- adicionar 20 mL de metanol HPLC ou p.a.r, 20 mL de acetonitrila HPLC ou p.a.r em 60 mL de água deionizada, previamente filtrada em membrana de 0,45 mm.

- *Metanol:água (8:2, v/v)*

- adicionar 20 mL de água em 80 ml de metanol HPLC ou p.a.r.

- *Solução tampão (PBS) 0,1%*

- transferir quantitativamente com água deionizada 0,20 g de fosfato de potássio monobásico;

1,20 g de fosfato de sódio dibásico anidro; 8,0 g de cloreto de sódio e 0,2 g de cloreto de potássio para um balão volumétrico de 1000 mL. Completar com água deionizada e homogeneizar.

- *Ácido nítrico 4 M*

- Preparar a solução de ácido nítrico 4 M considerando a porcentagem e a densidade do ácido nos cálculos. Por exemplo: Para preparo de 100 mL da solução 4M, partindo de um ácido nítrico: d=1,4 g/mL, MM=63,01 e 65 %:

- Medir 28 mL (27,7 mL) do ácido e adicionar a 72 de água deionizada.

- *Solução padrão de aflatoxinas*

- A solução trabalho "pool" (TP) de AFLAB₁, AFLAB₂, AFLAG₁ e AFLAG₂ (1:0,2:1:0,2; v/v/v/v) deve ser preparada conforme procedimentos descritos no POP 013, revisão 06 - "Preparo e padronização de soluções padrão de micotoxinas".

