

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE RESIDÊNCIA EM ÁREA PROFISSIONAL DA SAÚDE
MEDICINA VETERINÁRIA- MEDICINA VETERINÁRIA PREVENTIVA

Luara Medianeira de Lima Schlösser

**AVALIAÇÃO DA INCERTEZA ANALÍTICA NO LIMITE TOLERÁVEL
PARA ATENDER LEGISLAÇÃO REFERENTE A DEOXINIVALENOL
EM FARINHA DE TRIGO**

Santa Maria, RS
2021

Luara Medianeira de Lima Schlösser

Avaliação da incerteza analítica no limite tolerável para atender legislação referente a deoxinivalenol em farinha de trigo

Monografia apresentada ao Programa de Residência em Área Profissional da Saúde Medicina Veterinária- Medicina Veterinária Preventiva, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Especialista em Medicina Veterinária- Ênfase e Medicina Veterinária Preventiva.**

Orientador: Prof. Dr. Carlos Augusto Mallmann

Santa Maria, RS
2021

Luara Medianeira de Lima Schlösser

**AVALIAÇÃO DA INCERTEZA ANALÍTICA NO LIMITE TOLERÁVEL PARA
ATENDER LEGISLAÇÃO REFERENTE A DEOXINIVALENOL EM FARINHA DE
TRIGO**

Monografia apresentada ao Programa de Residência em Área Profissional da Saúde Medicina Veterinária- Medicina Veterinária Preventiva, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Especialista em Medicina Veterinária- Ênfase e Medicina Veterinária Preventiva.**

Aprovado em 12 de fevereiro de 2021:

Carlos Augusto Mallmann, Dr. (UFSM)
(Presidente/Orientador)

Carlos Alberto Araújo de Almeida, Dr. (UFSM)

Cristina Tonial Simões, Me. (UFSM)

Santa Maria, RS
2021

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Sildo e Giselda, agradeço pelos ensinamentos de vida.

Agradeço aos meus grandes amores, Lucas e Chico, pelo companheirismo de vida. Obrigada Lucas por tudo que fazes por mim, és meu amor e meu melhor amigo; e Chico por ser minha alegria diária, meu ser de luz, que me fortalece a acreditar que o mundo ainda pode ser um lugar de amor.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Carlos Augusto Mallmann, obrigada pela confiança e pelos aprendizados proporcionados ao longo destes dois anos.

Agradeço aos amigos e colegas de LAMIC, pelo auxílio na realização deste trabalho, através de discussões e orientações.

Ao LAMIC, por possibilitar o desenvolvimento das atividades propostas neste trabalho.

Agradeço a Universidade Federal de Santa Maria e ao Programa de Residência Uniprofissional em Medicina Veterinária, pela oportunidade em realizar o curso de especialização em uma instituição de referência.

RESUMO

AValiação da Incerteza Analítica no Limite Tolerável para Atender Legislação Referente a Deoxinivalenol em Farinha de Trigo

AUTORA: Luara Medianeira de Lima Schlösser

ORIENTADOR: Carlos Augusto Mallmann

O trigo é uma das culturas de inverno mais produzidas no Brasil. A principal utilização do grão é na forma de farinha, ingrediente base para produção dos alimentos. O grão de trigo, a nível de campo, pode ser contaminado com a doença fusariose, causada por fungos do gênero *Fusarium*, que podem produzir micotoxinas como produtos de seu metabolismo secundário. Dentre estas micotoxinas, deoxinivalenol (DON), é a micotoxina mais prevalente. Por se tratar de questão de saúde humana e animal, muitos países estipulam Limites Máximos Tolerados (LMT) para o trigo e seus subprodutos. Com base nisso, o objetivo do trabalho foi avaliar a incerteza analítica referente aos LMT de DON em farinha de trigo, estipulados pela legislação vigente RDC 138/2017. A avaliação da incerteza foi realizada, utilizando amostras de farinhas de trigo, com resultados de Limite de Quantificação (LQ) $LQ < 200$ para DON. As amostras foram extraídas e analisadas sete vezes, por três dias consecutivos. O resultado da incerteza de medição analítica encontrado, com base no LMT estipulado pela legislação de $750 \mu\text{g.kg}^{-1}$, foi de $83,60 \mu\text{g.kg}^{-1}$. A partir deste resultado, foram selecionadas 32 amostras de farinha de trigo, analisadas no Laboratório de Análises Micotoxicológicas (LAMIC), de abril a junho de 2020, cujos resultados analíticos de DON estiveram entre 600 e $900 \mu\text{g.kg}^{-1}$. Destas, 19 amostras ficaram dentro do intervalo de incerteza encontrado no estudo. Com isso, podemos concluir que avaliar a incerteza dos LMT propostos pela legislação, é muito importante para assegurar a qualidade dos alimentos que são ofertados ao consumidor.

Palavras-chave: Trigo. Micotoxinas. LMT. Incerteza.

ABSTRACT

EVALUATION OF THE ANALYTICAL UNCERTAINTY AT THE TOLERABLE LIMIT TO COMPLY WITH LEGISLATION CONCERNING DEOXYNIVALENOL IN WHEAT FLOUR

AUTHOR: Luara Medianeira de Lima Schlösser

ADVISER: Carlos Augusto Mallmann

Wheat is one of the most produced winter crops in the Brazil. The main use of grain is in the form of flour, the basic ingredient for food production. Wheat grain, at field level, can be contaminated with the disease called fusariose, caused by fungi of the genus *Fusarium*, which can produce mycotoxins as products of its secondary metabolism. Among these mycotoxins, deoxynivalenol (DON), is the most prevalent mycotoxin. Because, it is a matter of human and animal health, many countries stipulate Maximum Tolerated Limits (LMT) for wheat and its by-products. Based on this, the objective of the work was to evaluate the analytical uncertainty regarding the LMT of DON in wheat flour, stipulated by the current legislation RDC 138/2017. The uncertainty was evaluated with wheat flour samples, with results of Quantification Limit (LQ) $LQ < 200$ for DON. The samples were extracted and analyzed seven times for three consecutive days. The result of the analytical measurement uncertainty found, based on the LMT stipulated by the legislation of $750 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$, was $83.60 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$. From this result, 32 wheat flour samples were selected and analyzed at the Laboratory for Mycotoxicologic Analysis (LAMIC), from April to June 2020, whose analytical results of DON were between 600 and $900 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$. Of these, 19 samples were within the uncertainty range found in the study. With this, we can conclude how important it is to evaluate the uncertainty of the LMTs proposed by the legislation, in order to ensure the quality of the food that is offered to the consumer.

