

# **Avaliação da Qualidade de Presuntos de Suíno, Ovino e Caprino Relativamente à Contaminação por Micotoxinas**

**Diana Raquel Teixeira da Silva**

*Dissertação apresentada à Escola Superior Agrária de Bragança  
para obtenção do Grau de Mestre em Qualidade e Segurança  
Alimentar*

Orientado por

**Professora Doutora Paula Cristina Azevedo Rodrigues**

**Professor Doutor Alfredo Jorge da Costa Teixeira**

Esta dissertação inclui as críticas e sugestões feitas pelo Júri

**Bragança  
2013**

## Agradecimentos

Quero desde já dedicar e agradecer este momento a todos aqueles que se cruzaram no meu caminho académico ao longo destes 5 anos. Estes anos foram passados com momentos muito bons mas também com momentos menos bons. Soltaram-se muitos sorrisos e também muitas lágrimas. No entanto, houve alguém sempre presente que sorriu e que também chorou comigo ou que me secou as lágrimas conseguindo, assim, ultrapassar o dia-a-dia da vida. O meu obrigado de coração a todos!

Agradeço de forma incondicional a todas as pessoas que desde o início desta investigação me impulsionaram para que este projeto se tornasse uma realidade:

À minha Orientadora Professora Doutora Paula Rodrigues que em primeiro lugar aceitou ser minha orientadora e que me apoiou ao longo deste trabalho. Agradeço a disponibilidade, a força e a sabedoria que me transmitiu.

Ao meu Co-orientador Professor Doutor Alfredo Teixeira pela disponibilidade e apoio demonstrado ao longo do trabalho.

Ao Doutor Luís Abrunhosa por todo o apoio prático, conhecimento científico adquirido e pela disponibilidade prestada ao longo do trabalho.

Aos meus Pais e ao meu Irmão pois sem eles jamais seria possível chegar onde cheguei e ser quem sou hoje. Obrigada por nunca desistirem de mim mesmo quando eu senti que as forças enfraqueciam. O vosso amor incondicional e as vossas palavras foram sem dúvida as mais importantes que tive para que nada me fizesse desistir.

À minha família materna e paterna que, de uma forma ou de outra, me encorajou a continuar.

Às minhas verdadeiras amigas sempre presentes Alissandra Anes, Carla Lousas, Delphine Pires e Sandra Dias por todas as palavras reconfortantes que fizeram com que eu levasse a cabo este projeto. Obrigada por ouvirem os meus desabafos e por estarem sempre comigo a cada dia que passa.

## Resumo

A contaminação de produtos cárneos com micotoxinas é um problema com interesse crescente no que respeita à saúde do consumidor. O presunto é um produto cárneo curado com elevado interesse económico para Portugal. No entanto, não existe conhecimento científico quanto à sua segurança em termos de micotoxinas. A ocratoxina A (OTA) e as aflatoxinas (AFs) B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub> são micotoxinas com elevado grau toxigénico que podem ser produzidas no presunto durante o processo de cura por algumas espécies de *Penicillium* e *Aspergillus*, respetivamente.

O presente trabalho teve como principal objetivo detetar e quantificar OTA e AFs em carne fresca, pá curada de suíno e presuntos de ovino e caprino com origem no Nordeste Transmontano. Neste sentido, foram testados vários métodos de extração e limpeza nas duas matrizes em estudo. Foi estudada a validação interna do método selecionado que consiste na extração simultânea das micotoxinas em estudo utilizando uma solução aquosa de metanol, na purificação do extrato com colunas de imunoafinidade e na análise/quantificação das micotoxinas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detecção por Fluorescência (HPLC-FLD).

Foram analisadas 15 amostras de carne fresca de suíno, 14 amostras de pá curada de suíno, 1 amostra de presunto de ovino e 2 amostras de presunto de caprino.

Seis amostras de carne fresca apresentaram contaminação com OTA no entanto nenhuma é quantificável. Das 14 amostras de pá, 3 continham níveis quantificáveis de OTA entre 2,46 µg/kg e 14,74 µg/kg. Apesar de não existir regulamentação europeia que defina os limites máximos para a presença de OTA em produtos cárneos, 3 amostras de pá apresentam valores de OTA quantificáveis que ultrapassam o valor-guia de 1 µg/kg recomendado pelo Governo Italiano. Em nenhuma amostra de pá e presunto foi detetada contaminação por AFs.

Com base nestes resultados, podemos concluir que os produtos cárneos de origem suína apresentam risco para a saúde do consumidor em termos de contaminação com OTA.

## Abstract

Contamination of meat products with mycotoxins is of growing interest concerning consumers' health. Ham is a cured meat product with high economic interest for Portugal. However, there is no scientific knowledge about their safety in terms of mycotoxins. Ochratoxin A (OTA) and aflatoxins (AFs) B1, B2, G1 and G2 are highly toxigenic mycotoxins that may be produced in ham during the curing process by some species of *Penicillium* and *Aspergillus*, respectively.

This study aimed to detect and quantify OTA and AFs in pig fresh meat, shovel cured of pig and hams of ovine and caprine produced in the northeast region of Portugal. In this sense, we tested various methods for extraction and cleaning of OTA and AFs in the matrices under study. Internal validation of the selected method consisted in the simultaneous extraction of mycotoxins in study using an aqueous solution of 60 % methanol, the extract purification with immunoaffinity columns and analysis/quantification of mycotoxins by High Performance Liquid Chromatography with Fluorescence Detection (HPLC - FLD).

We analysed 15 samples of pig fresh meat, 14 samples of shovel cured pig, 1 sample of ovine ham and 2 samples of caprine ham.

Six samples of pig fresh meat were contaminated with OTA however no quantifiable. Of the 14 samples of shovel cured of pig, 3 contained detectable levels of OTA between 2.46 µg/kg and 14.74 µg/kg. Although there are no European regulations that set maximum levels for the presence of OTA in meat products, 3 samples of shovel cured pig showed quantifiable OTA levels exceeding the guideline value of 1 µg/kg recommended by the Italian government. In any sample of shovel and ham was detected AFs contamination.

Based on these results, we conclude that the meat products of porcine origin present a risk to consumer health in terms of contamination with OTA.

---

## Índice

<b>1. Introdução – Enquadramento e Objetivos.....</b>	<b>2</b>
<b>2. Revisão Bibliográfica .....</b>	<b>5</b>
2.1. Importância dos Produtos Cárneos na Região de Trás-os-Montes .....	5
2.2. Problemas de Segurança Alimentar – Fungos e Micotoxinas.....	6
2.3. Micotoxinas.....	7
2.3.1. Ocratoxina A.....	8
2.3.2. Aflatoxinas .....	12
2.4. Controlo das Micotoxinas .....	14
2.5. Métodos de Análise de Micotoxinas .....	15
2.5.1. Determinação de OTA em Carne Fresca e Presunto .....	18
2.5.2. Determinação de AFs em Presunto .....	19
<b>3. Materiais e Métodos .....</b>	<b>21</b>
3.1. Plano de Amostragem .....	21
3.2. Reagentes e Materiais.....	22
3.3. Considerações de Segurança .....	22
3.4. Seleção e Validação de Métodos de Extração e Análise de OTA e AFs .....	23
3.4.1. Extração de OTA .....	23
3.4.1.1. Métodos Testados.....	23
3.4.1.1.1. Método do Acetonitrilo .....	23
3.4.1.1.2. Método do Clorofórmio .....	24
3.4.1.1.3. Método do Metanol I.....	24
3.4.1.1.4. Método do Metanol II .....	25
3.4.1.2. Detecção e Quantificação de OTA.....	25
3.4.1.3. Validação do Método .....	26

---

3.4.1.3.1.	Linearidade.....	26
3.4.1.3.2.	Exatidão e Precisão .....	27
3.4.2.	Extração de AFs .....	31
3.4.2.1.	Métodos Testados.....	31
3.4.2.1.1.	Método do Metanol I.....	31
3.4.2.1.2.	Método do Metanol II .....	32
3.4.2.2.	Deteção e Quantificação de AFs .....	32
3.4.2.3.	Validação do Método .....	33
3.4.2.3.1.	Linearidade.....	33
3.4.2.3.2.	Exatidão e Precisão .....	33
3.5.	Análise de OTA e AFs nas Amostras .....	36
3.5.1.	Preparação das Amostras.....	36
3.5.1.1.	Carne Fresca.....	36
3.5.1.2.	Pá e Presunto .....	36
3.5.2.	Extração e Purificação das Micotoxinas.....	36
3.5.3.	Deteção e Quantificação das Micotoxinas.....	38
<b>4.</b>	<b>Resultados .....</b>	<b>40</b>
4.1.	Seleção e Validação de Métodos.....	40
4.1.1.	Análise de OTA .....	40
4.1.1.1.	Métodos Testados.....	40
4.1.1.2.	Validação do Método .....	43
4.1.2.	Análise de AFs .....	46
4.1.2.1.	Métodos Testados.....	46
4.1.2.2.	Validação do Método .....	47
4.2.	Deteção e Quantificação de Micotoxinas nas Amostras .....	51
4.2.1.	Análise de OTA em Carne Fresca .....	51

---

4.2.2. Análise de OTA e AFs em Pá e Presunto.....	53
<b>5. Discussão .....</b>	<b>55</b>
5.1. Validação do Método de Extração e Detecção de OTA .....	55
5.2. Validação do Método de Extração e Detecção de AFs.....	57
5.3. Detecção e Quantificação de Micotoxinas nas Amostras .....	58
<b>6. Conclusões.....</b>	<b>61</b>
<b>7. Referências Bibliográficas .....</b>	<b>63</b>

---

## Índice de Quadros

Quadro 1 - Resultados obtidos para os vários métodos testados para extração de OTA, em termos de taxa de recuperação (TR), média, desvio-padrão ( $SD_r$ ) e desvio-padrão relativo ( $RSD_r$ ).....	42
Quadro 2 - Parâmetros de Calibração para OTA.....	43
Quadro 3 - Desempenho e Precisão do Método de Extração de OTA .....	45
Quadro 4 - Resultados obtidos para os vários métodos testados para extração de AFs, em termos de taxa de recuperação (TR), média, desvio-padrão ( $SD_r$ ) e desvio-padrão relativo ( $RSD_r$ ).....	46
Quadro 5 - Parâmetros de Calibração para AFs .....	48
Quadro 6 - Desempenho e Precisão do Método de Extração de AFs.....	49
Quadro 7 - Contaminação de OTA em Carne Fresca.....	51
Quadro 8 - Contaminação de OTA e AFs em Pá e Presunto.....	53

## Índice de Figuras

Figura 1 - Esquema do procedimento de extração, purificação e quantificação de OTA e AFs .....	37
Figura 2 - Cromatograma da solução-padrão de OTA correspondente à concentração 10 ng/mL. ....	43
Figura 3 - Cromatograma do <i>Spiking</i> 10 µg/kg de OTA em Carne Fresca .....	44
Figura 4 - Cromatograma do <i>Spiking</i> 10 µg/kg de OTA em Presunto .....	44
Figura 5 - Cromatograma da solução-padrão de AFs correspondente à concentração 10 ng/mL. ....	47
Figura 6 - Cromatograma do <i>Spiking</i> 10 µg/kg de AFs em Presunto.....	48

# Capítulo 1

## 1. Introdução – Enquadramento e Objetivos

A Região de Trás-os-Montes é caracterizada pela produção de uma grande variedade de produtos cárneos tradicionais. É uma região rica em várias raças animais e nesse sentido as empresas tentam obter novos produtos nomeadamente produtos curados de elevada aceitação no mercado.

Estes produtos são de elevada importância na região transmontana, que para além de constituírem uma marca da cultura e da etnografia nacional, são um património socioeconómico muito importante para a sustentabilidade do meio rural e da economia local, gerando independência económica, emprego e modos de subsistência autónomos. O fabrico e comércio de produtos curados estão entre as manifestações da cultura popular mais perenes em Portugal.

Atualmente, a Segurança Alimentar surge como uma das principais preocupações da indústria alimentar. Nas últimas décadas tem-se verificado uma maior exigência por parte dos consumidores no sentido de quererem alimentos com maior qualidade. A contaminação de alimentos com micotoxinas causa forte preocupação devido aos seus potenciais efeitos genotóxicos e potencialmente carcinogénicos e, ainda, aos eventuais efeitos aditivos ou sinérgicos que poderão resultar da sua combinação num mesmo alimento. Assim, a quantificação de micotoxinas em alimentos bem como a caracterização dos seus efeitos genotóxicos assume grande relevância em termos de saúde pública.

Este estudo surge no âmbito do Projeto PRODER "BISOVICAP - Novos Produtos: Processamento de carnes de suíno, ovino e caprino, para a produção de novos produtos: Presunto e paté".

O consórcio promotor do Projeto é constituído pela Bísaro, Salsicharia Tradicional e o co-promotor ESA-IPB, representado pelo Laboratório de Tecnologia e Qualidade da Carça e da Carne (LTQCC). O principal objetivo é a obtenção de novos produtos de carne transformados, como presunto de perna de ovino e caprino, presunto desossado e fatiado de porco Bísaro e paté de carne de ovino e caprino.

Das várias estratégias definidas, o projeto visa contribuir para a sustentabilidade da economia regional, através da elaboração de dois novos produtos de origem animal, baseados na utilização de carne de ovino e caprino de animais com peso e idade fora dos limites de comercialização como carne fresca com marcas de Denominação de Origem Protegida (DOP) ou Indicação Geográfica Protegida (IGP).

Pretende-se também estudar a composição química e os parâmetros físicos, sensoriais e microbiológicos e a sua utilização na rastreabilidade dos produtos, de forma a garantir a sua qualidade organolética e segurança alimentar bem como corresponder a uma crescente procura de alimentos que utilizam técnicas de produção e elaboração que garantem a qualidade e a uma filosofia de tentar sempre oferecer os melhores alimentos de uma região tradicionalmente rica em produtos com denominação de origem.

No âmbito do citado projeto desenvolveu-se o presente estudo que teve como objetivo avaliar a qualidade de pás curadas de suíno e presuntos de ovino e caprino relativamente à contaminação por micotoxinas.