- *Solução padrão da curva de calibração*

- Ver item 6.4

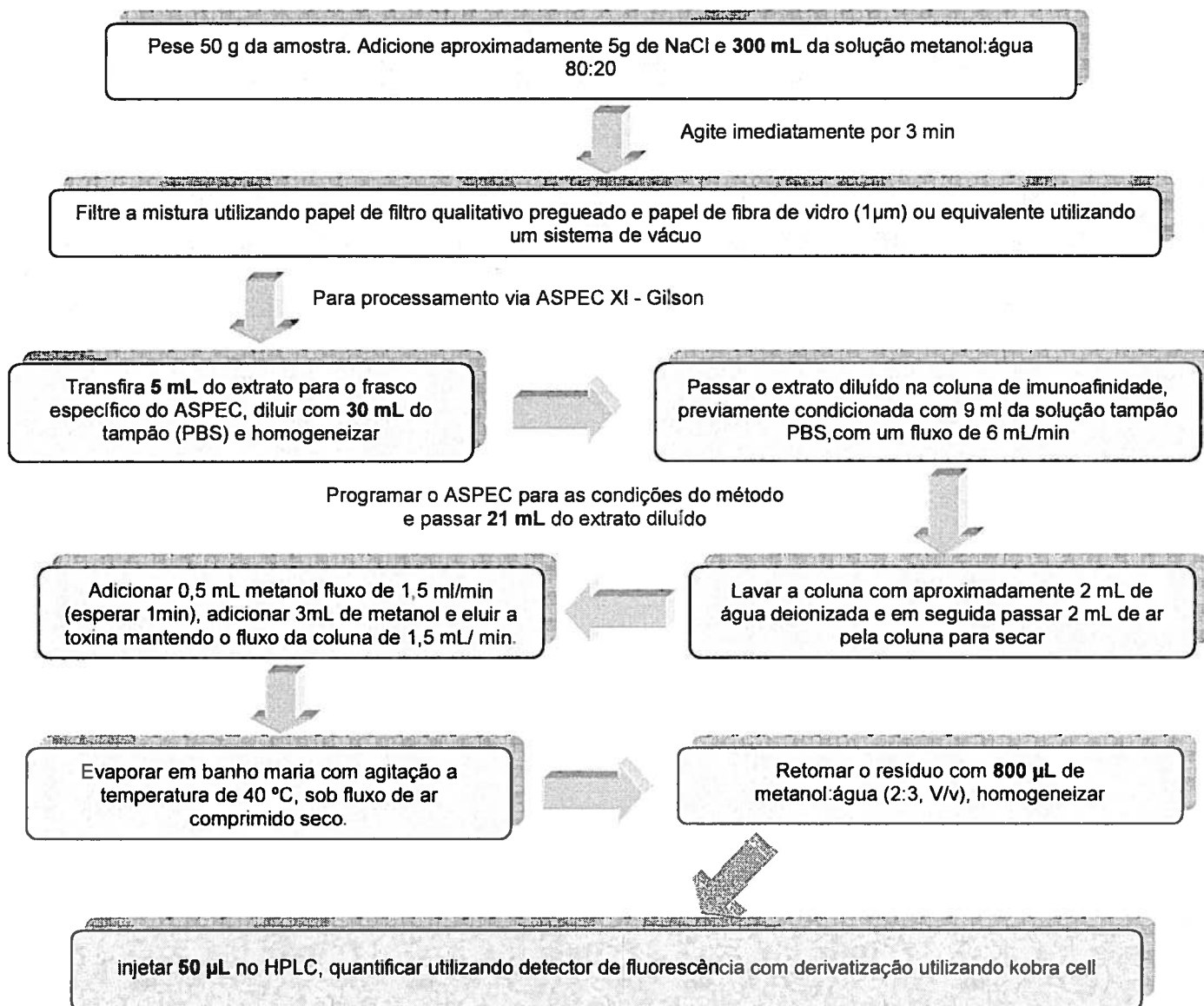
5 MÉTODOS

Será utilizado o método previamente validado pelo LACQSA segundo POP 055, revisão 3 – “Determinação de aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂ por cromatografia líquida de alta eficiência e em camada delgada” para extração, purificação, separação, detecção e quantificação de aflatoxinas onde a purificação será realizada no processador automático de amostras – Aspec. O preparo das amostras foi realizado de acordo com o procedimento descrito no POP 009, rev 13 – “Preparo, armazenamento e descarte de amostras” e o tratamento dos dados para a verificação da homogeneidade e presença de outliers foi realizado segundo o *Protocolo Internacional Harmonizado para Ensaio de Proficiência em Laboratórios de Química Analítica* (ELLISON, 2006). O teste confirmatório para a eficiência dos resultados baseado na análise de amostras de controle não-cego é descrito no POP 004, rev. 05 – “Controle Intralaboratorial”. Cada uma dessas etapas é descrita detalhadamente nos itens 6 e 7.

6 PROCEDIMENTOS PARA PREPARO DE AMOSTRAS E DETERMINAÇÃO DE AFLA BG

A seguir será descrito detalhadamente os processos de preparo de amostras, extração, purificação, separação, detecção e quantificação de aflatoxinas. O fluxograma 1 resume as etapas de análise, exceto a etapa de preparo de amostra que é bem descrita no item 6.1.

Fluxograma 1 - Metodologia para análise de Afla BG para amendoim seco (POP 055, rev. 3)



LEGENDA



Processo de Extração



Processo de Purificação



Processo de Detecção e Quantificação

6.1 Preparo de amostras

As amostras de número 11A0128A e 11A0163B provenientes do programa PNCRV preparadas a seco, previamente moídas em moinho Turrax foram reunidas em uma masseira para homogeneização prévia. O tempo de homogeneização foi de 240 min com intervalo de descanso de 20 min a cada 40 min de homogeneização. A massa resultante da união das amostras foi de 18 kg e a nova amostra foi então denominada de 11AT029. A mesma foi transferida para o moinho Geiger para homogeneização por 30 min. Após homogeneização foram retiradas 20 subamostras de 50 g para a realização da análise.

6.2 Extração

- Pesar 50 g da amostra (100 g para amostras preparadas em pasta), à temperatura ambiente;
- adicionar 5 g de cloreto de sódio;
- adicionar 100 mL de hexano;
- adicionar 300 mL da solução de metanol:água (8:2, v/v) ou 200 mL de metanol para amostras em pasta;
- homogeneizar por 3 minutos, a velocidade alta (aproximadamente 800 rpm);
- filtrar o extrato através de papel de filtro qualitativo pregueado e em seguida filtrar à vácuo através de membrana de fibra de vidro Whatman GF/B 1 µm ou equivalente, utilizando aparato de filtração.
- pipetar 5 mL do filtrado adicionar 30 mL da solução tampão PBS 0,1% e homogeneizar.

