



Universidade do Estado do Rio de Janeiro
Centro de Tecnologia e Ciências
Instituto de Química


Robson Alves Luiz

**Desenvolvimento de metodologia para a determinação de
aflatoxinas em amostras de amendoim usando espectrofluorimetria
e análise dos fatores paralelos (PARAFAC).**

Rio de Janeiro
2012

Robson Alves Luiz

Desenvolvimento de metodologia para a determinação de aflatoxinas em amostras de amendoim usando espectrofluorimetria e análise dos fatores paralelos (PARAFAC).



Dissertação apresentada, como requisito para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Processos Químicos, Petróleo e Meio Ambiente.

Orientador: Prof. Dr. Aderval Severino Luna

Rio de Janeiro
2012

CATALOGAÇÃO NA FONTE

UERJ/REDE SIRIUS/CTC/Q

L953

Luiz, Robson Alves.

Desenvolvimento de metodologia para a determinação de aflatoxinas em amostras de amendoim usando espectro fluorimetria e análise dos fatores paralelos (PARAFAC). / Robson Alves Luiz. – 2012.

92 f.

Orientador: Aderval Severino Luna.

Dissertação (mestrado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Química.

1. Amendoim – Teses. 2. Fluorimetria – Teses. 3. Validação de método – Teses. 4. Quimiometria – Teses. I. Luna, Aderval Severino. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Química. III. Título.

CDU 633.368

Autorizo, apenas para fins acadêmicos ou científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação.

Assinatura

Data

Robson Alves Luiz

Desenvolvimento de metodologia para a determinação de aflatoxinas em amostras de amendoim usando espectrofluorimetria e análise dos fatores paralelos (PARAFAC).

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação do Instituto de Química, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Processos Químicos, Petróleo e Meio Ambiente.

Aprovado em 21 de março de 2012

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Aderval Severino Luna (Orientador)
Instituto de Química da UERJ

Prof. Dr^a. Lílian Ferreira de Senna
Instituto de Química da UERJ

Prof. Dr^a. Deborah Vargas Cesar
Instituto de Química da UERJ

Prof. Dr^a. Christina Maria Queiroz de Jesus Morais
INCQS / FIOCRUZ

Rio de Janeiro
2012

AGRADECIMENTOS

Não é uma tarefa muito fácil agradecer a todos que ajudaram a construir esta dissertação, já que são muitos aqueles que me incentivaram aos estudos e fizeram com que eu chegasse até esse momento. Sendo assim, o maior perigo que se coloca para o agradecimento seletivo não é decidir quem incluir, mas decidir quem não mencionar. Mesmo que eu deixe de mencionar alguém, fica aqui a minha profunda gratidão aos meus amigos, professores e familiares que, de uma forma ou de outra, contribuíram com sugestões efetivas para a realização deste trabalho.

Dirijo meu maior agradecimento aos meus pais, pela importância na construção dos meus próprios valores, é por vocês que hoje estou aqui, e as minhas tias Marli e Marlene (*in memoriam*) por acreditarem na minha capacidade e financiar grande parte dos meus estudos. Muito obrigado! Agradeço em especial a minha noiva, Liliane, que soube compreender, como ninguém, esta fase de minha vida, pois deixamos de curtir diversas coisas para que este trabalho fosse concluído, soube entender muito bem minhas ausências e ainda ajudou cuidadosamente na formatação desta dissertação.

Ao meu orientador, professor Aderval Luna, por ter aceitado a orientação, a minha proposta de trabalho e fornecimento de uma estrutura adequada para a realização das análises. Agradeço também por ter me ensinado a arte de pensar o trabalho acadêmico com rigor e disciplina, propiciando-me a fundamentação básica, sem a qual este trabalho não teria sido escrito. Suas sugestões ao manuscrito levaram a sucessivas revisões do texto, cujas eventuais falhas, inteiramente responsabilidade do autor.

Ao Programa de Pós-Graduação de Engenharia Química da Universidade do Estado do Rio de Janeiro, onde convivi com excelentes pessoas das quais destaco o pessoal do apoio administrativo, Denise Cândido e Marco Antônio, sempre eficientes e prestativos, e aos professores Antônio Carlos Augusto da Costa e Lilian Ferreira de Senna, que se mostraram professores muito amigos de seus alunos, além de transmitirem conhecimentos importantes para a minha formação acadêmica e profissional.

Aos meus amigos Lauro, André Colonese, Elizabete, Leonardo Paiva, Alex (Bicudo) e Alexandre Muniz, obrigado pelo incentivo e compreensão pelas minhas faltas em

algumas confraternizações. À minha amiga e colega de trabalho Christina Morais, por ajudar em algumas tarefas durante o meu período de estudo e análises na UERJ e por suas idéias, sempre coerentes, que contribuíram bastante nesta etapa de conclusão de mestrado.

Agradeço também ao pessoal do LTAP (Laboratório de Tecnologias Analíticas de Processos), pelo apoio técnico e por proporcionarem o ambiente de trabalho muito agradável: Arnaldo, Francesco, Ruan e Igor, este último em especial, pois sem ele algumas etapas deste trabalho não seriam concluídas. Valeu Igor, obrigadão!!!!

Ao Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde/FIOCRUZ, pelo fornecimento de materiais e reagentes, e por permitir o meu afastamento, em alguns momentos, do serviço durante o período de realização do mestrado.

EPÍGRAFE

*"É melhor tentar e falhar,
que preocupar-se e ver a vida passar;
é melhor tentar, ainda que em vão,
que sentar-se fazendo nada até o final.*

*Eu prefiro na chuva caminhar,
que em dias tristes em casa me esconder.*

*Prefiro ser feliz, embora louco,
que em conformidade viver ..."*

Martin Luther King

RESUMO

LUIZ, Robson Alves. *Desenvolvimento de metodologia para a determinação de aflatoxinas em amostras de amendoim usando espectrofluorimetria e análise dos fatores paralelos (PARAFAC)*. 2012. 92 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Instituto de Química, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.

Neste trabalho de pesquisa são descritos dois estudos de caso que se baseiam na determinação de aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂ em amostras de amendoim, utilizando a técnica de espectroscopia de fluorescência molecular.

O primeiro estudo tem o objetivo de avaliar a metodologia empregada para a quantificação de aflatoxinas totais em amendoins, utilizando o método clássico de validação fazendo-se o uso da calibração univariada. Os principais parâmetros de desempenho foram avaliados visando certificar a possibilidade de implementação desta metodologia em laboratórios.

O segundo estudo está focado na separação e quantificação destas aflatoxinas com a aplicação combinada da espectrofluorimetria e de um método quimiométrico de segunda ordem (PARAFAC) utilizando a calibração multivariada. Esta técnica pode ser empregada como uma alternativa viável para a determinação de aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂ isoladamente, tradicionalmente é feito por cromatografia líquida de alta eficiência com detector de fluorescência. Porém, como estes analitos apresentam uma larga faixa de sobreposição espectral e as aflatoxinas (B₁ e G₁) possuem intensidade de sinal de fluorescência bem abaixo das demais, a separação e quantificação das quatro aflatoxinas foi inviável. O estudo foi retomado com a utilização das aflatoxinas B₂ e G₂ e os resultados alcançados foram satisfatórios.

O método utilizado para a quantificação de aflatoxinas totais apresentou bons resultados, mostrando-se como uma importante ferramenta para a determinação destes analitos. Além disso, contempla perfeitamente o que é requerido pela legislação brasileira para a análise de aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂, que tem como exigência em laudos finais de análise a declaração do somatório, em µg/kg, destas aflatoxinas, ou seja, sem a necessidade de quantificá-las separadamente.

Palavras-chave: Aflatoxinas. Amendoim. Espectrofluorimetria. Métodos. Quimiométricos, PARAFAC.

ABSTRACT

This research describes two case studies that are based on the determination of aflatoxins B₁, B₂, G₁ and G₂ in peanut samples, using the technique of molecular fluorescence spectroscopy.

The first study aims to evaluate the methodology used for the quantification of total aflatoxins in peanuts, using the classical validation method by employing univariate calibration. The main performance parameters were evaluated to assure the ability to ensure implementation of this methodology in laboratories.

The second study focuses on the separation and quantification of these aflatoxins with the combined application spectrofluorimetry and a chemometric method of second order (PARAFAC) using the multivariate calibration. This technique can be used as a viable alternative for the determination of aflatoxins B₁, B₂, G₁ and G₂ alone, which traditionally is done by high performance liquid chromatography with fluorescence detection. However, as these analytes exhibit a wide range of spectral overlap and the aflatoxins (B₁ and G₁) have intensity of fluorescence signal well below the others, the separation and quantification of the four aflatoxins was not feasible. The study was resumed with the use of aflatoxins B₂ and G₂ and the results were satisfactory.

The method used for quantification of total aflatoxins showed good results, showing itself as an important tool for the determination of these analytes. Furthermore, it contemplates exactly what is required by Brazilian legislation for the analysis of aflatoxins B₁, B₂, G₁ and G₂, which as a requirement in the final analysis reports is the statement of the sum, in µg/kg, these aflatoxins, ie without the need to quantify them separately.

Keywords: Aflatoxins, Peanuts, Spectrofluorimetry, Chemometric Methods, PARAFAC.

LISTA FIGURAS

1 - Fórmula estrutural das principais aflatoxinas.....	20
2 - Perfil de separação das aflatoxinas por CLAE sem (a) e com derivatização (b), respectivamente.....	26
3 - Princípio de funcionamento das colunas de imunoafinidade.....	28
4 - Espectro eletromagnético.....	29
5 - Representação do estado fundamental e dos estados excitados singlete e tripleto.....	30
6 - Diagrama de Jablonski modificado. (A) absorção de um fóton, (S_0) estado fundamental, (S_n) estado excitado singlete, (S_1) primeiro estado excitado singlete, (RV) relaxamento vibracional, (CI) cruzamento interno, (CIS) cruzamento intersistemas, (T_n) estado excitado tripleto.....	31
7 - Estimativa do resíduo do sinal analítico em uma curva de calibração.....	38
8 - Curva analítica ilustrando os parâmetros utilizados no cálculo do LD.....	40
9 - Curva analítica ilustrando os parâmetros utilizados no cálculo do LQ.....	41
10 - Representação gráfica da decomposição dos dados realizada pelo modelo PARAFAC.....	48
11 - Representação do ortogonalidade do sinal analítico líquido (NAS).....	50
12 - Representação da reação de derivatização das aflatoxinas utilizando solução de bromo 0,003 %v/v.....	56
13 - Superfícies de resposta da matriz de emissão-excitação das aflatoxinas totais em três níveis de concentração.....	61
14 - Espectro de emissão das aflatoxinas indicando o máximo de emissão fluorescente.....	62
15 - Representação gráfica da curva analítica dos padrões de aflatoxinas, com a equação da reta e os valores dos coeficientes de correlação linear (r) e de determinação (r^2).....	63

16 - Variabilidade dos erros do modelo no gráfico de resíduos.....	64
17 - Avaliação da seletividade por comparação da superfície de excitação-emissão (λ excitação – 300 - 370 nm e λ emissão – 380 - 550 nm) entre matrizes brancas e fortificada com aflatoxinas na concentração de 20 $\mu\text{g. Kg}^{-1}$	66
18 - Gráficos de superfície das aflatoxinas B ₁ , B ₂ , G ₁ e G ₂	70
19 - Sobreposição dos espectros de emissão fluorescente das aflatoxinas (B ₁ , B ₂ , G ₁ e G ₂) na concentração de 40 ng. mL ⁻¹	71
20 - Superfície excitação-emissão (a) curvas de contorno (b) do solvente, mostrando ainda o espalhamento da radiação eletromagnética.....	73
21 - Mapa de contorno excitação-emissão da mistura quaternária, (a) dados originais (b) após a remoção do espalhamento.....	74
22 - Perfis espectrais dos componentes do PARAFAC com as normas das aflatoxinas B ₁ , B ₂ , G ₁ e G ₂	75
23 - Parâmetros do PARAFAC mostrando o CORCONDIA e a variância explicada para cada modelo.....	76
24 - Parâmetros do PARAFAC mostrando o CORCONDIA e a variância explicada para cada modelo.....	79
25 - Perfis espectrais de emissão das aflatoxinas B ₂ e G ₂ modelados pelo PARAFAC e as suas respectivas normas.....	80

LISTA DE TABELAS

1 - Limites máximos admissíveis de concentração de aflatoxinas em leite, amendoim e milho.....	19
2 - Características físico-químicas das aflatoxinas.....	20
3 - Dados da curva analítica.....	62
4 - Valores calculados para os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) para três níveis de confiança.....	64
5 - Valores determinados para exatidão e recuperação nos três níveis de concentração.....	65
6 - Resultados do estudo da precisão da metodologia.....	65
7 - Valores determinados para exatidão e recuperação em três condições distintas.....	67
8 - Concentrações das soluções de aflatoxinas (ng. mL^{-1}), do planejamento fatorial completo (2^4) com ponto central.....	72
9 - Parâmetros do modelo PARAFAC.....	75
10 - Concentrações das aflatoxinas (ng. mL^{-1}) do conjunto de calibração.....	77
11 - Concentrações das aflatoxinas (ng. mL^{-1}) do conjunto de validação.....	77
12 - Parâmetros do modelo PARAFAC.....	78
13 - Concentrações de referência, concentrações estimadas e os erros relativos (%) para as aflatoxinas B_2 e G_2	81
14 - Parâmetros de mérito calculados com o PARAFAC para as aflatoxinas B_2 e G_2	82

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALS	<i>Alternating Least Squares</i> (Mínimos Quadrados Alternados).
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária.
AOAC	<i>Association of Official Agricultural Chemists</i> (Associação Oficial de Químicos Agrícolas).
CCD	Cromatografia de Camada Delgada.
CEE	<i>Comunidade Econômica Européia</i> .
CFR	<i>Code of Federal Regulations</i> (Código de Regulamentos Federais).
CLAE	<i>Cromatografia Líquida de Alta Eficiência</i> .
DPR	Desvio Padrão Relativo.
ELISA	<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i> (Ensaio Imunoenzimático).
EM	Espectrometria de Massas.
FAO	<i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i> (Organização de Agricultura e Alimentos das Nações Unidas).
FDA	<i>Food and Drug Administration</i> (Órgão de administração de alimentos e drogas).
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz.
IEC	<i>International Electrotechnical Commission</i> (Comissão Eletrotécnica Internacional).
INCQS	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde.
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia.
ISO	<i>International Standard Organization</i> (Organização Internacional de Padronização).
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i> (União Internacional de Química Pura e Aplicada).
LD	Limite de Detecção.
LMT	Limite Máximo Tolerável.

LQ	Limite de Quantificação.
NAS	<i>Net Analytical Signal</i> (Sinal Analítico Líquido).
PARAFAC	<i>Parallel Factor Analysis</i> (Análise de Fatores Paralelos).
RMSEC	<i>Root Mean Square Error of Calibration</i> (Raiz Quadrada do Erro Médio Quadrático de Calibração)
RMSEP	<i>Root Mean Square Error of Prediction</i> (Raiz Quadrada do Erro Médio Quadrático de Predição)
SEL	Seletividade.
SEN	Sensibilidade.
SIIA	<i>Sequential Injection Immunoassay</i> (Imunoensaio de Injeção Sequencial).
USP	<i>United States Pharmacopeia</i> (Farmacopéia dos Estados Unidos).
WHO	<i>World Health Organization</i> (Organização Mundial de Saúde).

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	19
	Objetivo geral	21
	Objetivos específicos	21
1	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	23
1.1.	Aflatoxinas e o amendoim	23
1.1.1.	<u>Ocorrência</u>	23
1.1.2.	<u>Problemas causados pela exposição</u>	24
1.2.	Metodologias empregadas na determinação de aflatoxinas	25
1.3.	Espectroscopia de Fluorescência Molecular	28
1.3.1.	<u>Métodos espectroquímicos</u>	28
1.3.2.	<u>Espectrofluorimetria</u>	29
1.3.3.	<u>Aspectos quantitativos da fluorescência</u>	31
1.4.	Validação de Métodos Analíticos	33
1.5.	Métodos Quimiométricos: Calibração Univariada e Calibração Multivariada	35
1.5.1.	<u>Calibração univariada</u>	36
1.5.1.1.	Parâmetros de mérito para calibração univariada.....	37
1.5.1.1.1.	Linearidade.....	37
1.5.1.1.2.	Limites de detecção e quantificação.....	39
1.5.1.1.3.	Exatidão e Recuperação.....	42
1.5.1.1.4.	Precisão.....	43
1.5.1.1.5.	Seletividade/Especificidade.....	44
1.5.1.1.6.	Robustez.....	45
1.5.2.	<u>Calibração multivariada de 2ª ordem</u>	45
1.5.2.1.	Modelo de análise de fatores paralelos (PARAFAC).....	47
1.5.2.2.	Parâmetros de mérito para calibração multivariada de 2ª ordem.....	50
1.5.2.2.1.	Sinal analítico líquido.....	50
1.5.2.2.2.	Exatidão.....	51
1.5.2.2.3.	Sensibilidade.....	52

1.5.2.2.4.	Sensibilidade analítica.....	52
1.5.2.2.5.	Seletividade.....	52
1.5.2.2.6.	Linearidade.....	53
1.5.2.2.7.	Limite de detecção.....	53
1.5.2.2.8.	Limite de quantificação.....	53
2	ESTUDO DE CASO: DETERMINAÇÃO DO TOTAL DE AFLATOXINAS EM AMENDOIM POR ESPECTROFLUORIMETRIA.....	54
2.1.	 Materiais e métodos.....	54
2.1.1.	<u>Processo de amostragem do amendoim.....</u>	54
2.1.2.	<u>Processo de extração e análise de aflatoxinas em amendoim.....</u>	55
2.1.3.	<u>Materiais.....</u>	56
2.1.3.1.	Equipamentos e materiais.....	56
2.1.3.2.	Reagentes.....	56
2.1.3.3.	Soluções reagentes.....	57
2.1.3.4.	Preparo das soluções padrão de aflatoxinas.....	57
2.1.4.	<u>Definição das condições operacionais.....</u>	57
2.1.5.	<u>Características de desempenho.....</u>	58
2.1.5.1.	Linearidade, Limites de Detecção e Quantificação.....	58
2.1.5.2.	Exatidão/ Recuperação.....	58
2.1.5.3.	Precisão.....	59
2.1.5.4.	Especificidade/ Seletividade.....	59
2.1.5.5.	Robustez.....	59
2.2.	 Resultados e discussões.....	60
2.2.1.	<u>Definição das condições operacionais.....</u>	60
2.2.2.	<u>Linearidade, Limites de Detecção e Quantificação.....</u>	62
2.2.3.	<u>Exatidão/ Recuperação.....</u>	64
2.2.4.	<u>Precisão.....</u>	65
2.2.5.	<u>Especificidade/ Seletividade.....</u>	66
2.2.6.	<u>Robustez.....</u>	66
2.3.	 Considerações finais.....	67

3	ESTUDO DE CASO: DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DAS AFLATOXINAS POR ESPECTROFLUORIMETRIA ACOPLADO COM PARAFAC.....	69
3.1.	Materiais e métodos.....	69
3.1.1.	<u>Materiais.....</u>	69
3.1.1.1.	Equipamentos e materiais.....	69
3.1.1.2.	Reagentes.....	69
3.1.1.3.	Solução reagente.....	69
3.1.1.4.	Preparo das soluções padrão de aflatoxinas.....	69
3.1.2.	<u>Avaliação preliminar.....</u>	70
3.2	Resultados e discussão.....	71
3.2.1	<u>Determinação simultânea das aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂.....</u>	71
3.2.2.	<u>Determinação simultânea das aflatoxinas B₂ e G₂.....</u>	76
3.3	Considerações finais.....	83
4	CONCLUSÕES E SUGESTÕES FUTURAS.....	84
4.1.	Conclusões.....	84
4.2.	Sugestões futuras.....	85
	REFERÊNCIAS.....	86

INTRODUÇÃO

É uma questão de saúde pública a exposição de indivíduos a micotoxinas pelo consumo de alimento contaminado. A conscientização dos produtores de alimentos e as ações de vigilância sanitária permanentes são essenciais para diminuir a exposição humana a esses fungos, produtores de metabólitos secundários tóxicos, e prevenir doenças crônicas advindas desse contato. Devido a este fato, programas de monitoramento dos níveis de contaminação de alimentos por micotoxinas são essenciais para estabelecer prioridades em ações de vigilância sanitária (FAO/WHO, 2001).

Pesquisas indicam que níveis elevados de contaminação têm sido encontrados em amendoim e derivados. No Brasil, a alta ocorrência de aflatoxinas em amendoins se deve principalmente às tradicionais práticas de colheita, secagem e armazenamento utilizado pelos produtores. A contaminação por aflatoxinas em amendoim continua sendo um problema sério neste país, devido às condições climáticas brasileiras, ambientes com muita umidade e altas temperaturas (SABINO *et al.* 1995).

A população brasileira que consome amendoim regularmente está sujeita ao fator de risco, caso os níveis máximos permitidos de aflatoxinas pela legislação brasileira sejam ultrapassados. Neste trabalho será desenvolvida uma metodologia para a determinação das aflatoxinas, espécies de micotoxinas, que possuem um limite máximo tolerável (LMT) já regulamentado para alguns alimentos, como mostra a Tabela 1:

Tabela 1: Limites máximos admissíveis de concentração de aflatoxinas em leite, amendoim e milho.

ALIMENTO	AFLATOXINA	LIMITE MÁXIMO
Leite fluído; Leite em pó	M ₁	0,5 µg/L; 5,0 µg/kg
Milho em grão (inteiro, partido, amassado, moído); Farinhas ou sêmolos de milho	B ₁ + B ₂ + G ₁ + G ₂	20,0 µg/kg
Amendoim (com casca), (descascado, cru ou tostado); Pasta de amendoim (pasta de amendoim ou manteiga de amendoim)	B ₁ + B ₂ + G ₁ + G ₂	20,0 µg/kg

Fonte: BRASIL, 2011.

O amendoim possui vulnerabilidade a gêneros fúngicos produtores de metabólitos secundários tóxicos, dentre os quais os mais habituais são produzidos primariamente por espécies de *Aspergillus* (KAWASHIMA; SOARES, 2006), onde se destacam *A. flavus* e *A. parasiticus* que produzem as aflatoxinas B₁, B₂ (*blue-azul*), G₁ e G₂ (*green-verde*), grupo identificado como grandes contaminantes naturais de produtos agrícolas. Essas toxinas possuem estruturas muito semelhantes e ocorrem como substâncias heterocíclicas altamente oxigenadas (Figura 1 e Tabela 2). As aflatoxinas podem ser produzidas no alimento ainda no campo ou durante o armazenamento (FREIRE *et al.*, 2007). Estas são as micotoxinas que podem causar os maiores danos aos seres humanos e animais pela sua alta toxidez e ampla ocorrência, possuindo propriedades carcinogênicas, mutagênicas, teratogênicas e imunossupressoras. Dentre o grupo das aflatoxinas, ressalta-se que a aflatoxina B₁ é a mais perigosa devido à sua alta toxicidade e poder carcinogênico (DILKIN *et al.*, 2000; CREPPY, 2002).

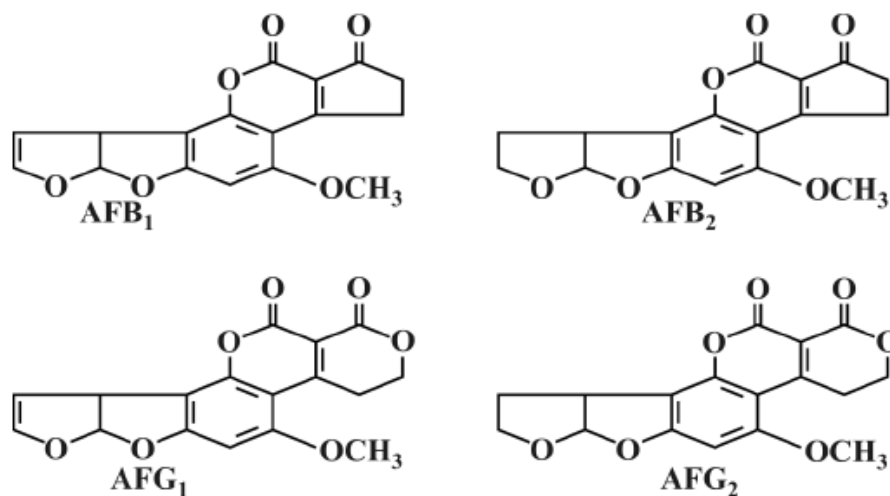


Figura 1: Fórmula estrutural das principais aflatoxinas

Tabela 2: Características físico-químicas das aflatoxinas.

