

## Verificação intralaboratorial da *performance* obtida em método de determinação de ocratoxina A por purificação em coluna de imunoafinidade e cromatografia líquida de alta eficiência usando café

*Verifying the performance in the determination of ochratoxin by immunoaffinity column cleanup and high performance liquid chromatography in a laboratory using single laboratory validation*

Maria de Lourdes Mendes de SOUZA<sup>1,2</sup>, Elisabeth Borges GONÇALVES<sup>1\*</sup>,  
Otniel Freitas SILVA<sup>1</sup>, Antonio Xavier de FARIAS<sup>1</sup>, Anderson Luis da Silva CAVALCANTI<sup>3</sup>

### Resumo

A ocratoxina A é um contaminante que pode estar presente em vários alimentos e ser prejudicial tanto para a saúde quanto para a economia, então deve ser medida. Mas, para bem quantificar um analito, mesmo com o uso de métodos oficiais, é necessário verificar o sistema de medição; nisto se empregam requisitos de validação. Assim, procedeu-se a uma verificação intralaboratorial de método por purificação em coluna de imunoafinidade e cromatografia líquida de alta eficiência em amostras de café verde artificialmente contaminadas e medidas. Foi obtido o comportamento de medição esperado ao longo do analito, a faixa de trabalho teve o limite inferior entre 0,489 e 1,59 e o superior entre 220 e 300  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ . A linearidade não foi rejeitada nesta faixa e não houve interferência externa significativa no modelo. O intercepto não diferiu significativamente da origem e o coeficiente linear não diferiu significativamente de 1,00. Os níveis de desvios padrão dependeram das concentrações estudadas, como ocorrido em diversas publicações, e os desvios padrão relativos não demonstraram inconformidade nos estudos colaborativos localizados. Concluiu-se pela competência do laboratório no método pesquisado, especialmente para café verde.

**Palavras-chave:** segurança alimentar; faixa de trabalho; valores aberrantes; precisão; metrologia.

### Abstract

Ochratoxin A is a food contaminant which can appear in several foods and can be harmful not only to human health, but also to the economy. In order to quantify properly an analite, even when using standard methods, it is necessary to check the validation method requirements. Therefore, a single laboratory validation of the method using immunoaffinity column and high performance liquid chromatography in spiked samples of ground green coffee beans was conducted. The evolution of the measurements along the analyte was sigmoid, as expected, and the range showed bottom between 0.489 and 1.59, and top between 220 and 300  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ , top. Linear regression was not rejected in this range and there was no external significant interference in the model. The intercept was in the origin and the linear coefficient did not differ significantly from 1.00 ( $p < 0.05$ ). The standard deviations depended on the concentrations of ochratoxin A, similarly to studies in the literature, and the estimated values of the relative standard deviation obtained were in accordance with the values from those studies. Therefore, the laboratory proved competence in this measurement process, especially for green coffee beans.

**Keywords:** food safety; range; outliers; precision; metrology.

## 1 Introdução

Micotoxinas fazem parte de um grupo de contaminantes quimicamente complexos que podem estar presentes em uma grande variedade de alimentos, como ocratoxina A no milho, trigo, café, cevada, centeio, aveia, feijão e rações para animais. Sua incidência tem sido maior em países da Europa Central e pode ser responsável por perdas econômicas significativas associadas ao seu impacto na saúde humana, produtividade animal e comércio doméstico e internacional (ANGSUBHAKORN, 1989).

A ocratoxina A, Hsieh (1988), é a micotoxina mais tóxica do grupo das sete ocratoxinas existentes. É produzida principalmente

pelo *Aspergillus ochraceus*, *Penicillium verrucosum* e *Aspergillus westerdijkiae*, o último mais comumente verificado na produção de OTA em café, e age mais intensamente nos rins. Em dosagem aguda em aves, provoca tremores e perda de reflexos, em muitos outros animais dificulta a coagulação do sangue e diminui a defesa do organismo contra infecções.

Uma vez ingerida, é rapidamente absorvida no trato gastrointestinal, passa para o sangue, liga-se à albumina e é distribuída em concentrações tecidulares decrescentes para os pulmões, fígado, rins, coração, intestino e testículos, e pode atravessar a barreira placentar (LI; JI, 2003).

Recebido para publicação em 19/6/2008

Aceito para publicação em 16/5/2009 (003597)

<sup>1</sup> Embrapa Agroindústria de Alimentos, Av. Américas, 29501, Guaratiba, CEP 23020-470, Rio de Janeiro – RJ, Brasil, E-mail: goncaleb@ctaa.embrapa.br

<sup>2</sup> Núcleo de Pesquisas de Produtos Naturais, Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, Av. Athos da Silveira Ramos, 149 Bloco A, Ilha do Fundão, CEP 21941-909, Rio de Janeiro – RJ, Brasil

<sup>3</sup> Departamento de Estatística, Universidade Estadual do Rio de Janeiro – UERJ, R. São Francisco Xavier, 524, Maracanã, CEP 20550-900, Rio de Janeiro – RJ, Brasil

\*A quem a correspondência deve ser enviada

A União Europeia, segundo Sartori (2005), recomenda níveis máximos de  $5 \mu\text{g.kg}^{-1}$  para café torrado e moído e  $10 \mu\text{g.kg}^{-1}$  para café solúvel, respectivamente, e os cientistas europeus, Engormix (2006), consideram tolerável um consumo semanal de  $120 \mu\text{g.kg}^{-1}$ , outros,  $100 \mu\text{g.kg}^{-1}$ .

