



CATÓLICA

UNIVERSIDADE CATÓLICA PORTUGUESA | PORTO
Escola Superior de Biotecnologia

Casos Práticos de Validação e Controlo da Qualidade em Laboratórios de Ensaios da Área Alimentar

Fátima Silva, Pedro Machado

Porto, 26 Maio 2010

CINATE



IPAC
acreditação

L0147
Ensaios



- Química
- Análise sensorial
- Microbiologia
- Embalagem



CATÓLICA
UNIVERSIDADE CATÓLICA PORTUGUESA | PORTO
Escola Superior de Biotecnologia

Validação de Métodos

	Métodos normalizados	Métodos adaptados pelo laboratório	Métodos desenvolvidos pelo laboratório
Parâmetros de avaliação obrigatória	Estudo da repetibilidade Estudo da precisão intermédia Ensaios interlaboratoriais/ comparações interlaboratoriais Percentagens de recuperação Estimação da incerteza dos resultados		
Parâmetros de avaliação complementar	Avaliação da conformidade das condições de uso com as características de desempenho prescritas no método normalizado	Estudo das curvas de calibração Estudo dos limiares analíticos Ensaios em materiais de referência	Especificidade / Selectividade Estudo das curvas de calibração Estudo dos limiares analíticos Estudo da robustez do método Ensaios em materiais de referência Comparação com resultados obtidos por um método alternativo



Aflatoxinas - EN 12955:1999 e 14123:2003

Estudo de caso

IPAC
accreditação
L0147
Ensaços



CATÓLICA
UNIVERSIDADE CATÓLICA PORTUGUESA | PORTO
Escola Superior de Biotecnologia

Estudo de Casos

Aflatoxinas

As aflatoxinas, são micotoxinas produzidas por fungos do género *Aspergillus*. Merecem especial atenção por parte da indústria dos alimentos e do público em geral porque apresentam uma alta toxicidade quer para o homem quer para os animais constituindo uma preocupação mundial. Os bolores do género *Aspergillus*, mais propriamente as espécies *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*, são susceptíveis de elaborar essas substâncias extraordinariamente tóxicas durante o crescimento quando as condições são favoráveis.



Estudo de Casos

Aflatoxinas

Isto acontece quer no campo, na colheita, no carregamento, no transporte (terrestre e marítimo), no armazém, na embalagem, no local de venda, no restaurante, e até em casa onde o produto aguarda para ser consumido. As aflatoxinas podem permanecer no alimento após a morte do fungo que as produz, podendo apresentar-se em alimentos onde não são verificadas alterações visíveis. Elas são mutagénicas, carcinogénicas e altamente tóxicas para grande número de animais.



Estudo de Casos

Aflatoxinas

A sensibilidade ao tóxico varia grandemente de espécie para espécie, dependendo da idade, sexo, condições nutricionais do animal, nível de dosagem, frequência e composição da dieta.

Embora o órgão mais afectado seja o *fígado*, no qual produzem alterações tumorais e tecidulares, podem também ser afectados outros órgãos.



Estudo de Casos

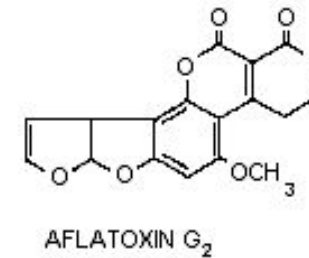
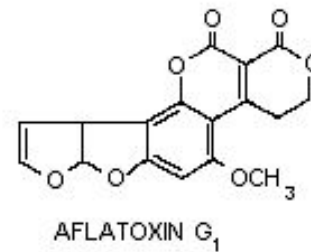
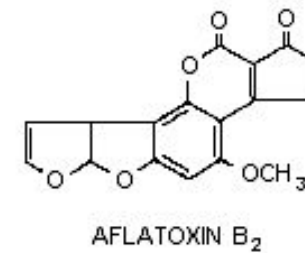
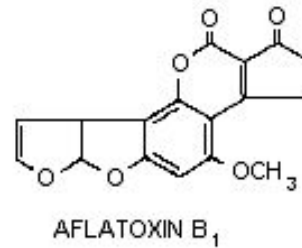
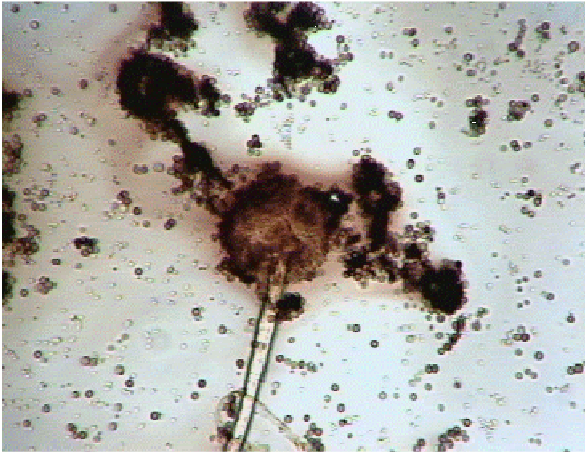
Aflatoxinas

Podem ser encontradas várias aflatoxinas nos produtos alimentares, sendo as mais importantes e mais vulgarmente conhecidas as **B1**, **B2**, **G1** e **G2**. A aflatoxina **B1** é de todas as aflatoxinas conhecidas a mais importante em termos de ocorrência e toxicidade.