Aflatoxina	Fórmula química	Massa molecular	Temperatura de fusão (°C)	Emissão de fluorescência nanômetros (nm) e cor*
AFB ₁	C ₁₇ H ₁₂ O ₆	312	269	425 – azul
AFB ₂	C ₁₇ H ₁₄ O ₆	314	286-289	425 – azul
AFG ₁	C ₁₇ H ₁₂ O ₇	328	244-246	450 – verde
AFG ₂	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	330	237-240	450 - verde

NOTA: *Sob radiação ultravioleta. Fonte: OPAS, 2003

Métodos analíticos eficientes devem ser empregados a detecção de toxinas microbianas no controle de qualidade em sistema agroalimentar. Diversas técnicas analíticas como a cromatografia em camada delgada (CCD) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) tem sido empregadas, porém, embora nesta última o custo seja um fator limitante para a implantação na rotina laboratorial (FUJII *et al.*, 2004).

Métodos imunoquímicos como o ELISA (do inglês “*Enzyme Linked ImmunonoSorbent Assay*”) e cromatografia por imunoafinidade também constituem opções para detecção de toxinas, acoplando a especificidade biológica à confiabilidade dos procedimentos químicos (Ibidem); porém, há a dependência da importação de alguns reagentes imunológicos o que eleva um pouco o custo de aplicação destas técnicas.

As secretarias de saúde estaduais possuem laboratórios centrais de saúde pública que prestam serviços à população fazendo o monitoramento destas micotoxinas em diversos alimentos. Em sua maioria, estas instituições não dispõem de recursos para implantar metodologias de análise que requerem tecnologias mais avançadas, principalmente nas regiões Norte e Nordeste, onde se tem um menor investimento de capital quando comparado com as regiões Sul e Sudeste. Nesse contexto, surge a necessidade de desenvolver uma metodologia alternativa prática e de menor custo para atender a essa demanda.

Objetivo geral

Esse trabalho tem como objetivo geral o desenvolvimento de uma metodologia analítica, rápida e eficiente, para a determinação de aflatoxinas por espectrofluorimetria em amostras de amendoim.

Objetivos específicos

- a) Desenvolver uma metodologia para a determinação de aflatoxinas totais por espectrofluorimetria visando o atendimento da legislação brasileira;
- b) Desenvolver uma metodologia visando à determinação simultânea das aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂ por espectrofluorimetria combinado com a análise dos fatores paralelos (PARAFAC).

Este trabalho foi dividido em dois estudos de caso. Como mencionado anteriormente, no primeiro estudo de caso, foi desenvolvida uma metodologia visando à determinação da concentração de aflatoxinas totais (B₁, B₂, G₁ e G₂) em amendoim, utilizando-se a espectrofluorimetria. Para isso foram avaliados os parâmetros de mérito essenciais para a viabilidade de um método analítico como: linearidade, limites de detecção e quantificação, exatidão, precisão e a robustez.

No segundo estudo de caso foi avaliada a eficiência de um método quimiométrico de calibração multivariada de 2^a ordem, onde se fez a separação e determinação das aflatoxinas a partir das superfícies de excitação-emissão fluorescente usando a análise de fatores paralelos (PARAFAC). Trata-se de uma metodologia rápida, de baixo custo e não destrutiva, sendo uma alternativa para análises que empregam a separação física e/ou química. Posteriormente, foram determinados os parâmetros de mérito dessa metodologia usando o sinal analítico líquido.

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Tecnologia Analítica de Processos, pertencente ao Instituto de Química da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ), com a utilização de materiais de referência certificados e reagentes do Setor de Resíduos de Micotoxinas, localizado no Laboratório de Alimentos e Contaminantes do Instituto Nacional de Controle de Qualidade e Saúde da Fundação Oswaldo Cruz (INCQS/FIOCRUZ), no período de Abril de 2011 à Janeiro de 2012.

1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1. Aflatoxinas e o amendoim

De uma maneira geral, aflatoxina é a denominação dada a um grupo de substâncias, muito semelhantes, e que são tóxicas para o homem e para os animais. São produzidas, principalmente, por dois fungos denominados *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*, que se desenvolvem sobre muitos produtos agrícolas e alimentos quando as condições de umidade do produto, umidade relativa do ar e temperatura ambiente são favoráveis. O amendoim é o produto mais afetado pelos fungos (OLIVEIRA e GERMANO, 1997).

O marco da descoberta das aflatoxinas foi em 1960, onde mais de 100.000 perus e outros milhares de filhotes de outros tipos de aves pereceram de hepatite aguda necrosante e morreram na Inglaterra em um período de poucos meses. Testes realizados revelaram que o agente causador era uma toxina presente na ração dos animais que era feita à base de farinha de amendoim proveniente do Brasil (GOLDBLATT, 1977).

Enormes prejuízos econômicos decorrem da utilização de produtos contaminados com essas substâncias tóxicas. Quando não provocam a morte de aves em processos de intoxicação aguda, as micotoxinas determinam diminuição de peso e da postura, aumento da suscetibilidade a doenças infecciosas e parasitárias e problemas reprodutivos, entre outros (CIB, 2004).

1.1.1. Ocorrência

A maior incidência das aflatoxinas se dá quando o amendoim é batido, ensacado e armazenado com umidade elevada. Além do amendoim, a aflatoxina pode ser encontrada em outros alimentos, tais como, cereais, sementes oleaginosas, nozes, leite etc. (FONSECA, Boletim Técnico N° 13, 2011).

Os materiais vegetais podem sofrer contaminação desde que são cultivados até ao momento da colheita por fungos filamentosos, produtores de micotoxinas. As espécies de *Aspergillus* são encontradas no solo como fungos saprófitos, podendo também surgir como contaminantes da vegetação e de alimentos armazenados (PETTERSSON, 2004; CALVO, 2005). O desenvolvimento do *Aspergillus* é

aumentado em alguns períodos do ano onde há um maior volume de precipitações pluviométricas. Isso ocorre nos meses de janeiro/fevereiro, onde se tem um histórico de seguidas chuvas durante as semanas ou dias nublados, o que impede uma secagem rápida (FONSECA, Boletim Técnico N° 13, 2011).

Na colheita o amendoim contém, no mínimo, 40% de umidade. A velocidade de perda desta umidade depende muito do clima da região e da maneira de como o amendoim será estocado. A umidade ideal para a armazenagem deve ser superior a 20-22% ou abaixo de 11%. Quando a umidade está acima de 20-22%, a atividade metabólica da vagem oferece resistência à penetração do fungo; abaixo de 11%, não há umidade suficiente para os fungos crescerem, oferecendo pouco risco de contaminação (Ibidem).

1.1.2. Problemas causados pela exposição

A aflatoxicose, designação atribuída à intoxicação por estas micotoxinas, é uma patologia bastante semelhante à registada quando há exposição a pesticidas ou resíduos de metais pesados (BENNET e KLICH, 2003). O efeito que as aflatoxinas podem causar depende da dose e da frequência com que são ingeridas. Estas toxinas estão, na maior parte das situações, presentes em concentrações muito baixas (ng/g) nos alimentos, não alterando as propriedades organolépticas, nomeadamente o sabor e odor. Não sendo detectadas pelos consumidores, estas podem ser ingeridas de forma sistemática provocando situações de aflatoxicose crônica. Já as aflatoxicoses agudas ocorrem quando as quantidades ingeridas ultrapassam concentrações na ordem dos mg/g (MIDIO e MARTINS, 2000).

Estudos indicam que o fígado é o principal órgão afetado pela exposição às aflatoxinas. Estão ainda descritos efeitos tóxicos nos pulmões, miocárdio e rins, podendo ocorrer também acumulação de aflatoxinas no cérebro (EMAN, 2011).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) concluiu que as aflatoxinas podem desenvolver câncer primário no fígado do homem. A simples ingestão de aflatoxinas, não faz com que a pessoa fatalmente contraia um câncer, mas há um aumento deste risco. Em países da África e da Ásia, onde se consome, regularmente, alimentos contaminados com aflatoxinas, a incidência de câncer no fígado é de, aproximadamente, 13 casos por 100.000 habitantes (Moçambique), por ano (FONSECA, Boletim Técnico N° 13, 2011).

A grande suscetibilidade do amendoim ao fungo *Aspergillus flavus* levou as entidades sanitárias a criar um rígido sistema de controle de aflatoxinas nesse produto e em seus derivados, já que se trata de itens bastante consumidos nos países tropicais. Assim, a porcentagem da produção de amendoim afetada pela aflatoxina, que já foi de 50%, caiu para 20%. Embora os estudos sobre esse alimento estejam mais avançados, ainda se tem a contaminação em milho e outros tipos de cereais e sementes (CIB, 2004).

1.2. Metodologias empregadas na determinação de aflatoxinas

Em sua maioria, as detecções de toxinas microbianas são realizadas por metodologias que empregam as técnicas de espectrofluorimetria, cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), cromatografia em camada delgada (CCD) e ensaio imunoenzimático (ELISA) (MACHINSKI *et al.*, 2006).

A CCD foi a primeira metodologia utilizada para determinação de aflatoxinas, mas foi substituído no início dos anos 80 nos países desenvolvidos, devido ao avanço da tecnologia com a CLAE e mais tarde com os métodos de ELISA e técnicas fluorimétricas. Estes métodos modernos oferecem várias vantagens sobre a CCD, mas os requisitos instrumentais também aumentaram, elevando o custo das análises (STROKA e ANKLAM, 2002).

O principal progresso foi associado ao aperfeiçoamento das metodologias analíticas, tais como a produção de anticorpos específicos para aflatoxinas, que são usados para ELISA e em colunas de imunoafinidade nos sistemas de detecção (SCOTT e TRUCKSESS, 1997), assim como o estabelecimento de outras melhorias, como, por exemplo, o aumento da fluorescência das aflatoxinas. Na CLAE, este aumento da fluorescência pode ser conseguido com derivatização pós-coluna através da bromação ou irradiação por luz ultravioleta (JOSHUA, 1993).

Na realização de análises utilizando ELISA existem diversos tipos de testes (*kits* comerciais) baseados em métodos imunológicos, tanto para detecção como para quantificação. As principais vantagens são a rapidez, a facilidade de manuseio e o baixo uso de solventes orgânicos. No entanto, apresenta como desvantagens: a ocorrência do efeito matriz (grupos químicos semelhantes às estruturas químicas do analito analisado) e baixa reprodutibilidade.

Para a técnica de CLAE, faz-se necessário o uso de sistema de detecção por

fluorescência. A formação de derivados de aflatoxinas por derivações pré e pós-coluna, tem melhorado a sensibilidade dessa técnica. Como desvantagens têm-se o custo do equipamento e o uso de solventes orgânicos; mas a técnica apresenta alta sensibilidade, especificidade, repetitividade e reprodutibilidade. Se com a técnica CLAE for acoplado um detector de espectrometria de massas, obtêm-se resultados bastante satisfatórios, já que se trata de um procedimento de confirmação altamente específico na análise de aflatoxinas. Porém, requer equipamentos de alto custo e pessoal bem treinado (AMARAL *et al.*, 2006).

A Figura 2 mostra o perfil de separação das aflatoxinas por CLAE-F, onde se observa um grande aumento nas intensidades dos sinais analíticos após a derivatização, principalmente para as aflatoxinas B₁ e G₁.

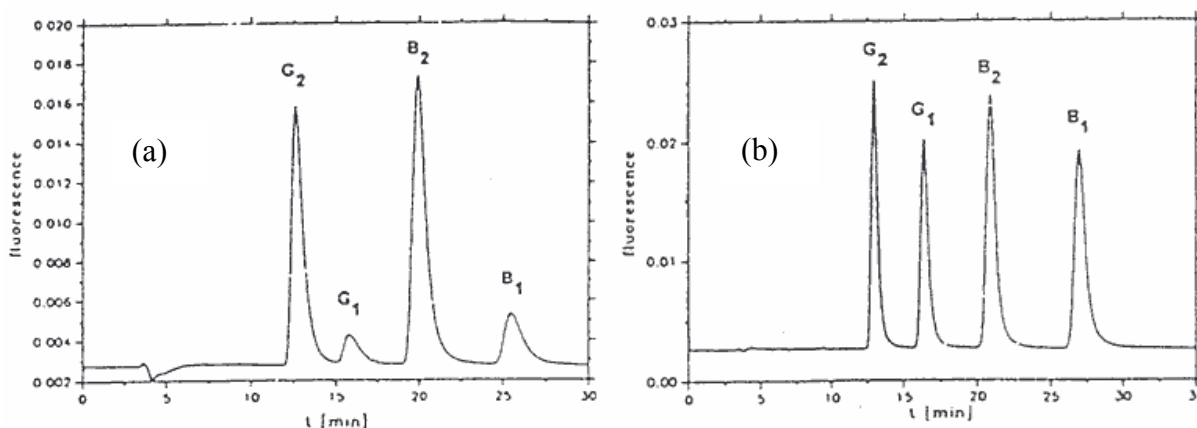


Figura 2: Perfil de separação das aflatoxinas por CLAE sem (a) e com derivatização (b), respectivamente. Fonte: REIF e METZGER, 1995.

Entre outras metodologias, também podem ser empregados para estas determinações, os biossensores e o imunoenensaio de injeção sequencial (SIIA - *Sequential injection immunoassay*). Os biossensores fluorimétricos de imunoafinidade têm sido desenvolvidos para detectar e quantificar aflatoxinas. O equipamento funciona usando os princípios de imunoafinidade e fluorescência para um ensaio quantitativo (CARLSON *et al.*, 2000). O SIIA é um ensaio imunoenzimático colorimétrico de injeção sequencial que utiliza uma célula de jato de fluxo com fase sólida de polimetilmetacrilato adsorvidas com aflatoxina B₁-albumina sérica bovina. Esta técnica é tão sensível quanto o ELISA na detecção de aflatoxina B₁. A desvantagem é que este realiza os ensaios individualmente e sequencialmente, e no caso da análise de várias amostras, o ensaio torna-se

demorado (GARDEN e STRACHAN, 2001).

Devido ao elevado grau de ocorrência de contaminações com aflatoxinas, o desafio é desenvolver métodos de triagem para a sua rápida detecção simultânea de múltiplas famílias de micotoxinas partir da mesma amostra. Mas as diferenças em suas propriedades físicas e químicas e os seus intervalos de concentrações de interesse, dificultam a detecção simultânea. A técnica de CLAE acoplado com espectrometria de massa ou múltiplos detectores tem demonstrado através de estudos boas perspectivas futuras para a determinação simultânea de aflatoxinas (MANETTA, 2011).

A técnica empregada nos estudos deste trabalho foi a espectrofluorimetria, utilizando-se colunas de imunoafinidade para a purificação das aflatoxinas. Esta técnica tem como principal vantagem a alta sensibilidade e o uso relativamente baixo de solventes orgânicos quando comparado ao utilizado em CLAE, além do custo do equipamento ser menor.

A aplicação de métodos de separação baseados em ensaios imunoquímicos justifica-se por ser a espectrofluorimetria uma técnica qualificada de alta sensibilidade, e uma ferramenta bastante utilizada para a detecção de toxinas em segurança alimentar. O uso da coluna de imunoafinidade confere especificidade e eficiência ao processo de limpeza e pré-concentração na etapa de extração do analito. Nesse intuito, a coluna de imunoafinidade vem sendo amplamente difundida na análise quantitativa de aflatoxinas, podendo também ser associada a metodologias que utilizam CLAE ou ELISA (FUJII *et al.*, 2004).

SYLOS *et al.* (1996), realizou a comparação entre métodos por imunodosagem com coluna de imunoafinidade e CCD em amostras de amendoim e milho. Foi observado que com o uso da coluna a análise torna-se de alta especificidade, dispensando a etapa de remoção de substâncias interferentes, encurtando o tempo de análise. Uma das desvantagens apontadas no trabalho foi a vida útil da coluna, que é limitada e como o material é importado, fica-se na dependência dos países desenvolvidos. A outra desvantagem é o custo em relação a CCD que é cerca de cinco vezes maior.

A técnica de separação em coluna de imunoafinidade é geralmente empregada na área de metodologia analítica para detecção de toxinas de origem biológica de baixa massa molecular (KONDO, 2002). Estas colunas são compostas de um suporte de fase sólida ativada, onde se imobilizam os anticorpos específicos

contra as aflatoxinas. O processo de limpeza baseia-se na retenção seletiva destes analitos presentes no extrato a anticorpos imobilizados da coluna, seguido de eluição com solvente apropriado, no caso deste estudo o metanol. A Figura 3 traz a ilustração deste processo de isolamento/separação das aflatoxinas:

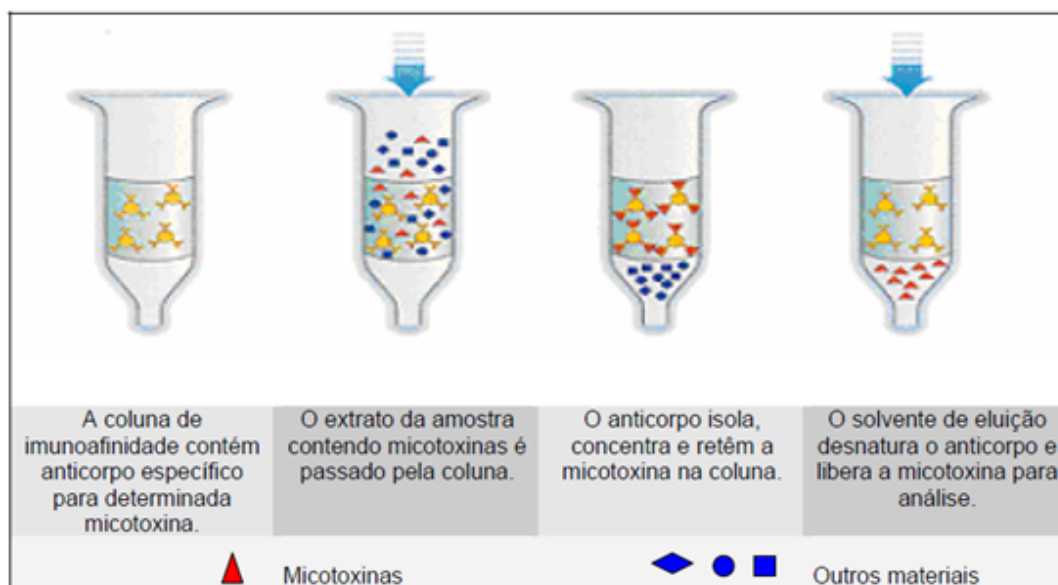


Figura 3: Princípio de funcionamento das colunas de imunoafinidade. Fonte: RHÖNE DIAGNÓSTICS TECHNOLOGIES LTD, 2004b

1.3. Espectroscopia de Fluorescência Molecular

1.3.1. Métodos Espectroquímicos

Os métodos espectroscópicos ou espectroquímicos de análise são baseados na medida da quantidade de radiação produzida ou absorvida pelas moléculas ou pelas espécies atômicas de interesse. A classificação dos métodos espectroscópicos é feita de acordo com a região do espectro eletromagnético (Figura 4) envolvida na medida. As regiões espectrais que têm sido empregadas incluem os raios γ , os raios X, ultravioleta (UV), visível (VIS), infravermelha (IV), microondas (MO) e radiofrequência (RF). A espectroscopia desempenhou um papel fundamental no desenvolvimento da teoria atômica moderna. Além disso, os métodos espectroquímicos têm fornecido as ferramentas mais utilizadas para a elucidação de estruturas moleculares, bem como a determinação qualitativa e quantitativa de substâncias orgânicas e inorgânicas (SKOOG *et al.*, 2010).

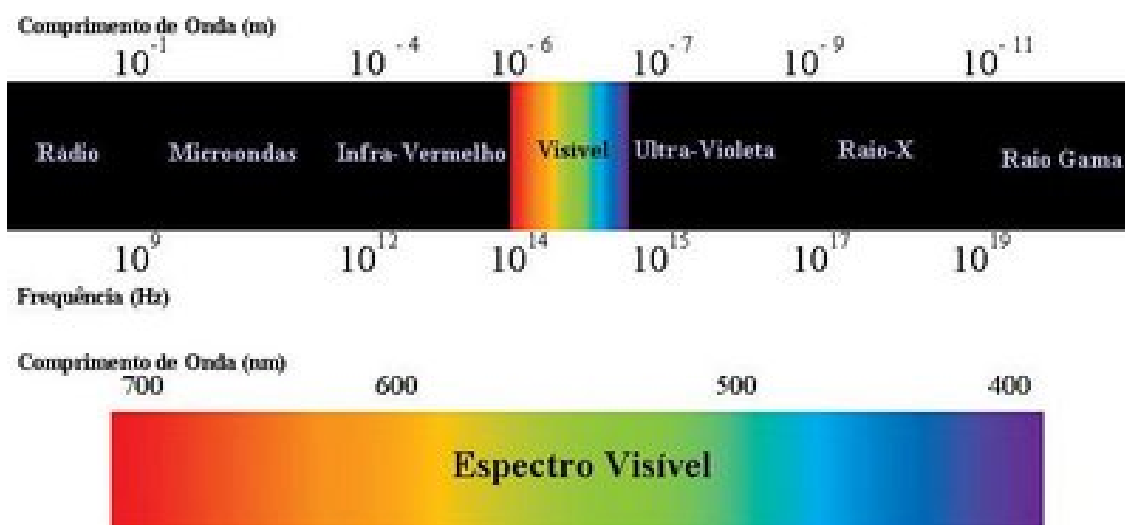


Figura 4: Espectro eletromagnético. Fonte: NOVAES, 2008.

1.3.2. Espectrofluorimetria

A análise espectrofluorimétrica é uma técnica de análise na qual se usa a quantidade de radiação emitida por um analito para medir sua concentração. A fluorescência molecular é o resultado da absorção de energia radiante e emissão de parte desta energia na forma de radiação eletromagnética. A radiação emitida tem, quase sempre, comprimento de onda maior do que a radiação absorvida (lei de Stokes). Na fluorescência, a absorção e a emissão ocorrem em um tempo, curto, porém mensurável, da ordem de 10^{-12} a 10^{-9} s. Quando houver um retardamento do processo emissivo ($t > 10^{-8}$ s), a fosforescência irá ocorrer, pois nesse caso a transição eletrônica é proibida pelas regras da mecânica quântica. O retardamento pode ser de frações de segundo ou de minutos. A fluorescência e a fosforescência são casos particulares da fotoluminescência, um termo geral aplicado aos fenômenos de absorção e reemissão de radiação eletromagnética (VOGEL, 2002).

O tipo de fotoluminescência mais usado hoje em dia em química analítica é a espectrofluorescência, que se distingue das demais formas de fotoluminescência pelo fato de a molécula excitada retornar ao estado fundamental imediatamente após a excitação. Quando uma molécula absorve um fóton de radiação ultravioleta, ela sofre uma transição a um estado eletrônico excitado e um de seus elétrons é promovido para um orbital de energia mais alta.

Na fluorescência, o estado excitado é um singleto (Figura 5) e a transição eletrônica para o estado fundamental é muito rápida e fácil. Na fosforescência o estado excitado é um tripleto (Figura 5) e a transição eletrônica para o estado fundamental é mais moderada, pois a probabilidade de ocorrência é menor. O fenômeno pode ser observado em sólidos, líquidos e gases.