Além das consequências das possíveis quantidades em que pode estar presente nos alimentos, como qualquer outro analito, deve ser devidamente quantificada em qualquer laboratório de alimentos; objetivo da prova de competência em métodos analíticos.

Diversos são os métodos em uso para medição de micotoxinas em alimentos. Especificamente para ocratoxina A em café, Vargas, Santos e Pittet (2005), em estudo colaborativo (experimento de precisão), obtiveram desvio padrão relativo da repetitividade entre 7,42 e 20,94%, enquanto que o similar para a reprodutibilidade variou de 16,34 a 29,17%, empregando purificação em coluna de imunoafinidade e cromatografia líquida com detecção por fluorescência em café verde. Foi verificada tendência crescente nos desvios padrão ao longo do analito.

Entwisle et al. (2001) usaram cromatografia líquida e purificação em coluna de imunoafinidade e fenil silano em café torrado e obtiveram desvio padrão relativo da repetitividade entre 2 e 22% e desvio padrão relativo da reprodutibilidade de 14 a 26%. Adicionalmente, este estudo colaborativo também mostrou tendência crescente nos desvios padrão ao longo do eixo do analito.

O método disponível para a quantificação desta micotoxina no Brasil é oficial, porém nem todos os seus requisitos de validação foram estabelecidos.

Todavia, mesmo usando métodos validados, o laboratório tem que demonstrar que os opera competentemente. Portanto, faz-se necessária a verificação de alguns requisitos de validação, incluindo-se alguns raramente profundamente avaliados, como detalhes da faixa de trabalho, cujo máximo é desconhecido, limites como de detecção, etc.

## 2 Material e métodos

### 2.1 Método analítico e amostras

O método analítico para quantificação da ocratoxina A (BRASIL,1999), baseia-se na sua extração pela solução de metanol : bicarbonato de sódio 3% (1:1, v/v), purificação do extrato em coluna de imunoafinidade e quantificação por CLAE com detector de fluorescência (SARTORI, 2005); e tem limite de quantificação  $1 \mu\text{g.kg}^{-1}$ . A coluna utilizada foi RP-18 ( $250 \times 4,6 \text{ mm}$ ; 5 mm), fase móvel acetonitrila : metanol : água : ácido acético (35 : 35 : 29 : 1, v/v/v/v), fluxo de 0,8 mL/minuto e detector de fluorescência ( $\lambda_{\text{exc}} = 332 \text{ nm}$  e  $\lambda_{\text{em}} = 476 \text{ nm}$ ).

Esse método tem em seu escopo café verde, então foram usadas amostras deste tipo de matriz, contaminadas com ocratoxina A em concentrações conhecidas, elaboradas para este fim. A micotoxina foi obtida através do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.

O café verde foi moído, porções de 25 g de material foram admitidas/análise e se adicionou o padrão em diversas concentrações em cada uma delas, homogeneizando-as em seguida em *blender* por 5 minutos. Seguiu-se o procedimento analítico anteriormente descrito para cada porção contaminada, totalizando-se 120 análises.

Complementando as medições destas amostras, o laboratório participou de vários (mais de oito) ensaios de proficiência neste analito.

### 2.2 Preparação do experimento e análise de dados

Validação de métodos, tal como hoje exigida por organismos normalizadores internacionais, requer experimentação e testes estatísticos de hipóteses referentes a cada requisito testado.

Então, os principais métodos usados na verificação foram cálculo de estatísticas básicas, regressão linear, estatísticas F de Snedecor, testes T-Student e modelo a um critério de classificação com respectivo erro para obtenção de um desvio padrão do tipo erro quadrático médio de modelagem. O nível de significância máximo considerado foi de 5% ( $p < 0,05$ ). Todos estes métodos são amplamente conhecidos e facilmente encontrados nos livros de estatística experimental, regressão e probabilidades.

O programa *Statgraphics* (MANUGISTICS, 1993) foi utilizado para o ajuste de modelos de regressão e delineamento, gráficos e cálculo de estatísticas básicas.

Realizou-se ensaio cego, aleatorizado, gerado no *Statgraphics* de acordo com a distribuição amostral correspondente a uma amostra aleatória simples sem reposição. Iniciou-se o experimento com 16 concentrações de contaminante (OTA) preparadas conforme Brasil (1999). Posteriormente, foram adicionadas as concentrações 300 e 400  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  e se complementou a geração.

Os requisitos de validação empregados foram da norma *International Organization for Standardization, International Electrotechnical Commission, ISO/IEC 17025 (ISO/IEC 2005)* implementados segundo Thompson, Stephen e Wood (2002), Eurachem (1998), e Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO 2007).

Incerteza de medição e incerteza do ponto de vista de obtenção de limites para verificação de conformidade em geral não foram alvo deste trabalho por estarem em discussão e justificarem artigo específico.