# Capítulo 2

## **2. Revisão Bibliográfica**

### **2.1. Importância dos Produtos Cárneos na Região de Trás-os-Montes**

Os produtos de transformação cárnea apresentam uma grande variedade de sabores, texturas e formas, como resultado da diversidade das matérias-primas, dos ingredientes e dos processos de fabrico utilizados. O termo “salsicharia” é mundialmente conhecido e engloba todos os produtos de transformação cárnea. Destes fazem parte não só os enchidos mas também todas as carnes curadas como as pás, os presuntos, entre outros. Em Portugal é utilizada, predominantemente, a carne de porco.

Nos últimos anos a indústria de salsicharia tem vindo a apresentar um apreciável incremento, expresso no elevado número de estabelecimentos fabris instalados e na variedade de produtos existentes. Alguns destes produtos poderão não apresentar as características dos produtos genuínos, apesar de subsistirem ainda, principalmente nos meios rurais, os chamados produtos tradicionais.

Os produtos tradicionais portugueses são produtos únicos pelas suas matérias-primas e conhecimentos aplicados, bem como pelo uso e práticas de produção, consumo e distribuição e que na atualidade recebem, entre outras, as denominações de produtos locais, tradicionais, artesanais ou regionais.

A produção de alimentos tradicionais deverá ser enquadrada segundo as exigências atuais de higiene/salubridade e necessita de estar de acordo com a legislação em vigor imposta para este ramo de atividade, tanto a nível dos ingredientes como dos processos de fabrico.

O objetivo destas normas ou padrões é o de manter uma qualidade constante dos produtos. Adicionalmente, o consumidor poderá ter acesso a uma informação mais detalhada sobre os produtos, tal como a identificação dos ingredientes usados no seu fabrico. Este tem vindo a dar cada vez mais importância à segurança dos alimentos.

## 2.2. Problemas de Segurança Alimentar – Fungos e Micotoxinas

Segurança alimentar é um conjunto de normas de produção, transporte e armazenamento de alimentos visando determinadas características físico-químicas, microbiológicas e sensoriais, segundo as quais os alimentos são adequados ao consumo.

Na garantia de um alimento saudável temos que ter em conta o conceito “perigos”. Estes podem ser de várias origens nomeadamente físicos, químicos e biológicos.

Entre os perigos de origem biológica as partículas fúngicas são as principais causas de deterioração de produtos cárneos curados (Asefa et al., 2010). O ar tem sido relatado como a principal fonte de esporos de fungos contaminantes de produtos cárneos curados (Asefa et al., 2010). A qualidade das matérias-primas e fatores físicos como temperatura e atividade de água (aw) foram descritos como fatores importantes para o crescimento de fungos na superfície destes produtos (Asefa et al., 2010). As práticas de fabrico, tais como a salga e a fumagem são reconhecidas por influenciarem os tipos de crescimento de fungos em produtos cárneos curados, nas fases de pré-maturação e amadurecimento (Asefa et al., 2010).

O crescimento de microrganismos, como bactérias, leveduras e bolores pode pôr em risco a segurança e qualidade dos produtos alimentares e causar perdas económicas significativas (Asefa et al., 2010). O crescimento de fungos indesejáveis pode levar a efeitos económicos indesejáveis para os produtores, aumentando o custo de produção e perdas de produtos, mas pode também representar um potencial perigo para a saúde dos consumidores, se os fungos contaminantes forem patogénicos ou tóxicos (Asefa et al., 2010). Tais impactos podem ser minimizados, reduzindo o seu crescimento sobre os produtos (Asefa et al., 2010). Isso requer a identificação de fungos associados aos produtos, as suas fontes importantes e os fatores que facilitam o seu crescimento (Asefa et al., 2010).

Geralmente, os bolores ocorrem em alimentos com baixo teor de água e/ou elevada quantidade de lípidos (Asefa et al., 2010). São elementos microbianos encontrados em todos os lugares, seja na água, no ar ou no solo (Asefa et al., 2010). Existem milhares de espécies de fungos e dentre estes milhares, algumas espécies atacam ou apenas

sobrevivem em produtos agrícolas (Asefa et al., 2010). Alguns destes fungos possuem a capacidade de produzir toxinas, chamadas de micotoxinas (Asefa et al., 2010).

### **2.3. Micotoxinas**

As micotoxinas são produtos naturais de baixo peso molecular produzidos como metabolitos secundários por alguns fungos filamentosos (Bennett and Klich, 2003). Ao contrário dos metabolitos primários, que são essenciais ao crescimento do fungo, os metabolitos secundários são formados durante o final da fase exponencial de crescimento e, aparentemente, não possuem significância para o crescimento ou metabolismo do organismo produtor (Bennett and Klich, 2003).

As micotoxinas são um conjunto de moléculas toxicológica e quimicamente heterogéneo e têm como característica comum o facto de, em baixas concentrações, poderem causar doenças ou morte em seres humanos e outros vertebrados (Bennett and Klich, 2003).

As ocratoxinas e as aflatoxinas são dois grupos de micotoxinas de elevado significado nos alimentos, não só pela sua incidência, mas também pelo elevado nível de toxicidade que apresentam sobre os animais.

### 2.3.1. Ocratoxina A

As ocratoxinas são um pequeno grupo de micotoxinas produzidas por certos fungos dos géneros *Aspergillus* e *Penicillium* (Duarte et al., 2012). O grupo de ocratoxinas é constituído, no mínimo, por sete metabolitos secundários relacionados estruturalmente (Duarte et al., 2012). Deste grupo, a ocratoxina A (OTA) é a mais importante e mais tóxica ocratoxina encontrada naturalmente em alimentos (Duarte et al., 2012).

A OTA foi descoberta em 1965 durante uma grande pesquisa de metabolitos de fungos concebida especificamente para identificar novas micotoxinas (Bennett and Klich, 2003). Pouco tempo depois o metabolito foi isolado a partir de uma amostra comercial de milho nos Estados Unidos e foi reconhecido como uma potente nefrotoxina (Bennett and Klich, 2003). A OTA é uma nefrotoxina a todas as espécies de animais estudadas até à data e provavelmente a mais tóxica para os seres humanos (Bennett and Klich, 2003). Além deste efeito, estudos em animais indicam que a OTA é também uma toxina do fígado, um imunossupressor e um agente teratogénico (Bennett and Klich, 2003). A Agência Internacional de Pesquisa de Cancro classificou a OTA como um possível carcinogénico humano (Bennett and Klich, 2003).

A ocorrência de OTA em produtos agrícolas tem sido amplamente estudada, sendo os cereais e seus derivados as principais fontes de OTA na dieta humana e animal (Dall'Asta et al., 2010). No entanto, os produtos de origem animal também podem contribuir para o consumo humano de OTA. Neste caso, a OTA pode ocorrer nos produtos de origem animal por três vias: (1) a carne fresca pode apresentar contaminação por exposição dos animais a rações contaminadas (devido à elevada contaminação dos cereais usados na sua produção); (2) os produtos derivados podem sofrer contaminação direta através do desenvolvimento natural de fungos ocratoxigénicos durante o processo de cura; e/ou (3) os produtos podem sofrer contaminação através dos condimentos usados (Pietri et al., 2006; Dall'Asta et al., 2010).

De entre os animais de quinta, o porco é particularmente sensível à toxina, pois a OTA é absorvida e acumulada no sangue, fígado, rim e músculo (Pietri et al., 2006). No caso dos ruminantes, a OTA é degradada no rúmen (Pietri et al., 2006).

A capacidade de produção de OTA foi detetada em várias espécies do género *Aspergillus*, nomeadamente *Aspergillus alliaceus*, *Aspergillus auricomus*, *Aspergillus carbonarius*, *Aspergillus glaucus*, *Aspergillus melleus* e *Aspergillus niger* (Bennett and Klich, 2003). Para além do género *Aspergillus*, o género *Penicillium* é também implicado na produção de OTA nomeadamente as espécies *Penicillium verrucosum* (principalmente em cereais) e *Penicillium nordicum* (principalmente em produtos cárneos) (Chiavaro et al., 2002; Iacumin et al., 2009; Dall'Asta et al., 2010).

Tal como acontece com outras micotoxinas, o substrato sobre o qual os fungos crescem, bem como o nível de humidade, temperatura, e presença de microflora competitiva interagem para influenciar o nível de toxina produzida (Bennett and Klich, 2003).

A produção de OTA depende das estirpes fúngicas, bem como das condições de crescimento, incluindo composição do substrato ou fatores físicos, tais como atividade de água, temperatura e pH (Rodríguez et al., 2012). A síntese de micotoxinas é geralmente maior em alimentos ricos em hidratos de carbono (como os cereais) do que em produtos cárneos, pelo que o crescimento de fungos na superfície de presuntos não pode ser considerada como indicadora da presença de micotoxinas (Mateo et al., 2011).

Por outro lado, as condições ambientais, nomeadamente a humidade e a temperatura, ao longo do tempo de cura, especialmente na fase de secagem, também influenciam fortemente o crescimento fúngico e a produção de micotoxinas na superfície de presuntos (Rodríguez et al., 2012). A população de bolores que normalmente cresce na superfície do presunto inclui várias espécies, principalmente pertencentes aos géneros *Aspergillus* e *Penicillium*, como referido anteriormente (Rodríguez et al., 2012). A maioria dos fungos necessita de humidade relativa acima de 80 % e uma atividade de água mínima para crescer (Iamanaka et al., 2010). Normalmente, a produção de toxina não ocorre a uma humidade relativa abaixo daquele valor (Iamanaka et al., 2010). As toxinas podem ser produzidas em atividades de água

que vão de 0,60 a 0,90 em alimentos com uma humidade intermédia (Iamanaka et al., 2010). O crescimento fúngico e a produção de OTA é sensível à temperatura (Iamanaka et al., 2010). Em geral, a temperatura ótima para produzir toxinas está entre a temperatura mínima e a máxima para ele crescer (Iamanaka et al., 2010). A maioria dos fungos são organismos mesófilos, apresentando um crescimento ótimo a temperaturas entre os 25 e os 30 °C (Iamanaka et al., 2010). O pH também é um fator importante no desenvolvimento dos fungos (Iamanaka et al., 2010). Estes apresentam uma capacidade de sobrevivência num intervalo de pH que varia entre 2,5 e 9,5, mas o seu crescimento ótimo dá-se num intervalo de pH entre 5-6 (Iamanaka et al., 2010).

Foram conduzidas várias avaliações de risco para a OTA (Bennett and Klich, 2003). Dada a exposição humana conhecida e a abundância de dados toxicológicos dos estudos em animais, o Comité Científico da União Europeia recomendou que os níveis de OTA devem ser reduzidos a valores inferiores a 5 ng/kg de peso corporal por dia (Bennett and Klich, 2003). Além disso, vários países europeus propuseram regulamentos individuais para diferentes produtos alimentares com concentrações máximas toleradas que variam de país para país e de produto para produto (Bennett and Klich, 2003).

A Comissão das Comunidades Europeias, no Regulamento (CE) N° 1881/2006 estabeleceu níveis máximos admissíveis para a OTA em vários alimentos e expressou a conveniência de fixar um nível máximo em produtos cárneos (Regulamento (CE) N° 1881/2006). Concretamente para estes produtos não existe um valor específico, no entanto, os valores limite existentes para produtos de consumo direto variam entre 2 µg/kg e 10 µg/kg (Regulamento (CE) N° 1881/2006). A recomendação da concentração máxima desta micotoxina no presunto seco curado existe apenas em Itália, que limita OTA neste produto a 1 µg/kg (Ministério da Saúde de Itália, 1999).

A produção de OTA tem sido descrita em vários sistemas modelo de carne curada em consequência do crescimento de estirpes fúngicas ocratoxigénicas inoculadas (Rodríguez et al., 2012). No entanto, existem poucos dados sobre a contaminação natural de presuntos com OTA (Rodríguez et al., 2012).

Pietri et al. (2006) relatam 9 % de amostras de carne fresca e 40 % de amostras de presunto contaminadas com OTA, com níveis máximos de OTA de 0,06 µg/kg e 28,42

$\mu\text{g}/\text{kg}$ , respetivamente. Matrella et al. (2006) estudaram a ocorrência de OTA em músculo de porcos abatidos em Itália e detetaram contaminação média de  $0,024 \mu\text{g}/\text{kg}$  e máxima de  $0,9 \mu\text{g}/\text{kg}$ . Chiavaro et al. (2002) relatam contaminação máxima de presuntos com 6 meses de cura com  $2,2 \mu\text{g}/\text{kg}$  de OTA.

Rodríguez et al. (2012) estudaram a presença de OTA sobre a superfície do presunto seco ibérico após crescimento fúngico na fase inicial de secagem, e referem que até 50 % dos presuntos analisados continham OTA acima do limite de determinação e que as concentrações de OTA encontradas na superfície de presuntos variaram entre  $2 \mu\text{g}/\text{kg}$  e  $160,9 \mu\text{g}/\text{kg}$ , valores maiores que  $3,62 \mu\text{g}/\text{kg}$  relatados anteriormente por Dall'Asta et al.. É notório que 30 % dos presuntos que continham OTA na superfície também continham esta micotoxina nos tecidos internos em níveis acima de  $1,9 \mu\text{g}/\text{kg}$  (Rodríguez et al., 2012). Isto significa que a OTA penetra nos tecidos internos dos presuntos (Rodríguez et al., 2012).

### 2.3.2. Aflatoxinas

As aflatoxinas (AFs) são as micotoxinas mais amplamente estudadas (Bennett and Klich, 2003). São um grupo de metabolitos fúngicos tóxicos quimicamente semelhantes produzidas por certos fungos do género *Aspergillus* (Bennett and Klich, 2003). As AFs mais importantes nos alimentos são a B1, B2, G1 e G2 (Bennett and Klich, 2003). A AFB1 é a mais importante, produzida por todas as estirpes produtoras de AFs, sendo o agente cancerígeno natural mais conhecido (Bennett and Klich, 2003).