Keywords: Wheat. Mycotoxins. LMT. Uncertainty.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Alterações dos LMT de DON em subprodutos de trigo conforme a RDC 07/2011 e RDC 138/2017.....	15
Tabela 2- Parâmetros de validação segundo a RDC 166/2017 da ANVISA, EURACHEM/CITAC Guide 2016, EC 657/2002 e DOQ-CGCRE (Revisão 08- Abril de 2020) do INMETRO.....	16
Tabela 3- Preparo da curva de calibração analítica de DON.....	21
Tabela 4- Validação de amostras de farinha de trigo na concentração de 750 $\mu\text{g.kg}^{-1}$	22
Tabela 5- Obtenção da incerteza de medição analítica do método realizado.....	23
Tabela 6- Amostras de farinha de trigo selecionadas, segundo o intervalo de incerteza de medição encontrado no estudo.....	24

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Estrutura química dos tricotecenos.....	13
Figura 2 – Esquema de seleção de amostras (A) de farinha de trigo para validação e formação de grupos (G).....	20

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µg	Microgramas
µL	Microlitros
DON	Deoxinivalenol
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
g	Gramas
LAMIC	Laboratório de Análises Micotoxicológicas
kg	Quilogramas
LMT	Limites Máximos Tolerados
LQ	Limite de Quantificação
mL	Mililitros
ND	Não detectáveis
ppb	Partes por bilhão
ppm	Partes por milhão
UFSM	Universidade Federal de Santa Maria
UV	Ultravioleta
ZEA	Zearalenona

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
2.1	FUSARIOSE	12
2.2	MICOTOXINAS	12
2.2.1	Deoxinivalenol	13
2.3	LEGISLAÇÃO	14
2.4	VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO	15
2.5	PARÂMETROS ANALÍTICOS	16
2.5.1	Seletividade	17
2.5.2	Linearidade e Curva de calibração analítica	17
2.5.3	Faixa de trabalho	17
2.5.4	Limite de detecção	18
2.5.5	Limite de quantificação	18
2.5.7	Robustez	18
2.5.8	Precisão	18
2.5.9	Incerteza de medição	19
3	MATERIAL E MÉTODOS	19
3.1	AMOSTRAGEM	19
3.2	PREPARO DA AMOSTRA E FORTIFICAÇÃO	20
3.3	CURVA ANALÍTICA	20
3.4	EXTRAÇÃO	21
3.5	DILUIÇÃO E ANÁLISE CROMATOGRÁFICA	21
4	ANÁLISE ESTATÍSTICA	22
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	22
5.1	VALIDAÇÃO DA INCERTEZA NO LIMITE DE 750 $\mu\text{g.kg}^{-1}$	22
5.2	APLICAÇÃO DA INCERTEZA	23
6	CONCLUSÃO	26
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	26

1 INTRODUÇÃO

Entre as culturas de inverno produzidas no país, a de maior destaque é o trigo. Existem muitas espécies de trigo que compõem o gênero *Triticum*, e cerca de 95% do trigo produzido no mundo é o trigo *Triticum aestivum*. A produção brasileira de trigo em 2020 foi de 6.183 mil toneladas, segundo o terceiro levantamento da Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB), realizado em dezembro de 2020.

A principal utilização do grão de trigo é na forma de farinha, ingrediente base para produção dos alimentos de elevado consumo por grande parte da população, sendo um dos cereais mais consumidos no mundo, na forma de pães, bolos, massas, entre outros (SANTOS et al., 2011). O grão de trigo, a nível de campo, pode ser contaminado com a doença chamada fusariose, causada principalmente por fungos do gênero *Fusarium*, e estando sob condições favoráveis, estes fungos podem produzir micotoxinas como produtos de seu metabolismo secundário.

Dentre estas micotoxinas, deoxinivalenol (DON), é a micotoxina mais prevalente em culturas utilizadas para alimentação humana e animal. Por se tratar disso, muitos países estipulam Limites Máximos Tolerados (LMT) para o trigo e seus subprodutos, assim como outros cereais. Um alimento que contém nível de contaminante inaceitável do ponto de vista de saúde pública, não pode ser colocado no mercado. E para manter os níveis dessas substâncias indesejadas em um limite tolerado, a legislação se mostra cada vez mais rigorosa.

Com base nisso, este trabalho teve como objetivo avaliar a incerteza analítica referente aos LMT de DON em farinha de trigo, estipulados pela legislação vigente RDC 138/2017. A incerteza de uma medição remete a falta de conhecimento do valor exato do mensurando, caracterizando a dispersão dos valores que podem ser atribuídos ao que se está medindo.

Desta forma, validar a incerteza de medição referente ao LMT determinado pela legislação é muito importante, pois uma amostra pode ou não ser condenada com base no intervalo de incerteza obtido. Na prática, uma amostra que está com seu resultado no intervalo da incerteza de medição, pode ser considerada dentro das normas da legislação e, portanto, se o método de avaliação da incerteza for realizado em laboratório que siga a ABNT NBR ISO/IEC 17025, o responsável pela amostra pode contestar a não liberação do produto.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 FUSARIOSE

A fusariose é uma doença fúngica, causada principalmente pelo fungo *Fusarium graminearum*, e que ocorre em regiões quentes e úmidas durante a floração do trigo. A contaminação com a doença não só resulta na redução do rendimento de grãos e na qualidade do uso final, mas também colocam em perigo a segurança dos alimentos e rações devido à contaminação com micotoxinas, especialmente DON (McMULLEN, JONES e GALLENBERG, 1997; CHAMPEIL, DORÉ e FOURBET, 2004; McMULLEN et al., 2012).

2.2 MICOTOXINAS

Micotoxinas são substâncias tóxicas resultantes do metabolismo secundário de diversos fungos. As principais espécies fúngicas produtoras de micotoxinas pertencem aos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Claviceps*, *Alternaria*, *Pithomyces*, *Mirothecium*, *Stachibotrys* e *Phoma* (MALLMANN e DILKIN, 2007).