## 3 Resultados e discussões

### 3.1 Panorâmica das medições

Na Figura 1a, com todas as concentrações, pode-se notar comportamento pretensamente aberrante de cinco resultados de medição e uma faixa linear pouco clara. Já a Figura 1b, com remoção de valores aberrantes e das duas maiores concentrações, demonstrou comportamento de crescimento mais regular que a anterior. Apesar da remoção dos valores aberrantes, novos valores deste tipo surgiram na Figura 1b, que não foram confirmados em itens a seguir.

### 3.2 Sensibilidade

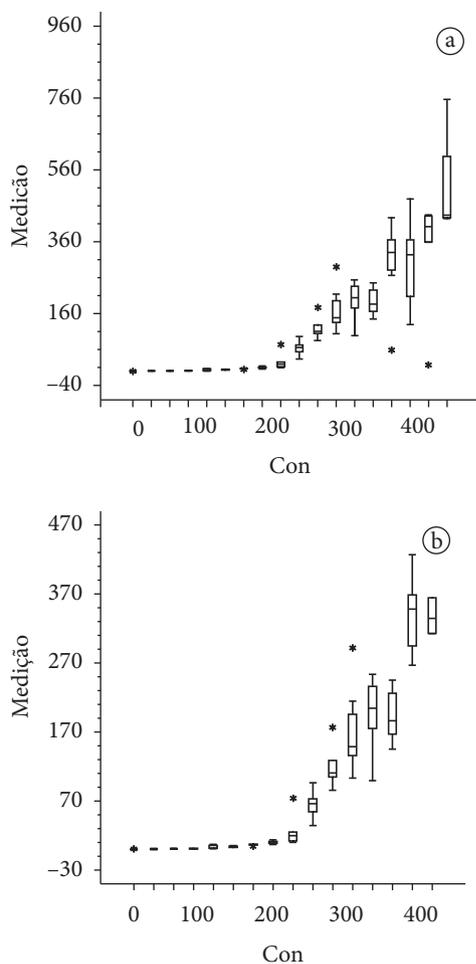
De acordo com os resultados da Tabela 1, houve efeito significativo de concentrações dos padrões do analito ( $F = 42,692$ , significativo  $p < 0,05$ ). Assim, o método se mostrou sensível a diversas concentrações do analito (ocratoxina A, ou OTA).

No que se refere aos parâmetros da curva (reta) de calibração, foi observado valor significativo do modelo de regressão, Tabela 2 ( $F = 6032,480$ ,  $p < 0,05$ ). A falta de ajuste não foi significativa, de modo que não houve interferência de fatores externos na regressão.

Adicionalmente, o intercepto não diferiu significativamente de zero, deste modo a curva passa pela origem, e o valor do coeficiente linear não diferiu significativamente de 1. Assim, o método respondeu com intercepto e coeficiente compatíveis ao esperado no decorrer do crescimento do analito.

### 3.3 Limites de detecção e quantificação

Limites de detecção e quantificação foram obtidos conforme a literatura, Tabela 3, porém estes limites são teóricos, sendo preciso comprovar que eles são atingidos, se realmente há



**Figura 1.** Desenho esquemático de todas as medições segundo concentrações de ocratoxina A (Con) adicionadas até ~900  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  (a) e até 400  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  (b).

**Tabela 1.** Sensibilidade inicial das medições.

C.V.	GL	SQ	QM	F
Concentrações	15	1788357,0	119223,80	42,692 *
Resíduo	97	270885,7	2792,64	
Total	112	2059242,7		

C.V.: causas de variação; GL: graus de liberdade; SQ: soma de quadrados; QM: quadrado médio; F: F Snedecor.

**Tabela 2.** Resultados da curva de calibração.

Parâmetro	Estimativa	Desvio padrão	T-Student
Intercepto	0,0000001	0,0790538	0,000001
Coeficiente	1,00	0,0128751	77,669 *

C.V.	GL	SQ	QM	F
Modelo	1	426,4000	426,4000	6032,480 *
Falta de ajuste	3	0,1525332	0,0508444	0,702420
Erro	35	2,533460	0,072385	
Resíduos	38	2,685993	0,070684	
Total	39	429,08598		

C.V.: causas de variação; GL: graus de liberdade; SQ: soma de quadrados; Coeficiente de determinação = 99,37%; Erro padrão estimado= 0,265865; QM: quadrado médio; F: F Snedecor.

mudança de comportamento, por exemplo, após 0,65. No entanto, de acordo com a Tabela 4, estaria ocorrendo medição até 0,489.

Na realidade, o que se nota até  $0,489 \mu\text{g.kg}^{-1}$  é superestimação significativa do real valor do analito. Essa irregularidade significativa inverteu seu sentido ao redor de  $1,6 \mu\text{g.kg}^{-1}$ . Isto pode ser explicado por uma região estacionária, na qual o analito não pode ser devidamente medido, que é seguida de uma fase de crescimento do tipo exponencial.

Assim, é possível que o real limite de quantificação esteja entre 0,489 e  $1,59 \mu\text{g.kg}^{-1}$ . Os limites inferior e superior de quantificação serão discutidos em outros itens.