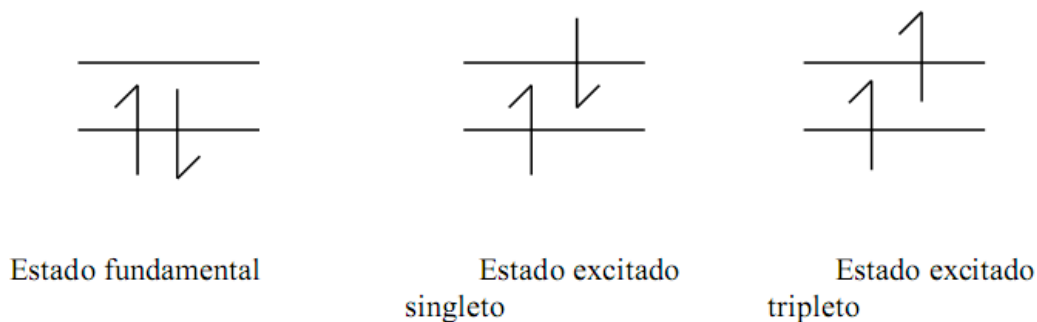


Figura 5: Representação do estado fundamental e dos estados excitados singleto e tripleto.

Após a absorção de radiação de comprimento de onda característico, a população de moléculas é promovida para um estado excitado singleto, S_n , (Figura 6). Segundo a regra de Kasha, a molécula se desativa por relaxamento através dos níveis vibracionais de estados eletrônicos de mesma multiplicidade até atingir o primeiro nível vibracional do estado excitado singleto de menor energia (S_1). Este processo de relaxamento recebe o nome de cruzamento interno (CI) e é um fenômeno que ocorre com muita rapidez (10^{-11} s) e sem emissão de radiação (CDNT, 2006).

e como $I_t = I_0 e^{-\epsilon bc}$ (lei de Beer), onde ϵ é a absorvidade molar, c é a concentração do analito em mol.l^{-1} e b a espessura do meio em cm, obtemos a equação 2.3,

$$F = I_0 (1 - I_0 e^{-\epsilon bc}) \Phi_f$$

Eq. 2.3

No caso de soluções que exibem baixa absorção, ϵbc é pequeno e com isso podemos reescrever a equação 3.3 de acordo com a equação 2.4,

$$F = 2,3I_0 \epsilon bc \Phi_f$$

Eq. 2.4

Deste modo, para soluções muito diluídas ($\leq \mu\text{g.g}^{-1}$) a intensidade total da fluorescência, F , é proporcional à concentração da amostra e à intensidade da energia de excitação. É instrutivo comparar a sensibilidade que pode ser alcançada pelos métodos de absorção e fluorescência. A precisão total com que se pode medir a absorvância de uma solução, em uma célula de 1 cm, não é maior que 0,001 unidade. Como, para a maior parte das moléculas, o valor de $\epsilon_{\text{máx}}$ é raramente maior que 10^6 , tem-se, usando a lei de Beer, que a menor concentração que se pode medir é

$$c_{\text{mín}} > (10^{-3}/10^6) \text{ mol.L}^{-1} = 10^{-9} \text{ mol.L}^{-1}$$

No caso da fluorescência, a seletividade é, em princípio, limitada apenas pela intensidade máxima da fonte de luz excitadora e, em condições ideais, $c_{\text{mín}} = 10^{-12} \text{ mol.L}^{-1}$. Em geral, o limite de detecção da técnica de fluorescência é da ordem de 10^3 vezes menor do que o limite de detecção da absorção na região do ultravioleta (VOGEL, 2002).

A seletividade pode ser também maior com os métodos de fluorescência porque nem todas as espécies que absorvem podem fluorescer e ainda porque o analista pode selecionar dois comprimentos de onda (excitação e emissão), contra apenas um nos métodos de absorção. Esta seletividade inerente pode, entretanto ser inadequada e tem de ser, freqüentemente, realçada por separação física, por exemplo, extração com solvente. É possível, também, melhorar a seletividade com técnicas que usam derivatização, isto é, a adição da solução derivatizante na amostra para induzir um ganho de sinal dos analitos no espectro de fluorescência (REIF e METZGER, 1995).

É importante saber a distinção entre os espectros de emissão e excitação de fluorescência. Os espectros de emissão são produzidos com a excitação em comprimento de onda fixo e o espectro é registrado como a intensidade da emissão

em função do comprimento de onda da emissão. Os espectros de excitação são obtidos por variação do comprimento de onda de excitação com a medida da intensidade de fluorescência em comprimento de onda fixo. A excitação não é a mesma coisa que absorção, porém os fatores que provocam desvios da lei de Lambert-Beer na absorção têm efeito semelhante na fluorescência. Qualquer material que faz com que a intensidade de fluorescência fique menor do que o esperado pela Eq. 3.3 é um inibidor (*quencher*) e o efeito que ele provoca é chamado inibição (*quenching*). Este efeito é normalmente provocado por íons ou moléculas estranhos à análise. A fluorescência é também afetada pelo pH da solução, pela natureza do solvente, pela concentração dos reagentes adicionados na determinação de íons inorgânicos e às vezes, pela temperatura. O tempo necessário para que a fluorescência chegue ao máximo depende muito da reação que produz a espécie fluorescente (VOGEL, 2002).

Um aspecto importante da inibição, em química analítica, é que a fluorescência de um analito pode ser inibida por alguma substância presente na amostra – um exemplo de efeito matriz. Se a concentração da espécie inibidora é constante, a inibição pode ser compensada pelo uso de padrões adequados, isto é, que contêm a mesma concentração do inibidor. No entanto podem ocorrer dificuldades quando a concentração do inibidor varia de forma imprevisível.

Para a aplicação de uma técnica analítica, como a espectroscopia de fluorescência molecular, com confiabilidade nos resultados, deve-se realizar a validação da mesma. O próximo item faz uma breve abordagem sobre a significância da validação analítica.

1.4. Validação de Métodos Analíticos

Segundo a definição do vocabulário internacional de metrologia, a validação é uma verificação na qual os requisitos especificados são adequados para um uso pretendido (INMETRO, 2009). Ou seja, validação é o ato ou efeito de validar, dar validade, tornar válido, tornar legítimo ou legal. Visa diminuir ou controlar os fatores que levam à imprecisão ou inexatidão de um dado gerado (LANÇAS, 2004).

Entre esses fatores podem ser citados: variabilidade de amostra, eventual contaminação, reagentes inadequados, erros de pipetagem, variações de temperatura, variações e descuidos na manutenção dos equipamentos, além de

calibração ineficiente, analista despreparado e perdas durante a análise (CHASIN *et al.*, 1998).

A validação de métodos é um importante aspecto para garantia da qualidade analítica. De uma maneira mais clara, validar um método analítico é confirmar por análises e fornecimentos de evidências objetivas que os requisitos especificados para um determinado uso são atendidos (NBR ISO/IEC 17025, 2005).

A validação deve ser efetuada após seleção, desenvolvimento, e otimização dos métodos (SWARTZ e KRULL, 1997). Nesse sentido, ter validado um resultado significa que a metodologia, o qual inclui desde as condições de operação do equipamento até toda a seqüência analítica, seja aceita como correta. Sendo assim, estudos de validação devem ter representatividade, ou seja, devem ser realizados em condições mais próximas possível às de uso normal da metodologia (THOMPSON *et al.*, 2002). Com isso, ao padronizar uma metodologia, pode-se estabelecer níveis de exigência capazes de definir a aprovação de um determinado produto ou espécie em estudo (SILVA e ALVES, 2006).

Segundo requisitos da norma 21 CFR 211.194 (a)(2) (2011), os métodos analíticos usados para a avaliação da qualidade de produtos, tais como os alimentícios, estão sujeitos a vários requisitos legais e normativos. Sendo assim, os métodos de ensaios empregados para a avaliação da conformidade destes produtos com especificações estabelecidas devem atingir padrões adequados de exatidão, precisão e confiabilidade.

Órgãos internacionais, como a ISO, USP, FDA e AOAC, requerem a validação de métodos analíticos e a documentação do trabalho de validação, para a obtenção de resultados confiáveis e adequados ao uso pretendido. Logo, existem motivos legais, técnicos e comerciais, que justificam a validação de métodos analíticos (SILVA e ALVES, 2006).

Na Seção de Ensaio Gerais da farmacopéia americana (USP 25, 2002) são apresentadas recomendações para a validação de métodos analíticos de compêndio. Esta seção não apresenta distinção entre métodos cromatográficos e não cromatográficos e demonstra um sumário dos parâmetros de desempenho requeridos para diversos ensaios.

Para um melhor entendimento sobre a validação de metodologias analíticas, é necessário saber a definição de métodos normalizados e não normalizados.

Os métodos normalizados são aqueles desenvolvidos por um organismo de normalização ou outras organizações, cujos métodos são aceitos pelo setor técnico em questão. Entretanto, a conformidade dos métodos normalizados usados deve ser verificada sob condições reais de uso. É responsabilidade do laboratório verificar se as características de desempenho prescritas no método normalizado podem ser obtidas. Já o método não normalizado é aquele desenvolvido pelo próprio laboratório, ou adaptado a partir de métodos normalizados e validados (INMETRO, 2010). A metodologia utilizada neste trabalho se enquadra nos métodos não normalizados.

Em uma validação, faz-se necessário definir algumas características de desempenho como a utilização de materiais de referência certificados, que são padrões que têm uma concentração pré-definida do analito, ou utilizar matrizes brancas adicionadas de analito em concentrações definidas (Ibidem). Neste trabalho foram utilizadas matrizes brancas de amendoim, sendo estas fortificadas com concentrações pré-definidas de padrões de aflatoxinas. Com isso, pode ser feita uma avaliação da eficiência da extração de um analito na matriz em métodos analíticos, já que estes podem não medir exatamente a concentração de analito presente na amostra, assim sendo, matrizes fortificadas com quantidades conhecidas do analito são analisadas.

Para a avaliação da consistência de um método analítico, faz-se necessário seguir um procedimento para provar que o método fornece os resultados esperados com credibilidade, precisão e exatidão adequadas. Embora não haja consenso sobre quais parâmetros devem ser incluídos em um processo de validação de um método analítico, pelo menos os seguintes parâmetros normalmente fazem parte da maioria dos processos de validação: Linearidade, Seletividade (especificidade), Limites de Detecção e Quantificação, Precisão, Exatidão (recuperação), e Robustez.

As definições e a explicação sobre cada um destes parâmetros serão mais bem detalhadas no item 2.5 do presente trabalho, na abordagem sobre os métodos quimiométricos.

1.5. Métodos Quimiométricos: Calibração Univariada e Calibração Multivariada

A quimiometria pode ser definida como sendo a aplicação de métodos matemáticos e estatísticos no planejamento ou otimização de procedimentos e na

obtenção de informações químicas através da análise de resultados relevantes (MASSART *et al.*, 2003).

A obtenção de resultados os mais próximos possíveis dos valores verdadeiros pode ser encontrada através da utilização correta dos métodos analíticos. O nível de confiança que se tem nos resultados de uma análise é relativamente pequeno se não for conhecida a exatidão e a precisão do método utilizado, e também se não temos consciência das fontes de erros que podem afetar os resultados (VOGEL, 2002).

A análise quantitativa não se limita à coleta da amostra, à execução de uma única determinação e à admissão tácita de que o resultado obtido é correto. É exigido também o conhecimento da química envolvida e das possíveis interferências de outros íons, elementos e moléculas, bem como da distribuição estatística dos resultados numéricos obtidos. Para a obtenção de uma coesão entre os resultados e o estabelecimento de uma relação entre os mesmos, se faz necessário o uso de métodos de calibração. Estes métodos fazem a relação entre as medidas instrumentais e os valores da propriedade de interesse correspondentes realizados em padrões feita através de uma série de operações matemáticas (BARROS *et al.*, 2002).

De acordo com a complexidade ou dimensionalidade dos dados, os métodos de calibração existentes podem ser divididos em calibração de ordem zero, primeira e segunda ordem (BOOKSH e KOWALSKI, 1994). Este capítulo traz uma breve introdução sobre as técnicas de calibração univariada e calibração multivariada de segunda ordem que foram utilizadas nos dois estudos de caso deste trabalho, com o objetivo de demonstrar como a aplicação destas técnicas quimiométricas permitiram extrair as informações contidas nos resultados analíticos apresentados.

1.5.1. Calibração univariada

Em uma calibração univariada são utilizados modelos de calibração de ordem zero, onde há um único valor da medida experimental por amostra (escalar). A aplicação deste tipo de calibração requer que a grandeza medida diretamente no sistema, por exemplo, a intensidade do sinal de um fluoróforo, não tenha a contribuição de interferentes que possam provocar desvios entre sua relação com a propriedade de interesse (VALDERRAMA *et al.*, 2009).

A calibração univariada pode ser dividida em duas etapas. A primeira, para a construção do modelo, onde são feitas medidas em uma série de padrões analíticos de concentrações conhecidas, e estas são usadas para estimar um modelo que relacione as medidas (espectrais, cromatográficas, potenciométricas, etc.) com a concentração (ou outra propriedade) da espécie de interesse. A outra etapa é a da previsão, onde se utiliza o modelo construído para prever concentrações de novas amostras, a partir dos sinais analíticos medidos para as mesmas.

No Brasil, a ANVISA e o INMETRO disponibilizam guias para o procedimento da validação de metodologias que utilizam modelos de calibração univariada. Existem também guias internacionais elaborados pela IUPAC e EURACHEM que dispõem propostas para validação de métodos univariados. Sendo assim, em consonância com esses guias e alguns trabalhos científicos, são definidos os parâmetros de mérito para calibração univariada e suas respectivas equações para a determinação de cada parâmetro.

1.5.1.1. Parâmetros de mérito para calibração univariada

1.5.1.1.1. Linearidade

A linearidade é a resposta obtida em função da concentração do analito, a qual deve ser estudada em um intervalo de concentração apropriado. Na prática, a linearidade é determinada por intermédio de curvas analíticas, seguidos de um tratamento estatístico. Estas curvas são construídas relacionando-se a resposta do equipamento em função das várias concentrações do analito em estudo (IUPAC, 1993). Esta característica mede a proporcionalidade entre a concentração do analito (ou concentração verdadeira) com o resultado obtido nas análises. A linearidade pode variar em diferentes matrizes com o mesmo analito, dependerá muito do efeito interferente de cada matriz (BRASIL, 2003).

O número mínimo de níveis de concentração do analito aceitos nas curvas analíticas é de, pelo menos, cinco níveis (FABRE, 1999). A linearidade é formulada pela expressão matemática usada para o cálculo da concentração do analito a ser determinada na amostra real. A equação de reta é expressa pela Equação 2.5:

$$y = a_1x + a_0$$

Eq. 2.5

Na qual, y é a variável dependente (resposta medida), x é a variável independente (concentração do analito), a_1 é o coeficiente angular = sensibilidade e a_0 é o coeficiente linear

A variação da resposta em função da concentração do analito demonstra a sensibilidade que é expressa pelo coeficiente angular da curva de regressão linear de calibração. O coeficiente de correlação linear (r) e o coeficiente de determinação (r^2) são parâmetros que indicam o quanto a reta pode ser adequada como modelo matemático. O critério mínimo aceitável do coeficiente de determinação varia entre 0,90 a 0,99 (BRASIL, 2003) e para o coeficiente de correlação linear um valor superior a 0,90 (INMETRO, 2010).

É importante saber que a melhor curva será aquela que fornecerá o menor valor para a soma quadrática dos resíduos (Q) obtidos entre o sinal analítico medido (y_i) e o sinal analítico predito (\hat{y}_i), para um conjunto de N pontos experimentais. Como demonstrado na Figura 7 e na Equação 2.6:

$$Q = \sum_{i=1}^N (y_i - \hat{y}_i)^2$$

Eq. 2.6

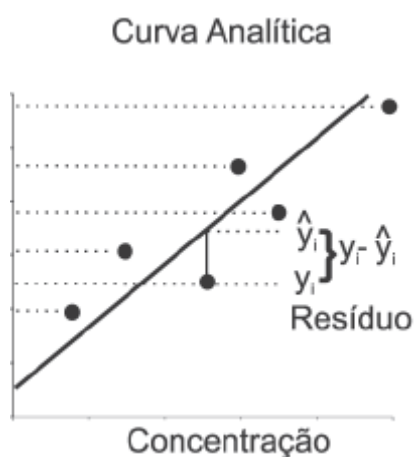


Figura 7: Estimativa do resíduo do sinal analítico em uma curva de calibração.
Fonte: RIBEIRO *et al.*, 2008.

1.5.1.1.2. Limites de detecção e quantificação

O Limite de detecção (LD) corresponde à menor quantidade de um analito que pode ser detectada, porém não necessariamente quantificada como um valor exato. Na prática, o LD é determinado como a menor concentração do analito que pode ser diferenciada do ruído do sistema com segurança. A exigência para distinguir ruído de um sinal analítico varia entre os laboratórios. Um procedimento comum é aceitar como LD a concentração ou massa do analito que gera um sinal igual a três (3) vezes maior do que o ruído do sistema (N) (do inglês *noise*) (FABRE, 1999), como na Equação 2.7:

$$LD = 3N$$

Eq. 2.7

Outra forma é definir o LD como a concentração ou massa do analito que produz sinal igual a 3S, em que S é o desvio-padrão do ruído medido empregando-se uma solução do branco em vez do ruído do equipamento.

O limite de quantificação (LQ) corresponde à menor quantidade de um analito que pode ser quantificada com exatidão e com uma fidelidade determinada. Pode também ser definido em relação ao ruído empregando-se o branco como referência; valores ao redor de 10S (sendo S o desvio-padrão do sinal gerado empregando-se um branco) são comumente aceitos (CHASIN *et al.*, 1998).

Adicionalmente, há ainda outras de formas de se estimar os limites de detecção e de quantificação, além do método da relação sinal-ruído. Neste trabalho foi utilizado o método baseado em parâmetros da curva analítica, considerando-se o grau de confiabilidade estatística necessária (DANZER e CURRIE, 1998).

Para o entendimento do cálculo de LD, deve-se saber que a equação de regressão apresenta um erro padrão e o produto deste erro pelo valor apropriado de t da distribuição de Student (BOX *et al.*, 2005), permite calcular o intervalo de confiança da curva analítica (Figura 8), o qual tem a forma de duas linhas hiperbólicas ao redor dessa curva.

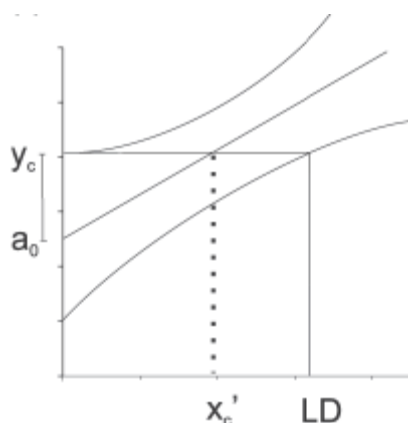


Figura 8: Curva analítica ilustrando os parâmetros utilizados no cálculo do LD. Fonte: RIBEIRO et. al., 2008.

A Figura 8 mostra o y_c crítico que é o limite superior do intervalo de confiança. Fazendo a sua projeção no limite inferior tem-se uma estimativa da concentração mínima, medida com um grau de confiança comprovado estatisticamente, ou seja, o LD do método. As Equações 2.8 e 2.9 demonstram o cálculo de y_c e LD (DANZER e CURRIE, 1998):

$$y_c = a_0 + s_y \cdot t \cdot \sqrt{\left(\frac{1}{N}\right) + 1 + \frac{\bar{x}^2}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}}$$

Eq. 2.8

onde a_0 é o coeficiente linear da curva, S_y é o desvio padrão calculado para o ajuste linear, t é o valor apropriado da distribuição de *Student*, N é o número de pontos da curva analítica e \bar{x} é o valor médio da concentração x_i .

$$LD = 2 \cdot \frac{S_y \cdot t}{a_1} \cdot \sqrt{\left(\frac{1}{N}\right) + 1 + \frac{(y_c - \bar{y})^2}{a_1^2 \cdot \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}}$$

Eq. 2.9

onde a_1 é o coeficiente angular da curva, S_y é o desvio padrão calculado para o ajuste linear, t é o valor apropriado da distribuição de *Student*, N é o número de

pontos da curva, \bar{x} é o valor médio da concentração x_i , \bar{y} é a média do sinal analítico.

O valor de S_y (desvio padrão calculado para o ajuste linear), pode ser obtido pela Equação 2.10.

$$s_y = \sqrt{\frac{\sum (y_i - \hat{y}_i)^2}{N - 2}}$$

Eq. 2.10

onde y_i é o sinal analítico medido, \hat{y} é o sinal analítico predito e N número de pontos da curva analítica.

Assim como o LD, o LQ também pode ser calculado a partir do intervalo de confiança da curva analítica, conforme a figura 9:

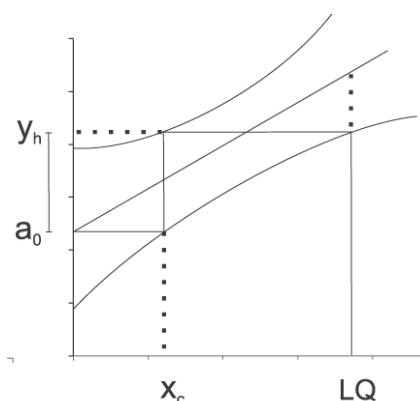


Figura 9: Curva analítica ilustrando os parâmetros utilizados no cálculo do LQ. Fonte: RIBEIRO *et al.*, 2008.

onde x_c é o valor da concentração (x) no ponto em que o valor de a_0 intercepta a reta de regressão, e y_h é o valor de y para a projeção de x_c no limite de controle superior. As Equações 2.11, 2.12 e 2.13 demonstram os cálculos de x_c , y_h e LQ respectivamente (DANZER e CURRIE, 1998).

$$x_c = \left(\frac{S_y \cdot t}{a_1} \right) \cdot \sqrt{\left(\frac{1}{N} \right) + 1 + \frac{\bar{x}^2}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}}$$

Eq. 2.11

onde a_1 é o coeficiente angular da curva, S_y é o desvio padrão calculado para o ajuste linear, t é o valor apropriado da distribuição de *Student*, N é o número de pontos da curva e \bar{x} é o valor médio da concentração x_i .

$$y_h = a_0 + 2 \cdot s_y \cdot t \cdot \sqrt{\left(\frac{1}{N}\right) + 1 + \frac{(x_c - \bar{x})^2}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}}$$

Eq. 2.12

onde a_0 é o coeficiente linear da curva, S_y é o desvio padrão calculado para o ajuste linear, t é o valor apropriado da distribuição de *Student*, N é o número de pontos da curva analítica e \bar{x} é o valor médio da concentração x_i .

$$LQ = \left(\frac{y_h - a_0}{a_1}\right) + \left(\frac{S_y \cdot t}{a_1}\right) \cdot \sqrt{\left(\frac{1}{N}\right) + 1 + \frac{(y_h - \bar{y})^2}{a_1^2 \cdot \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}}$$

Eq. 2.13

onde y_h é o valor de y para a projeção de x_c no limite de controle, a_0 é o coeficiente linear da curva, a_1 é o coeficiente angular da curva, S_y é o desvio padrão calculado para o ajuste linear, t é o valor apropriado da distribuição de *Student*, N é o número de pontos da curva, \bar{x} é o valor médio da concentração x_i , \bar{y} é a média do sinal analítico.

1.5.1.1.3. Exatidão e Recuperação

A exatidão é definida como a concordância entre o resultado de um ensaio e a quantidade do analito realmente existente na amostra (EURACHEM, 1998). A exatidão é, geralmente, determinada por intermédio do uso de uma amostra certificada ou na fortificação de uma amostra branca, cuja concentração do analito é conhecida. A exatidão também pode ser expressa como recuperação analítica, quando aplicada a uma série de resultados de ensaios (INMETRO, 2010).

A recuperação é uma medida da eficiência do processo de isolamento do analito de interesse da matriz na qual se encontra presente. Pode ser também definida como a porcentagem da concentração verdadeira de um analito recuperado durante o processo analítico, ou seja, efetuam-se as operações necessárias à recuperação do analito adicionado (por exemplo, extração com solventes, *clean-up*, etc.) e o valor do analito é, então, determinado. Esta prática é utilizada geralmente quando não se encontra um material de referência certificado disponível (CEE, 2002). A exatidão pode ser expressa pela Equação 2.14:

$$\text{Exatidão}(\%) = \left(\frac{x_i - x_v}{x_v} \right) \times 100$$

Eq. 2.14

Na qual:

x_i = Valor medido;

x_v = Valor verdadeiro.