6.3 Purificação e eluição utilizando coluna de imunoafinidade com o purificador automático de amostras (Aspec)

Programar o Aspec para processamento das etapas:

- condicionamento da coluna com 9,0 mL da solução tampão PBS 0,1% a uma taxa de 6 mL/min,
- passagem de aproximadamente 21,0 mL do extrato diluído pela coluna em três etapas com passagem de aproximadamente 7,0 mL cada uma com uma taxa de 6 mL/min,
- lavagem da coluna com aproximadamente 2,0 mL de água a 6 mL/min,
- secagem da coluna pela passagem de aproximadamente 2 mL de ar a 5 mL/min e
- eluição das aflatoxinas AFLAB₁, AFLAB₂, AFLAG₁ e AFLAG₂ em duas etapas:

- passagem de 0,5 mL de metanol grau HPLC ou semelhante pela coluna a uma taxa de aproximadamente 1,5 mL/min
- passagem de mais 3,0 mL de metanol grau HPLC ou semelhante pela coluna a uma taxa de aproximadamente 1,5 mL/min
- e por fim a lavagem da agulha com aproximadamente 30 mL de água deionizada e filtrada.

6.4 Detecção e quantificação por cromatografia líquida de alta eficiência

Utilizando a solução trabalho "pool" (TP) de AFLAB₁, AFLAB₂, AFLAG₁ e AFLAG₂ preparar uma curva padrão de calibração em metanol:água (2:3, v/v), com 10 concentrações diferentes, sendo estas iguais às aquelas apresentadas na Tabela 3.

- Pipetar utilizando micropipeta um volume conhecido da solução trabalho "pool" e transferir para um frasco apropriado para o preparo da primeira solução da curva de calibração;
- Evaporar o padrão sob fluxo de N₂ ou ar comprimido seco;
- Observar a proporção do solvente de retomada e adicionar metanol HPLC ou p.a.r., com agitação por 5 minutos em agitador de tubos, seguido de um minuto no ultra-som. Em seguida adicionar água para obtenção da proporção do solvente. Por exemplo: considerando que o padrão será redissolvido em 10 mL de metanol:água (2:3, v/v) deve-se adicionar 4 mL de metanol e depois de devidamente homogeneizado adicionar 6 mL de água, podendo a adição de metanol ser realizado pela adição de 4 alíquotas de 1 mL, sendo realizado agitação por 2 minutos seguida de transferência para outro frasco. Os demais padrões da curva de calibração serão preparados pela diluição do primeiro, conforme Tabela 3. O preparo da solução padrão P1 pode ser realizado 1 dia antes. Os procedimentos utilizados no preparo das soluções para a curva de calibração devem ser registrados

Tabela 3 - Faixas de concentrações aproximadas para o preparo da curva de calibração de Afla BG – CLAE

Padrão Preparado	Concentração de AFLA BG na solução preparada (µg/mL)			
	B ₁	B ₂	G ₁	G ₂
P10	0.000083	0.000017	0.000084	-
P9	0.000164	0.000033	0.000165	0.000033
P8	0.00036	0.000073	0.000363	0.000073
P7	0.000554	0.000112	0.000559	0.000112
P6	0.00108	0.000219	0.00109	0.000219
P5	0.002108	0.000427	0.002128	0.000427
P4	0.003361	0.00068	0.003392	0.000681
P3	0.005402	0.001093	0.005452	0.001095
P2	0.010804	0.002186	0.010904	0.00219
P1	0.021608	0.004373	0.021808	0.004379

- retomar os resíduos das amostras obtidos na etapa de purificação com a solução de metanol:água (2:3, v/v) e homogeneizar utilizando agitador de tubos ou ultra-som por 1 min, considerando os volumes:

- 800 µL para resíduos obtidos do processamento automático – ASPEC XL

- Injetar no CLAE soluções padrão e amostras nas condições cromatográficas especificadas para determinação de aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂:

- coluna C₁₈, 25 cm de comprimento com partículas de 5 µm e 4,6 µm de diâmetro interno;

- detector de fluorescência com excitação em 360 nm e emissão em 420 nm;

- fase móvel água:acetonitrila:metanol (6:2:2, v/v/v),

- fluxo da fase-móvel de 1,0 mL/min,

- volume de injeção de 50 µL.