### 3.4 Vício nas concentrações

De acordo com a Tabela 4, foram detectados vícios significativos nas regiões estudadas até 0,489. Assim, conforme as figuras 1a e 1b, ocorreu superestimação do teor do analito, que se seguiu de subestimação aos  $1,59 \mu\text{g.kg}^{-1}$ . Isto confirma a possibilidade já mencionada de uma fase estacionária cujo limite de quantificação deve se encontrar próximo de  $1,59 \mu\text{g.kg}^{-1}$ , pois, embora haja vício neste ponto, o vício trocou de sinal.

Na região até 1,59, não foram significativas as diferenças de desvios padrão,  $F_{\text{até } 1,59} = 1,970669566$ . No entanto, na comparação da variância a 1,59 com aquela aos  $3,97 \mu\text{g.kg}^{-1}$ , foi obtido  $F_{1,59 \times 3,97} = 24,63527828$ ,  $p < 0,05$ , significativo, indicando uma região de troca de precisão.

No espaço entre 3,97 e 400, os sinais dos vícios se alteraram e a quantidade de vício significativo foi desprezível. Este

comportamento denota faixa de desenvolvimento de medição, ou seja, faixa de trabalho.

Nas regiões superiores a  $400 \mu\text{g.kg}^{-1}$ , foram detectados vícios altos e significativos, positivos, em sequência, o que pode significar que a fase estacionária referente ao limite superior da faixa de trabalho já tenha sido alcançada. Isto será confirmado posteriormente.

Foi, então, obtido um comportamento esperado de um sistema de medição analítico potencialmente válido.

### 3.5 Linearidade

Diversas regiões foram testadas como faixa de trabalho a partir dos vícios anteriormente detectados.

Considerando-se todas as observações, foi obtido um ajuste linear significativo, Tabelas 5 e 6, porém foi obtida uma falta de ajuste também muito significativa. O intercepto foi de 29,4955, significativo e muito alto, logo uma reta inconcebível em validação, porque a reta deveria ter intercepto baixo e não significativo.

Iniciando-se a busca do limite inferior da faixa de trabalho na região até  $15,94 \mu\text{g.kg}^{-1}$ , o modelo foi significativo, a falta de ajuste não o foi e o intercepto tampouco. Reduzindo-se essa região até  $8,01 \mu\text{g.kg}^{-1}$ , o modelo foi significativo, a falta de ajuste também, o que não é aceitável, e o intercepto não o foi. No entanto, a margem de erro se reduziu drasticamente. O

**Tabela 3.** Estatísticas básicas,  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  e limites de detecção e quantificação teóricos.

Concentração	$\bar{x}$	S	LD	LQ
0	0	0,21689	0,65067	1,08445

$\bar{x}$ : média, s: desvio padrão, LD: limite de detecção, LQ: limite de quantificação.

coeficiente de regressão nestes dois casos foi suficientemente próximo de 1, mas o limite inferior, dada a falta de ajuste, ainda não parece próximo.

Reduzindo-se novamente a região estacionária inferior, trabalhando-se até  $5,2 \mu\text{g.kg}^{-1}$ , o modelo de regressão continuou significativo, Tabelas 5 e 6, mas a falta de ajuste não se mostrou significativa e a margem de erro tornou a demonstrar decréscimo drástico, atingindo menos que 10% do erro obtido no primeiro ajuste, com qualidade global de modelagem relativamente boa. Assim, o limite inferior da faixa de trabalho pôde ser considerado inferior a  $5,2 \mu\text{g.kg}^{-1}$ .

Testando-se então a parte superior da faixa de trabalho, o modelo linear foi significativo até  $956 \mu\text{g.kg}^{-1}$ , porém com falta de ajuste significativa, elevada margem de erro e baixa qualidade de regressão. Já na faixa até  $400 \mu\text{g.kg}^{-1}$ , a situação pouco mudou, embora tenha tido um coeficiente de regressão significativo e próximo de 1. Até  $300 \mu\text{g.kg}^{-1}$ , também houve nova redução de margem de erro, coeficiente de regressão aceitável e manutenção da qualidade da regressão.

Testando-se o intervalo de 1,59 até  $300 \mu\text{g.kg}^{-1}$ , foi também obtido modelo significativo e coeficiente de regressão próximo de 1, significativo, porém ainda houve falta de ajuste significativa.

Finalmente, testando-se a faixa de 1,59 até  $220 \mu\text{g.kg}^{-1}$ , foi obtido modelo significativo e falta de ajuste não significativa, assim, não se obteve interferência de outros agentes (externos) além do crescimento do valor medido em relação ao analito. Ainda, foi obtida boa qualidade global de ajuste e um decréscimo de aproximadamente 90% da margem de erro obtida até  $956 \mu\text{g.kg}^{-1}$ .

Deste modo houve uma resposta linear da medição ao analito, significativa, Tabelas 5 e 6, positiva, com coeficiente linear

**Tabela 4.** Investigação de vício nas médias das medições segundo concentrações ( $\mu\text{g.kg}^{-1}$ ) adicionadas através do teste de t-Student (T).