1.5.1.1.4. Precisão

A precisão é a expressão da concordância entre vários resultados analíticos obtidos para uma mesma amostra (LANÇAS, 2004). A precisão pode ser determinada em condições de repetitividade ou reprodutibilidade. Este parâmetro foi determinado pela análise de padrões analíticos. Pelo menos cinco replicatas devem ser usadas para a determinação da precisão. Neste trabalho, a precisão foi determinada através da repetitividade, calculando-se o desvio-padrão (S) e o desvio padrão relativo (DPR), conhecido também como coeficiente de variação. Este último termo fornece a dispersão dos valores medidos em torno de um valor médio, para análises de amostras contendo a mesma quantidade das espécies de interesse (INMETRO, 2003). A precisão pode ser determinada através das equações 2.15 e 2.16:

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

Eq. 2.15

$$DPR = \frac{100s}{\bar{x}}$$

Eq. 2.16

onde \bar{x} é o valor médio da concentração x_i , e n o número de medições realizadas.

1.5.1.1.5. Seletividade/Especificidade

A especificidade corresponde à capacidade de um método em determinar o analito de maneira inequívoca na presença de outras substâncias susceptíveis de interferirem na determinação. A especificidade é um parâmetro de grande importância na análise de amostras complexas, como resíduos de aflatoxinas em alimentos. Neste caso, devem-se analisar várias alíquotas diferentes da mesma matriz de forma a determinar, inequivocamente, os componentes de matriz que interferem na determinação do analito de interesse. O termo especificidade é também empregado como sinônimo de seletividade (CHASIN *et al.*, 1998).

De fato, o termo específico refere-se a um método que produz uma resposta para um único analito, enquanto o termo seletivo refere-se a um método que fornece resposta a um grupo de espécies químicas que podem ou não serem distinguíveis umas das outras (HUBER, 1993). Se a resposta da substância de interesse é distinguível das outras respostas, o método é denominado seletivo. Na prática, poucos métodos respondem a apenas um analito, fazendo com que o termo seletividade seja mais apropriado (KARNES *et al.*, 1991).

A farmacopéia americana define a seletividade de um método analítico como sua habilidade em medir, de forma acurada, um analito na presença de interferências as quais se espera que estejam presentes na matriz da amostra (USP 22, 1990). Isso inclui os precursores de síntese, isômeros, produtos de decomposição, entre outros.

Em geral, uma forma simples de determinar a seletividade de um método espectroscópico de absorção é observar a presença de sinais de absorvância na região do comprimento de ondas do analito de interesse, analisando-se um branco com a mesma matriz a ser avaliada. Nesse caso, devem-se empregar várias amostras, e a ausência de sinais de absorvância na região do comprimento de onda do analito de interesse deve ser observada.

1.5.1.1.6. Robustez

A robustez é uma medida da capacidade de um método de não sofrer alterações em decorrência de pequenas variações, deliberadamente introduzidas nos parâmetros do método. Ou seja, pode ser medida através de diversos fatores como variações no preparo de amostras, na armazenagem ou em alterações nas condições experimentais. Nesta característica de desempenho fazem-se variações no método de ensaio, avaliando-se o efeito destas modificações no resultado da análise (INMETRO, 2010).

Na robustez pode-se medir a confiabilidade do método em condições normais de operação, permitindo fixar as tolerâncias dos fatores do método. A influência dos fatores na resposta da análise pode ser verificada individual (método univariado) ou simultaneamente (método multivariado) (ALTRIA e FILBEY, 1994). Um método pode ser considerado robusto quando se apresenta praticamente insensível a pequenas variações que possam ocorrer quando de sua execução. Quanto maior a robustez de um método maior será a confiabilidade em sua precisão (EURACHEM, 1998).

1.5.2. Calibração multivariada de 2ª ordem

A quantidade de metodologias empregadas para análise de amostras simples ou complexas tem crescido bastante, principalmente quando se trata de resolução de misturas com multicomponentes com a utilização de métodos de calibração multivariada. Em uma calibração multivariada faz-se a associação de diversas variáveis simultaneamente durante as medições de análise de uma amostra. A utilização de técnicas de calibração multivariada constitui uma importante alternativa para a interpretação de dados e para a aquisição do máximo de informação sobre o sistema analítico (NUNES, 2008).

Em análises de alimentos, a calibração multivariada tornou-se uma importante ferramenta analítica, e o grande interesse nesta técnica está no fato deste procedimento analítico ser bastante rápido e eficiente na abordagem de muitos problemas reais (FORINA *et al.*, 2007).

Quando se trabalha com métodos quimiométricos pode ser utilizada toda informação instrumental (métodos baseados em espectro completo) ou pode ser usado o método de seleção de variáveis, o qual melhora significativamente o desempenho da calibração multivariada. O método de seleção de variáveis, quando aplicado em análises de espectros, envolve a demarcação de uma determinada região que pode ser composta por comprimentos de ondas discretos ou bandas.

A escolha dessa região pelo método de seleção de variáveis tem como alvo encontrar as variáveis minimamente correlacionadas e colineares que contenham informações relacionadas somente ao parâmetro de interesse. Com isso, a modelagem é realizada apenas com base nessas variáveis e o modelo construído será mais simples, robusto, eficaz e fácil de interpretar (NUNES, 2008).

Em oposição aos métodos que fazem a análise do espectro completo, ou seja, aqueles que utilizam todos os comprimentos de onda do espectro, encontram-se os métodos de compressão de variáveis, que são baseados na decomposição dos dados em componentes principais (MARTENS e NAES, 1987).

De uma forma geral, a calibração multivariada é realizada em cinco etapas, que são a preparação do conjunto de calibração, o registro do sinal analítico (espectro), o pré-tratamento dos dados, a construção do modelo e, por fim, a validação do mesmo.

Na preparação do conjunto de calibração, obtêm-se um conjunto de amostras das quais devem ser conhecidas as propriedades de interesse. O registro do sinal analítico visa obter informações químicas e físicas através dos espectros.

Na etapa de pré-tratamento dos dados são reduzidas possíveis contribuições indesejadas nos sinais, o que pode causar uma diminuição da capacidade de previsão dos modelos (PIZARRO *et al.*, 2004). Neste trabalho, foi somente aplicado um procedimento de suavização dos espectros. O algoritmo empregado e o mais utilizado para este fim é o de Savitzky-Golay (SAVITZKY e GOLAY, 1964).

Na construção do modelo, seleciona-se aquele que estabelece uma melhor relação entre o sinal instrumental e a concentração do analito. Para garantir que o modelo construído tenha uma boa capacidade preditiva, é necessário fazer um

processo de validação, onde será feito um estudo quantitativo dos resultados da aplicação deste modelo em novas amostras.

1.5.2.1. Modelo de análise de fatores paralelos (PARAFAC)

O PARAFAC é um método quimiométrico multidimensional bastante utilizado e que possibilita o emprego de um número bastante reduzido de amostras em relação aos métodos de primeira ordem, sem apresentar perda da reprodutibilidade dos resultados ou na estabilidade da decomposição, que envolve também a regressão de dados de segunda ordem (TREVISAN, 2003).

Há o registros recentes de diversos trabalhos que empregam técnicas espectrofluorimétricas utilizando o modelo PARAFAC para a determinação simultânea de diversos parâmetros ou analitos, tanto em análises ambientais quanto em alimentos. Dentre os quais podem ser citados, estudos da estabilidade do iogurte fazendo-se o uso da combinação da espectroscopia de fluorescência com análises de fatores paralelos (HENRIQUES *et al.*, 2009) e avaliações por este método quimiométrico na determinação simultânea de hidrocarbonetos aromáticos polinucleares em água por espectrofluorimetria (LIMA *et al.*, 2010).

O modelo de Análise de Fatores Paralelos possibilita a decomposição de um tensor de dados em matrizes de *loadings* (concentração, espectros de emissão e de excitação), mais um tensor de dados contendo os resíduos não modelados, facilitando a interpretação dos resultados (BRO, 1998).

Na utilização da técnica de fluorescência de excitação-emissão, a medida de uma única amostra gera uma superfície de excitação-emissão ou uma matriz de intensidades de fluorescência. Expandindo-se para um conjunto de amostras, tem-se a criação de um tensor tridimensional (amostras – comprimento de onda de excitação – comprimento de onda de emissão), com a formação de um sólido tridimensional ou cubo. Com isso, um tensor \underline{X} de dimensões $I \times J \times K$ é formado, através da medida de intensidade de fluorescência de várias amostras (TREVISAN, 2003). A Figura 10 demonstra graficamente a decomposição de um tensor de dados através do modelo PARAFAC.

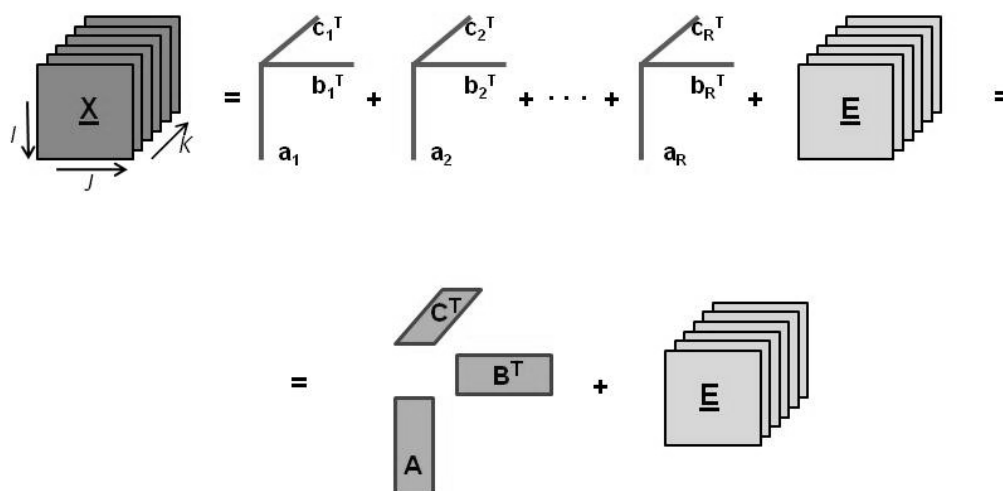


Figura 10: Representação gráfica da decomposição dos dados realizada pelo modelo PARAFAC. Fonte: SENA, 2005.

Este modelo é definido por uma matriz de *scores* ou *loading* (escores ou pesos) **A**, e duas matrizes de *loadings* (pesos) **B** e **C**, representadas respectivamente por a_{if} , b_{jf} e c_{kf} . x_{ijk} é um elemento do tensor de dados definido pelas dimensões $I \times J \times K$. O modelo tem a otimização obtida pela minimização das somas dos erros quadráticos do modelo, e_{ijk} , no próprio modelo (ENGELEN *et al.*, 2009), conforme a Equação 2.17:

$$x_{ijk} = \sum_{f=1}^F a_{if} b_{jf} c_{kf} + e_{ijk}$$

Eq. 2.17

Para a otimização do modelo PARAFAC é utilizado como algoritmo o ALS - *Alternating Least Squares* (Mínimos Quadrados Alternados), que inicializa assumindo os *loadings* em dois modos e usa-os para estimar os *loadings* do próximo modo, até a minimização dos resíduos (TREVISAN, 2003). Neste trabalho foram

feitas certas restrições como a não negatividade, que foi utilizada para melhorar a convergência do algoritmo e obter uma melhor interpretação física dos *loadings*, tais como as semelhanças espectrais.

Nesta técnica, além da identificação de componentes também pode ser realizada a quantificação e, neste caso, os *loadings* do modo de concentração ou *scores* obtidos após a decomposição são relacionados com as concentrações conhecidas dos grupos de calibração e validação.

Na utilização do PARAFAC como ferramenta quimiométrica, deve-se atentar para a escolha do número ideal de fatores para a decomposição. Possíveis erros na escolha destes fatores podem gerar interpretações falsas do sistema em estudo, minimizando a confiabilidade da análise. O parâmetro utilizado para a escolha dos fatores é o diagnóstico de consistência do tensor do núcleo, ou termo em inglês *Core Consistency Diagnostic* - Corcondia, como indicativo da trilinearidade do modelo, de modo que os elementos da superdiagonal da matriz do núcleo, que deverão ser o mais próximo possível do valor unitário, e os elementos externos da superdiagonal, sejam próximos a zero (SENA, 2005). O Corcondia é definido pela Equação 2.18:

$$\text{Corcondia} = 100 * \left(1 - \frac{\sum_{d=1}^F \sum_{e=1}^F \sum_{f=1}^F (g_{def} - t_{def})^2}{\sum_{d=1}^F \sum_{e=1}^F \sum_{f=1}^F t_{def}^2} \right)$$

Eq. 2.18

onde g_{def} é o elemento da matriz *core* calculado com os *loadings* obtidos pelo PARAFAC e definido pelas dimensões ($d-e-f$), t_{def} é o elemento de um tensor binário com zero em todos os elementos e um na superdiagonal (o ideal), e F é o número de fatores do modelo.

Se o resultado do *core consistency diagnostic* estiver entre 90% e 100%, há um indicativo de que o número de fatores escolhidos é adequado; um valor em torno de 50% indica que o modelo não é adequado, pois pode apresentar variações na trilinearidade. Se um resultado for próximo de zero ou ainda negativo indica um

modelo inválido, pois o espaço coberto pelas matrizes de componentes não descrevem uma variação trilinear (SENA, 2005).

Ao final da análise feita pelo PARAFAC puderam ser avaliados alguns parâmetros de mérito, explorados no item 2.5.2.2, que são de grande importância em calibração multivariada, em função da sua caracterização, comparação e desenvolvimento de métodos multivariados (OLIVIERI *et al.*, 2006).

1.5.2.2. Parâmetros de mérito para calibração multivariada de 2ª ordem

1.5.2.2.1. Sinal analítico líquido

O sinal analítico líquido (NAS – *Net Analyte Signal*) tem importante função na determinação de alguns parâmetros de mérito para calibrações multivariadas, como em cálculos de seletividade e razão sinal/ruído, que requerem o cálculo do sinal analítico líquido do analito de interesse. O NAS, que é a fração do sinal analítico é ortogonal ao sinal dos demais componentes presentes na amostra, como mostra a Figura 11. A contribuição individual de cada componente é armazenada em um fator do modelo em métodos de calibração de segunda ordem; logo, o sinal analítico líquido para cada espécie linearmente independente presente na amostra é armazenado separadamente (VALDERRAMA *et al.*, 2009).

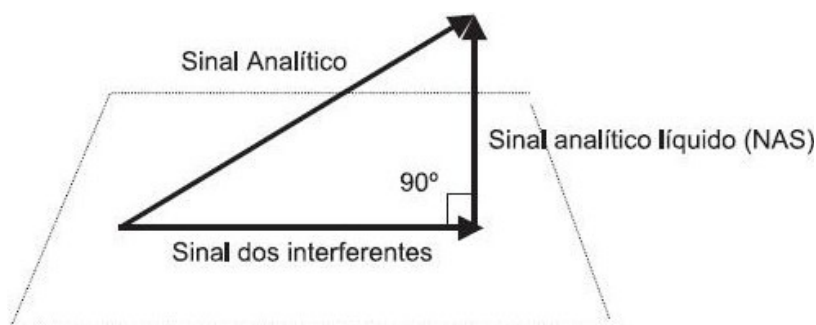


Figura 11: Representação do ortogonalidade do sinal analítico líquido (NAS). Fonte: VALDERRAMA *et al.*, 2009.

Como se trata de um vetor contendo valores para cada amostra e é proporcional a concentração do analito de interesse, o NAS pode ser representado pela Equação 2.19:

$$\text{NAS} = \|(X_{\text{nas}})\|$$

Eq. 2.19

onde X_{nas} é o vetor NAS do analito de interesse (X) e $\|.\|$ = norma euclidiana (OLIVIERI e FABER, 2009).

1.5.2.2.2. Exatidão

Para avaliação da exatidão é necessário medir a capacidade de predição fazendo-se a determinação de parâmetros de avaliação do modelo. Os principais são o somatório do quadrado dos resíduos ($\sum(y_{prev} - y)^2$), denominado habitualmente de PRESS (*Predicted Residual Error Sum of Squares*), ou o seu valor médio, MSE (*Mean Squared Error*), obtido dividindo-se o PRESS pelo número de amostras. Para utilizar as mesmas unidades de concentração, calcula-se a raiz quadrada do MSE obtendo-se o RMSE (*Root Mean Squared Error*), o qual se calcula tanto para as amostras de calibração, RMSEC (*Root Mean Squared Error of Calibration*) quanto para as amostras de predição, RMSEP (*Root Mean Squared Error of Prediction*).

As equações desses parâmetros (Equações 2.20 e 2.21), que foram utilizados no presente trabalho, são apresentadas abaixo:

Onde * N_p = número de amostras

Raiz quadrada do erro médio quadrático de calibração (RMSEC)

$$RMSEC = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{N_p} (y_{predito} - y_{obtido})^2}{N_p}}$$

Eq. 2.20

Raiz quadrada do erro médio quadrático de predição (RMSEP)

$$RMSEP = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{N_p} (y_{predito} - y_{referencia})^2}{N_p}}$$

Eq. 2.21

1.5.2.2.3. Sensibilidade

A sensibilidade (SEN) corresponde à fração do sinal responsável pelo acréscimo de uma unidade de concentração à propriedade de interesse (LORBER, 1986 e FERRÉ *et al.*, 2001). É determinada através da Equação 2.22.

$$SEN = 1/||\mathbf{b}||$$

Eq. 2.22

Onde \mathbf{b} é o vetor dos coeficientes de regressão e $||\cdot||$ é a norma euclidiana.

1.5.2.2.4. Sensibilidade Analítica

De uma maneira geral, apresenta a sensibilidade do método em termos da unidade de concentração que é utilizada, sendo definida como a razão entre a sensibilidade e o desvio padrão do sinal de referência, ou como sendo a razão entre a sensibilidade e o ruído instrumental (OLIVIERI e FABER, 2005), de acordo com a Equação 2.23:

$$\gamma = \frac{SEN}{\varepsilon} = \frac{SEN}{\|\delta \mathbf{k}\|}$$

Eq. 2.23

Onde ε e δ = ruído instrumental, \mathbf{k} corresponde à espécie de interesse e $||\cdot||$ é a norma euclidiana.

1.5.2.2.5. Seletividade

Mede o grau de sobreposição entre o sinal da espécie de interesse e os interferentes presentes na amostra indicando, também, a parte do sinal que é perdida por essa sobreposição (VESSMAN *et al.*, 2001). É representada pela razão entre a sensibilidade do analito de interesse e de um interferente particular. A seletividade pode ser obtida através da Equação 2.24:

$$SEL = \{[(\mathbf{B}_{exp}^T \mathbf{P}_{b,unx} \mathbf{B}_{exp}) \cdot (\mathbf{C}_{exp}^T \mathbf{P}_{c,unx} \mathbf{C}_{exp})]^{-1}\}_{nn}^{-1/2}$$

Eq. 2.24

Onde \mathbf{B}_{exp} e \mathbf{C}_{exp} são matrizes que contêm os perfis espectrais de todos os analitos conhecidos em cada dimensão, nn é o elemento (n,n) correspondente ao n -ésimo analito de interesse e $\mathbf{P}_{b,unx}$ e $\mathbf{P}_{c,unx}$ são as matrizes de projeções ortogonais que removem a contribuição dos componentes inesperados.

1.5.2.2.6. Linearidade

O parâmetro linearidade é estimado a partir da correlação entre os valores tidos como referência e os valores estimados pelo modelo de calibração multivariada, para a propriedade de interesse. Com isso, pode-se determinar a melhor reta pelo método dos mínimos quadrados e ajustar os valores de referência aos valores estimados pelo modelo (LAASONEN *et al.*, 2003). Também é possível determinar o ajuste do modelo através da melhor reta que se ajusta à relação do NAS contra a concentração, para as amostras de calibração (BRAGA, 2004).

1.5.2.2.7. Limite de detecção

O limite de detecção é a menor concentração de um dado analito que um processo analítico pode detectar com confiança (MASSART *et al.*, 2003) e representado pela Equação 2.25:

$$LD = 3,3.\varepsilon / SEN$$

Eq. 2.25

Onde ε é o ruído instrumental e SEN corresponde à sensibilidade.

1.5.2.2.8. Limite de quantificação

O limite de quantificação é a concentração mínima que permite a quantificação do analito de interesse com um desvio-padrão relativo de previsão menor que 10% e pode ser obtido a partir da Equação 2.26:

$$LQ = 10.\varepsilon / SEN$$

Eq. 2.26

Onde ε é o ruído instrumental e SEN corresponde à sensibilidade.

2 ESTUDO DE CASO: DETERMINAÇÃO DO TOTAL DE AFLATOXINAS EM AMENDOIM POR ESPECTROFLUORIMETRIA

Esta metodologia fixa condições, padroniza, define alguns parâmetros para a determinação das aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂ com derivatização pós-coluna de imunoafinidade, analisadas por espectrofluorimetria com base em um estudo colaborativo (TRUCKSESS *et al.*, 1991). O método apresentado neste trabalho se adequa a Resolução RDC Nº 274, que fixa um LMT (limite máximo tolerável) de 20 µg.kg⁻¹ para o somatório das aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂ para amendoim com casca, descascado, cru ou tostado (BRASIL, 2002). Esta portaria internalizou as normas do MERCOSUL GMC/RES. Nº 56/94.

2.1. Materiais e Métodos

2.1.1. Processo de amostragem do amendoim

As amostras de amendoim utilizadas neste trabalho são provenientes de estabelecimentos comerciais e processadas de acordo com o procedimento operacional padrão do Laboratório de Alimentos e Contaminantes do INCQS/FIOCRUZ (POP 65.3120.152-02, 2011). Neste processo são pesados 0,5 kg do amendoim de mesmo lote e para uma distribuição homogênea, as amostras recebidas devem ser moídas e homogeneizadas em sua totalidade.

Estas amostras devem ser moídas para obterem-se tamanhos de partículas menores do que 20 mesh. Nesta etapa de moagem é necessário a utilização de máscara protetora ou um exaustor de pó, já que processamento destas amostras secas pode resultar na presença de poeira no ar e mesmo se a toxina não estiver presente, existe um perigo potencial proveniente da inalação de esporos de fungos ou uma resposta alérgica da inalação desta poeira por um indivíduo (AOAC, 2005). A moagem das amostras de amendoim foi realizada em área separada do laboratório de análise.

2.1.2. Processo de extração e análise de aflatoxinas em amendoim

O princípio do ensaio baseia-se na extração de 6 g de amostra de amendoim (cru com casca) moído acrescidos de 1 g de cloreto de sódio em 30 mL de solução de metanol a 70% v/v. O extrato é homogeneizado durante uma hora em um agitador mecânico. Após esta etapa, o extrato é levado a uma filtração em papel de filtro qualitativo, onde, 15 mL do mesmo são recolhidos e misturados com 30 mL de água deionizada. Feito isto, o filtrado é passado em uma membrana de microfibras de vidro sob vácuo e ao final deste processo o extrato deve apresentar um aspecto límpido, caso contrário, esta última etapa de filtração deverá ser repetida. Em uma seringa de vidro é transferido 15 mL do extrato obtido, onde está acoplada a coluna de imunoafinidade contendo anticorpo monoclonal para as aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂. Após a passagem do extrato, a coluna deve ser lavada em duas porções de 10 mL de água deionizada para a retirada de possíveis resíduos advindos da extração do amendoim. Nesta etapa, as aflatoxinas são isoladas, purificadas, e ficam concentradas na coluna. A eluição das aflatoxinas é feita aplicando-se 1 mL de metanol na coluna. O eluato é transferido diretamente da coluna para uma cubeta de quartzo e as aflatoxinas totais são quantificadas pela medida da fluorescência após reação de derivatização com 1 mL de solução de bromo 0,003% v/v.