Os efeitos produzidos pelas micotoxinas incluem imunossupressão, carcinogenicidade, teratogenicidade e mutagenicidade, como resultado da exposição crônica; e náuseas, vômitos e rejeição alimentar em caso de exposição aguda (SOBROVA et al., 2010; OLIVEIRA, et al., 2014; LEMOS et al., 2020). Entretanto, o impacto das micotoxinas na saúde, depende de diversos fatores, como: o nível de ingestão, toxicidade do composto ingerido, peso corporal, tipo de micotoxina, tempo de exposição e estado fisiológico do indivíduo (BHATNAGAR et al., 2002).

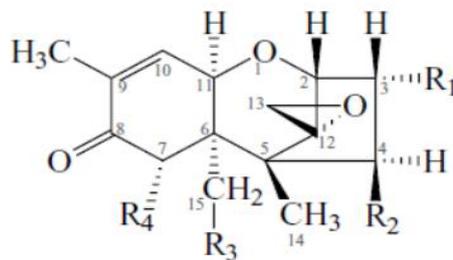
Por serem encontradas em baixas concentrações nos alimentos, requerem métodos sensíveis e confiáveis para sua detecção. Devido as diferenças como polaridade, fluorescência, volatilidade e absorção de raios ultravioleta, técnicas como métodos cromatográficos são necessários para fazer sua detecção e quantificação (IAMANAKA et al., 2013).

Os fungos do gênero *Fusarium*, em grãos de trigo, podem produzir muitos tipos de micotoxinas, entre as quais DON, um tricoteceno do tipo B, é a mais comumente encontrada (MARIN et al., 2013).

2.2.1 Deoxinivalenol

Dentre as micotoxinas, os tricotecenos são um grupo que inclui mais de 150 metabólitos fúngicos com a mesma estrutura básica (GROVE, 1988). São classificados de acordo com a presença de um átomo de hidrogênio ou um grupo éster na posição C-8. Os tricotecenos do tipo B, incluem: deoxinivalenol (DON), 3- 26 acetildesoxinivalenol (3-DONAc), 15-acetildeoxinivalenol (15-DONAc), nivalenol (NIV) e fusarenona-X (FUX) (Figura 1).

Figura 1- Estrutura química dos tricotecenos.



Fonte: LATANZZIO, PASCALE e VISCONTI (2009).

DON contém um grupo hidroxílico primário e dois secundários, e é solúvel em água e solventes polares, tais como: metanol e acetonitrila. Ainda, é um dos compostos mais polares entre os tricotecenos, e também, é muito estável em pH entre 1 e 10, e temperatura de 150°C durante o processamento de alimentos (LAUREN e SMITH, 2001). Diferentemente dos demais tricotecenos, sua molécula contém um sistema carbonílico conjugado, conferindo absorção ultravioleta (UV), o que auxilia a sua detecção por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).

Os efeitos de DON como recusa alimentar e vômitos (em decorrência disso, DON também é conhecida como “vomitoxina”), têm sido observados principalmente em suínos e aves, por apresentarem maior sensibilidade no organismo, e pelo modelo de produção atual, onde a dieta destes animais é basicamente de ração durante todo o ciclo de vida, podendo provocar acúmulo crônico nos órgãos dos mesmos.

Já os efeitos em humanos são mais difíceis de serem identificados e separados de outros fatores, uma vez que a dieta é diversificada (GOV/RS, 2019). Porém, há relatos na Ásia, de surtos de doenças agudas, com sintomas de náuseas, vômitos, vertigens, problemas

gastrointestinais e diarreia. Estes problemas foram correlacionados ao consumo de grãos contaminados por *Fusarium* e, mais recentemente, com a presença de DON (CREPPY, 2002). Esta micotoxina, foi classificada no Grupo 3 da categoria pela IARC (1993), indicando ser "não cancerígeno para os seres humanos" (OSTRY et al., 2016).

2.3 LEGISLAÇÃO

O cenário atual mundial da produção de alimentos revela o grande interesse da sociedade quanto à inocuidade do produto final a ser consumido. Muitos países têm procurado estabelecer normas legislativas rígidas que garantam o consumo de alimentos seguros por parte da população.

A farinha de trigo e os produtos de panificação podem ser contaminados pela micotoxina DON, que infecta os grãos de trigo, no campo e durante o armazenamento (FREIRE e SANT'ANA, 2018), e por isso, seus níveis aceitáveis são estabelecidos em muitos países, incluindo o Brasil.

Atualmente, na maior parte dos países, os LMT para consumo de farinha de trigo contendo DON é de $1.000 \mu\text{g.kg}^{-1}$, como é o caso dos Estados Unidos, Canadá e a maioria dos países da União Europeia, bem como os países que adotam o CODEX *Alimentarius*. No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), promulgou por meio da Resolução N° 138, de 8 de fevereiro de 2017 (RDC 138/2017), novos LMT para DON em farinha de trigo e outros subprodutos, que entraram em vigor a partir de 1° de janeiro de 2017 e 1° de janeiro de 2019. Essa resolução, altera a Resolução N° 7, de 18 de fevereiro de 2011 (RDC 07/2011), que dispõe sobre LMT para micotoxinas em alimentos, para alterar os LMT de DON em trigo e produtos de trigo prontos para oferta ao consumidor e os prazos para sua aplicação (Tabela 1).

Tabela 1- Alterações dos LMT de DON em subprodutos de trigo conforme a RDC 07/2011 e RDC 138/2017.

MICOTOXINA	ALIMENTO	LMT ($\mu\text{g.kg}^{-1}$)			
		2012	2014	2017	2019
Deoxinivalenol (DON)	Trigo integral, trigo para quibe, farinha de trigo integral, farelo de trigo.	2000	1500	1250	1000
	Farinha de trigo , massas, <i>crackers</i> , biscoitos de água e sal, e produtos de panificação, cereais e produtos de cereais, exceto trigo, e incluindo cevada malteada.	1750	1250	1000	750

Fonte: Adaptação da RDC 07/2011 e RDC 138/2017.