Conc	n	Média	Variância	Desv. pad.	T	RSD
0,00	10	0,10200	0,04704	0,21689	-1,48717	212,63725
0,106	7	0,53014	0,07372	0,27151	-4,13000 *	51,21477
0,204	7	0,64871	0,06666	0,25818	-4,55725 *	39,79899
0,489	7	1,00521	0,07070	0,26590	-5,13638 *	26,45218
1,59	8	1,42281	0,03741	0,19341	2,44499 *	13,59352
3,97	7	3,78486	0,92155	0,95997	0,51026	25,36342
6,39	9	6,39472	1,63986	1,28057	-0,01106	20,02543
8,01	5	9,99670	6,44377	2,53846	-1,75004	25,39298
15,94	4	17,0211	46,4364	6,81442	-0,31730	40,03513
63,76	9	64,7378	314,411	17,7316	-0,16543	27,38987
120,16	4	107,401	318,731	17,8530	1,42934	16,62275
160,21	11	154,833	1167,28	34,1654	0,52198	22,06597
204,35	7	212,206	1143,33	33,8131	-0,61470	15,93409
220,70	6	184,901	805,131	28,3748	3,09039 *	15,34594
300,00	7	340,120	2859,34	53,4728	-1,98508	15,72175
400,00	4	372,825	5472,01	73,9730	0,73473	19,84121
801,05	5	406,037	934,913	30,5763	28,88760 *	7,53042
956,36	3	430,708	47,8404	6,91667	131,63213*	1,60588

Conc: concentração, n: número de repetições, Desv. pad.: desvio padrão; \*: significativo  $p < 0,05$ , RSD: desvio padrão relativo.

**Tabela 5.** Resultados do ajuste do modelo linear.

	C. V.	GL	SQ	QM	F
Teor $\leq$ 5,2	Modelo	1	62,93237	62,93237	298,2645 *
Coefdet% = 87,14	Falta de ajuste	4	1,8028009	0,4507002	2,409844
Corr = 0,933512	Erro puro	40	7,480987	0,187025	
ErPad = 0,459342	Resíduos	44	9,283788	0,210995	
	Total	45	72,216161		
Teor $\leq$ 8,01	Modelo	1	543,14573	543,14573	495,3342 *
Coefdet% = 89,52	Falta de ajuste	6	17,223444	2,870574	3,21876 *
Corr = 0,94614	Erro Puro	52	46,374933	0,891826	
ErPad = 1,04715	Resíduos	58	63,598377	1,096524	
	Total	59	606,74411		
Teor $\leq$ 15,94	Modelo	1	1312,7241	1312,7241	401,062 *
Coefdet% = 86,61	Falta de ajuste	7	17,249413	2,464202	0,72990
Corr = 0,93065	Erro puro	55	185,68405	3,37607	
ErPad = 1,80918	Resíduos	62	202,93347	3,27312	
	Total	63	1515,6576		
Todas	Modelo	1	1883287,1	1883287,1	499,0 *
Coefdet% = 80,87	Falta de ajuste	16	382009,31	23875,58	38,3 *
Corr = 0,899251	Erro puro	102	63622,929	623,754	
ErPad = 61,4536	Resíduos	118	445632,24	3776,54	
	Total	119	2328919,3		
Até 956	Modelo	1	902313,51	902313,51	174,3 *
Coefdet% = 73,45	Falta de ajuste	9	262585,21	29176,13	24,8 *
Corr = 0,85702	Erro puro	54	63602,329	1177,821	
ErPad = 71,9554	Resíduos	63	326187,54	5177,58	
	Total	64	1228501,0		
Até 400	Modelo	1	694577,92	694577,92	460,2 *
Coefdet% = 89,32	Falta de ajuste	7	23241,005	3320,144	2,67 *
Corr = 0,945119	Erro puro	48	59766,996	1245,146	
ErPad = 38,8489	Resíduos	55	83008,001	1509,236	
	Total	56	777585,92		
Até 300	Modelo	1	510113,15	510113,15	419,9 *
Coefdet% = 89,17	Falta de ajuste	6	18608,337	3101,390	3,22 *
Corr = 0,944295	Erro puro	45	43350,964	963,355	
ErPad = 34,8552	Resíduos	51	61959,301	1214,888	
	Total	52	572072,45		
1,59 $\leq$ Teor $\leq$ 300	Modelo	1	849129,02	849129,02	1017,2 *
Coefdet% = 93,13	Falta de ajuste	9	19238,469	2137,608	3,25 *
Corr = 0,965055	Erro puro	66	43369,874	657,119	
ErPad = 28,8925	Resíduos	75	62608,343	834,778	
	Total	76	911737,36		
1,59 $\leq$ Teor $\leq$ 220	Modelo	1	427849,89	427849,89	894,1 *
Coefdet% = 92,93	Falta de ajuste	8	6325,1246	790,6406	1,810
Corr = 0,964014	Erro puro	60	26213,861	436,898	
ErPad = 21,875	Resíduos	68	32538,986	478,515	
	Total	69	460388,87		

Teor: teor de contaminação ( $\mu\text{g.kg}^{-1}$ ), C.V.: causas de variação, GL: graus de liberdade, SQ : soma de quadrados, ErPad: erro padrão, Corr: correlação, Coefdet%: coeficiente de determinação.