As AFs são associadas com a toxicidade e carcinogenicidade em populações humanas e animais (Bennett and Klich, 2003). A sua toxicidade decresce na seguinte ordem: B1>M1>G1>B2>M2>G2 (Bennett and Klich, 2003). As doenças causadas pelo consumo de AFs são chamadas de aflatoxicoses (Bennett and Klich, 2003). Aflatoxicose aguda, resultante do consumo de elevadas quantidades de AFs, pode provocar a morte (Bennett and Klich, 2003). A exposição a AFs na dieta é considerada um importante fator de risco para o desenvolvimento do carcinoma hepatocelular primário principalmente em indivíduos já expostos à Hepatite B (Bennett and Klich, 2003). Em epidemiologia clássica, vários estudos ligaram a incidência do cancro do fígado ao estimado consumo de AFs na dieta (Bennett and Klich, 2003).

As AFs são produzidas por muitas estirpes de *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus* (Bennett and Klich, 2003). Estas são as principais espécies produtoras de AFs mas existem muitas outras espécies produtoras embora com menor frequência nos alimentos (Bennett and Klich, 2003).

Existem muitos substratos que favorecem o crescimento e a produção de AFs pelos fungos que as produzem (Bennett and Klich, 2003). O crescimento de fungos aflatoxigénicos é fortemente dependente das condições de crescimento, tais como a composição do substrato, pH, aw, temperatura ou atmosfera modificada (Bennett and Klich, 2003).

A temperatura e o equilíbrio de humidade relativa ambiental/aw do substrato são os fatores que afetam mais fortemente o crescimento de fungos aflatoxogénicos e produção

de AFs, mas existe também uma forte dependência da existência de hidratos de carbono no produto (Rodrigues et al., 2012).

Tal como para OTA, a Comissão das Comunidades Europeias, no Regulamento (CE) N° 1881/2006 estabeleceu níveis máximos admissíveis para a AFs em vários alimentos e expressou a conveniência de fixar um nível máximo em produtos cárneos (Regulamento (CE) N° 1881/2006). Contudo, não existe um valor específico para estes produtos. Para a AFB1 os valores limite para produtos de consumo direto variam entre 0,1 µg/kg e 8 µg/kg (Regulamento (CE) N° 1881/2006). Por outro lado, os valores limite para o somatório de AFB1, AFB2, AFG1 e AFG2 encontram-se entre 4 µg/kg e 15 µg/kg (Regulamento (CE) N° 1881/2006).

Não existem, do nosso conhecimento, estudos de rastreio de AFs em produtos cárneos.

## 2.4. Controlo das Micotoxinas

O ponto mais importante para o controlo de micotoxinas é, sem dúvida, a prevenção, já que a sua eliminação do produto final é muitas vezes inviável ou impossível (Leung et al., 2006).

A aplicação de protocolos de prevenção e controlo destes metabolitos, ajuda a reduzir a sua ocorrência para níveis de contaminação aceitáveis (Leung et al., 2006). A contaminação por micotoxinas em alimentos e derivados não configura um problema apenas de países pobres (Leung et al., 2006). A economia de muitos países é afetada pela ocorrência de micotoxinas, por estas interferirem ou impedirem a exportação, reduzirem a produção animal e agrícola e comprometerem a saúde humana (Leung et al., 2006).

Uma vez que é normalmente impraticável evitar a formação de micotoxinas, a indústria alimentar tem estabelecido métodos de controlo interno (Bennett and Klich, 2003). Da mesma forma, o governo regulamentar e as agências de pesquisa para a ocorrência de micotoxinas em alimentos e rações tentam estabelecer limites regulamentares (Bennett and Klich, 2003). As diretrizes para o estabelecimento desses limites são baseadas em dados epidemiológicos e extrapolações a partir de modelos animais, tendo em conta as incertezas inerentes (Bennett and Klich, 2003).

## 2.5. Métodos de Análise de Micotoxinas

As micotoxinas são frequentemente produzidas em concentrações residuais, pelo que a sensibilidade dos sistemas de deteção é essencial (Bennett and Klich, 2003). Os métodos tradicionais de deteção e quantificação de micotoxinas contam com solventes para os passos de extração e limpeza, e com várias técnicas cromatográficas para quantificação (Bennett and Klich, 2003). Mais recentemente, foram desenvolvidos ensaios imunogénicos que podem ser aplicados a amostras com pouca ou nenhuma purificação (Bennett and Klich, 2003).

Os métodos para análise de micotoxinas envolvem três procedimentos básicos nomeadamente a extração, a purificação/separação e a deteção (Trucksess, 2000).

A maior parte dos métodos analíticos requer que as micotoxinas sejam extraídas para uma fase líquida composta por solventes orgânicos ou misturas destes solventes e água (Trucksess, 2000). Normalmente os solventes utilizados podem ser o metanol, o acetonitrilo, a acetona, o clorofórmio, entre outros (Shephard, 2000; Stroka et al., 2000; Trucksess, 2000).

A eficiência do procedimento de extração pode ser influenciada pelas técnicas utilizadas na homogeneização da amostra com o líquido extrator (Resnik et al., 1995). Para separar as fases líquida e sólida são utilizadas técnicas de filtração e de centrifugação (Resnik et al., 1995). Após a extração da matriz sólida, o extrato é purificado para se remover as interferências e para se isolar as toxinas antes dos procedimentos de deteção (Resnik et al., 1995). Esta etapa pode não ser necessária para todos os métodos analíticos (Resnik et al., 1995). Na purificação do extrato são utilizadas, geralmente, colunas de imunoafinidade (IAC) (Trucksess, 2000; Ventura et al., 2004).

A característica mais importante exigida para os anticorpos a utilizar nas colunas de imunoafinidade, é a sua especificidade, afinidade, estabilidade face às condições de lavagem, e reversibilidade (Katz, 1992). É também essencial que o complexo micotoxina-anticorpo possa ser dissociado para libertar a micotoxina na fase de eluição (Katz, 1992). O imunoadsorvente é então transferido para uma coluna, à qual é aplicada

a amostra ou o extrato aquoso a analisar (Katz, 1992). Por um processo de interação imunoquímico, as moléculas do analito (hapteno, a micotoxina) vão ser fixadas aos anticorpos imobilizados, enquanto os componentes interferentes que não se ligam ao suporte, que possam encontrar-se na coluna, são eliminados por lavagem da coluna com uma solução salina de tampão fosfato (Katz, 1992). A utilização de IAC é uma técnica altamente sensível e seletiva que oferece a possibilidade de extrair/purificar com rigor as amostras ou os seus extratos, antes da sua quantificação pelos métodos físico-químicos (Katz, 1992).

A etapa final do processo envolve a determinação qualitativa e quantitativa da micotoxina (Trucksess, 2000). Têm sido desenvolvidos métodos analíticos para a determinação de micotoxinas que normalmente envolvem técnicas cromatográficas (Trucksess, 2000). A maior parte dos métodos utiliza a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) (Trucksess, 2000). Também podem ser utilizados outros métodos como a cromatografia gasosa (GC), a cromatografia em camada fina (TLC), entre outros (Trucksess, 2000). Métodos alternativos baseados em imunodeteção, como ELISA, também têm encontrado ampla aplicação em análise de micotoxinas (Trucksess, 2000).

TLC e ELISA são talvez as técnicas mais simples e mais amplamente utilizadas para a monitorização qualitativa e semi-quantitativa de micotoxinas, e são úteis para a triagem e análise de rotina de um grande número de amostras (Muscarella et al., 2009). Não exigem equipamentos caros ou manuseamento altamente treinado, mas também são técnicas menos precisas e sensíveis (Muscarella et al., 2009). Embora os métodos ELISA sejam amplamente utilizados para o rápido rastreio qualitativo e semi-quantitativo de micotoxinas, não são úteis para proporcionar uma determinação quantitativa precisa (Muscarella et al., 2009).

Os métodos analíticos para determinar micotoxinas, devem ser sensíveis, específicos, exatos e precisos e, são necessários para cumprimento de legislação e levantamentos com o objetivo de determinar a exposição às micotoxinas (Muscarella et al., 2009).

Tem sido feita uma pesquisa considerável dedicada ao desenvolvimento de métodos analíticos para identificação e quantificação de micotoxinas em alimentos e rações (Bennett and Klich, 2003). A diversidade química das micotoxinas e os diversos substratos em que elas ocorrem representam desafios para a química analítica (Bennett and Klich, 2003). Cada grupo de compostos de cada substrato têm diferentes propriedades físicas e químicas, por isso os métodos para a separação das toxinas a partir de substratos devem ser desenvolvidos numa base caso-a-caso (Bennett and Klich, 2003). Para as amostras em estudo, descrevem-se a seguir os métodos mais adequados.

### **2.5.1. Determinação de OTA em Carne Fresca e Presunto**

A extração de OTA a partir de um alimento muito proteico, como é o caso dos produtos cárneos, é um passo crítico para a análise, devido à elevada afinidade do analito para a proteína (Toscani et al., 2007).

A extração de OTA na carne é feita normalmente com solventes clorados ou acidificados ou com acetato de etilo, acetonitrilo ou misturas de metanol com bicarbonato de sódio (Toscani et al., 2007). A extração é geralmente seguida de um processo de purificação e concentração por meio de colunas de imunoafinidade (Toscani et al., 2007). A deteção e quantificação são alcançadas através da análise por HPLC usando uma fase móvel ácida (Toscani et al., 2007).

A análise de OTA em presuntos é importante para quantificar OTA potencialmente produzida pela população fúngica inicial que começa a desenvolver-se na superfície de presuntos na fase de secagem (imediatamente após a fase de pós-salga em baixa temperatura) (Toscani et al., 2007).

### **2.5.2. Determinação de AFs em Presunto**

As AFs são compostos de baixo peso molecular que possuem absorção de UV significativa e propriedades fluorescentes (Stroka et al., 2000). Os mais divulgados incluem a cromatografia em camada fina (TLC) e a cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa (HPLC), acoplado a um detetor de fluorescência (FLD) (Stroka et al., 2000). A tendência atual é a utilização de HPLC para a determinação de AFs, devido às suas características de especificidade, sensibilidade elevada e simplicidade de operação (Stroka et al., 2000). Além disso, a determinação cromatográfica permite a quantificação de cada toxina individualmente (Stroka et al., 2000). Isto é particularmente importante para a análise de alimentos, onde é necessária a determinação de AFB1 (Stroka et al., 2000).

# Capítulo 3

### **3. Materiais e Métodos**

#### **3.1. Plano de Amostragem**

Neste estudo foram analisadas 15 amostras de carne fresca de suíno a serem usadas para produção de presunto, 14 amostras de pá curada de suíno, 1 amostra de presunto de ovino e 2 amostras de presunto de caprino. Todas as amostras analisadas são provenientes da empresa Bísaro, Salsicharia Tradicional.

As amostras de carne fresca foram obtidas imediatamente após o abate dos animais que iriam ser usados para produção de presunto. De cada animal recolheu-se uma porção de cerca de 100 g para um saco estéril, que foi imediatamente selado e transportado para o Laboratório de Microbiologia em condições de refrigeração.

As amostras de pá e de presunto foram recolhidas na sala de cura dos presuntos. As pás apresentavam um tempo de cura de 15 a 16 meses, enquanto os presuntos de ovino e caprino tinham um tempo de cura de aproximadamente 3 meses. Ao longo do período de cura, as pás e os presuntos estiveram submetidos a condições de humidade e temperatura controladas na ordem de 70-75 % e 9/10 °C, respetivamente. Estes dados foram fornecidos gentilmente pelo Laboratório Tecnologia e Qualidade da Carcaça e da Carne da Escola Superior Agrária de Bragança. De cada pá/presunto, foi recolhida uma porção de cerca de 250 g, colocada num saco estéril e transportada para o Laboratório de Microbiologia.

As amostras de carne fresca, pá e presunto foram congeladas a -20 °C até ser efetuada a extração das micotoxinas.

### 3.2. Reagentes e Materiais

A solução padrão de OTA utilizada (Sigma) tinha uma concentração de 4 µg/mL. Desta foram preparadas para cada dia soluções de trabalho com uma concentração de 100 ng/mL.

A solução padrão de AFs utilizada (Sigma) tinha uma concentração de 5 µg/mL de AFB1 e AFG1 e 1,5 µg/mL de AFB2 e AFG2. Foram igualmente preparadas para cada dia soluções de trabalho com uma concentração de 100 ng/mL de AFB1 e AFG1 e 30 ng/mL de AFB2 e AFG2.

Na preparação de padrões de OTA e AFs, na extração das amostras e na preparação da fase móvel foram utilizados solventes de qualidade para HPLC (acetonitrilo, clorofórmio e metanol). As colunas de imunoafinidade (IAC) para purificação dos extratos foram OchraTest WB e AflaTest WB da VICAM (Watertown, MA, EUA).

A solução de lavagem utilizada foi o Tampão Fosfato Salino adicionado de Tween 80 (PBS-T). Inicialmente preparou-se a solução concentrada da seguinte forma: 16 g de NaCl, 2,4 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,4 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> e 0,4 g de KCl, para um volume final de 200 mL. A partir desta solução *stock* preparou-se a solução final de lavagem.

### 3.3. Considerações de Segurança

Devido à toxicidade da OTA e das AFs, foram tomadas as considerações de segurança necessárias para manusear estas substâncias. As soluções foram manipuladas com equipamentos de proteção nomeadamente bata e luvas de nitrilo. Todos os materiais descartáveis foram descontaminados no autoclave antes de serem descartados e os materiais reutilizáveis foram descontaminados, por imersão em lixívia a 10 %, durante a noite sendo lavados na tarde seguinte.

### **3.4. Seleção e Validação de Métodos de Extração e Análise de OTA e AFs**

#### **3.4.1. Extração de OTA**

A OTA foi analisada em carne fresca, pás curadas de suíno e presuntos de ovino e caprino. A análise foi feita em carne fresca na tentativa de se perceber se esta já estaria contaminada inicialmente, ou seja, se antes do processo de cura do presunto a matéria-prima já estaria contaminada com alguma quantidade de OTA.

##### **3.4.1.1. Métodos Testados**

De forma a escolher o método mais adequado para análise de OTA em carne fresca pá e presunto foram inicialmente testados vários métodos. Numa primeira fase foram testados vários métodos já implementados no laboratório para outras matrizes utilizando diferentes solventes, nomeadamente acetonitrilo, clorofórmio e metanol.