- temperatura do forno da coluna de 40°C ou ambiente de aproximadamente de 25°C;

- derivatização:

Utilizando célula eletroquímica – Kobra Cell:

- dicionar 340 mg de KBr e 700 µL de ácido nítrico 4M à 2000 mL da fase móvel

- água:acetonitrila:metanol (6:2:2, v/v/v) e desgaseificar em ultra-som por 10 a 15 minutos.

Nota 6: exemplo de cromatogramas de solução padrão e amostras estão mostrados no anexo.

- armazenar os extratos brutos e os purificados, em freezer;
- calcular as concentrações de aflatoxinas presentes nas amostras (o tempo de retenção é aproximadamente de 11; 13; 14 e 17,5 minutos para AFLAG2, AFLAG1, AFLAB2 e AFLAB1, respectivamente) utilizando a curva padrão de calibração dos padrões (Figura 3).

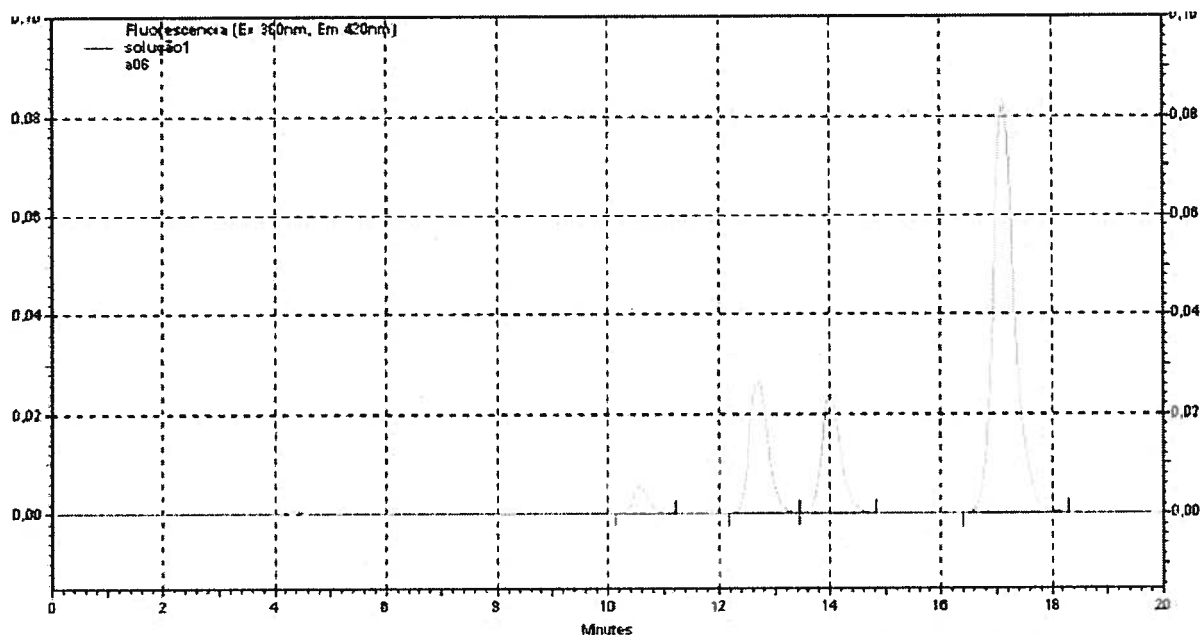


Figura 3 - Cromatograma da solução padrão de aflatoxinas G₂, G₁, B₂ e B₁ com os tempos de retenção de 10,6 min, 12,8 min, 14,1 min e 17,2 min, respectivamente.