**Tabela 6.** Parâmetros e estatísticas obtidas nos ajustes lineares.

	Parâmetro	Estimativa	Erro Padrão	T
Teor $\leq$ 5,2	Intercepto	0,322514	0,0839059	3,84376 *
	Coeficiente	0,85351	0,0494206	17,2703 *
Teor $\leq$ 8,01	Intercepto	0,140072	0,177362	0,78975
	Coeficiente	1,0672	0,0479507	22,2561 *
Teor $\leq$ 15,94	Intercepto	0,150323	0,283998	0,52931
	Coeficiente	1,06153	0,053006	20,0265 *
Todas	Intercepto	29,4955	6,57611	4,48525 *
	Coeficiente	0,562279	0,0251791	22,3311 *
Até 956	Intercepto	77,2403	12,5756	6,14208 *
	Coeficiente	0,467837	0,0354388	13,2013 *
Até 400	Intercepto	-1,78991	9,25219	-0,193458
	Coeficiente	1,00291	0,0467496	21,4527 *
Até 300	Intercepto	-8,51763	8,98763	-0,947706
	Coeficiente	1,06242	0,051848	20,4911 *
1,59 $\leq$ Teor $\leq$ 300	Intercepto	-3,48269	4,68151	-0,743926
	Coeficiente	1,03804	0,0325471	31,8934 *
1,59 $\leq$ Teor $\leq$ 220	Intercepto	1,60053	3,67703	0,435277
	Coeficiente	0,937375	0,0313484	29,9019 *

Teor : teor de contaminação ( $\mu\text{g.kg}^{-1}$ ), T: T-Student.

muito próximo de 1 e intercepto não significativo, portanto a reta se comportou da forma esperada e passou pela origem.

Assim, a faixa de trabalho do método deve estar compreendida entre 0,489 e 1,59  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ , como limite inferior, e entre 220 e 300  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ , como limite superior, e aderiu a uma função linear.

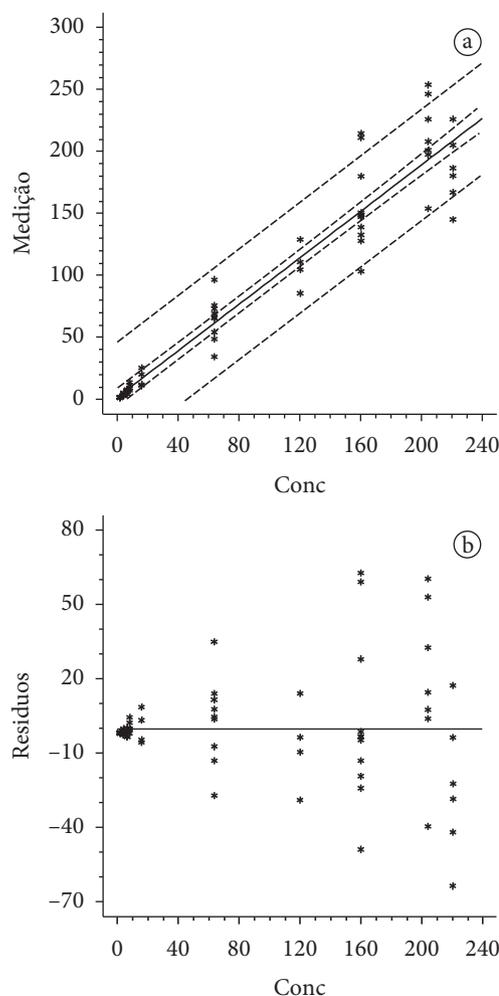
#### Confirmações: valores aberrantes e limite de quantificação

Anteriormente, as Figuras 2a e 2b trouxeram diversos candidatos a valores aberrantes, cinco deles foram obtidos após extração daqueles verificados em 2a, por exemplo, aos 300  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ . No entanto, após o ajuste do modelo linear, quatro outros valores, Figura 3a, poderiam ser considerados aberrantes. Porém, a Figura 1b não os apresenta como tal.

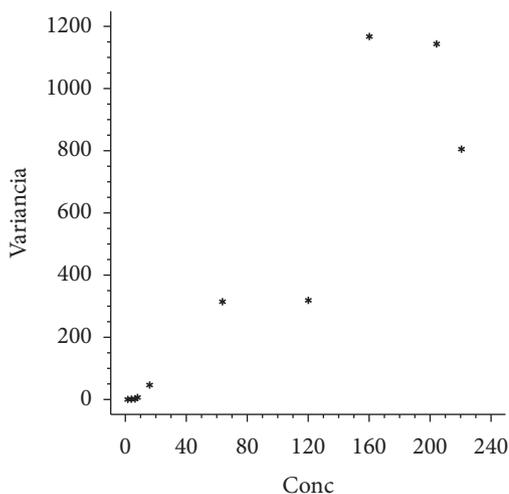
O comportamento observado na Figura 3b é do tipo em leque, bastante conhecido e admitido como fator que não invalida um método (apud THOMPSON; STEPHEN, WOOD, 2002). Foram realizadas transformações normalizantes da família de Box-Cox e foi ajustado o modelo regressivo nos erros, porém nenhuma destas duas tentativas trouxe melhora substancial ao modelo anterior – a redução da margem de erro foi de somente 3%.

Ainda, pelo tipo de conformação espacial na Figura 3b, não resultaram confirmados os pretensos valores aberrantes que foram destacados como tal na Figura 3a.