###### **3.4.1.1.1. Método do Acetonitrilo**

Pesou-se cerca de 10 g de amostra. Adicionou-se 20 mL de solução aquosa de acetonitrilo a 60 % e homogeneizou-se no vortex. De seguida centrifugou-se a 4000 rpm durante 15 minutos e filtrou-se com papel de filtro de celulose regenerada com o auxílio de uma bomba de vácuo. Ao extrato obtido adicionou-se 10 mL de hexano, agitou-se e centrifugou-se novamente a 1000 rpm durante 5 minutos. Descartou-se o hexano da fase superior e recolheu-se o acetonitrilo. Por fim filtrou-se 2 mL de extrato por um filtro de seringa de 0,45 µm e analisou-se por HPLC conforme descrito na secção 3.4.1.2.

Neste método depois de se adicionar o hexano obteve-se três fases. Removeu-se o hexano ficando-se com duas fases não sabendo concretamente qual seria a fase do acetonitrilo. Deste modo, retirou-se 2 mL de cada uma das fases para analisar por HPLC como se descreve na secção 3.4.1.2.

#### 3.4.1.1.2. Método do Clorofórmio

Pesou-se cerca de 10 g de amostra, adicionou-se 20 mL de clorofórmio acidificado com ácido *O*-fosfórico a 85 % e homogeneizou-se no vortex. Centrifugou-se a 4000 rpm durante 15 minutos e filtrou-se com papel de filtro de celulose regenerada com o auxílio de uma bomba de vácuo. Adicionou-se, ao extrato obtido, 20 mL de Solução Tampão Tris-HCl a 0,2M e pH 8,5, agitou-se e voltou-se a centrifugar a 3000 rpm durante 5 minutos. Recolheu-se 2 mL da fase superior e adicionou-se 2 mL de acetonitrilo/ácido acético (98:2, V/V). Filtrou-se por um filtro de seringa 0,45 µm e analisou-se por HPLC como descrito na secção 3.4.1.2.

#### 3.4.1.1.3. Método do Metanol I

Pesou-se 10 g de amostra, adicionou-se 20 mL de metanol a 60 % acidificado com ácido *O*-fosfórico a 0,1M e homogeneizou-se no vortex. Centrifugou-se a 4000 rpm durante 15 minutos e filtrou-se com papel de filtro de celulose regenerada com uma bomba de vácuo. Adicionou-se 10 mL de hexano ao extrato obtido, agitou-se e voltou-se a centrifugar a 1000 rpm durante 5 minutos. Descartou-se o hexano da fase superior e recolheu-se o metanol. Filtrou-se 2 mL por um filtro de seringa 0,45 µm e analisou-se por HPLC conforme descrito na secção 3.4.1.2. Guardou-se o restante extrato para posteriormente ser analisado, depois de passado por colunas de imunoafinidade (OchraTest WB, VICAM). Para cumprir esta parte do protocolo recolheu-se 5 mL de extrato e diluiu-se com 45 mL de Solução A (preparada com 15 g de PEG8000, 75 g de NaHCO<sub>3</sub> e 1500 mL de água destilada). Passou-se o extrato na coluna e lavou-se uma primeira vez a mesma com 5 mL de Solução B (preparada com 25 g de NaCl, 5 g de NaHCO<sub>3</sub> e 1000 mL de água destilada) tendo o cuidado de não deixar secar o gel da coluna. Numa segunda vez lavou-se a coluna com 5 mL de água destilada e, neste caso, deixou-se secar bem a coluna. Passou-se 2 mL de metanol, de grau HPLC, na coluna para eluir a OTA seguindo-se a análise por HPLC conforme descrito na secção 3.4.1.2.

#### **3.4.1.1.4. Método do Metanol II**

Pesou-se cerca de 10 g de amostra e adicionou-se 40 mL de metanol acidificado com bicarbonato de sódio a 1 %. A extração foi feita por agitação mecânica durante cerca de 1 hora. De seguida filtrou-se com filtro de fibra de vidro e mediu-se 10 mL de filtrado. Diluiu-se com 40 mL de PBS-T, agitou-se e voltou-se a filtrar com filtro de fibra de vidro. Mediu-se 20 mL de filtrado e passou-se por uma coluna de imunoafinidade (OchraTest WB, VICAM). Lavou-se a coluna uma primeira vez com 10 mL de PBS-T e uma segunda vez com 10 mL de água destilada. A OTA foi eluída da coluna através da passagem de 2 mL de metanol, de grau HPLC, a uma taxa de cerca de 1-2 gotas por segundo analisando-se de seguida por HPLC como se descreve na secção 3.4.1.2.

#### **3.4.1.2. Detecção e Quantificação de OTA**

A OTA foi detetada e quantificada por um sistema de HPLC constituído por: um amostrador automático (Spark Basic Marathon), uma bomba (Varian 9002), uma coluna C18 de fase inversa (Waters Spherisorb ODS2, 4,6 mm x 250 mm, 5 µm), equipado com uma pré-coluna com a mesma fase estacionária, e um detetor de fluorescência (Jasco FP- 920).

A fase móvel para OTA consistiu um programa isocrático de água : acetonitrilo : ácido acético (99:99:02, v / v / v) e foi bombeada a 1,0 mL/min durante um tempo total de execução de 28 minutos. O volume de injeção foi 20 µL. A deteção de fluorescência foi realizada a comprimentos de onda de excitação e de emissão de 333 nm e 460 nm, respetivamente. O ganho foi definido para 1000 e a atenuação a 16.

O controlo da instrumentação, a aquisição e o processamento de dados, foram calculados com o software Varian 850-MIB Data System Interface. Consideraram-se amostras positivas quando se originou um pico, no tempo de retenção similar ao de cada padrão, com uma altura cinco vezes mais elevada do que o ruído da linha de base.

### **3.4.1.3. Validação do Método**

Dos vários métodos testados, o escolhido foi o Método do Metanol II descrito acima na secção 3.4.1.1.4. A escolha recaiu sobre este método pois em análises preliminares foi o que demonstrou ser o mais adequado. De todos foi o que obteve taxas de recuperação mais elevadas como se apresenta na secção 4.1.1.1.

Antes da análise das amostras, o método de extração e quantificação foi submetido a validação interna ao nível da precisão. A validação do método é baseada em vários parâmetros nomeadamente linearidade, exatidão e precisão (Chan, 2004). Estes parâmetros foram determinados para o método escolhido e estão aqui descritos.

#### **3.4.1.3.1. Linearidade**

A linearidade de um procedimento analítico pode ser definida como a capacidade para se obter resultados do teste de dados variáveis que são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra (Chan, 2004). Os parâmetros de calibração avaliados para a OTA foram o Limite de Detecção (LOD) e o Limite de Quantificação (LOQ), que refletem a linearidade do método. O LOD pode ser definido como a menor quantidade de um analito numa amostra que pode ser detetada, mas não necessariamente quantificada como um valor exato. O LOQ corresponde à concentração do analito que seja mensurável dentro de um determinado nível de confiança (Taverniers et al., 2004.). A obtenção de valores abaixo do LOD e do LOQ significa que a determinação e a quantificação são possíveis, mas torna-se pouco fiável pois a incerteza associada a estes níveis mais baixos é maior do que o valor de medição propriamente dito (Taverniers et al., 2004).

No presente estudo a linearidade do método foi determinada através da injeção de sete soluções-padrão de OTA em concentrações de 0,5 ng/mL, 1,0 ng/mL, 2,5 ng/mL, 5,0 ng/mL, 7,5 ng/mL, 10,0 ng/mL e 15,0 ng/mL. A curva de calibração usada para quantificação foi calculada pelo método dos mínimos quadrados no Excel 2007. O LOD e o LOQ foram calculados de acordo com o rácio sinal/ruído. Definiram-se para as

concentrações para as quais o rácio sinal/ruído é igual a 3 e a 10, respetivamente. A variável de dados utilizada para a quantificação do analito foi a área do pico.

#### **3.4.1.3.2. Exatidão e Precisão**

A exatidão, ou recuperação, de um procedimento analítico é o grau de concordância entre os valores que são aceites como valores convencionais verdadeiros ou um valor de referência e o valor encontrado (Chan, 2004). A exatidão é geralmente classificada como a percentagem de recuperação do ensaio, utilizando o método analítico proposto, de uma quantidade conhecida de analito adicionado à matriz (*spiking*) (Chan, 2004).

A precisão de um procedimento analítico, expressa o grau de concordância entre uma série de medições obtidas a partir de várias amostras da mesma matriz homogénea sob condições prescritas (Chan, 2004). A precisão é normalmente investigada a três níveis: repetibilidade, precisão intermédia e reprodutibilidade (Chan, 2004).

A repetibilidade é uma medida da precisão do método sob as mesmas condições de funcionamento ao longo de um curto intervalo de tempo (Chan, 2004). A precisão intermédia é definida como a variação dentro do mesmo laboratório (por exemplo, a variação dia-a-dia, a variação do analista, a variação do equipamento) (Chan, 2004). Reprodutibilidade mede a precisão entre laboratórios como acontece em estudos colaborativos (Chan, 2004). Esse parâmetro não foi aplicado no nosso estudo. O desvio-padrão (SD) e o desvio padrão relativo (RSD) são geralmente reportados para os parâmetros mencionados (Chan, 2004).

A taxa de recuperação de OTA foi calculada para as 6 repetições dos dois níveis de adição pela razão da concentração da toxina recuperada em relação à concentração conhecida que foi adicionada. A precisão foi calculada em termos de repetibilidade intra-dia ( $n = 3$ ) e precisão intermediária (dois dias diferentes) para OTA para os dois níveis de contaminação.

As definições para os critérios de desempenho são os seguintes de acordo com o Regulamento (CE) N° 401/2006:

$SD_r$  = desvio-padrão, calculado a partir dos resultados obtidos em condições de repetibilidade.

$RSD_r$  (%) = desvio padrão relativo, calculado a partir dos resultados obtidos em condições de repetibilidade  $[(SD_r / \text{média}) \times 100]$ .

$SD_{int}$  = desvio-padrão, calculado a partir dos resultados obtidos em condições de precisão intermediária.

$RSD_{int}$  (%) = desvio-padrão relativo, calculado a partir dos resultados obtidos em condições de precisão intermediária  $[(SD_{int} / \text{média}) \times 100]$ .

A identificação dos picos foi obtida por comparação com os tempos de retenção obtidos para soluções-padrão sob as mesmas condições. A quantificação de micotoxina foi determinada seguindo uma equação linear, tal como sugerido por Miller e Miller (1993):

$$Y = bx + a$$

Onde:

$y$  é o pico da área;

$b$  é o declive;

$x$  é a concentração;

$a$  interseção com o eixo dos  $y$ .

A micotoxina extraída foi eluída em 2 mL de metanol em vez de 1 mL, pelo que as concentrações de micotoxinas medidas a partir da curva de calibração (em ng/mL) foram multiplicadas por 2 para se obter a quantidade na amostra (em ng/g ou  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ).

### *Spiking*

Os testes de precisão e de recuperação foram feitos por meio de enriquecimento da amostra (*spiking*) com quantidades conhecidas de OTA. Para tal, comprou-se cerca de 500 g de carne fresca picada e usou-se 1 kg de presunto de porco. Estas matrizes foram cuidadosamente homogeneizadas e armazenadas a -20 °C até à sua utilização. Fez-se a divisão da matriz de carne fresca e de presunto em duas partes. Uma parte era composta por nove réplicas de 10 g cada uma. A segunda parte tinha seis réplicas também de 10 g cada uma. A primeira parte era composta por nove réplicas pois a três delas não foi adicionado qualquer enriquecimento com OTA (para servir de branco). As restantes réplicas desta primeira parte foram enriquecidas com diferentes concentrações de OTA. Foram testados em dias diferentes as várias partes.

Para efeitos de enriquecimento das matrizes, foi utilizada uma solução de trabalho de OTA com uma concentração de 100 ng/mL, feita a partir de um padrão de OTA com uma concentração de 4000 ng/mL. No primeiro dia, utilizou-se a primeira parte onde três réplicas não foram enriquecidas (não foi adicionada qualquer concentração de solução de trabalho de OTA) para servir de branco. Das seis réplicas sobrantes adicionou-se a três delas 0,1 mL da solução de trabalho de OTA (correspondente à concentração de 1 ng/g de OTA) e a outras três 1 mL da mesma solução de trabalho de OTA (correspondente à concentração de 10 ng/g de OTA). Estas unidades amostrais foram codificadas como  $S_nX_N$ , onde S corresponde a *spiking*; n é o número da réplica; X corresponde à matriz analisada e N é o número do dia em que se fez a análise. Os frascos foram cobertos com papel de alumínio e deixados durante a noite em repouso antes de serem submetidos ao protocolo de extração.

Este procedimento foi repetido no dia seguinte para os restantes conjuntos de matriz de carne fresca e de presunto.

### Extração de OTA

A extração de OTA foi feita com base no Método do Metanol II descrito acima na secção 3.4.1.1.4.

### Deteção e Quantificação de OTA

A deteção e quantificação de OTA foi feita por HPLC conforme descrito na secção 3.4.1.2.

### **3.4.2. Extração de AFs**

As aflatoxinas foram analisadas apenas nas pás curadas de suíno e nos presuntos de ovino e caprino. Segundo o que vários autores referem as aflatoxinas não estão, normalmente, presentes na carne fresca. Há maior incidência nas pás e nos presuntos, o que nos levou apenas a analisar nestes produtos.

#### **3.4.2.1. Métodos Testados**

Para a escolha do melhor método a utilizar para a análise de AFs em pá e presunto foram inicialmente testados dois métodos de extração. Um dos métodos (Método do Metanol I) correspondia ao método já implementado no laboratório para outras matrizes e o outro correspondia ao método anteriormente validado para OTA (Método do Metanol II). Este segundo método, apesar de não corresponder a nenhum método anteriormente descrito para extração de AFs, foi testado no sentido de extrair ambas as toxinas em simultâneo, ou seja, numa tentativa de otimização de recursos (maior rapidez e menor consumo de reagentes).