A etapa de derivatização nesta metodologia se faz necessária, já que em determinações de aflatoxinas por espectrofluorimetria, há um aumento da fluorescência destes analitos após a adição de reagentes complexantes ou derivatizantes. Com a adição de solução de bromo ocorrem reações de derivatização das aflatoxinas, conforme mostra a Figura 12. As aflatoxinas são determinadas no espectrofluorímetro com os comprimentos de onda de excitação e emissão fixados em 360 nm e 420 nm, respectivamente (TRUCKSESS *et al.*, 1991). Nestas reações ocorre a superposição entre estados vibracionais dos dois estados eletrônicos, e quando a molécula contém átomo pesado como o Br, as interações spin-órbita propiciam condições mais favoráveis para uma mudança de spin. Os efeitos do átomo pesado se refletem em todos os processos onde os estados de diferentes multiplicidade (transições dos estados tripleto e singleto) estão envolvidos, acarretando na mudança de propriedades fotofísicas da molécula, o que ocasiona um aumento na fluorescência (INGLE e CROUCH, 1998).

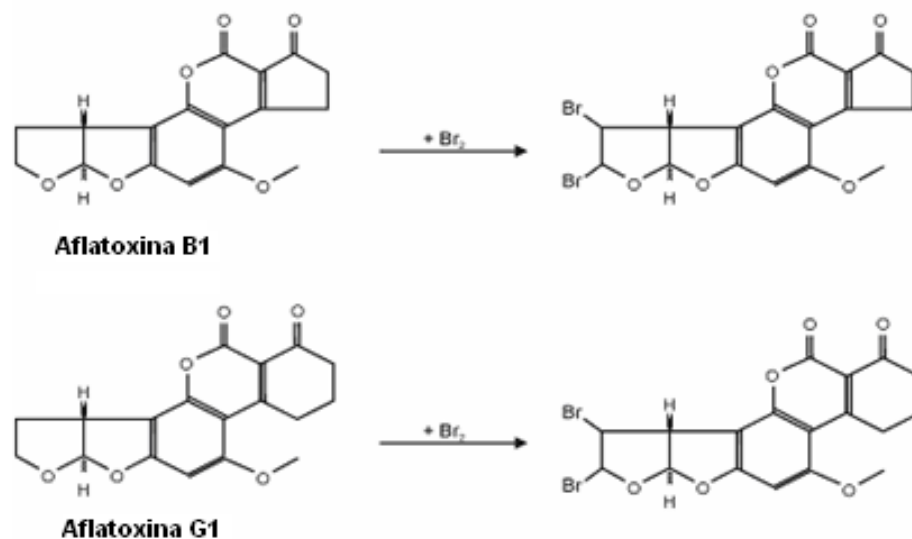


Figura 12: Representação da reação de derivatização das aflatoxinas utilizando solução de bromo 0,003 %v/v. Fonte: R-BIOPHARM RHÔNE LTD, 2004.

2.1.3. Materiais

2.1.3.1. Equipamentos e Materiais

- Espectrofluorímetro – Modelo Panorama Fluorat-02 (Lumex, Rússia);
- Balança analítica com resolução de 0,0001g – Modelo AL204 (Mettler Toledo, Suíça);
- Micropipetas de volume variável de 10 – 1000 µl (Eppendorf, USA);
- Sistema de filtração a vácuo;
- Bomba de vácuo;
- Agitador mecânico – Tipo *shaker*;
- Coluna de imunoafinidade (Aflatest™);
- Cubetas de quartzo de 1 cm;
- Papel de filtro qualitativo (Whatman N°2);
- Papel de microfibra de vidro, Ø = 47 mm.

2.1.3.2. Reagentes

- Água deionizada ou com maior grau de pureza;
- Padrão de aflatoxinas (B₁, B₂, G₁, G₂) com pureza ≥ 98% (Sigma-Aldrich)
- Solução de bromo 0,03 %v/v (Biovet);

- Metanol, grau CLAE (Merck, Alemanha);
- Cloreto de sódio para análise (Merck, Alemanha).

2.1.3.3. Soluções reagentes

Solução de bromo 0,003 % v/v

Solução metanol/água 70% v/v

2.1.3.4. Preparo das soluções padrão de aflatoxinas

Solução estoque de aflatoxinas: B₁, B₂, G₁ e G₂ 10 µg. mL⁻¹ em acetonitrila (grau CLAE). Posteriormente, foram feitas diluições para a preparação das soluções de 10; 25; 50; 75 e 100 ng. mL⁻¹ usando metanol como diluente.

2.1.4. Definição das condições operacionais

O objetivo da definição das condições operacionais foi determinar quais os comprimentos de onda (excitação e emissão) ideais para a determinação espectrofluorimétrica de aflatoxinas totais na matriz (amendoim).

Para a definição das condições operacionais foram fortificadas amostras brancas de amendoim, em três concentrações diferentes: uma de baixa concentração (20 ng. mL⁻¹), uma de concentração intermediária (50 ng. mL⁻¹) e uma de alta concentração (100 ng. mL⁻¹), preparadas à partir da solução estoque.

Foram utilizadas três concentrações distintas no intuito de avaliar o comportamento da reação de derivatização em diferentes concentrações de aflatoxinas, mantendo-se a mesma quantidade do reagente (solução de bromo 0,003% v/v). Para a seleção dos comprimentos de onda foi obtido uma superfície de excitação-emissão com a excitação no intervalo de 300-370 nm e a emissão de 380-550 nm.

2.1.5. Características de desempenho

Para a análise dos parâmetros de linearidade, limites de detecção e quantificação, precisão, exatidão, e robustez foi utilizado como recurso para os cálculos uma planilha de validação elaborada no software Excel 2003 da Microsoft®, de domínio público. A planilha pode ser obtida no endereço eletrônico <http://lqta.iqm.unicamp.br>.

2.1.5.1. Linearidade, Limites de Detecção e Quantificação

Para a determinação destes parâmetros foram analisadas cinco amostras brancas de amendoim moído fortificadas com soluções padrão de aflatoxinas, obtendo-se uma curva analítica com cinco pontos para avaliação da linearidade. As concentrações utilizadas foram: 10, 25, 50, 75, 100 ng. mL⁻¹, todas analisadas em quintuplicata. Foram obtidos, por regressão linear, a equação da curva e o coeficiente de determinação. Além disso, foi construído o gráfico dos resíduos, que permite detectar problemas no ajuste da curva como, por exemplo, possíveis desvios da linearidade ou mesmo a heterocedasticidade (a variância não se mantém constante).

2.1.5.2. Exatidão/ Recuperação

Foram analisadas matrizes brancas de amendoim moído adicionadas de solução de aflatoxinas totais em três níveis de concentrações (10; 20; 30 µg. kg⁻¹). A solução padrão com aflatoxinas foi adicionada à matriz, após a pesagem, antes do início do processo de extração descrito no início deste capítulo. Foram feitas seis determinações para cada amostra. Após a análise das amostras foi calculada a exatidão/recuperação obtida de cada amostra através da Equação 2.14.

Depois de determinadas, as recuperações nas diferentes concentrações estudadas, foram comparadas ao intervalo de variação aceitável na faixa de concentração recomendada (CEE, 2002). Os valores de recuperação aceitáveis devem estar na faixa de 70 a 120% (SOARES e RODRIGUEZ-AMAYA, 1989).

2.1.5.3. Precisão

A precisão das análises, dentro do processo de validação, foi avaliada pela repetitividade e, para a avaliação desta característica, um único analista realizou todas as etapas do procedimento deste ensaio. A precisão das análises foi realizada fazendo-se determinações em amostras de amendoim fortificadas em três níveis de concentrações. As amostras fortificadas tinham concentrações de 10, 50 e 75 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$, as quais cobriam a maior parte da faixa linear da curva analítica. Para cada nível de concentração foram feitas seis determinações.

A partir dos valores de concentração obtidos, foram calculados os DPR (desvio padrão relativo) ou coeficientes de variação e comparou-se com valor encontrado pelo cálculo do valor de Horwitz (DPR_R), representada pela Equação 3.1 (INMETRO, 2010).

$$\text{DPR}_R = 2^{(1 - 0,5 \log C)}$$

Eq. 3.1

Onde C é a fração mássica expressa sob a forma de uma potência de 10.

No caso desse experimento foi usado $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$, portanto $C = 10^{-9}$. Calculando-se o DPR_R obtêm-se o valor de 45,3%, indicando que o DPR encontrado na análise destas amostras deverá ser inferior a este valor.

3.1.5.4. Especificidade/ Seletividade

A seletividade foi avaliada observando-se a presença de sinais na região do comprimento de ondas de fluorescência das aflatoxinas, fazendo-se a análise de três matrizes brancas. Nesse caso, a ausência de sinais de interferentes nesta região do espectro deve ser observada.

2.1.5.5. Robustez

Para avaliar a robustez da metodologia foram feitas pequenas alterações na metodologia. Foi realizada a extração de três amostras de amendoim fortificadas

com solução padrão de aflatoxinas totais, perfazendo-se uma concentração de aflatoxinas de $20 \mu\text{g. kg}^{-1}$ na matriz.

Uma das amostras foi extraída pela metodologia original (controle – condição 1). Em outra, foi modificado o processo de extração na etapa de agitação, fazendo-se a mesma de forma manual, ao invés da utilização de um agitador mecânico (condição 2). Na última, foi realizada toda etapa de extração até a obtenção do extrato final, deixando a etapa de separação através da coluna de imunoafinidade para o dia seguinte. Este extrato foi armazenado em refrigerador e mantido a uma temperatura de aproximadamente 10°C (condição 3).

Nestas amostras foram realizadas seis determinações e avaliados os parâmetros de recuperação e precisão para a observação da sensibilidade do método em relação a essas pequenas variações.

2.2. Resultados e discussão

2.2.1. Definição das condições operacionais

Os resultados encontrados para definição dos comprimentos de onda ideais que foram utilizados para a determinação de aflatoxinas totais em amostras de amendoim estão demonstrados nas Figuras 13 e 14.

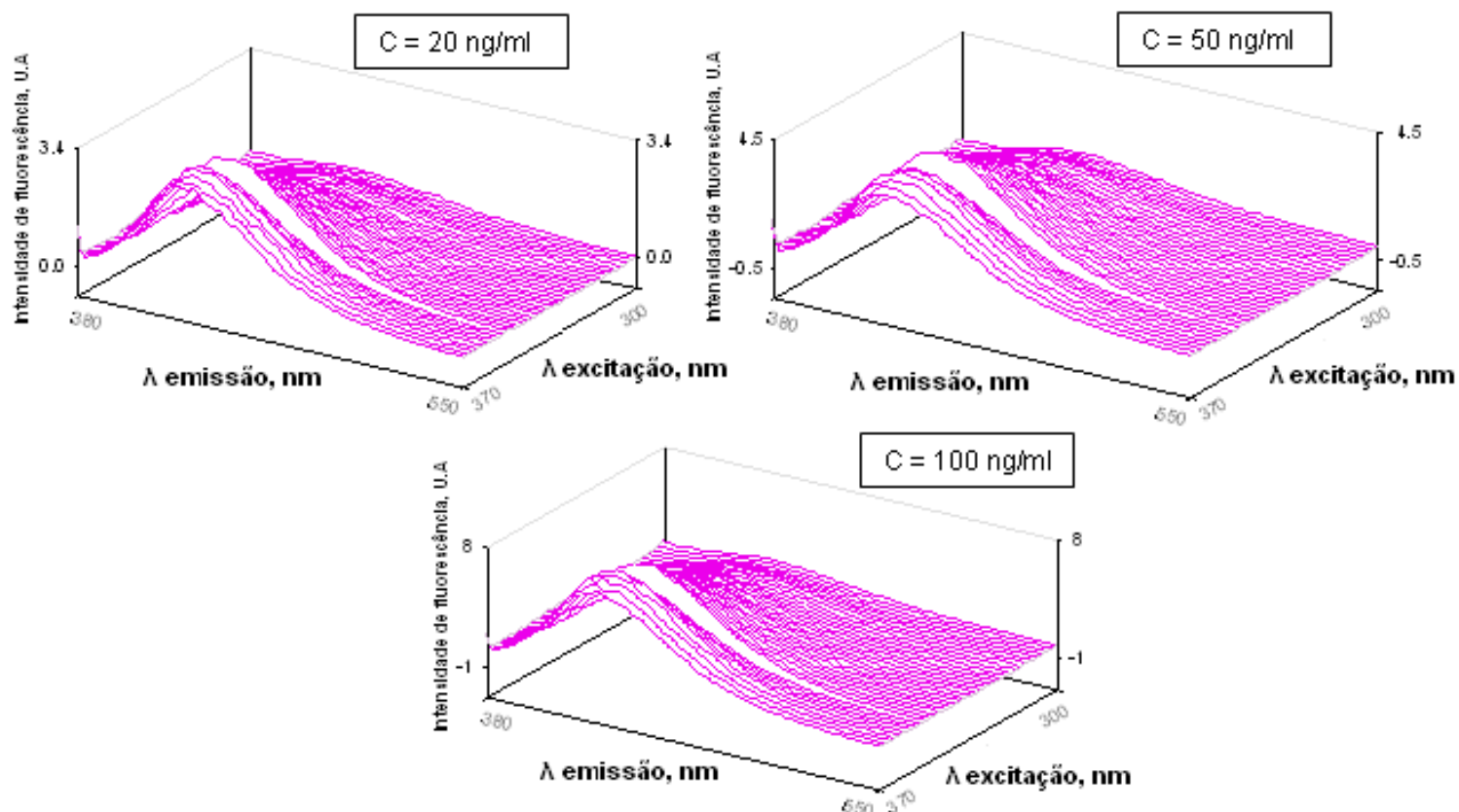


Figura 13: Superfícies de resposta da matriz de emissão-excitação das aflatoxinas totais em três níveis de concentração.

Fazendo-se a avaliação das intensidades dos sinais nas três amostras (Figura 13), conclui-se que os resultados foram relativamente crescentes em relação aos níveis de fortificação das aflatoxinas no amendoim. As maiores intensidades de fluorescência foram 3,4, 4,5 e 8 para as concentrações de 20 ng. mL^{-1} , 50 ng. mL^{-1} e 100 ng. mL^{-1} , respectivamente, evidenciando que o processo da reação de derivatização não causou perda na eficiência após a extração das aflatoxinas nos diferentes níveis de concentrações.

Para a construção da curva analítica foram utilizados como comprimentos de onda de excitação e emissão, 362 nm e 430 nm, respectivamente, já que nesses comprimentos ocorreu uma maior intensidade de sinal (Figura 14). Em algumas literaturas os maiores comprimentos de onda empregados são os de 360 nm para excitação e 420 nm para emissão. Estas pequenas variações de valores está relacionada à resolução do espectrofluorímetro utilizado.

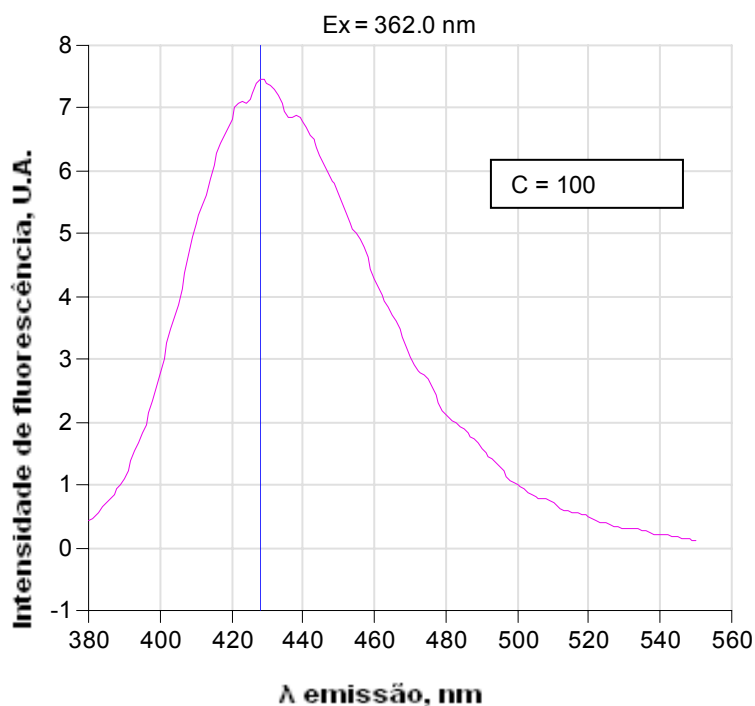


Figura 14: Espectro de emissão das aflatoxinas indicando o máximo de emissão fluorescente.

2.2.2. Linearidade, limites de detecção e quantificação

A curva de calibração obtida para as aflatoxinas totais apresentou um comportamento linear para a faixa de concentração de 10 a 100 ng. mL⁻¹, com coeficientes de correlação acima de 0,99. Os dados da curva estão apresentados na Tabela 3. Os coeficientes da regressão podem ser observados no gráfico da Figura 15:

Tabela 3: Dados da curva analítica.

Nível	Concentração de aflatoxinas, ng/mL	Sinal Analítico Médio (n = 5)	Desvio Padrão	DPR (%)
1	10	0,80	0,038	4,7
2	25	2,14	0,110	5,2
3	50	3,92	0,165	4,2
4	75	5,61	0,224	4,0
5	100	7,54	0,1529	2,0

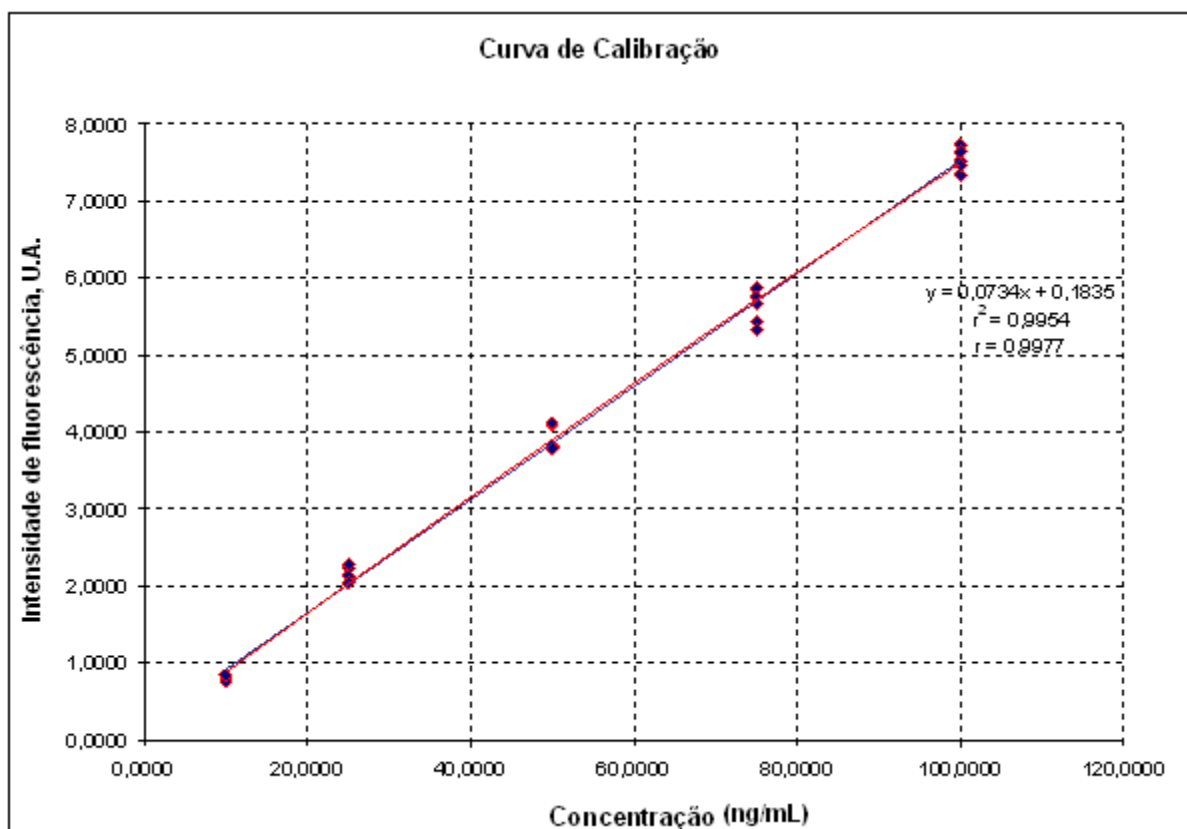


Figura 15: Representação gráfica da curva analítica dos padrões de aflatoxinas, com a equação da reta e os valores dos coeficientes de correlação linear (r) e de determinação (r^2).

O coeficiente de determinação apresentou um valor de 0,9954 e o coeficiente de correlação linear encontrado foi de 0,9977, sendo superior ao usualmente requerido, onde são preconizados como satisfatório os coeficientes de determinação maiores do que 0,98 e de correlação linear acima de 0,90 (INMETRO, 2010).

Analisando o gráfico dos resíduos podemos observar a variabilidade dos dados que não foi explicada pelo ajuste, e que são interpretados com uma estimativa do erro do modelo. Os resíduos devem ter uma distribuição normal com média zero e variância constante (homocedasticidade). A análise do gráfico dos resíduos para os diferentes níveis de concentração de aflatoxinas demonstra este comportamento, como pode ser observado na Figura 16, dados com dispersão homogênea e variância constante:

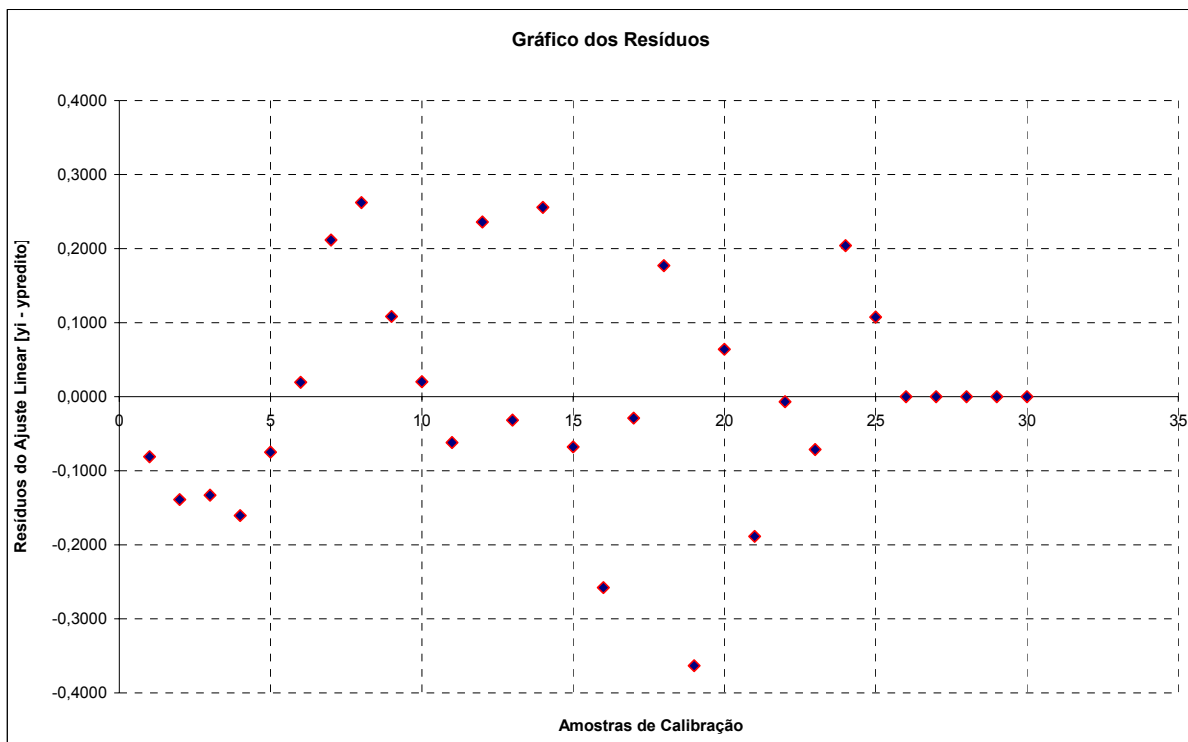


Figura 16: Variabilidade dos erros do modelo no gráfico de resíduos.