Ficou, então, estabelecido como o melhor ajuste obtido o juste linear, e a faixa de trabalho com limites entre 0,489 e 1,59  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ , como limite inferior, e entre 220 e 300  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ , como limite superior.



**Figura 2.** Reta ajustada e medições realizadas (a) segundo concentrações de ocratoxina A (Conc) adicionadas,  $\mu\text{g/kg}$ , e resíduos do ajuste (b).



**Figura 3.** Variâncias nas medições segundo concentrações (Conc,  $\mu\text{g/kg}$ ) de ocratoxina A.

Essa faixa de trabalho pode ser limitada pelo real valor do limite de quantificação, ainda não testado experimentalmente.

Uma vez que, neste trabalho, o valor estimado  $1,08 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  para o limite de quantificação não diferiu significativamente ( $T = 1,16$ ) do limite teórico propagado pela legislação  $1 \mu\text{g}\cdot\text{Kg}^{-1}$ , The Commission of the European Communities, EC 1881 (EC 2007), e a primeira concentração do analito superior a estes limites, 1,59, como mencionado anteriormente, obteve medição satisfatória, é possível que o real limite de quantificação esteja entre 1 e aproximadamente  $1,59 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ .

### 3.6 Variações nas medições segundo contaminação e desvios padrão

Como mencionado anteriormente, as variações medições obtidas ao longo do eixo do analito aumentaram substancialmente. Isto já foi mostrado na Figura 2b. Na Figura 3 isto novamente é notado, mas não ficou estabelecido nenhum padrão diferente do esperado nas variâncias estimadas (e respectivos desvios padrão), conforme mencionado em 3.5.

Adicionalmente, a mesma conformação de variância/desvio padrão (imprecisão, etc.) é claramente corroborada em café verde no *Ministry of Agriculture, Livestock and Supply* (2006), ou seja, no mesmo material empregado neste artigo. Ainda, com o mesmo tipo de matriz e método, Vargas, Santos e Pittet (2005), bem como Entwisle et al. (2001), em café torrado, também encontraram a mesma tendência nas variâncias.

Logo, não foi notado nada nos desvios padrão ou desvios padrão relativos que implicasse invalidade do ponto de vista metrológico. Um desvio padrão válido na faixa de trabalho como um todo, que resultaria em  $x \pm 20,90$ , não seria razoável, especialmente no início da faixa de trabalho e frente à utilização dos limites legais, que são abaixo de  $20 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ . Portanto optou-se por admitir como estimativa nas vizinhanças de cada concentração estudada, o desvio padrão amostral correspondente à ponderação das variâncias/desvios padrão que limitam a concentração de interesse (Tabela 4) para exprimir intervalos e imprecisão.

### 3.7 Adequação ao uso e ensaios de proficiência em café

Para ter utilidade frente à legislação internacional, é necessário que o método demonstre bom comportamento nas vizinhanças de 5 e  $10 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ , isto já foi demonstrado pela ausência de vício aos 3,97 e 6,39, bem como em 8,01 e 15,94. Adicionalmente, o laboratório obteve *performance* satisfatória neste método em 90% de 63 medições (MINISTRY OF AGRICULTURE, LIVESTOCK AND SUPPLY, 2006), incluindo-se, às vezes, valores de ordem 1, 2, 5,  $13 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  e outros. Portanto, o laboratório tem condições de atender a medições em regiões próximas ao limite inferior de quantificação e regiões estratégicas como as previstas pela legislação internacional.

Não se pôde obter comparações sobre a performance do laboratório em termos de precisão na forma de erro puro conforme 3.5, porque os ensaios de proficiência disponíveis já

mencionados realizaram subamostragem, com duas medições/unidade amostral, não independentes, enquanto os presentes experimentos tiveram dupla leitura e o número de observações independentes/concentração (1 medição/unidade amostral) variou de 3 a 10, conforme Tabela 4.

Porém o *Ministry of Agriculture, Livestock and Supply* (2006) em seus testes de proficiência reporta variações de 22% entre *duplicatas* – com duas medições/unidade amostral, não independentes.

Finalmente, revendo-se a Tabela 4, deve-se notar que os desvios padrão relativos encontrados na faixa de trabalho, excetuando-se a concentração de  $15,94 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  de ocratoxina A, foram obtidos de valores que se encaixam nos valores dos experimentos de precisão de Vargas, Santos e Pittet (2005), também realizado em café verde, e de Entwisle et al. (2001) para café torrado.

Portanto, admitindo-se algum eventual problema na concentração  $15,94 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ , não foram encontradas evidências de problemas de precisão que afetassem a performance do laboratório no método estudado.