6.4.1 Cálculos

Os cálculos podem ser realizados no programa Excel desde que a fórmula tenha sido validada ou utilizando a seguinte fórmula:

$$C_{AflaBG (\mu\text{g} / \text{kg})} = \frac{C_{CLAE} \times V_1 \times V_3}{V_2 \times m} \times F_{Diluição}$$

sendo:

C_{CLAE} = concentração de aflatoxina determinada pela CLAE ($\mu\text{g}/\text{mL}$),

V_1 = volume da solução de extração (mL),

V_3 = volume de retomada do resíduo (μL),

V_2 = volume do filtrado passado na coluna de imunoafinidade (mL),

m = massa da amostra extraída (g).

A concentração determinada pela CLAE (C_{CLAE}) e determinada pela seguinte fórmula:

$$C_{CLAE} = \frac{AC - a}{b}$$

sendo:

AC = área cromatográfica do pico da amostra

a = intercepto da curva de calibração

b = inclinação da curva de calibração (mL/μg)

7 TRATAMENTO DE DADOS

Após a análise das amostras brancas, de controle não-cego e naturalmente contaminadas, avalia-se a recuperação obtida da análise da amostra branca fortificada com solução padrão de Afla BG (amostras de controle não-cego) na faixa de concentração das amostras naturalmente contaminadas. A expressão para o cálculo da recuperação é a seguinte (POP 004, rev. 5):

$$\% \text{ de recuperação} = 100 \times \frac{\text{valor determinado}}{\text{valor adicionado}}$$

Onde o valor determinado corresponde ao resultado da análise e o valor adicionado corresponde a concentração obtida pela quantidade de padrão adicionado a uma massa específica de amostra branca.

Além da recuperação, o DPR dos controles não-cegos (duplicata) foram calculados para que tanto o DPR quanto a recuperação sejam avaliadas de acordo com os critérios de desempenho descritos na Tabela 2.

Para a avaliação da homogeneidade da concentração de aflatoxinas no material naturalmente contaminado, é necessário, primeiramente, observar se o preparo deste material foi feito adequadamente garantindo que haja homogeneidade de granulometria e composição visual de acordo com o POP 009, rev 13.

Depois de verificado o aspecto visual, o material é dividido em lotes. Desses lotes, um número m de lotes são escolhidos aleatoriamente onde são coletados uma amostra de cada um desses lotes. Cada amostra é pesada em duplicata (50 g por duplicata) e analisada com o procedimento descrito no item 6.

Foram analisados 10 lotes ($m = 10$) e os resultados foram avaliados de acordo com dois procedimentos estatísticos: o teste de Cochran para resultados duplicados e o teste para a não-homogeneidade significativa (IUPAC, 2006).

7.1 Teste de Cochran para resultados duplicados

Calcular a soma, S_i , e a diferença, D_i , para cada par de duplicatas, para $i = 1, \dots, m$.

Calcular a soma dos quadrados, S_{DD} , das m diferenças pela expressão:

$$S_{DD} = \sum_{i=1}^m D_i^2$$

Onde D_i^2 corresponde a i -ésima diferença entra as duas indicações ao quadrado das m duplicatas

O teste de Cochran consiste na razão de D_{\max}^2 , o maior valor dos quadrados das diferenças, D_i^2 , com a soma dos quadrados das diferenças:

$$C = \frac{D_{\max}^2}{\sum_{i=1}^m D_i^2} = \frac{D_{\max}^2}{S_{DD}}$$

Calcular esta razão (C) a compará-la com o valor crítico apropriado de acordo com a Tabela 4. A Tabela 4 contém valores críticos para 95 e 99% de confiança para m amostras entre 7 e 20. Se o valor do teste de Cochran for superior ao valor crítico apropriado, conclui-se que existe(m) valor(es) discrepante(s) dentre os demais, ou seja, há presença de *outlier(s)*. Caso contrário, não há presença de *outlier(s)*.

Resultados que apontam a presença de *outliers* para um nível de confiança de 95% ou mais devem ser analisados com cautela para a identificação de erros de análise e uma ação apropriada deve ser tomada. Os *outliers* encontrados não devem ser rejeitados a não ser que estes sejam significantes ao nível de 99% de confiança ou houve um erro claro e irreversível no procedimento de análise.