Estudo de Casos

Aflatoxinas



Estudo de Casos

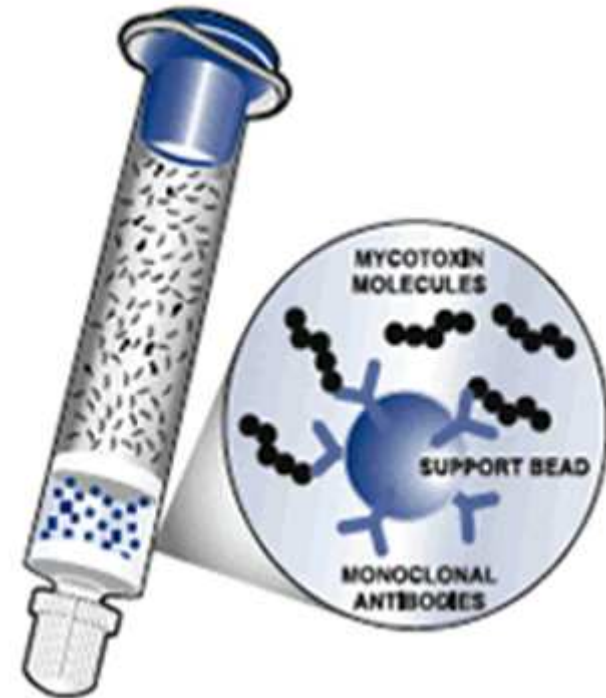
Aflatoxinas – Avelãs



Estudo de Casos

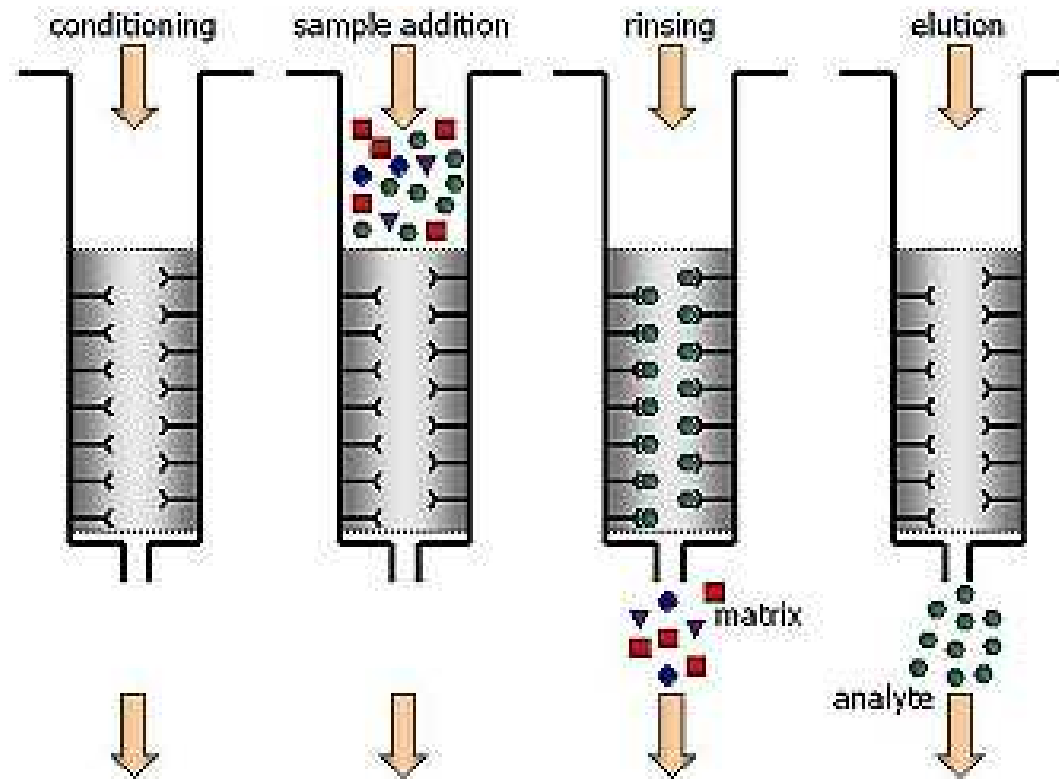
Aflatoxinas - EN 12955:1999 e EN 14123:2003