## 4 Conclusões

De acordo com os dados obtidos e analisados pôde-se concluir que:

- Valores aberrantes obtidos em diversas fases da validação não foram confirmados.
- Conforme esperado, foi obtido comportamento sigmóide na extensão do analito.
- Os limites teóricos de detecção e quantificação foram estimados conforme 0,65067 e 1,08445, que não foram descartados após a presente validação.
- A faixa de trabalho ficou estabelecida entre 0,489 e  $1,59 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ , como limite inferior, e entre 220 e  $300 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ , como limite superior.
- A linearidade pôde ser admitida na faixa de trabalho, não rejeitou intercepto na origem e coeficiente linear 1,00.
- O comportamento da regressão linear foi o esperado.
- A tendência encontrada nos desvios padrão é normalmente aceita pela comunidade científica e foi notada também nos dois ensaios colaborativos envolvendo o mesmo método em café.
- Nada que implicasse invalidade foi obtido nos desvios padrão relativos das medições com o uso deste método.
- Pôde-se admitir o laboratório como competente na medição de ocratoxina A no que se refere a ter apresentado limites de detecção e quantificação teóricos suficientemente baixos frente a valores de interesse legal, faixa de trabalho sem vícios significativos, linearidade razoável, com falta de ajuste não significativa, qualidade global satisfatória e tendência esperada.

## Agradecimentos

A André P. Montello pelas análises realizadas e ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento pelo fornecimento do material.

## Referências bibliográficas

- ANGSUBHAKORN, S. Mycotoxins and human health risks an overview. In: SEMPLE, R. L. et al. (Eds.). **Mycotoxin prevention and control in foodgrains**. Rome: FAO, 1989. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/x5036e/x5036E05.htm#Mycotoxins%20and%20human%20health%20risks%20an%20overview>>. Acesso em: 01 maio 2008.
- Associação Brasileira de Normas Técnicas; International Organization FOR Standardization; INTERNATIONAL ELETROTECHNICAL COMMISSION. **NBR/ISO/IEC 17025**. Requisitos gerais para competência de laboratórios de ensaio e calibração. Rio de Janeiro, 2005. 28 p.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Portaria n. 49, de 3 de setembro de 1999. Preparo de soluções padrões de aflatoxinas, ocratoxina A, zearalenona, tricotecenos e fumonisina B1. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 15 set. 1999. Seção 1, p. 27.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n. 9, de 24 de março de 2000. Aprova os métodos analíticos de referência para análise de micotoxinas em produtos, subprodutos e derivados de origem vegetal. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 30 mar. 2000. Seção 1, p. 35. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=7336>>. Acesso em: 19 jul. 2007.
- BRASIL. Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior. Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial – INMETRO. **DOQ-CGRE-008**. Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos. Rio de Janeiro, 2007. 25 p. (rev. 2).
- ENGORMIX. Ocratoxina A: la Unión Europea fija limites en el consumo de ocratoxina A. **Diario del Agro**, Santiago, 01 set. 2006. Disponível em: <[http://64.76.120.161/s\\_news\\_view.asp?news=9035&AREA=MYC](http://64.76.120.161/s_news_view.asp?news=9035&AREA=MYC)>. Acesso em: 18 jul. 2007.
- ENTWISLE, A. C. et al. Combined phenyl silane and immunoaffinity column cleanup with liquid chromatography for determination of ochratoxin A in roasted coffee: collaborative study. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, v. 84, n. 2, p. 444-450, 2001.
- EURACHEM. **The fitness for purpose of analytical methods: a laboratory guide to method validation and related topics**. Teddington, 1998. 61 p.
- HSIEH, D. P. H. Potential human health hazards of mycotoxins. In: NATORI, S.; HASHIMOTO, K.; UENO, Y. (Eds.). **Mycotoxins and phycotoxins**. Amsterdam: The Nethes, 1988.
- International Organization FOR Standardization; INTERNATIONAL ELETROTECHNICAL COMMISSION. **ISO/IEC 17025**. General requirement for the competence of testing and calibration laboratories. Genève, 2005.
- LI, F.; JI, R. Ochratoxin A and human health. **Wei Sheng Yan Jiu**, v. 32, n. 2, p. 172-175, 2003.
- MANUGISTICS. **Statgraphics reference manual**. Rockville, 1993. p. S117-S129.
- MINISTRY OF AGRICULTURE, LIVESTOCK AND SUPPLY. **Proficiency test final report: determination of ochratoxin a in green coffee by immunoaffinity column cleanup and lc/tlc**. Belo Horizonte, 2006. 24 p.
- SARTORI, D. **Marcadores moleculares para detecção de espécies de Aspergillus produtores de ocratoxina A em grãos de café**. Londrina, 2005, 97 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina – UEL.
- THE COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES. Commission regulation EC 1881, Setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. **Official Journal of the European Union**, n. 1881, p. L173/6-L173/9. Disponível em: <[http://eurlex.europa.eu/LexUriServ/site/en/oj/2006/l\\_364/l\\_36420061220en00050024.pdf](http://eurlex.europa.eu/LexUriServ/site/en/oj/2006/l_364/l_36420061220en00050024.pdf)>. Acesso em: 22 nov. 2007.
- THOMPSON, N.; STEPHEN, L. R.; WOOD, R. Harmonized guidelines for the single laboratory validation of methods of analysis. **Pure and Applied Chemistry**, v. 74, n. 5, p. 835-855, 2002. (IUPAC Technical Report)
- VARGAS, E. A.; SANTOS, E. A.; PITTET, A. Determination of ochratoxin A in green coffee by immunoaffinity column cleanup and liquid chromatography: collaborative study. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, v. 88, n. 3, p. 773-779, 2005.