A definição do valor estipulado do LMT de micotoxina de um país, normalmente é baseado em pesquisas científicas sobre os efeitos dessa micotoxina para a saúde humana e animal (estratificando as diferentes espécies animais) e relacionando com o consumo *per capita* do alimento da população, estabelecendo parâmetros considerados seguros para o seu consumo.

2.4 VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO

Métodos analíticos têm sido desenvolvidos para a determinação de resíduos de contaminantes em alimentos como ferramenta principal para assegurar que os produtos estejam enquadrados nas determinações legais. Para que estes métodos garantam a disponibilidade de um alimento seguro, é preciso que sejam normalizados e cumpram requisitos que garantam bons resultados (PASCHOAL et al., 2008).

A validação do método analítico é uma avaliação que garante que as informações geradas possuam rastreabilidade, confiabilidade e comparabilidade sobre a amostra a que se refere. No processo de validação deve-se levar em consideração todas as incertezas do processo analítico, incluindo aquelas atribuídas aos equipamentos, padrões, calibrações, pipetagem, analista, ambiente, procedimento de amostragem e preparo da amostra (BRASIL, 2015).

Os laboratórios de ensaio, acreditados com base na norma de referência ABNT NBR ISO/IEC 17025/2017, que realizam análises em alimentos, precisam ter capacidade técnica comprovada, a qual é garantida pelas normas de credenciamento estabelecidas por órgãos responsáveis, que no Brasil são representados pela ANVISA e pela Coordenação Geral de

Acreditação (CGCRE) do Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO), que disponibilizam guias para procedimentos de validação de métodos analíticos (Resolução RDC Nº 166, de 24 de julho de 2017 e o documento DOQ-CGCRE-008, revisão 08 de abril de 2020, respectivamente). Há ainda órgãos internacionais, como a *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC), *International Organization for Standardization* (ISO) e *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC International), EURACHEM, que também estabelecem procedimentos de validação como critério fundamental no credenciamento de laboratórios.

As maiores exigências pelo cumprimento das leis e regulamentos por órgãos de fiscalização e clientes (nas relações comerciais ou necessidade de obtenção de certificações específicas), tem feito aumentar a procura por laboratórios que garantam resultados de qualidade, através de métodos analíticos validados com incertezas de medição claras e confiáveis.

2.5 PARÂMETROS ANALÍTICOS

Os parâmetros de validação de métodos analíticos têm sido definidos em diferentes grupos de trabalho de organizações internacionais e nacionais (Tabela 2).

Tabela 2- Parâmetros de validação segundo a RDC 166/2017 da ANVISA, EURACHEM/CITAC Guide 2016, EC 657/2002 e DOQ-CGCRE (Revisão 08- Abril de 2020) do INMETRO.

RDC 166/2017 (ANVISA)	EURACHEM/ CITAC Guide 2016	EC 657/2002	INMETRO DOQ- CGCRE (Revisão 08- ABRIL 2020)
Seletividade	Seletividade	Seletividade	Seletividade
Linearidade	Linearidade	Linearidade/Curva de calibração	Linearidade
Efeito matriz	-	-	-
Faixa de trabalho	Faixa de trabalho	-	Faixa de trabalho
Precisão	Precisão	Precisão	Precisão
Exatidão	-	-	-
Limite de detecção	Limite de detecção	Limite de detecção	Limite de detecção
Limite de quantificação	Limite de quantificação	Limite de quantificação	Limite de quantificação
Robustez	Robustez	Robustez	Robustez
-	Incerteza de medição	-	-
-	Recuperação	Recuperação	Recuperação

Os parâmetros geralmente empregados para a validação do método analítico são: seletividade, linearidade/curva de calibração, faixa de trabalho, limites de detecção e de quantificação, recuperação, robustez, precisão e incerteza de medição (EURACHEM/CITAC, 2016).

2.5.1 Seletividade

A seletividade representa a capacidade de um método em identificar ou quantificar o analito de interesse, na presença de interferentes que podem estar presentes na amostra, como impurezas, diluentes e componentes da matriz (THOMPSON, ELLISON e WOOD, 2002).

2.5.2 Linearidade e Curva de calibração analítica

Linearidade é a capacidade de o procedimento produzir resultados diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de uma faixa de concentração (INMETRO, 2020). A curva de calibração analítica consiste na determinação da resposta do instrumento às várias concentrações da substância em estudo (PRIMEL, 2003; OLIVEIRA, 2010). Se houver relação linear aparente após exame visual do gráfico (sinal *versus* concentração), deve-se determinar o coeficiente de correlação (r^2). Valor igual a 0,99 é o mínimo aceitável para o coeficiente de correlação (r^2) (BRASIL, 2003). As diretrizes da *International Conference on Harmonization* (ICH), especificam um mínimo de cinco níveis de concentração para preparo de uma curva analítica.

2.5.3 Faixa de trabalho

A faixa de trabalho compreende as concentrações em que a linearidade for atingida, definindo-se, assim, a curva de calibração correspondente. No limite inferior da faixa de concentração, o fator limitante é o valor do limite de quantificação (LQ), e no limite superior, os fatores limitantes dependem do sistema de resposta do equipamento de medição (INMETRO, 2020).

2.5.4 Limite de detecção

O limite de detecção representa a menor concentração do analito de interesse que pode ser detectado em uma amostra, mas não necessariamente quantificado, podendo ser calculado pelo método visual, relação sinal-ruído ou método baseado em parâmetros da curva de calibração (RIBANI et al., 2004).

2.5.5 Limite de quantificação

O limite de quantificação representa a menor concentração do analito de interesse que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas. Na prática, corresponde normalmente ao nível mais baixo da curva de calibração.

2.5.6 Recuperação

A recuperação do analito pode ser estimada pela análise de amostras adicionadas com quantidades conhecidas do mesmo (*spike*). O analito pode ser adicionado às amostras em pelo menos três diferentes concentrações, por exemplo, próximo ao limite de detecção, próximo à concentração máxima permissível e em uma concentração próxima à média da faixa de uso do método. A limitação deste procedimento é a de que o analito adicionado não está necessariamente na mesma forma que o presente na amostra (FORTI e ALCAIDE, 2011).