##### **3.4.2.1.1. Método do Metanol I**

Começou-se por pesar 10 g de amostra, adicionou-se 50 mL de solução aquosa de metanol a 60 % e extraiu-se por agitação mecânica durante cerca de 30 minutos. Filtrou-se com filtro de fibra de vidro e mediu-se 20 mL de filtrado diluindo-se de seguida com 20 mL de PBS-T. Agitou-se e voltou-se a filtrar com filtro de fibra de vidro. Mediu-se 10 mL de filtrado e passou-se o mesmo por uma coluna de imunoafinidade (AflaTest WB, VICAM). Lavou-se duas vezes a coluna com 10 mL de água destilada. Passou-se 2 mL de metanol, de grau HPLC, para eluir as AFs da coluna e analisou-se por HPLC como descrito na secção 3.4.2.2.

#### **3.4.2.1.2. Método do Metanol II**

Procedeu-se à extração conforme descrito na secção 3.4.1.1.4, mas usando a coluna de imunoafinidade correspondente à purificação de AFs (AflaTest WB, VICAM). Analisou-se por HPLC conforme descrito na secção 3.4.2.2.

#### **3.4.2.2. Detecção e Quantificação de AFs**

Tal como para OTA, as AFs foram detetadas e quantificadas por um sistema de HPLC constituído por: um amostrador automático (Spark Basic Marathon), uma bomba (Varian 9002), uma coluna C18 de fase inversa (Waters Spherisorb ODS2, 4,6 mm x 250 mm, 5 µm), equipado com uma pré-coluna com a mesma fase estacionária, um detetor de fluorescência (Jasco FP- 920) e um derivatizador fotoquímico.

A fase móvel de AFs foi diferente da OTA. Esta consistiu um programa isocrático de água : acetonitrilo : metanol (03:01:01, v / v / v) e foi bombeada a 1,0 mL/min durante um tempo total de execução de 28 minutos. O volume de injeção foi 20 µL. A deteção de fluorescência foi realizada a comprimentos de onda de excitação e emissão de 365 nm e 435 nm, respetivamente. O ganho foi definido para 1000 e a atenuação a 16.

O controlo da instrumentação, a aquisição e o processamento de dados, foram calculados com o software Varian 850-MIB Data System Interface. Consideraram-se amostras positivas quando se originou um pico, no tempo de retenção similar ao de cada padrão, com uma altura cinco vezes mais elevada do que o ruído da linha de base.

### **3.4.2.3. Validação do Método**

A escolha do método recaiu sobre o Método do Metanol II, tal como para OTA, visto ser aquele onde se obtiveram taxas de recuperação mais elevadas e desta forma minimizou-se custos e fez-se o trabalho com uma maior rapidez.

Antes da análise das amostras, o método de extração anteriormente selecionado foi submetido a validação interna ao nível da precisão. A validação do método seguiu os parâmetros descritos para a OTA, apresentados na secção 3.4.1.3, com algumas adaptações específicas à análise de AFs, que a seguir se descrevem.

#### **3.4.2.3.1. Linearidade**

No caso específico das AFs a linearidade do método foi determinada por uma série de análises pela injeção de quatro soluções-padrão, em triplicado cada uma, de AFs em concentrações de 1,56 ng/mL, 3,91 ng/mL, 7,81 ng/mL e 15,63 ng/mL para as AFB1 e AFG1 e em concentrações de 0,47 ng/mL, 1,17 ng/mL, 2,34 ng/mL e 4,69 ng/mL para as AFB2 e AFG2. A curva de calibração usada para quantificação foi calculada pelo método dos mínimos quadrados no Excel 2007. O LOD e o LOQ foram calculados de acordo com o rácio sinal/ruído. Definiram-se para as concentrações para as quais o rácio sinal/ruído é igual a 3 e a 10 respetivamente. A variável de dados utilizada para a quantificação do analito foi a área do pico.

#### **3.4.2.3.2. Exatidão e Precisão**

A exatidão e a precisão seguiram os parâmetros descritos para a OTA (ver secção 3.4.1.3.2), com algumas adaptações específicas à análise de AFs, que a seguir se descrevem.

### *Spiking*

Os testes de precisão e de recuperação foram feitos por meio de fortificação da amostra (*spiking*) com quantidades conhecidas de AFs. Para o efeito, usou-se 1 kg de presunto de porco que foi cuidadosamente homogeneizado e armazenado a -20 °C até à sua utilização. A matriz de presunto foi dividida em dois conjuntos. O primeiro conjunto era composto por nove réplicas de cerca de 10 g cada uma. O segundo conjunto tinham seis réplicas também de cerca de 10 g cada uma.

Para efeitos de enriquecimento da matriz foi utilizada uma solução de trabalho de AFs com uma concentração de 100 ng/mL de AFB1 e AFG1 e 30 ng/mL de AFB2 e AFG2, feita a partir de uma solução padrão de AFs de 5000 ng/mL e 1500 ng/mL, respetivamente. No primeiro dia utilizou-se o primeiro conjunto onde três réplicas não foram enriquecidas (não foi adicionada solução de trabalho de AFs) para servir de branco. Das seis réplicas sobrantes adicionou-se a três delas 0,1 mL da solução de trabalho de AFs (correspondente à concentração de 1 ng/g de AFB1 e AFG1 e à concentração de 0,3 ng/g de AFB2 e AFG2) e a outras três 1 mL da mesma solução de trabalho de AFs (correspondente à concentração de 10 ng/g de AFB1 e AFG1 e à concentração de 3 ng/g de AFB2 e AFG2). Estas unidades amostrais foram codificadas como  $S_n_X_N$ , onde S corresponde a *spiking*; n ao número da réplica; X corresponde à matriz analisada, e N é o número do dia. Os frascos foram cobertos com papel de alumínio e deixados durante a noite em repouso antes de serem submetidos ao protocolo de extração.

Este procedimento foi repetido no dia seguinte para os restantes conjuntos de matriz de presunto.

### Extração de AFs

A extração de AFs foi feita com base no Método do Metanol II descrito na secção 3.4.1.1.4.

### Deteção e Quantificação de AFs

A deteção e quantificação de AFs foi feita por HPLC conforme descrito na secção 3.4.2.2.

### **3.5. Análise de OTA e AFs nas Amostras**

#### **3.5.1. Preparação das Amostras**

##### **3.5.1.1. Carne Fresca**

As amostras foram recolhidas, etiquetadas e congeladas. Imediatamente antes da análise as amostras foram descongeladas e picadas finamente. Retirou-se 10 g para análise e a porção sobranete foi novamente congelada.

##### **3.5.1.2. Pá e Presunto**

Uma vez que foi determinado usar o mesmo método de extração para OTA e AFs, foi preparada apenas uma subunidade amostral usada para extração simultânea de ambas as toxinas. Desta forma, cortou-se uma camada superficial de pá e de presunto (com uma profundidade de 2 cm) com pelo menos 100 g, removeu-se a gordura e picou-se finamente. Retirou-se 10 g para análise e congelou-se o restante.

#### **3.5.2. Extração e Purificação das Micotoxinas**

Nesta fase, a extração de OTA e AFs foi simultânea até à obtenção de extrato filtrado. A partir desse ponto cada uma das toxinas foi purificada usando as IACs específicas para cada uma (OchraTest WB e AflaTest WB, respetivamente). O procedimento de extração de OTA e AFs foi descrito anteriormente para a validação dos métodos e encontra-se esquematizado na Figura 1.

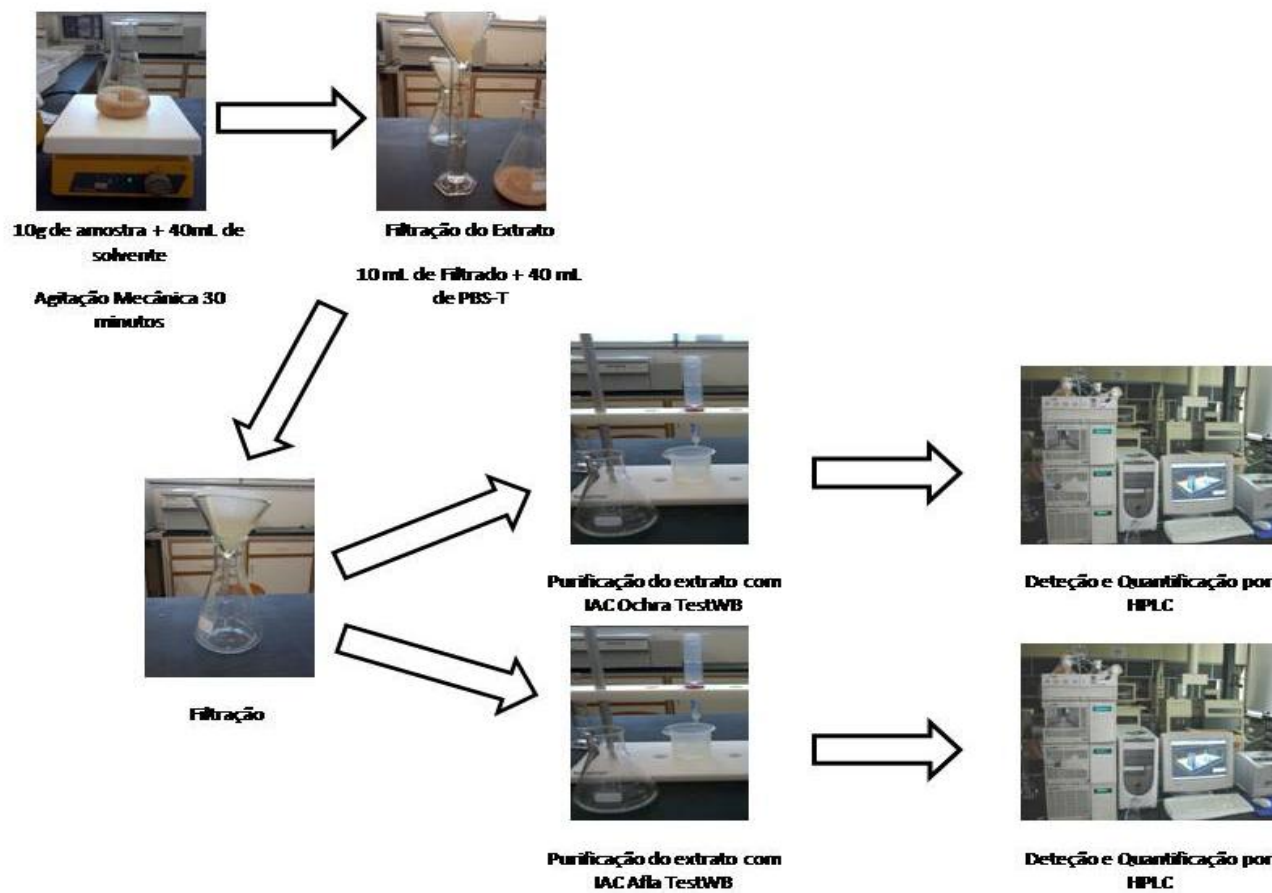


Figura 1 - Esquema do procedimento de extração, purificação e quantificação de OTA e AFs

### **3.5.3. Detecção e Quantificação das Micotoxinas**

A deteção e a quantificação de OTA e AFs foram feitas por HPLC como descrito nas secções 3.4.1.2 e 3.4.2.2, respetivamente.

# Capítulo 4

## **4. Resultados**

### **4.1. Seleção e Validação de Métodos**

Nesta secção são apresentados os resultados dos métodos testados para análise de OTA (Secção 4.1.1.1) e AFs (Secção 4.1.2.1). São também apresentados os resultados da validação do método selecionado para análise de OTA em carne fresca e presunto (Secção 4.1.1.2) e AFs em presunto (Secção 4.1.2.2).

#### **4.1.1. Análise de OTA**

##### **4.1.1.1. Métodos Testados**

Nesta secção são apresentados os resultados dos diferentes métodos testados para extração de OTA em presunto. Estão indicados no Quadro 1 os valores obtidos das taxas de recuperação (TR) para cada uma das três réplicas nas quatro concentrações em que foi adicionada OTA. Encontram-se também as taxas de recuperação média, o desvio padrão (SD) e o desvio padrão relativo ( $RSD_r$ ).

Desta forma, analisando o Quadro 1 podemos verificar que as taxas de recuperação variaram consoante os métodos.

Em relação ao método do acetonitrilo as taxas foram elevadas sobretudo na fase do acetonitrilo. Na fase aquosa os valores obtidos consideram-se aceitáveis. No entanto, este método não foi selecionado pois o acetonitrilo é um solvente muito tóxico, caro e com falha no fornecimento.

No método do clorofórmio as taxas de recuperação obtidas são bastante baixas o que fez com que este método fosse descartado não só por as taxas de recuperação serem baixas mas também pelo facto de o clorofórmio ser um solvente muito tóxico, tal como o acetonitrilo.

Analisando o método do metanol I verificamos que as taxas de recuperação foram baixas quando o extrato não foi passado por IAC. O mesmo não aconteceu quando o

mesmo extrato foi passado por IAC onde se confirma que os valores obtidos são mais elevados. No método do metanol II as taxas de recuperação obtidas foram bastante aceitáveis o que nos levou à escolha deste método para posterior análise de OTA nas amostras sendo também um método mais rápido e prático quando comparado com o método do metanol I.