Tabela 4 - Valores críticos de Cochran

<i>m</i>	Nível de confiança	
	95%	99%
7	0.727	0.838
8	0.68	0.794
9	0.638	0.754
10	0.602	0.718
11	0.57	0.684
12	0.541	0.653
13	0.515	0.624
14	0.492	0.599
15	0.471	0.575
16	0.452	0.553
17	0.434	0.532
18	0.418	0.514
19	0.403	0.496
20	0.389	0.480

7.2 Teste para a não-homogeneidade significativa

Usar a mesma soma dos quadrados das diferenças, S_{DD} , para calcular:

$$s_{an}^2 = \frac{S_{DD}}{2m}$$

Onde s_{an}^2 corresponde a estimativa da variância analítica e m o número de duplicatas.

Calcular a variância, V_S , das somas S_i

$$V_S = \sum_{i=1}^m \frac{(S_i - \bar{S})^2}{m-1}$$

Onde $\bar{S} = (1/m) \sum S_i$ corresponde a média das somas S_i (somas das duas indicações das m duplicatas)

Calcular a variância de amostragem das subamostras, s_{sam}^2 , como:

$$s_{sam}^2 = \frac{1}{2} \left(\frac{V_S}{2} - s_{an} \right)$$

Ou $s_{sam}^2 = 0$ se a estimativa acima for negativa.

Calcular a variância permitida (limite), σ_{all}^2 , como sendo:

$$\sigma_{all}^2 < (0,3\sigma_p)^2$$

Sendo σ_p o desvio padrão para avaliação de proficiência (desvio padrão alvo), que corresponde a 22% do valor da média das indicações, x_i .

$$\sigma_p = 0,22 \left(\frac{\sum x_i}{2m} \right)$$

Selecionando o valor apropriado de F_1 e F_2 da Tabela 5, calcular o valor crítico para o teste como sendo:

$$c = F_1\sigma_{all}^2 + F_2s_{an}^2$$

Se $s_{sam}^2 > c$, há uma evidência com 95% de confiança que o desvio padrão de amostragem das amostras avaliadas excede a fração permitida do desvio padrão alvo ($s_{sam} > 0,3\sigma_p$) e o teste de homogeneidade aponta que o material não é homogêneo.

Se $s_{sam}^2 < c$, não há evidência significativa e então o material é considerado homogêneo.

Tabela 5 - Tabela de fatores F para o teste para a não-homogeneidade significativa

<i>m</i>	<i>F</i> ₁	<i>F</i> ₂
20	1.59	0.57
19	1.60	0.59
18	1.62	0.62
17	1.64	0.64
16	1.67	0.68
15	1.69	0.71
14	1.72	0.75
13	1.75	0.80
12	1.79	0.86
11	1.83	0.93
10	1.88	1.01
9	1.94	1.11
8	2.01	1.25
7	2.10	1.43

8 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram analisadas 20 subamostras da amostra naturalmente contaminada de amendoim denominada 11AT029 para avaliação da homogeneidade, tanto utilizando colunas de imunoafinidade novas quanto utilizando colunas reutilizadas. Essas subamostras foram divididas em

10 grupos de duas subamostras cada (A e B). Para o controle de qualidade, foram analisadas 2 amostras brancas e 2 amostras brancas fortificadas com 150 μL da solução padrão de Afla BG (as concentrações de Afla B₁, B₂, G₁ e G₂ são 1,0372; 0,2099; 1,0489 e 0,2102 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente) para as colunas reutilizadas e 1 amostra branca e 1 amostra branca fortificada com 150 μL da mesma solução padrão de Afla BG para as colunas novas.

A análise feita com as colunas novas foi realizada simultaneamente e no mesmo instrumento CLAE que a análise feita com colunas reutilizadas sendo que a análise feita com colunas novas foi realizada por outro técnico analista. A etapa de extração foi comum para todas as amostras analisadas tanto em coluna nova quanto em coluna reutilizada. Tal trabalho foi realizado pelo mesmo técnico que analisou as amostras com colunas novas.