2.5.7 Robustez

O estudo da robustez de um procedimento analítico procura avaliar o quão sensível o resultado analítico é as variações nas condições experimentais do procedimento analítico. No caso de métodos cromatográficos, as variações referem-se a diferentes tipos de colunas, temperatura e fluxo (NIJHUIS, 1999).

2.5.8 Precisão

A precisão de um método analítico representa a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra ou padrões, em condições definidas, sendo usualmente expressa pelo desvio padrão (INMETRO, 2007).

2.5.8.1 Repetibilidade

A repetitividade indica a concordância entre os resultados de medições sucessivas de um mesmo método, sob as mesmas condições de medição – mesmo procedimento, mesmo analista, mesmo instrumento usado sob as mesmas condições, mesmo local, e repetições em um curto intervalo de tempo.

2.5.8.2 Reprodutibilidade

A reprodutibilidade é a concordância entre os resultados das medições de uma mesma amostra, efetuadas sob condições variadas, como diferentes analistas, local e equipamentos (RIBANI et al., 2004).

2.5.9 Incerteza de medição

Segundo o Guia para a Expressão de Incerteza de Medição (GUM, 2008), a incerteza de uma medição remete a falta de conhecimento do valor exato do mensurando caracterizando a dispersão dos valores que podem ser atribuídos ao que se está medindo. A incerteza expandida define um intervalo em torno de um resultado, o qual tenha um nível de confiança estabelecido para que defina a probabilidade de abrangência dos valores.

A estimativa de incertezas de medição é um importante componente do processo analítico em laboratórios químicos, visto que somente com um resultado de medição expresso pelo valor obtido e sua respectiva incerteza, é possível obter conclusões satisfatórias em relação à grandeza medida. Esta preocupação tem destaque em especial quando o objetivo dos ensaios é obter evidências do atendimento a requisitos legais e regulamentares.

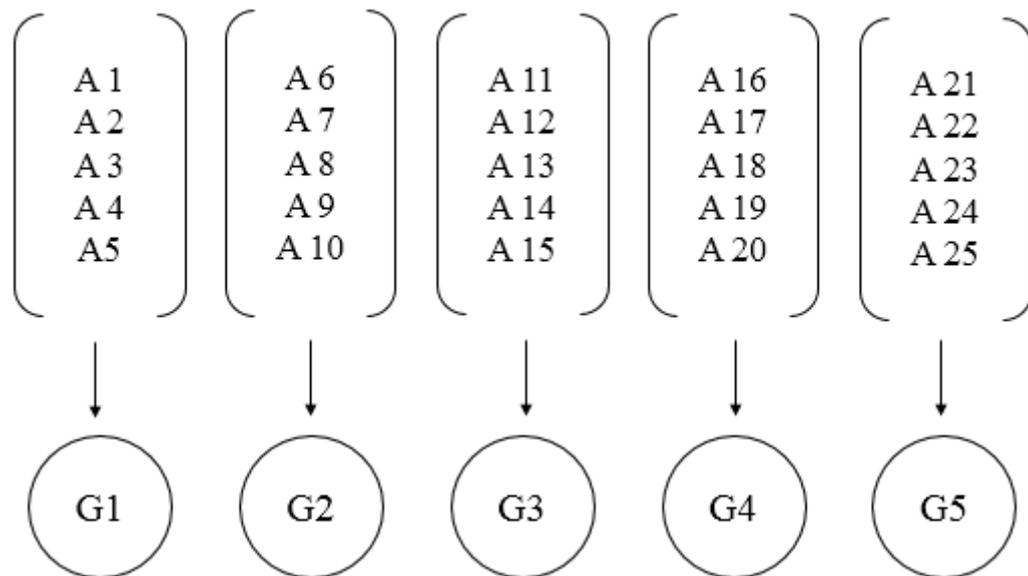
3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 AMOSTRAGEM

Foram selecionadas 25 amostras de farinha de trigo que haviam sido analisadas anteriormente no Laboratório de Micotoxinas da UFSM (LAMIC) de abril a junho de 2020, e cujos laudos emitidos para DON foram ausentes de contaminação (LQ<200). A partir disso, se

fez a homogeneização das amostras em grupos de cinco (de forma aleatória), e então, foram formados novos grupos de amostras, com 500g cada (Figura 1).

Figura 2 – Esquema de seleção de amostras (A) de farinha de trigo para validação e formação de grupos (G).



Os grupos de amostras formados, foram submetidos novamente a análise de DON, em triplicata, em aparelho de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplado à Espectrometria de Massas (HPLC-MS/MS), para garantir que as amostras fossem totalmente livres de contaminação. Após, um grupo foi utilizado e iniciou-se o processo de validação, onde a amostra foi extraída em triplicata, durante três dias consecutivos.

3.2 PREPARO DA AMOSTRA E FORTIFICAÇÃO

As amostras foram homogeneizadas e pesadas em tubos do tipo *falcon*, na quantidade de 3g cada. Para a fortificação, foi pipetado em cada amostra 22,5 µL de padrão de DON, na concentração de 19,7 µg/mL.

3.3 CURVA ANALÍTICA

A curva analítica foi preparada utilizando as soluções em sete níveis de concentrações, de 200 a 8000 µg.L⁻¹ (Tabela 3). O diluente utilizado foi uma solução de fase aquosa: fase orgânica 1:1 (v:v). No preparo da curva analítica e na extração das amostras, DON e

zearalenona (ZEA) são analisadas juntas pois esta é a metodologia do laboratório. No entanto, em nosso trabalho, foram considerados somente os dados de DON.

Tabela 3- Preparo da curva de calibração analítica de DON.

Pd DON/ZEA	Diluyente (μL)	DON 100 ppb (μL)	ZEA (μL)	DON-1 1000 ppb (μL)	Z-Lanol 100 ppb (μL)
Pd 1/0.1	935	10	10 (Pd 10 ppb)	5	40
Pd 2/0.5	885	20	50 (Pd 10 ppb)	5	40
Pd 3/1	825	30	100 (Pd 10 ppb)	5	40
Pd 5/2	705	50	200 (Pd 10 ppb)	5	40
Pd 10/4	851	100	4 (Pd 1000 ppb)	5	40
Pd 20/5	750	200	5 (Pd 1000 ppb)	5	40
Pd 40/10	545	400	10 (Pd 1000 ppb)	5	40

Fonte: LAMIC, 2016.