**Quadro 1 - Resultados obtidos para os vários métodos testados para extração de OTA, em termos de taxa de recuperação (TR), média, desvio-padrão (SD<sub>r</sub>) e desvio-padrão relativo (RSD<sub>r</sub>).**

Parâmetro	OTA												
	Método	Acetonitrilo								Clorofórmio			
		Fase Aquosa				Fase do Acetonitrilo							
<i>Spiking</i>	1 µg/kg	5 µg/kg	10 µg/kg	20 µg/kg	1 µg/kg	5 µg/kg	10 µg/kg	20 µg/kg	1 µg/kg	5 µg/kg	10 µg/kg	20 µg/kg	
TR Réplica 1 (%)	123,0	103,8	81,2	76,8	79,2	113,5	121,8	122,4	89,7	39,3	32,9	25,9	
TR Réplica 2 (%)	176,6	103,3	93,7	86,8	127,8	139,7	138,9	134,8	107,0	48,9	37,5	34,5	
TR Réplica 3 (%)	210,8	97,2	89,0	87,9	115,1	131,4	131,5	141,3	100,8	40,0	39,8	30,4	
TR Média (%)	170,1	101,5	88,0	83,8	107,4	128,2	130,7	132,8	99,2	42,8	36,7	30,3	
SD <sub>r</sub>	44,3	3,7	6,3	6,1	25,2	13,4	8,6	9,6	8,8	5,3	3,5	4,3	
RSD <sub>r</sub> (%)	26,0	3,6	7,2	7,3	23,5	10,4	6,6	7,2	8,9	12,5	9,6	14,2	

Parâmetro	OTA												
	Método	Metanol I								Metanol II			
		Sem IAC				Com IAC							
<i>Spiking</i>	1 µg/kg	5 µg/kg	10 µg/kg	20 µg/kg	1 µg/kg	5 µg/kg	10 µg/kg	20 µg/kg	1 µg/kg	5 µg/kg	10 µg/kg	20 µg/kg	
TR Réplica 1 (%)	38,7	45,2	48,5	51,2	67,7	102,5	99,8	109,4	84,1	78,7	83,8	79,1	
TR Réplica 2 (%)	37,6	49,0	53,3	51,8	47,9	98,9	103,8	103,9	110,9	88,8	81,5	87,7	
TR Réplica 3 (%)	43,3	54,0	53,9	54,8	59,1	103,6	115,8	125,8	109,9	70,8	92,8	85,5	
TR Média (%)	39,9	49,4	51,9	52,6	58,3	101,7	106,5	113,0	101,7	79,4	86,0	84,1	
SD <sub>r</sub>	3,0	4,4	3,0	1,9	9,9	2,5	8,3	11,4	15,2	9,0	6,0	4,4	
RSD <sub>r</sub> (%)	7,6	9,0	5,7	3,6	17,1	2,5	7,8	10,1	15,0	11,4	7,0	5,3	

#### 4.1.1.2. Validação do Método

Nesta secção são apresentados os resultados de validação do método de extração de OTA para carne fresca e presunto.

A precisão instrumental foi avaliada pela análise de sete soluções padrão durante um dia. As condições de HPLC permitiram a determinação de OTA com um tempo de retenção de cerca de 19 minutos (Figura 2).

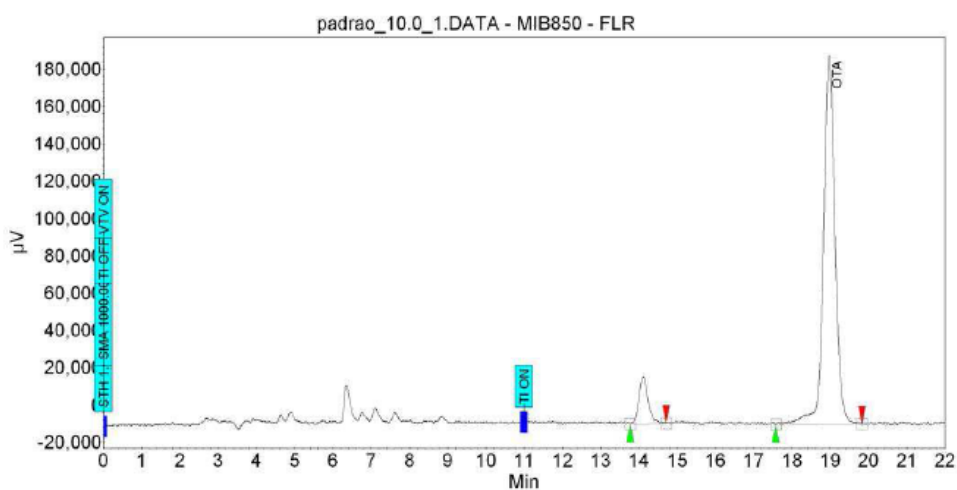


Figura 2 - Cromatograma da solução-padrão de OTA correspondente à concentração 10 ng/mL.

Os parâmetros de calibração estão apresentados no Quadro 2.

Quadro 2 - Parâmetros de Calibração para OTA

Toxina	Curva de Calibração	R <sup>2</sup>	LOD (ng/mL)	LOQ (ng/mL)
OTA	$y = 6380x - 1543$	0,996	0,37	1,2

Para efeitos de validação do método, a OTA foi extraída e analisada em triplicado durante dois dias consecutivos. Obtiveram-se cromatogramas com o pico bem resolvido correspondente à toxina analisada tanto em carne fresca como em presunto (Figuras 3 e 4, respetivamente).

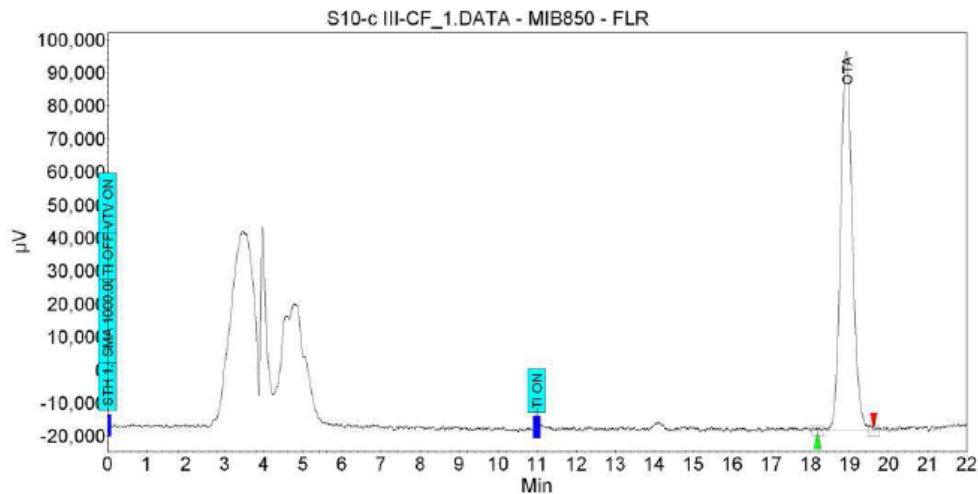


Figura 3 - Cromatograma do *Spiking* 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de OTA em Carne Fresca

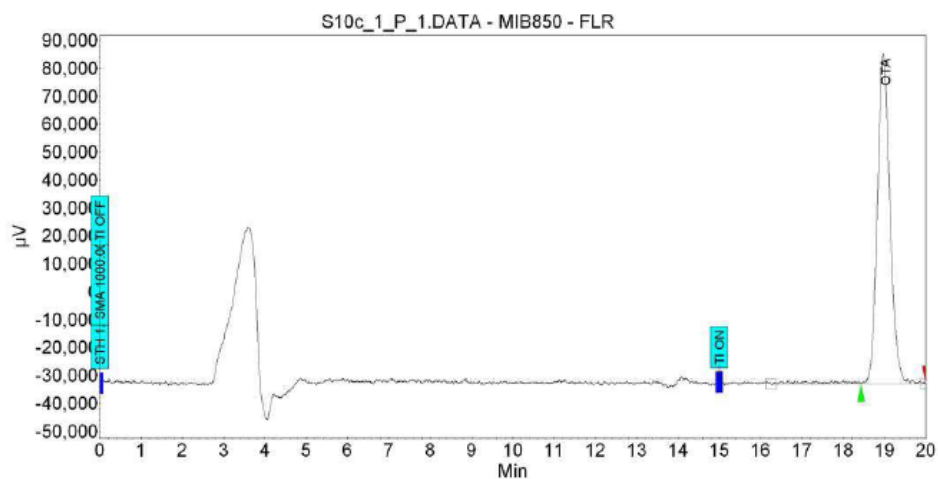


Figura 4 - Cromatograma do *Spiking* 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de OTA em Presunto

No Quadro 3 estão indicados os valores das taxas de recuperação (TR) obtidas para cada uma das três réplicas nas duas concentrações em que foi adicionada OTA. Encontram-se também as taxas de recuperação média, o desvio padrão (SD) e o desvio padrão relativo (RSD<sub>r</sub>) obtidos para cada um dos dias e para os dois dias.

**Quadro 3 - Desempenho e Precisão do Método de Extração de OTA**

Parâmetro	Carne Fresca		Presunto		
	<i>Spiking</i>	1 µg/kg	10 µg/kg	1 µg/kg	10 µg/kg
Dia 1					
TR Réplica 1 (%)		164	132,9	84,1	93,3
TR Réplica 2 (%)		230,6	115,4	110,9	97,7
TR Réplica 3 (%)		170,7	100,9	109,9	115,4
TR Média (%)		188,4	116,4	101,7	102,1
SD <sub>r</sub>		36,7	16	15,2	11,7
RSD <sub>r</sub> (%)		19,5	13,8	15	11,4
Dia 2					
TR Réplica 1 (%)		140,7	107,5	50,5	71,9
TR Réplica 2 (%)		211,1	121,8	50,3	116,4
TR Réplica 3 (%)		155	114,5	67,9	110,7
TR Média (%)		168,9	114,6	56,3	99,7
SD <sub>r</sub>		37,2	7,2	10,1	24,2
RSD <sub>r</sub> (%)		22	6,3	17,9	24,3
Recuperação Média (%)		178,7	115,5	79	100,9
MD <sub>int</sub>		13,8	1,3	32,1	1,8
RMD <sub>int</sub> (%)		7,7	1,1	40,7	1,7
LOD (µg/kg)				0,74	
LOQ (µg/kg)				2,4	
Limites Recomendados					
TR (%)				70-110	
RSD <sub>r</sub> (%)				20	
RSD <sub>R</sub> (%)				30	

Como se pode verificar no Quadro as taxas de recuperação média para carne fresca variaram entre 115 e 179 % e para o presunto entre 79 e 101 %. Os valores de precisão para carne fresca encontram-se entre 1,1 e 7,7 % e para presunto entre 1,7 e 40,7 %.

## 4.1.2. Análise de AFs

### 4.1.2.1. Métodos Testados

Tal como para OTA, nesta secção são apresentados os resultados dos métodos testados para extração de AFs em presunto. Apresentam-se no Quadro 4 os valores das taxas de recuperação (TR) obtidas para cada uma das três réplicas na única concentração em que foram adicionadas AFs. Encontram-se também as taxas de recuperação média, o desvio padrão (SD) e o desvio padrão relativo ( $RSD_r$ ).

**Quadro 4 - Resultados obtidos para os vários métodos testados para extração de AFs, em termos de taxa de recuperação (TR), média, desvio-padrão ( $SD_r$ ) e desvio-padrão relativo ( $RSD_r$ ).**

Parâmetro	Presunto							
	Método	Metanol I				Metanol II		
AFs	B1	B2	G1	G2	B1	B2	G1	G2
<i>Spiking</i>	1 µg/kg	0,3 µg/kg	1 µg/kg	0,3 µg/kg	10 µg/kg	3 µg/kg	10 µg/kg	3 µg/kg
Dia 1								
TR Réplica 1 (%)	71,5	75,6	82,5	99,4	54,3	50,5	57,7	92,0
TR Réplica 2 (%)	64,7	69,9	79,8	94,9	87,8	90,6	79,3	117,7
TR Réplica 3 (%)	65,3	69,2	74,6	97,9	75,3	77,0	90,6	126,2
TR Média (%)	67,2	71,6	79,0	97,4	72,5	72,7	75,8	111,9
$SD_r$	3,7	3,5	4,0	2,3	16,9	20,4	16,7	17,8
$RSD_r$ (%)	5,6	4,9	5,1	2,3	23,3	28,0	22,0	15,9

Como se verifica, o Método do Metanol II foi o que apresentou taxas de recuperação, em geral, mais elevadas (exceto para AFG1) levando à escolha deste método para análise posterior de AFs nas amostras.

#### 4.1.2.2. Validação do Método

Nesta secção são apresentados os resultados de validação do método de extração de AFs para presunto.

No caso das AFs, a precisão instrumental foi avaliada pela análise de quatro soluções padrão durante dois dias consecutivos. As condições de HPLC permitiram a determinação de AFs com tempos de retenção de cerca de 17,5, 21,5, 24,5 e 30,5 minutos para AFG2, AFG1, AFB2 e AFB1, respetivamente (Figura 5).

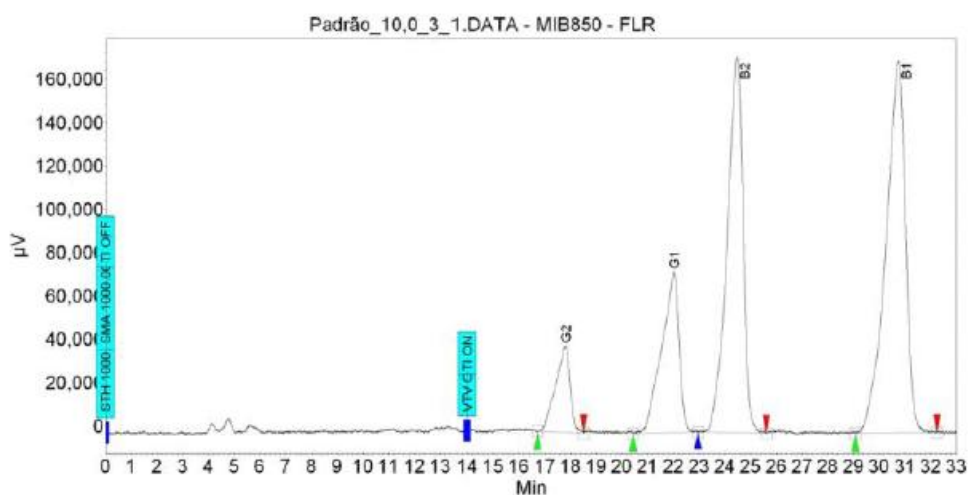


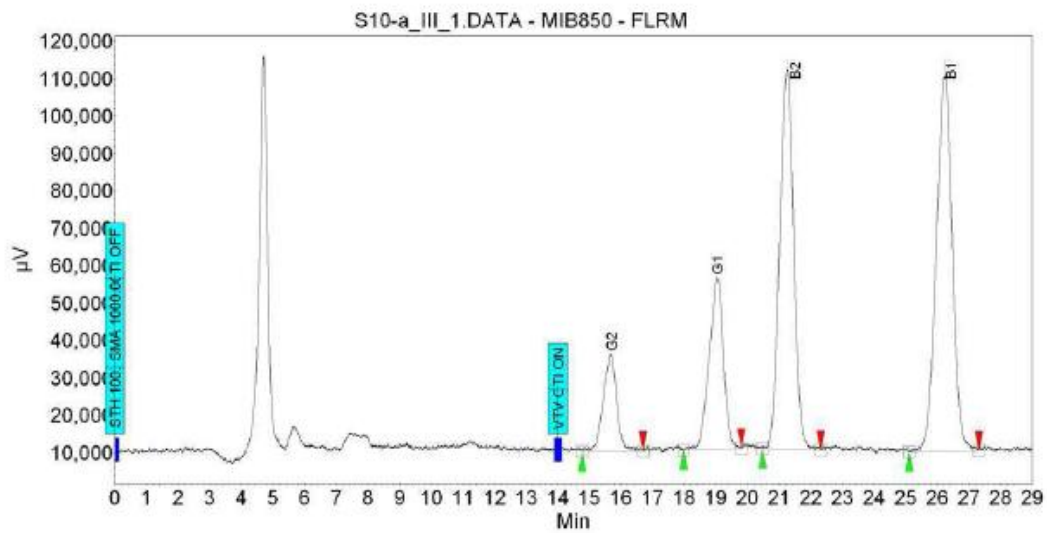
Figura 5 - Cromatograma da solução-padrão de AFs correspondente à concentração 10 ng/mL.