Os valores calculados para LD e LQ, usando as Equações 2.9 e 2.13, respectivamente, foram satisfatórios, já que estão abaixo do LMT (limite máximo tolerável) para resíduos de aflatoxinas em amendoim que é de $20 \mu\text{g. kg}^{-1}$, como mostrado na tabela 4 para níveis de confiança de 95%, 99,0% e 99,9%.

Tabela 4: Valores calculados para os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) para três níveis de confiança.

Nível de confiança, %	LD ($\mu\text{g. kg}^{-1}$)	LQ ($\mu\text{g. kg}^{-1}$)
95,0	1,7	2,5
99,0	2,3	2,8
99,9	3,0	3,2

2.2.3. Exatidão/ Recuperação

A Tabela 5 mostra que, nas concentrações de 10, 20, 30 μg de aflatoxinas totais/kg de amendoim, os valores de recuperação encontraram-se todos dentro do intervalo de variação aceitável. Pode ser observado que quanto maiores forem as

concentrações investigadas, maiores foram os valores de recuperação e menores foram os DPR (%). Portanto, como o esperado, foi verificado que quanto maior a concentração das aflatoxinas, menor é a interferência causada por perdas no processamento.

Tabela 5: Valores determinados para exatidão e recuperação nos três níveis de concentração.

Concentração ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Valores de recuperação (%)	Intervalo de variação aceitável (%)	Valores de DPR (%)
10	86,9 - 108,9	70 - 120	8,5
20	89,5 - 109,8	70 - 120	8,1
30	94,7 - 108,6	70 - 120	5,6

2.2.4. Precisão

A precisão foi estimada como repetitividade e de acordo com o DPR_R (valor de Horwitz), calculado no item 3.1.5.3, o intervalo de variação aceitável para a precisão em condições de repetitividade é de 45,3%. Os resultados encontram-se na Tabela 6, onde é possível observar que, para os três níveis de concentração de aflatoxinas no amendoim, o desvio padrão relativo não excedeu o limite calculado usando-se dez réplicas autênticas para cada nível.

Tabela 6: Resultados do estudo da precisão da metodologia.

Concentração predita ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Concentração de referência ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Exatidão (%)	Desvio padrão	Valores de DPR (%)
9,5	10,0	- 5,4	0,8	8,5
49,3	50,0	- 1,4	1,8	3,6
72,9	75,0	- 2,8	0,9	1,2

2.2.5. Especificidade/ Seletividade

Para avaliar a especificidade (seletividade) do método foram feitas extrações de três amostras brancas de amendoim e compararam-se os espectros obtidos com o espectro de uma amostra fortificada com solução padrão de aflatoxinas totais (Figura 17). A concentração de aflatoxinas na amostra de amendoim foi de $20 \mu\text{g. kg}^{-1}$. Foi observada a ausência de sinais de interferentes na região do espectro onde as aflatoxinas fluorescem, constatando-se que o método é seletivo.

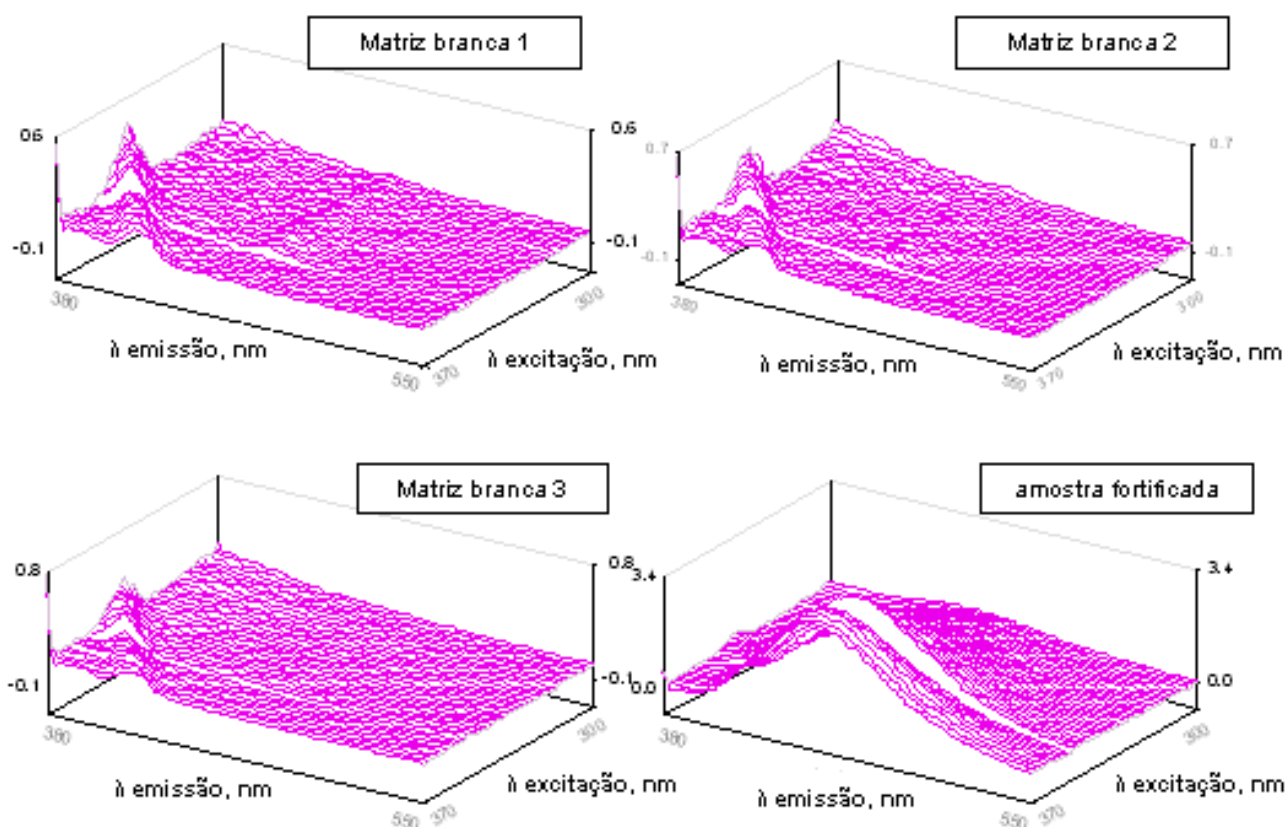


Figura 17: Avaliação da seletividade por comparação da superfície de excitação-emissão (λ excitação – 300 - 370 nm e λ emissão – 380 - 550 nm) entre matrizes brancas e fortificada com aflatoxinas na concentração de $20 \mu\text{g. kg}^{-1}$.

2.2.6. Robustez

A robustez foi estimada variando-se algumas etapas da metodologia de extração. Foram atribuídos, como parâmetros de avaliação, o percentual de recuperação e o desvio padrão relativo (DPR) das determinações.

A primeira extração (condição 1) foi realizada da maneira padrão, sem alterar nenhuma etapa, e os resultados obtidos ficaram dentro do previsto. Na segunda

extração (condição 2), a agitação do extrato foi feita manualmente, sem o agitador mecânico. Nesta extração, o resultado da recuperação não foi satisfatório, ficando a maioria dos valores encontrados fora do limite estabelecido de 70 a 120%. Na terceira extração (condição 3), optou-se por modificar o tempo da última filtração para a etapa de separação dos analitos na coluna de imunoafinidade, esta foi realizada no dia posterior. Os resultados da terceira extração foram satisfatórios, porém nota-se que há um decaimento no percentual de recuperação do analito, indicando que há perdas durante o repouso, devido a falta de estabilidade neste meio, mesmo o extrato sendo acondicionado sob refrigeração. Nas três condições de extração, o DPR não excedeu o limite calculado no item 3.1.5.3 de 45,3% usando seis réplicas autênticas. Os valores de recuperação são mostrados na Tabela 7:

Tabela 7: Valores determinados para exatidão e recuperação em três condições distintas.

Condição	Concentração (µg/kg)	Valores de recuperação (%)	Intervalo de variação aceitável (%)	Valores de DPR (%)
1	20	91,8 - 108,3	70 - 120	6,2
2	20	66,9 - 79,7	70 - 120	6,9
3	20	84,7 - 93,6	70 - 120	4,1

2.3. Considerações finais

Para a determinação espectrofluorimétrica de aflatoxinas em amendoim devem ser utilizados comprimentos de onda de excitação e emissão, de 362 nm e 430 nm, respectivamente. A adição do reagente derivatizante aumenta o sinal analítico proporcionalmente para concentrações do analito. A metodologia possui linearidade entre as concentrações estudadas e neste trabalho foi de 10 -100 ng. mL⁻¹. A matriz amendoim não interfere nas análises espectrofluorimétricas das aflatoxinas. Para um intervalo de confiança de 95,0%, foi estabelecido um limite de detecção do método de 1,7 e um limite de quantificação de 2,5 µg de aflatoxinas totais/kg de amendoim, respectivamente. As determinações realizadas por esta metodologia apresentaram parâmetros de exatidão e precisão dentro dos limites estabelecidos, porém esta não se mostrou robusta quando alterada a forma de

agitação do extrato de amendoim com solvente, devido ao fato da recuperação do analito ter se apresentado na maior parte fora do limite de 70 a 120%. A planilha eletrônica, disponibilizada gratuitamente no endereço eletrônico <http://lqta.iqm.unicamp.br>, mostrou-se uma ótima ferramenta a estimação dos parâmetros de mérito para a implantação desta metodologia, em virtude dos cálculos envolvidos para estimar os limites de detecção, quantificação e teste de linearidade utilizando as informações da curva de calibração não serem triviais, já que são baseadas em critérios estatísticos mais rígidos.

Há inúmeros trabalhos referentes a análise de aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂, porém os que utilizam o amendoim como matriz, se restringem a metodologias como CLAE-F e CCD. A técnica de CLAE-F não pode ser comparada com espectrofluorimetria e a CCD, pois, detecta e quantifica cada aflatoxina separadamente, ou seja, a análise não é feita pelo somatório das mesmas.

Neste estudo de determinação das aflatoxinas pela técnica espectrofluorimétrica, foi observado que os resultados obtidos para os limites de detecção e quantificação estão menores do que os encontrados com a CCD, que é a técnica mais utilizada pelos laboratórios na análise destas toxinas em amendoim. MARTINS *et al.* (2008), fazendo estudos em amostras de amendoim e paçoca, e analisando as mesmas aflatoxinas através da cromatografia em camada fina, obtiveram em seus ensaios, limites de detecção e quantificação de 5 µg. kg⁻¹ e 8 µg. kg⁻¹, respectivamente. Os resultados encontrados nos estudos com a CCD estão abaixo LMT de 20 µg. kg⁻¹, porém com a espectrofluorimetria foi possível obter valores de LD (1,7 µg.kg⁻¹) e LQ (2,5 µg.kg⁻¹) que equivalem a quase um terço dos limites apresentados com a cromatografia de camada fina, demonstrando ser uma técnica com uma melhor sensibilidade para a determinação destas aflatoxinas.

3. ESTUDO DE CASO: DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DAS AFLATOXINAS POR ESPECTROFLUORIMETRIA ACOPLADO COM PARAFAC

Este estudo de caso visa avaliar a eficiência de um método quimiométrico de calibração multivariada de 2ª ordem, fazendo-se a separação e determinação das aflatoxinas a partir das superfícies de excitação-emissão fluorescente usando a análise de fatores paralelos (PARAFAC).

3.1. Materiais e métodos

3.1.1. Materiais

3.1.1.1. Equipamentos e materiais

- Espectrofluorímetro – Modelo Panorama Fluorat-02 (Lumex, Rússia);
- Micropipetas de volume variável de 10 – 1000 µl (Eppendorf, USA);
- Cubetas de quartzo de 1 cm;

3.1.1.2. Reagentes

- Padrão de aflatoxinas (B₁, B₂, G₁, G₂) com pureza ≥ 98% (Sigma-Aldrich)
- Solução de bromo 0,03 %v/v (Biovet);
- Metanol, grau CLAE (Merck, Alemanha) com densidade = 0,792g.mL⁻¹;

3.1.1.3. Solução reagente

Solução de bromo 0,003 % v/v

3.1.1.4. Preparo das soluções padrão de aflatoxinas

Solução estoque de aflatoxinas: B₁, B₂, G₁ e G₂ 10 µg. mL⁻¹ em acetonitrila (grau CLAE). Posteriormente, foram feitas diluições para a preparação das soluções de trabalho usando metanol como diluente.

3.1.2. Avaliação preliminar

Inicialmente feita uma avaliação prévia do perfil espectral das quatro aflatoxinas nas mesmas concentrações (40 ng. mL^{-1}). Observa-se que entre as mesmas, as aflatoxinas B_1 , B_2 e G_2 possuem uma intensidade de emissão superior a G_1 . As intensidades de máximas de fluorescência foram 8, 15, 4 e 10 para B_1 , B_2 , G_1 e G_2 , respectivamente, conforme mostra a Figura 18.

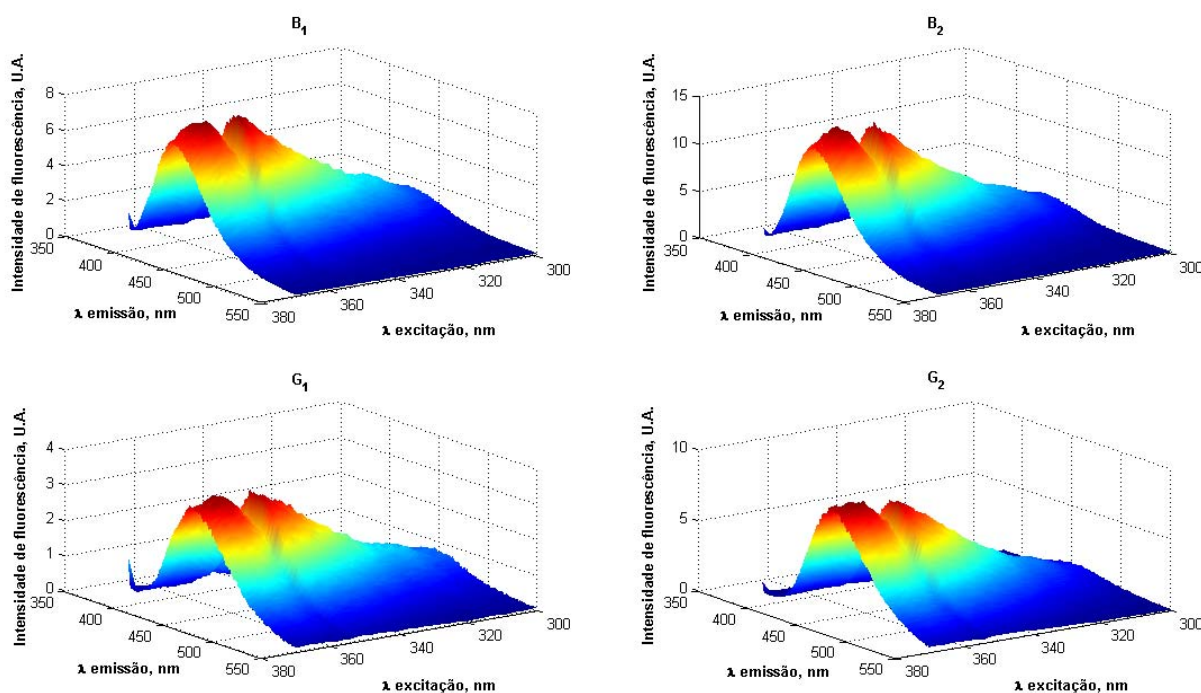


Figura 18: Gráficos de superfície das aflatoxinas B_1 , B_2 , G_1 e G_2 .

Em fluorescência molecular é comum aparecerem problemas de sobreposição espectral, como é o caso das aflatoxinas. Os quatro analitos estudados, neste trabalho, possuem espectros semelhantes que se sobrepõem, o que dificulta a separação e quantificação dos mesmos (Figura 19).

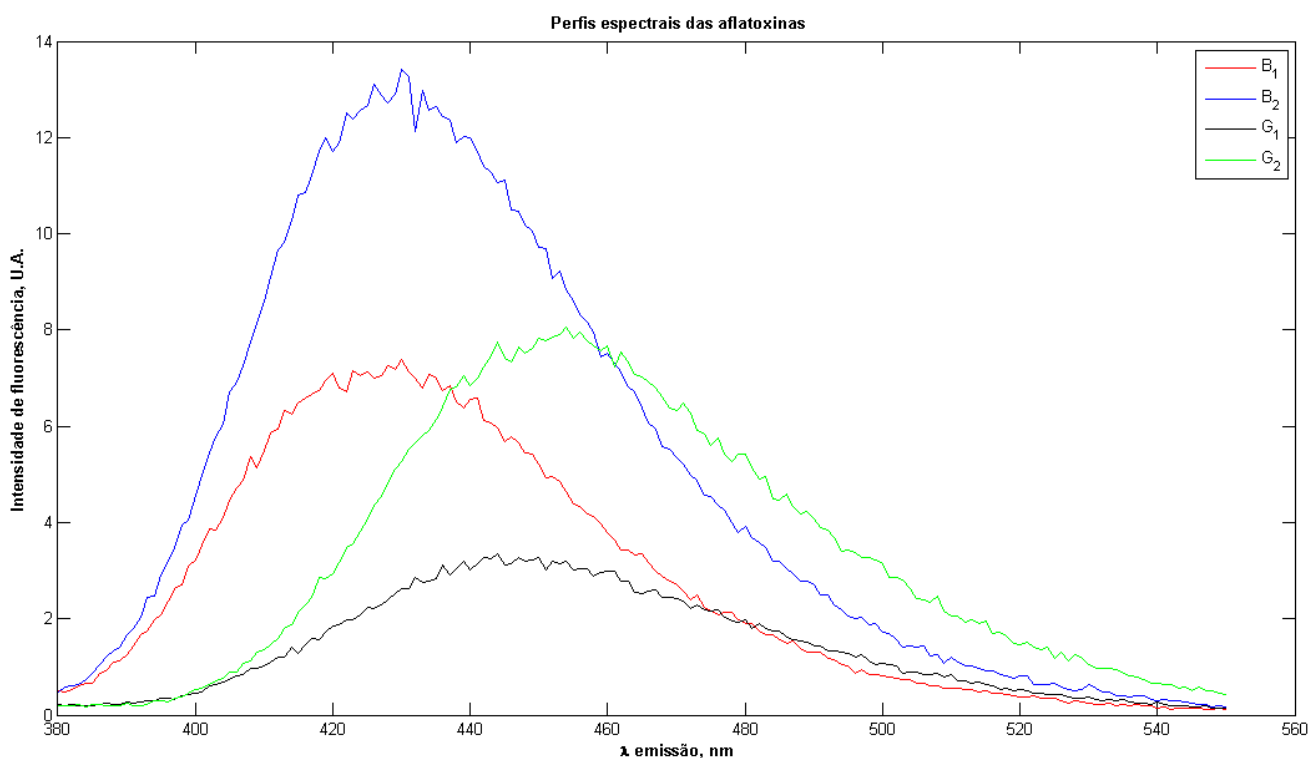


Figura 19: Sobreposição dos espectros de emissão fluorescente das aflatoxinas (B₁, B₂, G₁ e G₂) na concentração de 40 ng. mL⁻¹.

3.2. Resultados e discussão

3.2.1. Determinação simultânea das aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂

Após a avaliação prévia para o desenvolvimento da metodologia analítica foi realizada a montagem de um planejamento fatorial completo (2⁴) com um ponto central, onde foram preparadas amostras com soluções padrão em três níveis de concentrações (20, 30 e 40 ng. mL⁻¹) para cada aflatoxina (B₁, B₂, G₁ e G₂), mais a solução do branco (metanol). Também foram preparadas misturas quaternárias destes analitos, conforme explicitado na Tabela 8:

Tabela 8: Concentrações das soluções de aflatoxinas (ng. mL^{-1}), do planejamento fatorial completo (2^4) com ponto central.

Solução	B ₁	B ₂	G ₁	G ₂	B ₁	B ₂	G ₁	G ₂
	Valores codificados				Valores normais			
1	- 1	- 1	- 1	- 1	20	20	20	20
2	+ 1	- 1	- 1	- 1	40	20	20	20
3	- 1	+ 1	- 1	- 1	20	40	20	20
4	+ 1	+ 1	- 1	- 1	40	40	20	20
5	- 1	- 1	+ 1	- 1	20	20	40	20
6	+ 1	- 1	+ 1	- 1	40	20	40	20
7	- 1	+ 1	+ 1	- 1	20	40	40	20
8	+ 1	+ 1	+ 1	- 1	40	40	40	20
9	- 1	- 1	- 1	+ 1	20	20	20	40
10	+ 1	- 1	- 1	+ 1	40	20	20	40
11	- 1	+ 1	- 1	+ 1	20	40	20	40
12	+ 1	+ 1	- 1	+ 1	40	40	20	40
13	- 1	- 1	+ 1	+ 1	20	20	40	40
14	+ 1	- 1	+ 1	+ 1	40	20	40	40
15	- 1	+ 1	+ 1	+ 1	20	40	40	40
16	+ 1	+ 1	+ 1	+ 1	40	40	40	40
17	0	0	0	0	30	30	30	30
18	0	0	0	0	30	30	30	30
19	0	0	0	0	30	30	30	30

Foram obtidas as superfícies de excitação-emissão de fluorescência molecular utilizando-se comprimentos de onda de excitação, variando-se de 300 nm a 370 nm com intervalos de 2 nm, e para o comprimento de onda de emissão, selecionou-se a faixa de 380 nm a 550 nm, com intervalo de 1 nm. Um tensor de dados \mathbf{X} de tamanho 32 x 36 x 171 (amostras x $\lambda_{\text{excitação}}$ x $\lambda_{\text{emissão}}$), foi gerado, o qual, continha 32 amostras, das quais uma é a solução branco, três amostras de soluções-padrão de cada aflatoxina utilizadas para a calibração (12 soluções) e 19

soluções de misturas quaternárias, onde cada amostra é uma matriz de tamanho 36 x 171.

Primeiramente, obteve-se a superfície de excitação-emissão da solução branco (metanol) empregado para fazer as soluções, a fim de visualizar a contribuição desse componente. A Figura 20 mostra a superfície excitação-emissão do solvente.

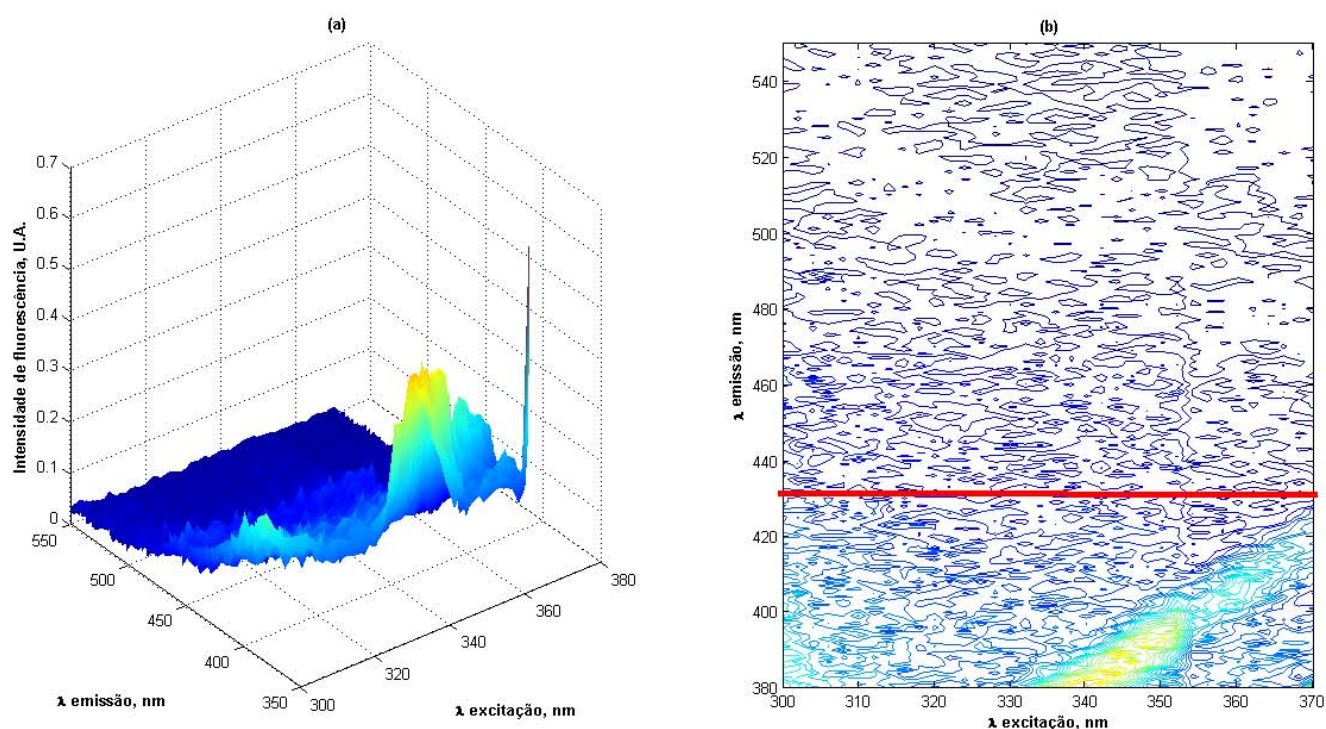


Figura 20: Superfície excitação-emissão (a) e mapa de contorno (b) do solvente, mostrando ainda o espalhamento da radiação eletromagnética.