3.4 EXTRAÇÃO

Para extração, foi adicionado aos tubos *falcon* contendo as amostras, 48 μ L de zearalanol e 24 mL de solução de metanol:água (7:3, v/v). Após, os tubos foram agitados por 20 minutos, utilizando o agitador orbital para tubos (MA563, Marconi) e levados a centrífuga (5804R, *Eppendorf*), em rotação de 2500 rpm por 5 minutos.

3.5 DILUIÇÃO E ANÁLISE CROMATOGRÁFICA

Após a centrifugação, os extratos foram diluídos com diluente preparado com as fases móveis (fase aquosa:fase orgânica, 1:1, v/v), sendo a fase aquosa (água:acetato de amônio, 1000:5, v/v) e fase orgânica (metanol:água:acetato de amônio, 900:95:5, v/v). Após, foram levados para serem submetidos à separação por cromatografia líquida, seguido de detecção por espectrometria de massas. O equipamento empregado é um cromatógrafo HPLC 1290 *Infinity* (*Agilent Technologies*) acoplado a um espectrômetro de massas (QTRAP 5500, *Sciex*).

4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi realizado uma amostragem aleatória simples das amostras de farinha de trigo com LQ<200 para validação, em um delineamento inteiramente casualizado. As análises foram realizadas em triplicata e os resultados expressos como média \pm desvio-padrão. Os resultados foram analisados estatisticamente utilizando análise de variância (ANOVA).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 VALIDAÇÃO DA INCERTEZA NO LIMITE DE 750 $\mu\text{g.kg}^{-1}$

As amostras foram extraídas e analisadas em triplicata, por três dias consecutivos e os resultados são apresentados na Tabela 4. A partir dos resultados de desvio padrão associados a repetibilidade e reprodutibilidade (44, 166 e 39,315, respectivamente), se fez o cálculo para obter o resultado da incerteza expandida.

Tabela 4- Validação de amostras de farinha de trigo na concentração de 750 $\mu\text{g.kg}^{-1}$.

Rep	SPK	DON 750 $\mu\text{g.kg}^{-1}$			Média
		1º dia	2º dia	3º dia	
1	750	732,00	709,00	755,00	732,00 \pm 23,00
2	750	722,00	802,00	723,00	749,00 \pm 45,90
3	750	777,00	801,00	731,00	769,67 \pm 35,57
4	750	777,00	745,00	675,00	732,33 \pm 52,17
5	750	764,00	790,00	683,00	745,67 \pm 55,81
6	750	795,00	759,00	700,00	751,33 \pm 47,96
7	750	756,00	678,00	734,00	722,67 \pm 40,22
Média das Médias					743,24 \pm 15,66
Sr					44,166
SR					39,315

Rep= repetibilidade; Sr= desvio padrão associado a repetibilidade; SR= desvio padrão associado a reprodutibilidade.

Para satisfazer as necessidades de indústrias e empresas, assim como a requisitos nas áreas da saúde, calcular a incerteza expandida fornece um intervalo em torno do resultado de uma medição com o qual se espera abranger uma grande fração da distribuição de valores que podem ser atribuídos a grandeza. Desta forma, a incerteza expandida é obtida multiplicando-se

a incerteza combinada pelo fator de abrangência (k) (Tabela 5). Em nosso estudo, o resultado da incerteza expandida encontrado foi de $\pm 83,60 \mu\text{g.kg}^{-1}$.

Tabela 5- Obtenção da incerteza de medição analítica do método realizado.

FONTE	VE	DP	DIVISOR	IP	CS	CI	v_i OU v_{eff}
Preparação/ Extração	0,000017	t	13,97	0,00000	1,000	0,0000012	1000,000
Pipetagem extrato	0,4	t	2,04	0,18520	1,000	0,1852038	1000,000
Estudo R&R	39,3	t	1,00	39,31530	1,000	39,3153039	21,000
Incerteza combinada						39,32	21
Incerteza expandida		k=	2,13			83,60	

VE= valor de entrada; DP= distribuição de probabilidade; IP= incerteza padrão; CS= coeficiente de sensibilidade; CI= contribuição para incerteza; k= fator de abrangência; v_i ou v_{eff}= graus de liberdade efetivo.

5.2 APLICAÇÃO DA INCERTEZA

Foram analisadas 603 amostras de farinha de trigo, no período de janeiro a dezembro de 2020, no Laboratório de Micotoxinas da UFSM (LAMIC). As amostras de farinha de trigo consideradas no estudo, incluem apenas as farinhas de trigo tradicionais, não foram consideradas farinhas de trigo integrais. Destas, 283 amostras foram analisadas para outras micotoxinas e, portanto, foram excluídas do estudo. Sendo assim, 320 (n=320) amostras foram utilizadas, e destas, 192 (60%) foram positivas para DON, com níveis variando de 200 a 2.730 $\mu\text{g.kg}^{-1}$, com uma média de contaminação de 462,39 $\mu\text{g.kg}^{-1}$. As amostras que tiveram resultados com LQ<200, foram de 128 (40,0%).

Para fazer a análise da incerteza, baseada no LMT de 750 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ exigido pela legislação, foram utilizadas amostras com resultados entre 600 a 900 $\mu\text{g.kg}^{-1}$. Das 32 (10%) amostras selecionadas nesse intervalo de resultado, 19 (5,93%) amostras se mantiveram dentro do intervalo de incerteza analítica obtidos no estudo (Tabela 6).

Tabela 6- Amostras de farinha de trigo selecionadas, segundo o intervalo de incerteza de medição encontrado no estudo.

AMOSTRA	DON (600 a 900 $\mu\text{g.kg}^{-1}$)	DON (666,4 a 833,6 $\mu\text{g.kg}^{-1}$)*
1	603	-
2	604	-
3	608	-
4	608	-
5	617	-
6	626	-
7	640	-
8	643	-
9	644	-
10	646	-
11	649	-
12	664	-
13	680	680
14	683	683
15	692	692
16	698	698
17	706	706
18	717	717
19	726	726
20	728	728
21	731	731
22	738	738
23	744	744
24	745	745
25	784	784
26	792,5	792,5
27	797	797
28	804	804
29	808	808
30	813	813
31	814	814
32	882	-

*Intervalo da incerteza de medição encontrado no estudo, considerando a concentração de 750 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ referente a legislação vigente RDC 138/2017.