Os parâmetros de calibração estão apresentados no Quadro 5.

Quadro 5 - Parâmetros de Calibração para AFs

Toxina	Curva de Calibração	R <sup>2</sup>	LOD (ng/mL)	LOQ (ng/mL)
AFB1	$y = 9796x - 1305$	0,998		
AFB2	$y = 26051x + 1034$	0,995	0,52	1,70
AFG1	$y = 3732x + 235,4$	0,998		
AFG2	$y = 5426x + 761,7$	0,996		

Para efeitos de validação do método, as AFs foram extraídas e analisadas em triplicado durante dois dias consecutivos. Obtiveram-se cromatogramas com picos bem resolvidos correspondentes às quatro AFs analisadas em presunto (Figura 6).

Figura 6 - Cromatograma do *Spiking* 10 µg/kg de AFs em Presunto

Estão indicados no Quadro 6 os valores das taxas de recuperação (TR) obtidas para cada uma das três réplicas nas duas concentrações em que foram adicionadas AFs. Encontram-se também as taxas de recuperação média, o desvio padrão (SD) e o desvio padrão relativo (RSD<sub>r</sub>) obtidos para cada um dos dias e para os dois dias.

**Quadro 6 - Desempenho e Precisão do Método de Extração de AFs**

Parâmetro	Presunto							
	B1	B2	G1	G2	B1	B2	G1	G2
<i>Spiking</i>	1 µg/kg	0,3 µg/kg	1 µg/kg	0,3 µg/kg	10 µg/kg	3 µg/kg	10 µg/kg	3 µg/kg
Dia 1								
TR Réplica 1 (%)	139	35,5	125,8	436	54,3	50,5	57,7	92
TR Réplica 2 (%)	123,9	63,9	-25,2	187,2	87,8	90,6	79,3	117,7
TR Réplica 3 (%)	138,7	69,5	96,3	187,2	75,3	77	90,6	126,2
TR Média (%)	133,9	56,3	65,6	270,1	72,5	72,7	75,8	111,9
SD <sub>r</sub>	8,7	18,2	80,1	143,7	16,9	20,4	16,7	17,8
RSD <sub>r</sub> (%)	6,5	32,4	122	53,2	23,3	28	22	15,9
Dia 2								
TR Réplica 1 (%)	165,8	120,7	150,5	302,9	123,3	130,6	125,5	168,5
TR Réplica 2 (%)	164,3	129,5	153,3	346,9	113,7	122,1	110,3	147,9
TR Réplica 3 (%)	178,5	168,7	202,2	444,3	132,9	145,8	146,6	186,6
TR Média (%)	169,5	139,6	168,6	364,7	123,3	132,8	127,5	167,7
SD <sub>r</sub>	7,8	25,6	29,1	72,4	9,6	12	18,3	19,3
RSD <sub>r</sub> (%)	4,6	18,3	17,2	19,8	7,8	9	14,3	11,5
Recuperação Média (%)	151,7	97,9	117,1	317,4	97,9	102,8	101,7	139,8
MD <sub>int</sub>	25,2	59	72,8	66,9	35,9	42,5	36,5	39,4
RMD <sub>int</sub> (%)	16,6	60,2	62,2	21,1	36,7	41,4	35,9	28,2
LOD (µg/kg)	1,04							
LOQ (µg/kg)	3,40							
Limites Recomendados								
Recuperação (%)	70-110	50-120	70-110	50-120	70-110	50-120	70-110	50-120
RSD <sub>r</sub> (%)	29,7	42,2	29,7	42,2	21,1	25,1	21,1	25,1
RSD <sub>R</sub> (%)	45	64	45	64	32	38	32	38

Analisando o Quadro verificamos que para a AFB1 as taxas de recuperação variam entre 98 e 152 % e para a AFB2 entre 98 e 103 %. Para a AFG1 e AFG2 as taxas de recuperação variam entre 102 e 117 % e 140 e 317 %, respectivamente. Tal como as taxas de recuperação, os valores de precisão obtidos também variam para as várias aflatoxinas. Para a AFB1 e AFB2 variam entre 17 e 37 % e 41 e 60 %, respectivamente. Para a AFG1 temos variação de valores entre 36 e 62 % e para a AFG2 entre 21 e 28 %.

## 4.2. Detecção e Quantificação de Micotoxinas nas Amostras

Nesta secção são apresentados os resultados das análises de OTA nas amostras de carne fresca e das análises de OTA e de AFs nas amostras de pá e presunto.

### 4.2.1. Análise de OTA em Carne Fresca

Os resultados das análises de OTA em carne fresca são apresentados nesta secção. No Quadro 7 encontram-se os valores obtidos, para OTA, das análises feitas a amostras de carne fresca.

**Quadro 7 - Contaminação de OTA em Carne Fresca**

AMOSTRA	OTA ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )
S45G	<LOQ
S47G	ND
S50G	ND
S56G	ND
S14I	<LOQ
S15I	<LOQ
S16I	<LOQ
S17I	<LOQ
S18I	<LOQ
S19I	ND
S20I	ND
S21I	ND
S22I	ND
S23I	ND
S24I	ND

ND: Não Detetado

<LOQ: Inferior ao Limite de Quantificação

De entre as 15 amostras de carne fresca analisadas, 6 apresentaram contaminação com OTA. O Regulamento (CE) N° 1881/2006 da Comissão Europeia, que fixa os teores de certos contaminantes em géneros alimentícios, apenas estabeleceu limites para produtos de origem vegetal, não existindo qualquer limite de OTA para produtos cárneos e derivados. Os valores limite existentes para produtos de consumo direto variam entre 2 µg/kg e 10 µg/kg (se excluirmos os produtos dirigidos a lactentes). No caso das amostras de carne fresca aqui analisadas nas quais foi detetada a presença de OTA, nenhuma delas atingiu o valor do LOQ de 2,4 µg/kg.

#### 4.2.2. Análise de OTA e AFs em Pá e Presunto

No Quadro 8 encontram-se descritos os valores obtidos para OTA e AFs em amostras de pá e presunto.

**Quadro 8 - Contaminação de OTA e AFs em Pá e Presunto**

AMOSTRA	OTA ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	AFs ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )			
		B1	B2	G1	G2
Porco 1B	ND	ND	ND	ND	ND
Porco 2B	14,74	ND	ND	ND	ND
Porco 3B	<LOQ	ND	ND	ND	ND
Porco 4B	ND	ND	ND	ND	ND
Porco 5B	ND	ND	ND	ND	ND
Porco 6B	<LOQ	ND	ND	ND	ND
Porco 7B	7,89	ND	ND	ND	ND
Porco 8B	ND	ND	ND	ND	ND
Porco 12A	ND	ND	ND	ND	ND
Porco 13A	ND	ND	ND	ND	ND
Porco 14A	ND	ND	ND	ND	ND
Porco 15A	ND	ND	ND	ND	ND
Porco 16A	ND	ND	ND	ND	ND
Porco 17A	2,46	ND	ND	ND	ND
Ovelha 2bb Direito	ND	ND	ND	ND	ND
Cabra 2cc Direito	ND	ND	ND	ND	ND
Cabra 23DD	ND	ND	ND	ND	ND

ND: Não Detetado

<LOQ: Inferior ao Limite de Quantificação

Analisando o Quadro 8 podemos verificar que, nas 14 amostras de pá, foram identificadas 5 amostras com níveis detetáveis de OTA sendo que 3 delas apresentaram níveis quantificáveis da micotoxina. Se tomarmos como referência os valores limite para produtos de consumo direto entre 2  $\mu\text{g}/\text{kg}$  e 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , definidos pelo Regulamento (CE) N° 1881/2006 da Comissão Europeia para outros produtos alimentares, a amostra 2B ultrapassa o valor máximo de 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (estabelecido para passas de uva e café solúvel).

Em nenhuma amostra analisada foi detetada contaminação com AFs.

# Capítulo 5

## 5. Discussão

### 5.1. Validação do Método de Extração e Detecção de OTA

Os parâmetros de calibração (linearidade) que determinam a precisão do equipamento foram satisfatórios. A linearidade é geralmente considerada boa quando o coeficiente de determinação ( $r^2$ ) é  $\geq 0,997$  (Chan, 2004). No nosso caso,  $r^2$  foi apenas ligeiramente abaixo daquele nível (0,996). O valor do limite de quantificação (LOQ) obtido foi de 2,40  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . Trata-se de um valor bastante elevado quando comparado com os obtidos por outros autores utilizando metodologias semelhantes à nossa. Dall'Asta et al. (2010), por exemplo, relatam um valor para LOQ de 0,3  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . Para valores desta grandeza, torna-se bastante imprecisa a quantificação de OTA em baixas concentrações.

Para as taxas de recuperação, o intervalo recomendado, de acordo com o Regulamento (CE) N° 401/2006 da Comissão de 23 de Fevereiro de 2006, é de 70-110 % para OTA. As taxas de recuperação médias obtidas no nosso estudo foram 179 e 115 % (para níveis de *spiking* de 1  $\mu\text{g}/\text{kg}$  e 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , respetivamente) para carne fresca e 79 e 101 % (para níveis de *spiking* de 1  $\mu\text{g}/\text{kg}$  e 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , respetivamente) para presunto. O valor de 179 % de recuperação para a carne fresca para *spiking* de 1  $\mu\text{g}/\text{kg}$  pode prender-se com o facto de que quanto mais baixa é a concentração do analito, maior a incerteza de quantificação. Neste sentido, a validação do método de extração de OTA em carne fresca para valores baixos será repetido e re-analisado no futuro.

Os valores de  $\text{RSD}_r$  foram entre 6,3 e 22 % para carne fresca e 17,9 e 24,3 % para presunto. Por outro lado, os valores de  $\text{RSD}_R$  foram entre 1,1 e 7,7 % para carne fresca e 1,7 e 40,7 % para presunto. Comparando estes valores com os recomendados pelo Regulamento (CE) N° 401/2006 da Comissão de 23 de Fevereiro de 2006 verificamos que o  $\text{RSD}_r$ , em ambas as amostras, ultrapassou ligeiramente o valor máximo recomendado. No caso do  $\text{RSD}_R$ , em carne fresca, os valores obtidos encontram-se abaixo do recomendado o que não acontece no presunto onde os valores obtidos estão acima do máximo recomendado.

Nas condições descritas, obteve-se picos bem resolvidos para OTA com um tempo de retenção de 19 minutos. Os tempos de retenção podem ser reduzidos através do aumento da percentagem de solvente orgânico (Campone et al., 2009). No entanto, quando se analisam os extratos de amostras de alimentos, é comum ter um certo nível de ruído de fundo devido aos materiais extraíveis que co-eluíram, normalmente durante os primeiros minutos da execução. Portanto, a percentagem mais baixa de solvente orgânico utilizado, mesmo que alongue o tempo de execução, é vantajoso para permitir a separação da OTA de possíveis componentes interferentes. Os cromatogramas de HPLC obtidos a partir dos extratos de carne fresca e presunto em branco e obtidos a partir dos *spikings* mostraram claramente que não houve picos de interferência da área de eluição da OTA, o que sugere que o método utilizado (nomeadamente ao nível da limpeza com IAC) é adequado e altamente seletivo para OTA.

## 5.2. Validação do Método de Extração e Detecção de AFs

No caso das AFs, os parâmetros de calibração (linearidade) que determinam a precisão do equipamento foram também satisfatórios. O  $r^2$  foi ligeiramente abaixo do nível para AFB2 e AFG2 (0,995 e 0,996, respetivamente). Para AFB1 e AFG1 o  $r^2$  foi 0,998. No entanto, o valor do limite de quantificação (LOQ), de 3,40  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , obtido é considerado bastante elevado quando comparado com os obtidos por outros autores. Para valores desta grandeza, torna-se bastante imprecisa a quantificação de AFs em baixas concentrações. Utilizando metodologias semelhantes Campone et al. (2009) e Muscarella et al. (2009) relataram níveis LOQ na gama de 0,1-0,22, 0,04, 0,2-0,5 e 0,1  $\mu\text{g}/\text{kg}$  para as quatro AFs. Chun et al. (2007) relataram LOQs de 0,15, 1,40, 1,30 e 2,5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ .

Segundo o Regulamento (CE) N° 401/2006 da Comissão de 23 de Fevereiro de 2006, o intervalo recomendado para as taxas de recuperação é de 70-100 % para AFB1 e AFG1, e 50-120 % para AFB2 e AFG2. No nosso estudo, as taxas de recuperação para a concentração de 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de AFB1 e AFG1 e 3  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de AFB2 e AFG2 situaram-se dentro dos limites estabelecidos, com exceção da AFG2, que é geralmente a AF mais difícil de quantificar.

Em relação aos desvios relativos os intervalos obtidos são superiores aos regulamentados, o que significa que o método apresentou algumas falhas em termos de reprodutibilidade. Os resultados obtidos para os valores de *spiking* mais baixos foram bastante insatisfatórios, tanto em termos de recuperação como de reprodutibilidade. Estes resultados podem ter-se ficado a dever ao facto de termos obtido valores de LOQ bastante elevados, e que, conforme já mencionado, impede a quantificação de valores tão baixos de AFs.