O procedimento foi repetido para as demais soluções, o que levou a remoção de parte do espectro devido ao espalhamento da radiação eletromagnética. Foi, desse modo, removida a região de emissão compreendendo o intervalo de 380 nm a 424 nm, caracterizada pela área abaixo na linha vermelha, ilustrada na Figura 20 (b), pelo gráfico do mapa de contorno. Na Figura 21 (a) são mostradas as superfícies de excitação-emissão para uma mistura quaternária das aflatoxinas e na figura 21 (b), a mesma análise realizada já com a região de espalhamento removida, onde a concentração de cada aflatoxina foi de 30 ng. mL⁻¹.

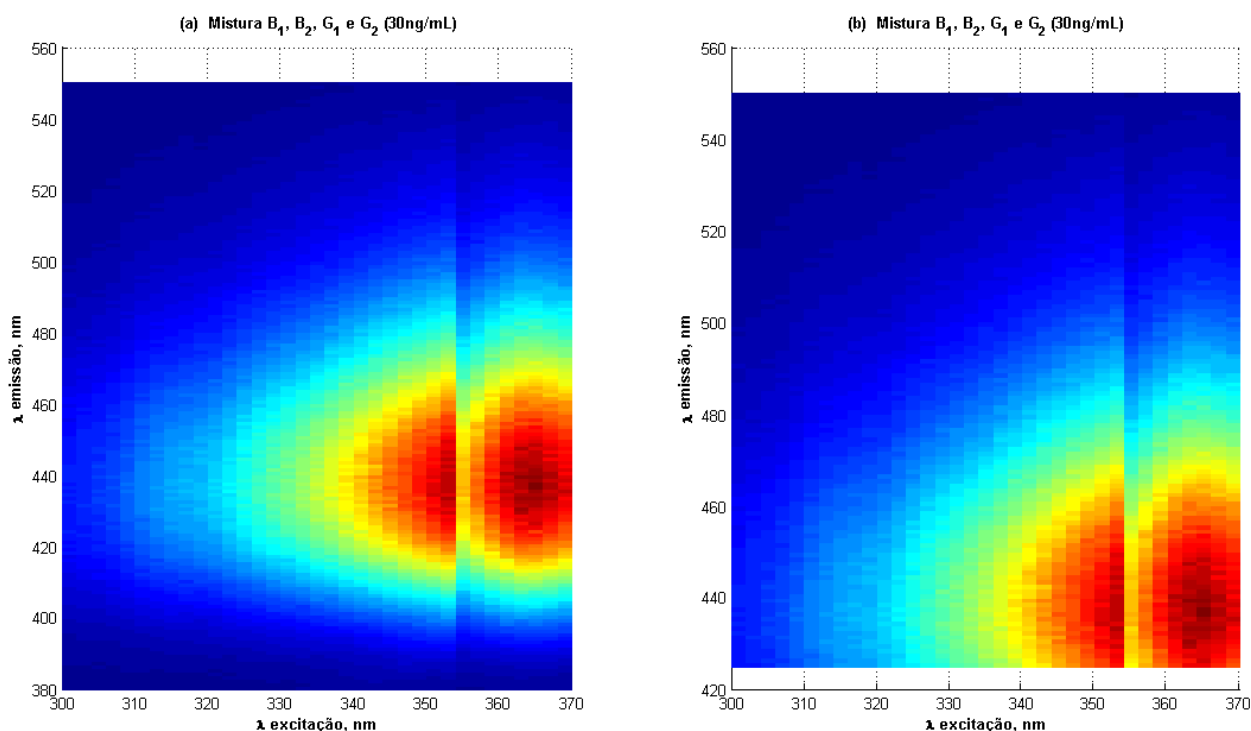


Figura 21: Mapa de contorno excitação-emissão da mistura quaternária, (a) dados originais (b) após a remoção do espalhamento.

Após a remoção da região com espalhamento, o tensor de dados \underline{X} assumiu as seguintes dimensões: 32 x 36 x 126. Os dados foram suavizados aplicando-se o método de alisamento Savitzky-Golay, utilizando-se o programa do Matlab PLS *toolbox*.

Para a análise dos fatores paralelos (PARAFAC), colocou-se como restrição a não-negatividade para as intensidades dos sinais dos analitos. A escolha otimizada do número de fatores utilizados pelo PARAFAC, foi feita através da variância explicada pelo modelo, empregando-se o teste da consistência trilinear do núcleo (CORCONDIA). Sabe-se que o sistema estudado possui quatro analitos (fluoróforos) presentes; porém nem todos os espectros dos componentes do PARAFAC foram identificados pelas normas do vetor. A aflatoxina G₂ foi identificada pela norma como o 2º componente do PARAFAC, porém as aflatoxinas B₁ e B₂ não são distinguidas pelo modelo e a norma da aflatoxina G₁ não coincidiu com nenhum dos componentes. Seus perfis espectrais normalizados, com as regiões de espalhamento removidas podem ser vistos na Figura 22:

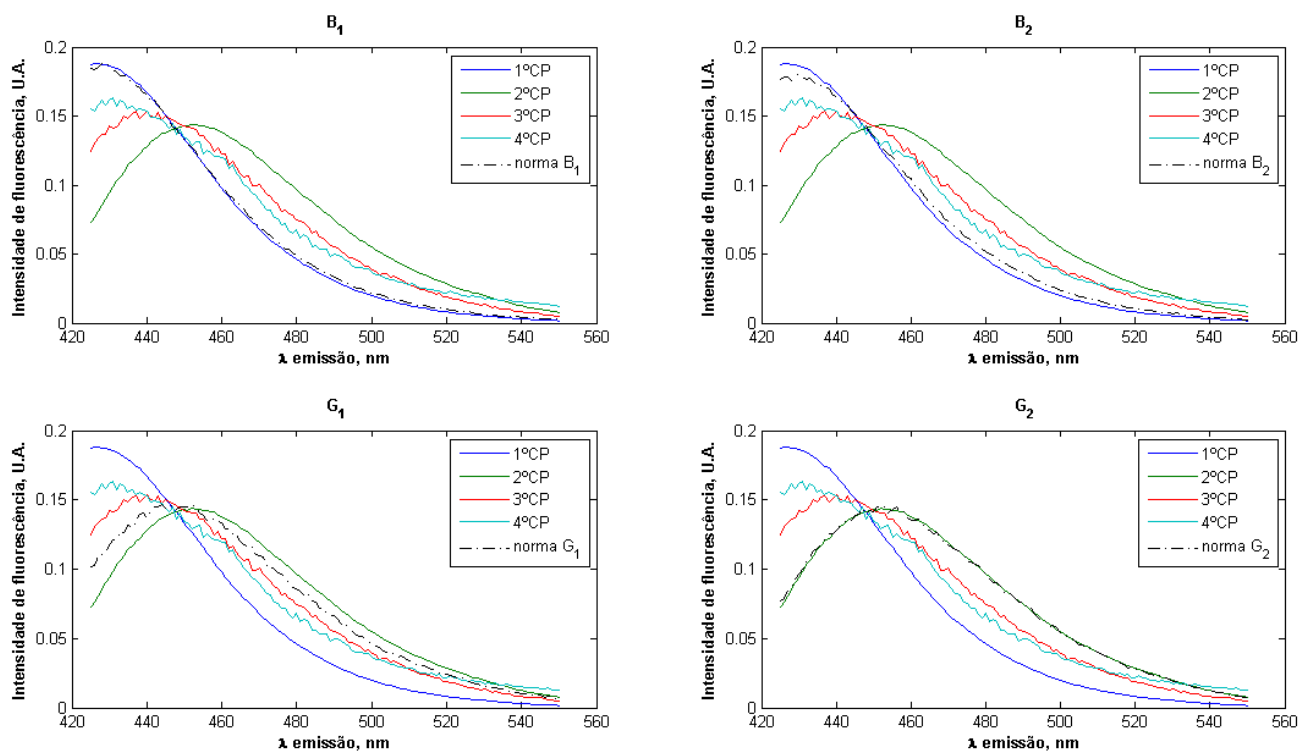


Figura 22: Perfis espectrais dos componentes do PARAFAC com as normas das aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂.

A Tabela 9 e a Figura 23 mostram os resultados encontrados para a concordância entre o número de fatores (analitos), a consistência da trilinearidade do núcleo (CORCONDIA) e as suas variâncias explicadas, parâmetros que indicarão a possibilidade de deconvolução destes espectros pelo PARAFAC:

Tabela 9: Parâmetros do modelo PARAFAC.

Fatores	CORCONDIA	Variância (%)
5	0	99,99
4	0	99,99
3	16	99,99
2	96	99,97

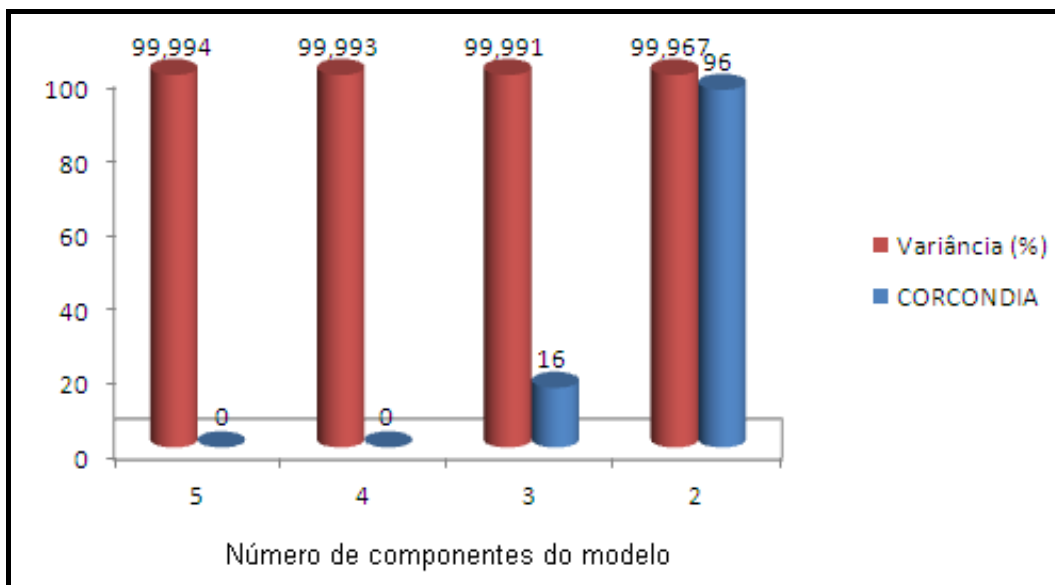


Figura 23: Parâmetros do PARAFAC mostrando o CORCONDIA e a variância explicada para cada modelo.

A análise desses resultados indica que o PARAFAC é capaz de modelar os dados no sistema para somente dois componentes, pois o CORCONDIA foi igual a 96. Conseqüentemente, mesmo com o emprego desse método quimiométrico não foi possível estabelecer uma metodologia para a quantificação dos quatro analitos presentes nas misturas originais.

Utilizando-se da observação feita na Figura 18, na qual foi mostrado que as aflatoxinas B₁, B₂ e G₂ apresentam uma intensidade de sinal de emissão superior a G₁ e os resultados das análises com o PARAFAC, optou-se pela proposta de se desenvolver uma metodologia para a quantificação simultânea das aflatoxinas B₂ e G₂, mencionadas anteriormente, empregando-se a espectrofluorescência combinada com o PARAFAC.

3.2.2. Determinação simultânea das aflatoxinas B₂ e G₂

Para esta etapa do trabalho foi feito um outro planejamento e um novo conjunto de calibração foi testado. Para a análise com o PARAFAC, foi utilizado um tensor contendo 29 amostras (calibração e validação). O conjunto de calibração contém 18 amostras: 3 soluções do branco (solvente), 5 soluções padrão para cada aflatoxina, nas concentrações de 10, 20, 30, 40 e 50 ng. mL⁻¹, além de 5 misturas binárias das aflatoxinas B₂ e G₂. O conjunto de validação possui 11 amostras de

misturas binárias de aflatoxinas B₂ e G₂, cujas concentrações foram obtidas a partir de um planejamento composto central (2²) com pontos axiais e um ponto central, com o intuito de avaliar o erro experimental do método (NETO *et al.*, 2002). As concentrações das aflatoxinas utilizadas nestes conjuntos são mostradas nas Tabelas 10 e 11.

Tabela 10: Concentrações das aflatoxinas (ng. mL⁻¹) do conjunto de calibração.

Solução	B ₂	G ₂	Solução	B ₂	G ₂
1	0	0	10	0	20
2	0	0	11	0	30
3	0	0	12	0	40
4	10	0	13	0	50
5	20	0	14	10	40
6	30	0	15	20	30
7	40	0	16	30	20
8	50	0	17	40	10
9	0	10	18	25	25

Tabela 11: Concentrações das aflatoxinas (ng. mL⁻¹) do conjunto de validação.

Solução	B ₂	G ₂	B ₂	G ₂
	Valores codificados		Valores normais	
19	- 1	- 1	20	20
20	+ 1	- 1	40	20
21	- 1	+ 1	20	40
22	+ 1	+ 1	40	40
23	0	0	30	30
24	0	0	30	30
25	0	0	30	30
26	- 1,4	0	16	30
27	+ 1,4	0	44	30
28	0	- 1,4	30	16
29	0	+ 1,4	30	44

Para estas análises manteve-se os comprimentos de onda de excitação de 300 à 370 nm (com intervalo de 2 nm) e os comprimentos de onda de emissão de 380 à 550 nm (com intervalo de 1 nm). Inicialmente o tensor apresentou as seguintes dimensões: 29 x 36 x 171, mas assim como no item 7.1, foram identificadas as regiões de espalhamento de radiação eletromagnética e estas foram removidas dos espectros de emissão de todas as amostras. Nesse caso, foi removida a região do espectro de emissão compreendida entre 380 nm e 426 nm. Com isso o tensor de dados passou a ter uma dimensão de 29 x 36 x 124. Após essa remoção, os espectros foram suavizados pelo método Savitzky-Golay.

Aplicando-se o PARAFAC foi possível obter os parâmetros para as amostras do sistema em estudo, dados pela concordância entre o número de analitos presentes e aquele fornecido pelo CORCONDIA. Foi também obtido a variância explicada para cada modelo. Para a aplicação do PARAFAC, foi selecionada a restrição de não-negatividade. A Tabela 12 e a Figura 24 mostram os resultados encontrados:

Tabela 12: Parâmetros do modelo PARAFAC.

Fatores	CORCONDIA	Variância (%)
5	< 0	99,99
4	< 0	99,99
3	< 0	99,99
2	97	99,94

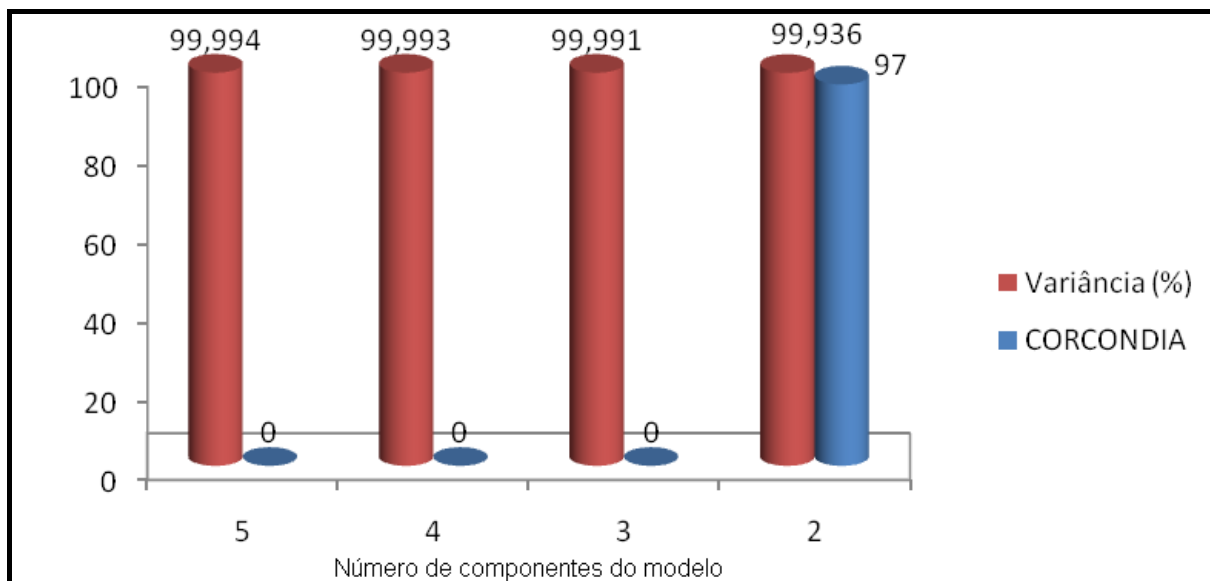


Figura 24: Parâmetros do PARAFAC mostrando o CORCONDIA e a variância explicada para cada modelo.

Esta análise inicial feita com o PARAFAC mostra que o número de fatores está de acordo com o número de analitos presentes, assim como o teste de consistência da trilinearidade do núcleo (CORCONDIA).

Ao se analisar os *loadings* dos perfis espectrais de emissão e as suas respectivas normas, pode-se considerar que o PARAFAC consegue modelar perfeitamente os perfis espectrais de emissão das aflatoxinas B₂ e G₂, mesmo na região onde há grande sobreposição espectral, como mostra a Figura 25:

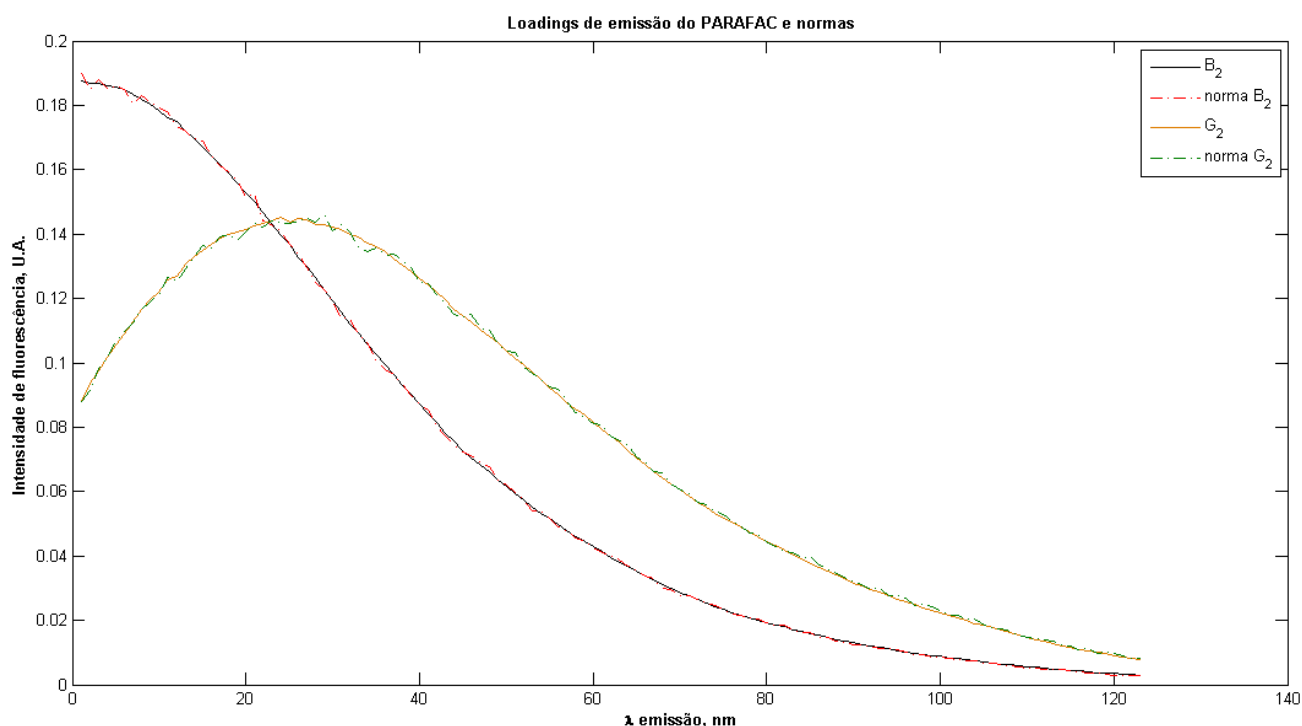


Figura 25: Perfis espectrais de emissão das aflatoxinas B₂ e G₂ modelados pelo PARAFAC e as suas respectivas normas.

Posteriormente, foi feita uma regressão pseudo-univariada relacionando-se os escores fornecidos pelo PARAFAC e as concentrações dos analitos. Em seguida, foram calculados os erros relativos das concentrações de cada aflatoxina, de acordo com a Equação 4.1:

$$E(\%) = \left(\frac{c_{est} - c}{c} \right) \times 100$$

Eq. 4.1

onde E% é o erro relativo, c_{est} é a concentração estimada e c é a concentração de referência da amostra.

As Tabelas 13 mostra os valores aproximados de c e de c_{est} (em ng. mL⁻¹) e de E(%) para as aflatoxinas B₂ e G₂, respectivamente.

Tabela 13: Concentrações de referência, concentrações estimadas e os erros relativos (%) para as aflatoxinas B₂ e G₂.

Solução	B ₂			G ₂		
	C	C _{est}	E (%)	c	C _{est}	E (%)
1	0	0,30	-	0	0	-
2	0	0,32	-	0	0	-
3	0	0,32	-	0	0	-
4	10	11	10,0	0	0	-
5	20	15	-25,0	0	0	-
6	30	24	-20,0	0	0	-
7	40	42	5,0	0	0	-
8	50	50	0,0	0	0	-
9	0	0,45	-	10	9	-10,0
10	0	1,47	-	20	17	-15,0
11	0	0,42	-	30	29	-3,3
12	0	0,25	-	40	40	0,0
13	0	0,06	-	50	43	-14,0
14	10	8	-20,0	40	39	-2,5
15	20	22	10,0	30	32	6,7
16	30	34	13,0	20	22	10,0
17	40	37	-7,5	10	8	-20,0
18	25	22	-12,0	25	21	-16,0
19	20	20	0,0	20	20	0,0
20	40	38	-5,0	20	21	5,0
21	20	22	10,0	40	43	7,5
22	40	41	2,5	40	42	5,0
23	30	29	-3,3	30	30	0,0
24	30	31	3,3	30	32	6,7
25	30	33	10,0	30	33	10,0
26	16	17	6,7	30	29	-3,3
27	44	44	0,0	30	31	3,3
28	30	32	6,7	16	17	6,7
29	30	31	3,3	44	49	11,4

O PARAFAC apresentou um bom desempenho para a quantificação das aflatoxinas B₂ e G₂, que pode ser evidenciado pelos resultados dos erros relativos das concentrações. No conjunto de validação, a aflatoxina B₂ apresentou um erro relativo entre -25,0 a 13,0% e para a aflatoxina G₂ o erro relativo obtido variou entre -20,0 e 11,4%. Os valores dos erros relativos encontram-se compatíveis com os níveis de concentração investigados (ng. mL⁻¹). Deve-se ressaltar que, a diferença entre as intensidades de fluorescência relativas a cada analito e a existência de uma região de sobreposição espectral, não reduziu a seletividade, mostrando que o método é eficiente. Os parâmetros de mérito obtidos com o PARAFAC são apresentados na Tabela 14:

Tabela 14: Parâmetros de mérito calculados com o PARAFAC para as aflatoxinas B₂ e G₂.