Analisando somente o LMT exigido pela legislação, sem considerar a incerteza de medição encontrada no estudo, das 320 amostras totais do estudo, 18 (5,62%) seriam condenadas, com níveis de contaminação acima de 750 $\mu\text{g.kg}^{-1}$. Porém, considerando o intervalo de incerteza analítica encontrado, de $\pm 83,60$ $\mu\text{g.kg}^{-1}$, 11 (3,43%) amostras seriam condenadas, com níveis de contaminação acima de 833,6 $\mu\text{g.kg}^{-1}$.

Portanto, com base em nosso estudo, sete amostras de farinha de trigo, com intervalo de análise para DON entre 750 a 833,6 $\mu\text{g.kg}^{-1}$, poderiam ter seus laudos contestados por clientes

que solicitam análises, para serem liberadas para industrialização. No entanto, esta decisão, depende de órgãos regulamentadores, que a partir de resultados de incerteza analítica realizados em laboratórios credenciados, como este, podem solicitar novas análises, afim de confirmar os resultados.

Com base nisso, estudos vêm sendo realizados a fim de avaliar a contaminação de DON em farinha de trigo e no grão *in natura* brasileiros. ALMEIDA et al. (2016), analisaram 58 amostras de farinha de trigo e 53 (91,4%) estavam contaminadas com níveis de DON variando de 200 a 1310 $\mu\text{g.kg}^{-1}$, com média de contaminação de 360 $\mu\text{g.kg}^{-1}$. CALORI-DOMINGUES et al. (2016), encontraram DON em 644, das 745 amostras de farinha de trigo analisadas (86,4%), com níveis variando de 50 a 8501 $\mu\text{g.kg}^{-1}$. MALLMANN et al. (2017), analisaram ao longo de oito anos (2008 - 2015), 2.714 amostras de trigo cultivadas na região sul do Brasil. A concentração média de DON das amostras positivas (73%), durante o período analisado, foi de 855 $\mu\text{g.kg}^{-1}$. A porcentagem média de amostras acima do limite estabelecido pela legislação brasileira foi de 30,2%.

Um aumento de positividade e níveis de DON tem sido observado em trigo brasileiro nos últimos anos, muitas vezes com contaminações que ultrapassam as exigências da legislação (OLIVEIRA et al., 2002; LAMARDO; NAVAS; SABINO, 2006; CALORI-DOMINGUES et al., 2007). Todavia, a contaminação por DON depende das condições meteorológicas, causando variações entre diferentes safras, devido a condições favoráveis ao desenvolvimento fúngico. Salienta-se a importância do contínuo monitoramento e desenvolvimento de métodos de fácil execução e elevada sensibilidade para detecção e quantificação de micotoxinas, para garantir a qualidade dos alimentos e atender as exigências da legislação.

Muitas pesquisas também vêm sendo desenvolvidas a fim de controlar a contaminação fúngica, e conseqüentemente, as micotoxinas na cultura do trigo. São mais de 30 genes envolvidos na infecção da planta por *Fusarium*, e que atuam na entrada do fungo na espiga, na dispersão da doença e na produção da micotoxinas. Como o controle químico nem sempre apresenta resultados satisfatórios, a melhor solução seria o desenvolvimento de cultivares resistentes a doença.

Segundo KUHNE (2019), o gene FHB1, presente em uma variedade de trigo, com origem na China, é atualmente a principal fonte de resistência para fusariose. O gene *Fhb1* decodifica uma proteína com propriedades antifúngicas que inibem o crescimento de fungos e tem sido utilizado em muitos programas de melhoramento genético no mundo. Entretanto, na condição de clima subtropical do sul do Brasil, a introdução do gene FHB1 resultou em fatores indesejado do trigo na indústria, como farinha mais escura e com fraco índice de força de glúten.

Uma alternativa é o monitoramento para determinação de ocorrência de micotoxinas, para a identificação e segregação de lotes com níveis elevados de contaminação.

É fundamental, que empresas e indústrias estejam atentas as leis impostas pelos órgãos governamentais, para que o produto fornecido se delimite nas exigências laboratoriais propostas. A disponibilidade, em laudos de análises laboratoriais, do intervalo de incerteza analítica dos LMT exigidos pela legislação, é uma ferramenta importante para que possa ser realizada a contestação de produtos que seriam condenados, considerando apenas valores isolados de limites de contaminação. A incerteza analítica, se realizada em laboratórios confiáveis, que seguem a ABNT NBR ISO/IEC 17025, é de grande valia para que produtos de qualidade sejam ofertados ao consumidor com segurança, ao invés de serem descartados.

6 CONCLUSÃO

Podemos concluir que, avaliar a incerteza analítica dos limites exigidos pela legislação, para análise de DON em farinha de trigo, é muito importante para garantir que o resultado liberado, embora possa estar acima do limite, está dentro do intervalo de incerteza, e que o fornecedor pode solicitar uma análise de contraprova ou o fiscal pode liberar a amostra. A avaliação realizada em laboratórios credenciados, que possam garantir resultados incontestáveis, auxilia empresas na busca pela garantia de produtos que estejam dentro dos limites legais propostos. Além disso, reforça-se a importância do monitoramento do trigo produzido, quanto à contaminação por micotoxinas, uma vez que se trata de uma matéria prima amplamente empregada na indústria alimentícia e de elevado conceito no agronegócio mundial.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução Nº 138, de 8 de fevereiro de 2017. Altera a RDC Nº 7, de 18 de fevereiro de 2011, que dispõe sobre os Limites Máximos Tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos, para alterar os LMT da micotoxina deoxivalenol (DON) em trigo e produtos de trigo. **Diário Oficial da União**, Ed. 29, de 09-02-2017, Seção 1, p.45.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução Nº 166, de 24 de julho de 2017. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Ed. 141, de 25-07-2017, Seção 1, p. 87, 2017.

ALMEIDA, A.P. et al. Occurrence of deoxynivalenol in wheat flour, instant noodle and biscuits commercialised in Brazil. **Food Additives & Contaminants: Part B**, n.4, v.9, p.251-255, 2016.