Como o procedimento utilizado na determinação das aflatoxinas é validado de acordo com os critérios da ISO/IEC 17025, parâmetros como incerteza de medição, limites de detecção e quantificação não foram abordados no presente trabalho devido a procedimentos estatísticos robustos e trabalhosos para a obtenção destes parâmetros. Isso não significa que esses parâmetros não sejam importantes na análise.

Devido a um problema ocorrido na etapa de extração, as subamostras do grupo 3 (3A e 3B) foram desconsideradas na análise.

As curvas de calibração para a quantificação das aflatoxinas foi realizada em 10 níveis para Afla B₁, B₂ e G₁ e 9 níveis para G₂ e são comuns para a quantificação tanto das amostras analisadas utilizando colunas novas quanto colunas reutilizadas. Todos os níveis foram injetados em triplicata. Os dados referentes às curvas estão descritos na Tabela 6.

Tabela 6 – Dados de concentração e área dos picos cromatográficos para a construção das curvas de calibração para as aflatoxinas analisadas.

Padrão	Aflatoxina B ₁		Aflatoxina B ₂		Aflatoxina G ₁		Aflatoxina G ₂	
	Concentração (µg/mL)	Área abaixo da curva	Concentração (µg/mL)	Área abaixo da curva	Concentração (µg/mL)	Área abaixo da curva	Concentração (µg/mL)	Área abaixo da curva
P10	0,000083	16.375	0,000017	4.560	0,000084	6.270	-	-
		15.427		5.499		6.831		
		17.357		5.563		7.310		
P9	0,000164	28.573	0,000033	8.215	0,000165	11.766	0,000033	2.737
		26.937		8.446		11.886		2.464
		28.806		8.316		11.559		2.143
P8	0,00036	57.439	0,000073	17.102	0,000363	24.212	0,000073	4.784
		57.269		18.178		24.084		4.629
		58.069		18.261		25.165		5.361
P7	0,000554	94.283	0,000112	28.989	0,000559	39.820	0,000112	7.234
		94.315		29.840		40.423		8.026
		94.930		30.868		40.061		7.357
P6	0,00108	177.618	0,000219	55.119	0,00109	76.286	0,000219	14.421
		178.784		56.939		76.237		14.489
		180.733		56.833		76.222		14.370
P5	0,002108	349.387	0,000427	108.206	0,002128	148.189	0,000427	27.370
		352.503		109.953		149.462		27.193
		353.269		113.153		149.911		26.820
P4	0,003361	573.400	0,00068	175.907	0,003392	243.849	0,000681	44.513
		576.839		181.984		246.297		45.630
		589.234		184.309		246.283		45.029
P3	0,005402	923.482	0,001093	277.216	0,005452	387.778	0,001095	72.524
		930.442		291.643		395.071		72.201
		942.751		294.825		398.049		73.607
P2	0,010804	1.855.871	0,002186	548.199	0,010904	779.442	0,00219	144.893
		1.852.205		574.495		789.241		144.752
		1.883.233		590.195		791.637		144.003
P1	0,021608	3.655.331	0,004373	1.092.611	0,021808	1.524.761	0,004379	286.849
		3.680.692		1.171.627		1.558.351		290.146
		3.769.489		1.021.921		1.579.014		302.045

Para a construção das curvas de calibração, utilizou-se o método dos mínimos quadrados ponderados (MMQP) devido a heterocedasticidade entre os níveis de concentração da curva. Tal característica é visualizada através da representação das barras de erros em cada nível nas Figuras 4, 5, 6 e 7. Essas barras de erro correspondem a seis vezes o desvio padrão da triplicata de cada nível. Esse múltiplo do desvio padrão foi escolhido apenas com o intuito de mostrar o tamanho relativo da dispersão dos dados em cada nível e notar que são significativamente diferentes.

O procedimento para a modelagem por MMQP é complexo e não será demonstrado neste trabalho. As curvas de calibração com suas respectivas equações de regressão estão representadas nas Figuras 4, 5, 6 e 7.