Foram obtidos, nas condições descritas, tempos de retenção entre 15 e 25 minutos para AFB1, AFB2, AFG1 e AFG2.

### 5.3. Detecção e Quantificação de Micotoxinas nas Amostras

No total de 15 amostras de carne fresca analisadas, 6 (40 %) apresentaram contaminação com OTA. No entanto, nenhuma é quantificável pois os valores obtidos foram abaixo do LOQ.

Nas amostras de pá curada de suíno foram identificadas 5 amostras (36 %) com níveis detetáveis de OTA. Destas, apenas 3 apresentaram níveis quantificáveis da micotoxina, entre 2,46 e 14,74  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , com valor médio de 8,4  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . Nenhuma das amostras de presunto de ovino e caprino apresentou contaminação com OTA. Em nenhuma das amostras de pá e de presunto foi detetada contaminação com AFs.

Como dito anteriormente, o Regulamento (CE) N° 1881/2006 da Comissão Europeia fixa os teores máximos de certos contaminantes presentes nos géneros alimentícios. Para os produtos cárneos e derivados não existe qualquer limite de OTA no entanto, para produtos de consumo direto o valor limite encontra-se entre 2  $\mu\text{g}/\text{kg}$  e 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . Tendo em conta este limite verificamos que uma amostra de pá (Porco 2B) ultrapassa o nível máximo referido. Para AFs também não existe qualquer limite, apenas que, para produtos de consumo direto os valores situam-se, para AFB1, entre 0,1  $\mu\text{g}/\text{kg}$  e 8  $\mu\text{g}/\text{kg}$  e para o somatório de AFB1, AFB2, AFG1 e AFG2 encontram-se entre 4  $\mu\text{g}/\text{kg}$  e 15  $\mu\text{g}/\text{kg}$ .

Os resultados de contaminação com OTA de carne de porco e derivados obtidos neste estudo são comparáveis aos obtidos noutros estudos. Pietri et al. (2006) relatam 9 % de amostras de carne fresca e 40 % de amostras de presunto contaminadas com OTA, com níveis máximos de OTA de 0,06  $\mu\text{g}/\text{kg}$  e 28,42  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , respetivamente. Matrella et al. (2006) estudaram a ocorrência de OTA em músculo de porcos abatidos em Itália e detetaram contaminação média de 0,024  $\mu\text{g}/\text{kg}$  e máxima de 0,9  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . Chiavaro et al. (2002) relatam contaminação máxima de presuntos com 6 meses de cura com 2,2  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de OTA.

No presente estudo, detetou-se contaminação da carne fresca de porco com níveis de OTA não quantificáveis. Essa contaminação poderá resultar do consumo, pelo animal, de ração contaminada. Nas pás curadas de suíno, o nível de contaminação é

bastante superior. Neste caso, a acumulação de OTA terá provavelmente origem no desenvolvimento de fungos ocratoxigénicos e consequente produção de OTA. Como descrito anteriormente, fatores como quantidade de sal, atividade da água, pH e temperatura influenciam o crescimento fúngico e a produção de micotoxinas. As condições de cura das pás e dos presuntos analisados foram controladas a uma humidade e temperatura entre 70-75 % e 9/10 °C, respetivamente. Segundo Rodríguez et al. (2012) espécies ocratoxigénicas do género *Penicillium* têm um crescimento elevado a uma humidade de 84 %, correspondente a uma atividade da água dos presuntos de 0,84, valor se que se aproxima da atividade da água geralmente encontrada nos presuntos com tempo de cura longo. Por outro lado, o pH ótimo para o crescimento fúngico varia entre 5 e 6. Para as amostras de pá, o pH variou entre 5,9 e 6,17, o que significa que o fator pH não terá sido fator limitante ao desenvolvimento fúngico e produção de toxina. Por outro lado, os fungos ocratoxigénicos associados à carne têm temperatura ótima de crescimento próxima de 25 °C, mas crescem e produzem toxina também a valores próximos de 10-15 °C. Neste sentido, o controlo do desenvolvimento fúngico e da consequente produção de OTA torna-se bastante difícil nos produtos cárneos em causa.

Fungos aflatoxigénicos (*Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*) produzem AFs a temperaturas superiores a 25 °C (Gqaleni et al. 1997). Ao longo do período de cura, as condições de atividade da água foram adequadas ao crescimento do fungo e produção de AFs, mas as temperaturas demasiado baixas terão limitado a produção destas toxinas.

Neste estudo não foi possível analisar a contaminação com OTA da carne usada para a produção dos presuntos aqui analisados. No entanto, foram analisadas 15 amostras de carne fresca com o objetivo de inferir sobre a possibilidade de estar a ser usada carne fresca para produção de presuntos já com alguma contaminação.

No caso de a matéria-prima não estar contaminada e o produto final possuir contaminação significa que esta contaminação se desenvolveu durante o processo de cura por crescimento de fungos que por sua vez produziram micotoxinas.

# Capítulo 6

## 6. Conclusões

Neste estudo podemos concluir que os métodos de extração de OTA e AFs apresentaram taxas de recuperação geralmente adequadas. No entanto, devido a problemas no equipamento de deteção, que resultaram em valores de LOD e LOQ elevados, apenas foi possível quantificar OTA em amostras naturalmente contaminadas a valores superiores ao recomendado. Pretende-se, desta forma, obter a breve prazo a concentração de OTA para as amostras nas quais a toxina apenas foi detetada.

Relativamente às amostras analisadas, podemos concluir que as pás curadas de origem suína apresentam risco para a saúde do consumidor em termos de contaminação com OTA. Uma vez que, pelos resultados obtidos neste estudo, a contaminação da carne fresca é aparentemente bastante baixa, podemos concluir que os elevados níveis de contaminação com OTA das pás se deve à sua acumulação durante o processo de cura. Por esta razão, as condições de cura destes produtos, nomeadamente ao nível da temperatura e humidade relativa da câmara de cura, devem ser controladas de forma a impedir o desenvolvimento de fungos e respetiva produção de toxina.

Quanto aos presuntos de ovino e caprino, o baixo número de amostras analisado não nos permite tirar uma conclusão válida sobre as condições de segurança destes produtos relativamente à contaminação com OTA. No entanto, podemos considerar que o período de cura, mais curto do que o das pás curadas de suíno, será menos propício à acumulação de níveis detetáveis de OTA.

No que se refere à contaminação por AFs, a ausência de contaminação a níveis detetáveis pode significar que, apesar da potencial presença de fungos aflatoxigénicos, as condições de cura não são adequadas à produção destas toxinas.

Neste estudo a análise das amostras de pá e presunto foi feita numa camada superficial com cerca de 2 cm de profundidade. No entanto, dado que a OTA é produzida por fungos que crescem nas pás e nos presuntos durante todo o processo de cura, seria também interessante avaliar se a acumulação desta micotoxina está limitada à superfície, ou se ocorre difusão para os tecidos interiores. Este é um estudo que perspetivamos desenvolver no futuro.

# Capítulo 7

---

## 7. Referências Bibliográficas

Asefa, D. T., Kure, C. F., Gjerde, R. O., Omer, M. K., Langsrud, S., Nesbakken, T., et al. (2010). Fungal growth pattern, sources and factors of mould contamination in a dry-cured meat production facility. *International Journal of Food Microbiology* 140 , 131-135.

Bennett, J. W., & Klich, M. (2003). Mycotoxins. *Clinical Microbiology Reviews* , 497-516.

Campone, L., Piccinelli, A. L., Aliberti, L., & Rastrelli, L. (2009). Application of pressurized liquid extraction in the analysis of aflatoxins B1, B2, G1 and G2 in nuts. *Journal of Separation Science* 32 , 3837-3844.

Chan, C. C. (2004). Potency Method Validation. In, Analytical Method Validation and Instrument Performance Verification. *John Wiley Interscience* , 11-26.

Chiavaro, E., Lepiani, A., Colla, F., Bettoni, P., Pari, E., & Spotti, E. (2002). Ochratoxin A determination in ham by immunoaffinity clean-up and a quick fluorometric method. *Food Additives and Contaminants* 19 , 575-581.

Chun, H. S., Kim, H. J., Ok, H. E., Hwang, J. B., & Chung, D. H. (2007). Determination of aflatoxin levels in nuts and their products consumed in South Korea. *Food Chemistry* 102 , 385-391.

Dall'Asta, C., Galaverna, G., Bertuzzi, T., Moseriti, A., Pietri, A., Dossena, A., et al. (2010). Occurrence of ochratoxin A in raw ham muscle, salami and dry-cured ham from pigs fed with contaminated diet. *Food Chemistry* 120 , 978-983.

Duarte, S. C., Lino, C. M., & Pena, A. (2012). Food safety implications of ochratoxin A in animal-derived food products. *The Veterinary Journal* 192 , 286-292.

Gqaleni, N., Smith, J. E., Lacey, J., & Gettinby, G. (1997). Effects of temperature, water activity, and incubation time on production of aflatoxins and cyclopiazonic acid

by an Isolate of *Aspergillus flavus* in surface agar culture. *Applied and Environmental Microbiology* 63 , 1048-1053.

Iamanaka, B. T., Taniwaki, M. H., Menezes, H. C., Vicente, E., & Fungaro, M. H. (2005). Incidence of toxigenic fungi and ochratoxin A in dried fruits sold in Brazil. *Food Additives and Contaminants* 22 , 1258-1263.

Katz, S. E., & Siewerski, M. (1992). Drug residue analysis using immunoaffinity chromatography. *Journal of Chromatography* 642 , 403-409.

Leung, M. C., Diaz-Llano, G., & Smith, T. K. (2006). Mycotoxins in pet food: a review on worldwide prevalence and preventative strategies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* , 9623-9635.

Mateo, E. M., Gil-Serna, J., Patiño, B., & Jiménez, M. (2011). Aflatoxins and ochratoxin A in stored barley grain in Spain and impact of PCR-based strategies to assess the occurrence of aflatoxigenic and ochratoxigenic *Aspergillus* spp. *International Journal of Food Microbiology* 149 , 118-126.

Matrella, R., Monaci, L., Milillo, M. A., Palmisano, F., & Tantillo, M. G. (2006). Ochratoxin A determination in paired kidneys and muscle samples from swines slaughtered in southern Italy. *Food Control* 17 , 114-117.

Ministero della Sanità 1999. Circolare 9 giugno 1999 N° 10. (1999). *Gazzetta Ufficiale della Repubblica Italiana* 135 .

Muscarella, M., Iammarino, M., Nardiello, D., Magro, D. L., Palermo, C., Centonze, D., et al. (2009). Validation of a confirmatory analytical method for the determination of aflatoxins B1, B2, G1 and G2 in foods and feed materials by HPLC with on-line photochemical derivatization and fluorescence detection. *Food Additives and Contaminants Part A - Chemistry Analysis Control Exposure & Risk Assessment* 26 , 1402-1410.

Pietri, A., Bertuzzi, T., Gualla, A., & Piva, G. (2006). Occurrence of ochratoxin A in raw ham muscles and in pork products from Northern Italy. *Food Science* 18 , 99-106.

Regulamento (CE) N° 1881/2006 da Comissão de 19 de Dezembro de 2006 que fixa os teores máximos de certos contaminantes presentes nos géneros alimentícios. (2006). *Jornal Oficial da União Europeia* , 5-24.

Regulamento (CE) N° 401/2006 da Comissão de 23 de Fevereiro de 2006 que estabelece os métodos de amostragem e de análise para o controlo oficial dos teores de micotoxinas nos géneros alimentícios. (2006). *Jornal Oficial da União Europeia* , 12-34.

Resnik, S., Neira, S., Pacin, A., Martinez, E., Apro, N., & Latreite, S. (1996). A survey of the natural occurrence of aflatoxins and zearalenone in Argentine field maize: 1983-1994. *Food Additives and Contaminants* 13 , 115-120.

Rodrigues, P., Venâncio, A., & Lima, N. (2012). Aflatoxigenic fungi and aflatoxins in Portuguese almonds. *The Scientific World Journal* , 1-9.

Rodrigues, P., Venâncio, A., & Lima, N. (2012). Mycobiota and mycotoxins of almonds and chesnuts with special reference to aflatoxins. *Food Research International* 48 , 76-90.

Rodríguez, A., Rodríguez, M., Martín, A., Delgado, J., & Córdoba, J. (2012). Presence of ochratoxin A on the surface of dry-cured Iberian ham after initial fungal growth in the drying stage. *Meat Science* 92 , 728-734.

Rodríguez, A., Rodríguez, M., Martín, A., Nuñez, F., & Córdoba, J. J. (2012). Evaluation of hazard of aflatoxin B1, ochratoxin A and patulin production in dry-cured ham and early detection of producing moulds by qPCR. *Food Control* 27 , 118-126.

Shephard, G. S. (2000). Analytical methodology for mycotoxins: recent advances and future challenges. *Mycotoxins and Phycotoxins in Perspective at the Turn of the Millenium* 2 , 19-28.

Stroka, J., Otterdijk, R. V., & Anklam, E. (2000). Immunoaffinity column clean-up prior to thin-layer chromatography for the determination of aflatoxins in various food matrices. *Journal of Chromatography A* 904 , 251-256.

Taverniers, I., Loose, M. D., & Bockstaele, E. V. (2004). Trends in quality in the analytical laboratory: II. Analytical method validation and quality assurance. *Trends in Analytical Chemistry* 23 , 535-552.

Toscani, T., Moseriti, A., Dossena, A., Dall'Asta, C., Simoncini, N., & Virgili, R. (2007). Determination of ochratoxin A in dry-cured meat products by a HPLC-FLD quantitative method. *Journal of Chromatography B* 855 , 242-248.

Trucksess, M. W. (2000). Rapid analysis (thin layer chromatographic and immunochemical methods) for mycotoxins in food and feeds. *Mycotoxins and Phycotoxins in Perspective at the Turn of the Millenium 2* , 29-40.

Ventura, M., Gómez, A., Anaya, I., Díaz, J., Broto-Puig, F., Agut, M., et al. (2004). Determination of aflatoxins B1, G1, B2 and G2 in medicinal herbs by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1048 , 25-29.