BHATNAGAR, D.; YU, J.; EHRILICH, K.C. Toxins of filamentous fungi. **Chemical Immunology**, v.81, p.167-206, 2002.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Manual de Garantia de Qualidade Analítica**. Áreas de Identidade e Qualidade de Alimentos e de Insumos. Brasília-DF, 2015.

BRASIL. Resolução-RE Nº 899, de 29 de maio de 2003. Determina a publicação do “Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos”. **Diário Oficial da União**. 02-06-2003.

CALORI-DOMINGUES, M.A. et al. Co-occurrence and distribution of deoxynivalenol, nivalenol and zearalenone in wheat from Brazil. **Food Additives & Contaminants: Part B**, n.2, v.9, p.142–151, 2016.

CALORI-DOMINGUES, M.A. et al. Ocorrência de Desoxinivalenol em trigo utilizado no Brasil. **Ciência e Tecnologia dos Alimentos**, Campinas, 27(1), p.181-185, jan.-mar. 2007.

CHAMPEIL, A.; DORÉ, T.; FOURBET, J.F. Fusarium head blight: epidemiological origin of the effects of cultural practices on head blight attacks and the production of mycotoxins by *Fusarium* in wheat grains. **Plant Science**, v.166, p.1389-1415, 2004.

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

EURACHEM/CITAC. Guide to Quality in Analytical Chemistry: An Aid to Accreditation. Third Edition, 2016. Disponível em: <https://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/Eurachem_CITAC_QAC_2016_EN.pdf>. Acesso em: 06 jan. 2021.

FORTI, M.C.; ALCAIDE, R.L.M. Validação de métodos analíticos do laboratório de aerossóis, soluções aquosas e tecnologias – LAQUATEC. INPE, São José dos Campos, 2011.

FREIRE, L.; SANT’ANA, A.S. Modified mycotoxins: An updated review on their formation, detection, occurrence, and toxic effects. **Food and Chemical Toxicology**, v.111, p.189-205, 2018.

GOVERNO DO ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL. Secretaria de Agricultura, Pecuária e Desenvolvimento Rural. **Orientações sobre a micotoxina Deoxinivalenol**. Câmara Setorial do Trigo. Nota Técnica, 2019.

GROVE, J.F. Non-macrocyclic trichothecenes. **Natural Products Reports**, n.5, p.187–209, 1988.

IAMANAKA, B.T. et al. Micotoxinas em alimentos. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica**, v.7, p.138-161, 2013.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA.

Orientação sobre validação de métodos analíticos. DOQ-CGCRE-008 - Revisão 08, abril de 2020. Disponível em:

<https://d335luupugsy2.cloudfront.net/cms/files/51020/1586959964DOQ-Cgcre-8_08.pdf>.

Acesso em: 04 jan. 2021.

KUHNEM, P. Micotoxinas desafiam consumo e produção de trigo no Brasil. 2019. Biotrigo. Disponível em: <<https://3talheres.com.br/micotoxinas-desafiam-consumo-e-producao-de-trigo-no-brasil/>>. Acesso em: 7 jan. 2021.

LATTANZIO, V.M.T.; PASCALE, M.; VISCONTI, A. Current analytical methods for trichothecene mycotoxins in cereals. **Trends in Analytical Chemistry**, v.28, n.6, p.758-768, 2009.

LEMOS, A.C. et al. Níveis de deoxinivalenol e nivalenol em pães elaborados com farinha naturalmente contaminada. **7º Simpósio de Segurança Alimentar**. Inovação com Sustentabilidade, 2020.

MALLMANN, C.A. et al. Prevalence and levels of deoxynivalenol and zearalenone in commercial barley and wheat grain produced in Southern Brazil: an eight-year (2008 to 2015) summary. **Tropical Plant Pathology**, n.3, v.42, p.146–152, 2017.

MALLMANN, C.A.; DILKIN, P. **Micotoxinas e Micotoxicoses em Suínos**. Ed. Sociedade Vicenti Palotti, Santa Maria, RS, 2007.

MARIN, S. et al. Mycotoxins: Occurrence, toxicology and exposure assessment. **Food and Chemical Toxicology**. v.60, p.218–237, 2013.

McMULLEN, M.; JONES, R.; GALLENBERG, D. Scab of wheat and barley: a re-emerging disease of devastating impact. **Plant Disease Journal**., v.81, p.1340-1348, 1997.

McMULLEN, M. et al. A unified effort to fight an enemy of wheat and barley: Fusarium head blight. **Plant Disease Journal**, v.96, p.1712-1728, 2012.

NIJHUIS, A. et al. Strategy for ruggedness tests in chromatographic method validation. **Analytica Chimica Acta**, v.391, p.187-202, 1999.

OLIVEIRA, C. A. F. et al. Animal Health: Mycotoxins. In: VAN ALFEN, N. K. **Encyclopedia of Agriculture and Food Systems**. Academic Press, 2 ed., 464 p., 2014.

OLIVEIRA, M.S. **Validação de metodologia analítica para análise de aflatoxina m1 e sua ocorrência em leite bovino comercializado no sul do Brasil**. 2010. 107f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2010.

OSTRY, V. et al. Mycotoxins as human carcinogens- the IARC *Monographs* classification. **Mycotoxin Research**, v.33, p.65-73, 2017.

PASCHOAL, J.A.R. et al. Validação de métodos cromatográficos para a determinação de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos. **Química Nova**, v.31, n.5, p.1190-1198, 2008.

PRIMEL, E.G. **Aplicação de extração em fase sólida e técnicas cromatográficas para determinação de herbicidas em águas de superfície e acompanhamento da degradação a campo e no laboratório.** 2003. 170f. Tese (Doutorado em Química Analítica) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2003.

RIBANI, M. et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v.27, n.5, p.771-780, 2004.

SANTOS, L. et al. Mycobiota and co-occurrence of mycotoxins in Capsicum powder. **International Journal of Food Microbiology**, v.151, p.270-276, 2011.

SOBROVA, P. et al. Deoxynivalenol and its toxicity. **Interdisciplinary Toxicology**, v.3, p.94-99, 2010.

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