Parâmetros de mérito	B ₂	G ₂
SEN (FU mL. ng ⁻¹)	2,34	1,73
LD (μg. kg ⁻¹)	0,18	0,23
LQ (μg. kg ⁻¹)	0,53	0,71

Obs. FU = unidade arbitrária de intensidade de fluorescência.

Avaliando-se a faixa de trabalho neste estudo, de 10 a 50 ng. mL⁻¹, com os resultados apresentados para a sensibilidade, limite de detecção e limite de quantificação, chega-se a conclusão que a metodologia é adequada para a determinação simultânea das aflatoxinas B₂ e G₂. Os limites de detecção e quantificação ficaram abaixo do LMT de 20 μg. kg⁻¹, para o somatório das aflatoxinas como previsto na legislação. Os valores de sensibilidade obtidos mostraram-se adequados e corroboram os perfis espectrais obtidos na Figura 25, devido a diferença entre as intensidades de fluorescência.

3.3. Considerações finais

Inicialmente neste estudo de caso, houve a tentativa de fazer a determinação simultânea das quatro aflatoxinas (B_1 , B_2 , G_1 e G_2) utilizando a espectrofluorescência acoplado com o PARAFAC, porém este se mostrou ineficaz para quantificar os quatro analitos. Isto foi observado pelo $CONCORDIA = 0$, quando colocado quatro fatores para modelar os dados do sistema. Contudo, o $CORCONDIA$ para dois fatores apresentou um valor igual a 96, predizendo que seria possível modelar os dados de um sistema que tivesse dois analitos, sendo assim o estudo continuou selecionando-se as aflatoxinas B_2 e G_2 .

Para a determinação destas duas aflatoxinas foi possível obter excelentes resultados com o PARAFAC, que apresentou um $CORCONDIA$ igual a 96 e baixos erros relativos, mesmo havendo uma intensa sobreposição espectral da aflatoxina B_2 sobre a G_2 . Os parâmetros de mérito (SEN, LD e LQ) obtidos com esta técnica também foram satisfatórios.

Em um estudo recente, fazendo a comparação com outra técnica, REN *et al.* (2010), realizou determinações simultâneas nas mesmas aflatoxinas, B_1 , B_2 , G_1 , G_2 em amostras de amendoim e seus derivados por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massa (CLAE-EM), fazendo a identificação e quantificação destas aflatoxinas em baixíssimos níveis. Neste caso a metodologia apresentou para a aflatoxina B_2 limites de detecção e quantificação de 0,056 e 0,084 $\mu\text{g. kg}^{-1}$, respectivamente, e com a aflatoxina G_2 foram obtidos limites de detecção de 0,212 $\mu\text{g. kg}^{-1}$ e quantificação de 0,273 $\mu\text{g. kg}^{-1}$. A elevada seletividade e sensibilidade dos métodos de detecção por espectrometria de massa associado com a resolução da CLAE, proporciona vantagens decisivas para uma visão qualitativa, bem como a análise quantitativa de uma ampla gama de moléculas em quantidades vestigiais em alimentos. Contudo, utilizando a técnica de espectrofluorescência acoplada com o PARAFAC foi possível atingir limites de detecção e quantificação similares ao da CLAE-EM, onde se determinou um LD de 0,18 $\mu\text{g. kg}^{-1}$ e um LQ de 0,53 $\mu\text{g. kg}^{-1}$ para a aflatoxina B_2 e um LD de 0,23 $\mu\text{g. kg}^{-1}$ e um LQ de 0,71 $\mu\text{g. kg}^{-1}$ para a aflatoxina G_2 . Os limites de detecção obtidos para a AFG_2 com as duas técnicas são praticamente idênticos, chegando-se a conclusão de que com o emprego da espectrofluorescência utilizando o PARAFAC podemos alcançar resultados promissores de maneira rápida, eficaz e a baixo custo.

4 CONCLUSÕES E SUGESTÕES FUTURAS

4.1. Conclusões

Este trabalho apresentou propostas de metodologias desenvolvidas para a análise de aflatoxinas utilizando a espectroscopia de fluorescência molecular.

O primeiro estudo de caso avaliou uma metodologia alternativa para a determinação total de aflatoxinas em amendoim, visando o atendimento da legislação brasileira. A determinação do total de aflatoxinas foi feita através da construção de uma curva de calibração utilizando o extrato de amendoim. O extrato de amendoim passou por etapas de filtração e purificação em coluna de imunoafinidade, minimizando a ação de possíveis interferentes. Embora existam métodos com limites de detecção mais baixos, como CCD, CLAE acoplada a espectrometria de massas, CLAE-F e ELISA, a metodologia apresenta uma faixa de trabalho em níveis aceitáveis, mostrando-se aplicável para estudos que envolvam análises de aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂ neste tipo de matriz.

No segundo estudo foi proposto o desenvolvimento de um método para a determinação simultânea das aflatoxinas B₂ e G₂ por espectrofluorimetria, combinado com a análise dos fatores paralelos (PARAFAC) e a utilização de planejamentos experimentais. O método proposto tem caráter promissor, pois isenta a necessidade de separações cromatográficas, como é feito tradicionalmente em análises de aflatoxinas ou etapas de elaboração. E, pelo desempenho apresentado poderá obter bons resultados se for validado por um método paralelo. Além disso, o procedimento apresenta-se rápido e com possibilidade de resposta instantânea, podendo vir a ser de relevante aplicação em laboratórios que fazem o monitoramento destas aflatoxinas em alimentos.

Os resultados obtidos no presente trabalho mostraram a eficiência da utilização conjunta do método quimiométrico de ordem superior e fluorescência molecular de excitação-emissão, com a obtenção de bons resultados em determinações quantitativas dos analitos.

4.2. Sugestões futuras

- Realização de análises baseadas nestas metodologias em amostras de amendoim de diferentes fontes, podendo também atuar como indicativo da necessidade de monitoramento programado.
- Efetuar a validação destes métodos através da comparação de resultados obtidos com uma metodologia consolidada, como a CLAE-F.
- Empregar outros tipos de ferramentas quimiométricas, como MCR-ALS, no sentido de comparar o desempenho entre diferentes métodos de calibração multivariada.
- Verificar a aplicação destas metodologias em outras matrizes alimentícias como milho (aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂) e leite (aflatoxina M₁).

REFERÊNCIAS

ALTRIA, K. D.; FILBEY, S.D. *The application of experimental design to the robustness testing of a method for the determination of drug-related impurities by capillary electrophoresis*. *Chromatographia*, n.39, p. 306-310, 1994.

AMARAL, K. A. S. *et al.* *Aflatoxinas em produtos à base de milho comercializados no Brasil e riscos para a saúde humana*. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 26, n. 2, p. 336-342, 2006.

AOAC (Association of Official Analytical Chemists International). *Sampling for aflatoxins – preparation for sample procedure*. *Natural Toxins*, Cap. 49.2.01, p. 2, 2005.

BARROS NETO, B.; PIMENTEL, M. F.; ARAÚJO, M. C. U. *Recomendações para calibração em química analítica - parte I. Fundamentos e calibração com um componente (calibração univariada)*. *Química Nova*, v. 25, n. 5, p. 856-865, 2002.

BENNETT, J.; KLICH, M. *Mycotoxins*. *Clinical Microbiology Review*, v. 16, n. 3, p. 497-516, 2003.

BOOKSH, K. S.; KOWALSKI, B. R. *Theory of analytical chemistry*. *Analytical Chemistry*, v. 66, p. 782A-791A, 1994.

BOX, G. E. P.; HUNTER, J. S.; HUNTER, W. G. *Statistics for Experimenters, Design, Innovation and Discovery*. Ed. John Wiley & Sons, USA, 2 ed., 46 p., 2005.

BRAGA, J. W. B.; POPPI, R. J. *Validação de modelos de calibração multivariada: uma aplicação na determinação de pureza polimórfica de carbamazepina por espectroscopia no infravermelho próximo*. *Química Nova*, v. 27, n. 6, p. 1004-1011, 2004.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Guia de validação para métodos analíticos e bioanalíticos. Resolução nº 899, de 29 de maio de 2003*. Diário Oficial [da] União, Brasília, DF, 02 de jun. 2003 (a). Seção 1, p. 56-59.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Regulamento técnico Mercosul, sobre limites máximos de aflatoxinas admissíveis no leite, no amendoim, no milho. Resolução RDC nº 274, de 15 de outubro de 2002*, Diário Oficial da União, Brasília, DF, 16 de out. de 2002. Seção 1, p. 45-46.

BRO, R. *Multi-way analysis in the in food industry: models, algorithms, and applications*. 1998, 290 f. Tese de doutorado - Royal Veterinary and Agricultural University, Denmark, 1998.

CALVO, A. M. *Mycotoxins*. In: Dabrowsky, W.; Sikorski, Z. *Toxins in Food*. CRC Press LLC, p. 215-237, 2005.

CARLSON, M. A. *et al.* *An automated, handheld biosensor for aflatoxin. Biosensors and bioelectronics.* Elsevier, Biosensors & Bioelectronics, v. 14, n. 10-11, p. 841-848, 2000.

CDTN (CENTRO DE DESENVOLVIMENTO DA TECNOLOGIA NUCLEAR). Comissão Nacional de Energia Nuclear, *PUBLICAÇÃO CDTN – 959 Calibração do fluorímetro – 10AU*, 20 p., 2006.

CEE (COMUNIDADE ECONÔMICA EUROPÉIA). *Decisão da comissão de 12 de agosto de 2002 dá execução ao disposto na Directiva 2002/657/CE do conselho relativamente ao desempenho de métodos analíticos e à interpretação de resultados.* Jornal Oficial das Comunidades Europeias, L. 221, p. 8-36, 2002.

CFR (CODE OF FEDERAL REGULATIONS), 21CFR211.194, 2011. Disponível em: <<http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?fr=211.194>>. Acesso em: 14 dez. 2011.

CHASIN, A. A. M. *et al.* *Validação de métodos em análises toxicológicas: uma abordagem geral.* Revista Brasileira de Toxicologia, v. 11, n. 1, p.1-6, 1998.
CIB (CONSELHO DE INFORMAÇÕES SOBRE BIOTECNOLOGIA). *Toxinas: Ingestão de aflatoxina pode causar câncer*, n.5, p. 4, 2004.

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

DANZER, K.; CURRIE, L. A. *Guidelines for Calibration in Analytical Chemistry.* Pure and Applied Chemistry, n. 70, p. 993, 1998.

DILKIN, P. *et al.* *Classificação macroscópica, identificação da microbiota fúngica e produção de alfa toxinas em híbridos de milho.* Ciência Rural, v. 30, n. 1, p. 137-141, 2000.

EMAN (EUROPEAN MYCOTOXIN AWARENESS NETWORK). *The aflatoxins.* Disponível em: <<http://193.132.193.215/eman2/fsheet2.asp>>. Acesso em: 01 nov. 2011.

ENGELN, S.; FROSCH, S.; JØRGENSEN, B. M. *A fully robust PARAFAC method for analyzing fluorescence data.* Journal of Chemometrics, v. 23, p. 124–131, 2009.

EURACHEM. *The Fitness for Purpose of Analytical Methods.* Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics, 1^a ed., p. 61, 1998.

FABRE, H. *Validation des méthodes d' électrophorese capillaire appliquées à l' analyse des composés pharmaceutiques.* Analysis, n. 27, p. 155-160, 1999.

FAO/WHO. *Evaluation of certain mycotoxins in food: fifty-sixth report of the Joint FAO/WHO. Expert Committee on Food Additives.* WHO-Technical-Report-Series, v. 3, n. 906, p. 62, 2001.

FERRÉ, J.; BROWN, S. D.; RIUS, X. *Improved calculation of the net analyte signal in inverse multivariate calibration*. Journal of Chemometrics, v.15, p. 537-553, 2001.

FONSECA, H. *O amendoim e a aflatoxina*. Boletim técnico N°13. Disponível em: <<http://www.micotoxinas.com.br/Boletim13.htm>>. Acesso em: 17 nov 2011.

FORINA, M.; LANTERI, S.; CASALE, M. *Multivariate calibration*. Journal of Chromatography A, v. 1158, p. 61-93, 2007.

FREIRE, F. C. O. *et al. Micotoxinas: Importância na alimentação e na saúde humana e animal*. Embrapa Agroindústria Tropical, 48 p., 2007.

FUJII, S.; GARCIA, L.B.; HIROOKA, E.Y. *Metodologia analítica imunoquímica com ênfase na detecção de micotoxinas – ficotoxinas no sistema agroalimentar*. Alimentos e Nutrição, v. 15, n. 3, p. 273-284, 2004.

GARDEN, S. R.; STRACHAN, J.J.C. *Novel colorimetric immunassay for the detection of aflatoxin B1*. Analytica Chimica Acta, v. 444, p. 187-191, 2001.

GOLDBLATT, L.A. *Mycotoxins - past, present and future*. Journal of the American Oil Chemists' Society, v. 54, p. 302-310, 1977.

HENRIQUES, C. A. *et al. A combinação da espectroscopia de fluorescência com análise dos fatores paralelos (PARAFAC) no estudo da estabilidade do iogurte*. XV Encontro Nacional de Química Analítica e III Congresso Ibero-americano de Química Analítica, Salvador, BA, 2009.

HURBER, L. *Good laboratory practice: a primer for high-performance liquid chromatography, capillary electrophoresis and UV-visible spectroscopy*. Hewlett Packard, USA, 138 p., 1993.

INGLE, J.D.; CROUCH, S. R. *Spectrochemical Analysis*. New Jersey: Prantice Hall, ed. 1, 1998.

INMETRO (INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA). *Orientação sobre Validação de Métodos Analíticos; DOQ-CGCRE-008*, revisão: 03, 20 p., 2010.

INMETRO (INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA). *Vocabulário Internacional de Metrologia: conceitos fundamentais e gerais e termos associados (VIM 2008)*. 1 ed., p. 78, 2009.

IUPAC (INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY). *Analytical Chemistry Division. Commission of chromatography and other analytical separations*. Pure and Applied Chemistry. N.65, p. 819-872, 1993.

JOSHUA, H. *Determination of Aflatoxins by Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography with Post-Column In-Line Photochemical Derivatization and Fluorescence Detection*. Journal of Chromatography, v. 654, p. 247-254, 1993.

KARNES, H. T.; SHIU, G.; SHAH, V. P. *Validation of bioanalytical methods*. Pharmaceutical Research, n. 8, p. 421-426, 1991.

KAWASHIMA, L. M.; SOARES, L. M. V. *Incidência de fumonisina B₁, aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂, ocratoxina A e zearalenona em produtos de milho*. Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas, v. 26, n. 3, p. 516-521, 2006.

KONDO, F. *Determination of microcystins in lake water using reusable immunoaffinity column*. Toxicon, v. 40, p. 893-899, 2002.

LAASONEN M. *et al. Development and validation of a near-infrared method for the quantitation of caffeine in intact single tablets*. Analytical Chemistry, v. 75, n. 4, p. 754-760, 2003.

LANÇAS, F.M. *Validação de métodos cromatográficos de análise*. São Paulo: RiMa, 62 p., 2004.

LIMA, I. C. A. *et al. Avaliação por métodos quimiométricos da determinação simultânea de HPAS em água por espectrofluorimetria*. XVIII Congresso Brasileiro de Engenharia Química (COBEQ), Fóz do Iguaçu, PR, 2010.

LORBER, A. *Error propagation and figures of merit for quantitation by solving matrix equations*. Analytical Chemistry, v. 58, p. 1167-1172, 1986.

MACHINSKI JUNIOR, M. *Aflatoxinas: Análise em Amendoim por Cromatografia em Camada Delgada*. Cap. 21, p. 196-199, 2006.

MANETTA, A. C. *Aflatoxins: Their Measure and Analysis*, Cap.6, p.94-108, 2011.

MARTENS, H., NAES, T. *Multivariate calibration by data compression*. In: WILLIAMS, P.; NORRIS, K. *Near infrared technology in the agricultural and food industries*. Ed. American Society of Cereal Chemist, p. 59-100, 1987.

MASSART, D. L. *et al. Chemometrics: a textbook*. Amsterdam: Elsevier, 2003.

MIDIO, A.; MARTINS, D. *Toxicologia de alimentos*. Ed. Varela, p. 62-78, 2000.

NBR ISO/IEC 17025. *Requisitos Gerais para a Competência de Laboratórios de Calibração e de Ensaios*. Associação Brasileira de Normas Técnicas, 31 p, 2005.

NOVAES, F. *Aulas de física: Transições segundo o modelo de Bohr – Espectro eletromagnético*. Aula 5, 3º ano, 2008.

NUNES, P. G. A. *Uma nova técnica para seleção de variáveis em calibração multivariada aplicada às espectrometrias UV-VIS e NIR*. 2008. 121 f. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2008.

OLIVEIRA, C. A. F.; 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, 1997.

OLIVIERI, A. C.; FABER, N. M. *A closed-form expression for computing the sensitivity in second-order bilinear calibration*. Journal of Chemometrics, v.19, p. 583-592, 2005.

OLIVIERI, A. C.; FABER, N. M. *Validation and error*. In: BROWN, S. D.; TAULER, R.; WALCZAK, B. Comprehensive Chemometrics – Chemical and Biochemical Data Analysis. Elsevier, v. 3, p. 91-120, 2009.

OLIVIERI, C. O. *et al. Uncertainty estimation and figures of merit for multivariate calibration*. Pure and Applied Chemistry, v. 78, 633 p, 2006.

OPAS (Organização Pan-Americana da Saúde). *Micotoxinas. Critérios de Saúde Ambiental*, 11. Whashington, p. 131, 2003.

PETTERSSON, H. *Controlling mycotoxins in animal feed*. In: MAGAN, N.; OLSEN, M. Mycotoxins in food: detection and control. Woodhead Publishing, p. 1-43, 2004.

PIZARRO, C. *et al. Influence of data pre-processing on the quantitative determination of the ash content and lipids in roasted coffee by near infrared spectroscopy*. Analytica Chimica Acta, v. 509, 217 p, 2004.

POP 65.3120.152-02. *Determinação de aflatoxina B₁, B₂, G₁ e G₂ por CLAE-F em amendoim cru com casca, descascado e torrado*. Procedimentos operacionais padrão do INCQS/FIOCRUZ, rev. 02, p. 17, 2011.

R-BIOPHARM RHÔNE LTD. *Manual de instrução da célula eletroquímica para derivatização de aflatoxinas - KOBRA[®] CELL*. 2004.

REIF, K.; METZGER, W. *Determination of aflatoxins in medical herbs and plant extracts*. Journal of Chromatography A, v. 692, p. 131-136, 1995.

REN, Y. *et al. Simultaneous determination of aflatoxins B₁, B₂, G₁, G₂, M₁ and M₂ in peanuts and their derivative products by ultra-high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry*. Analytica Chimica Acta, n. 662, p. 62–68, 2010.

RHÔNE DIAGNOSTICS TECHNOLOGIES LTA. *Manual de instrução da coluna de imunoafinidade AFLAPREP[®] para clean-up para análises de aflatoxinas para HPLC*. 2004b.

RIBEIRO, F. A. L. *et al. Planilha de validação: uma nova ferramenta para estimar figuras de mérito na validação de métodos analíticos univariados*. Química Nova, v. 31, p. 164, 2008.

SABINO, M. *Ocorrência e métodos analíticos para determinação de micotoxinas em grãos e rações*. Simpósio Internacional sobre Micotoxinas e Micotoxicoses em Aves, 1995, CURITIBA. Características gerais das micotoxinas e micotoxicoses. Campinas: FACTA, p. 35-37, 1995.

SAVITZKY, A.; GOLAY, M. J. E. *Smoothing and differentiation of data by simplified least squares procedures*. Analytical Chemistry, v. 36, n. 8, 1627 p, 1964.

SCOTT, P.M.; TRUCKSSES, M.W. *Application of immunoaffinity columns to mycotoxin analysis*. Journal of Association of Official Agricultural Chemists International, v. 80, n. 5, p. 941-949, 1997.

SENA, M.M.; TREVISAN, M. G.; POPPI, R. J. *PARAFAC: uma ferramenta quimiométrica para tratamento de dados multidimensionais. Aplicações na determinação direta de fármacos em plasma humano por espectrofluorimetria*. Química Nova, v. 28, n. 5, p. 910-920, 2005.

SILVA, A. P.; ALVES, M. C. C. *Como iniciar a validação de métodos analíticos*. São Paulo: ENQUALAB/REMESP, p. 8-15, 2006.

SKOOG, D.A. *et al. Fundamentos de química analítica*. São Paulo: Pioneira Thomson, 8 ed., 2010.

SOARES, L. M. V.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. *Survey of aflatoxins, ochratoxins, zearalenone and sterigmatocystin in some Brazilian foods by using multi-toxin thin-layer chromatographic method*. Journal of the Association of Official Analytical Chemists International, v. 72, n. 1, p. 22-26, 1989.

STROKA, J.; ANKLAM, E. *New strategies for the screening and determination of aflatoxins and the detection of aflatoxin-producing moulds in food and feed*. Trends in Analytical Chemistry, v. 21, n. 2, 2002.

SWARTZ, M. E.; KRULL, I. S. *Analytical method development and validation*. Ed. CRC Press, 96 p, 1997.

SYLOS, C.M.; RODRIGUEZ-AMAYA, D.; PINTO, C.A.P.A. *Comparison of immunoassay and minicolumn chromatography for the screening of aflatoxins in peanut and corn*. Revista Alimentos e Nutrição, v.7, p.7-14, 1996.

THOMPSON, M.; ELLISON, S. R.; WOOD, R. *Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis*. Pure and Applied Chemistry, v. 74, n. 5, p. 835-855, 2002.

TREVISAN, M. G. *Aplicação de métodos quimiométricos de ordem superior e fluorescência molecular na análise em matrizes biológicas*. 2003. 86 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, 2003.

TRUCKSESS, M. W. *et al. Immunoaffinity column coupled with solution fluorometry or liquid chromatography postcolumn derivatization for determination of aflatoxins in corn, peanuts and peanut butter: Collaborative study*. Journal of Association of Official Agricultural Chemists, v.74, n. 1, p. 81-88, 1991.

TRUCKSESS, M.;W.; YOUNG, K.; DONAHUE, K.F.; MORRIS, D.K.; LEWIS, E. *Comparacion of two immunochemical methods with thin-layer chromatographic methods for determination of aflatoxins*. Journal of the Association of Official Analytical Chemists International, v. 73, p. 425-428, 1990.

USP, U.S. *Pharmacopeia 22/ National Formulary 17*. U.S.Pharmacopeia Convention, Rockville, Maryland, 1990.

USP, U.S. *Pharmacopeia 25/ National Formulary 20*. U.S.Pharmacopeia Convention, Rockville, Maryland, 2002.

VALDERRAMA, P.; BRAGA, J. W. B.; POPPI, R. J. *Estado da arte de figuras de mérito em calibração multivariada*. *Química Nova*, v. 32, n.5, 1278-1287, 2009.

VESSMAN, J. *et al. Selectivity in analytical chemistry*. *Pure and Applied Chemistry*, v. 73, p. 1381-1386, 2001.

VOGEL, A.I. *Análise química quantitativa*. Rio de Janeiro: LTC, 6 ed., 2002.