1. Homogeneização da amostra
2. Extracção
3. Diluição e filtração
4. Purificação (imunoafinidade)
5. Separação por HPLC
5. Derivatização e quantificação - fluorescência



Estudo de Casos

Aflatoxinas - Purificação por imunoafinidade



Estudo de Casos

Aflatoxinas – Controlo de qualidade dos resultados

Controlo de Qualidade Externo

- Participação em Ensaio Interlaboratoriais

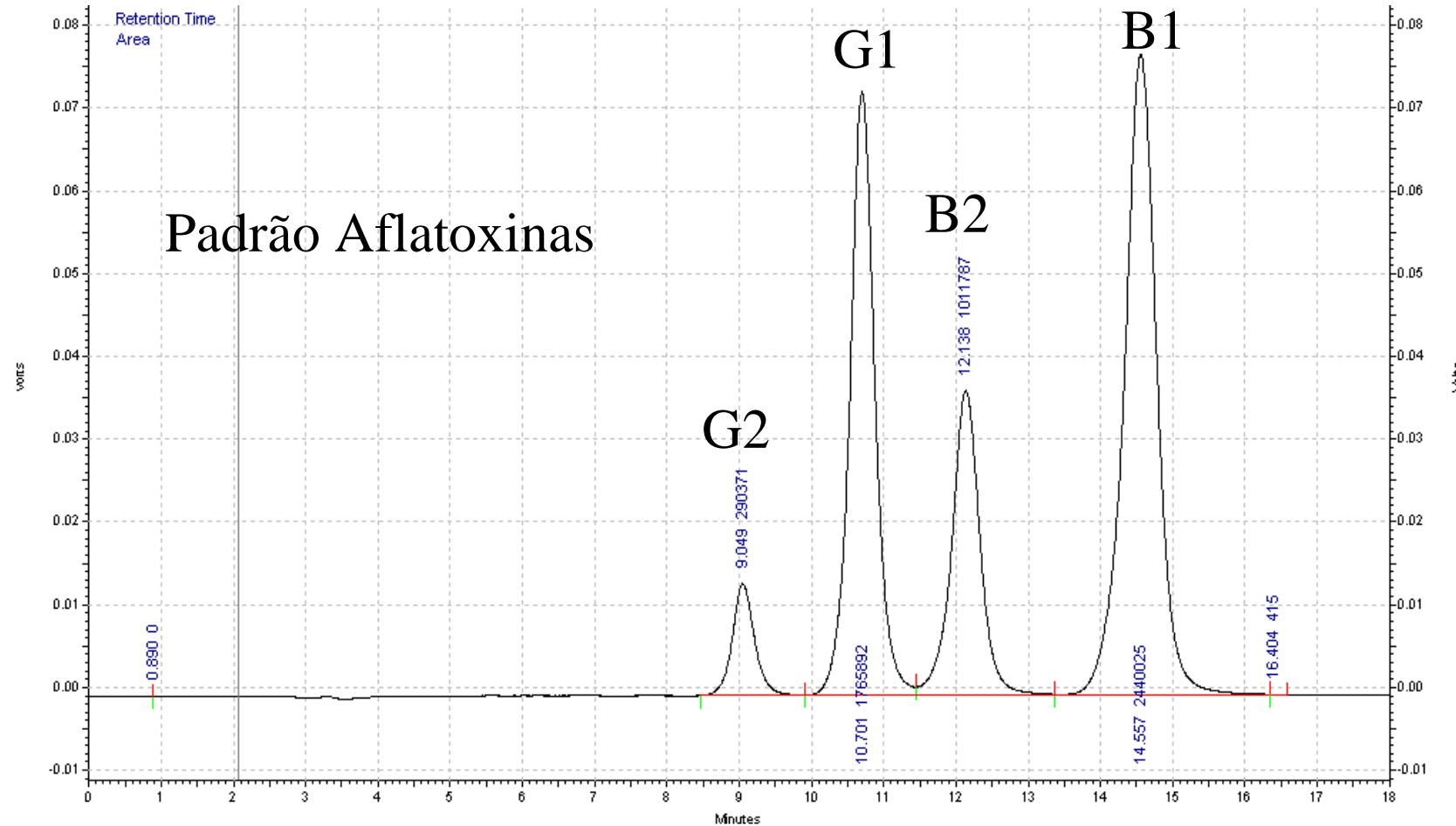
Controlo de Qualidade Interno

- Realização de ensaios em duplicado
- Realização de ensaios de recuperação
- Controlo das curvas de calibração
- Validação do LQ



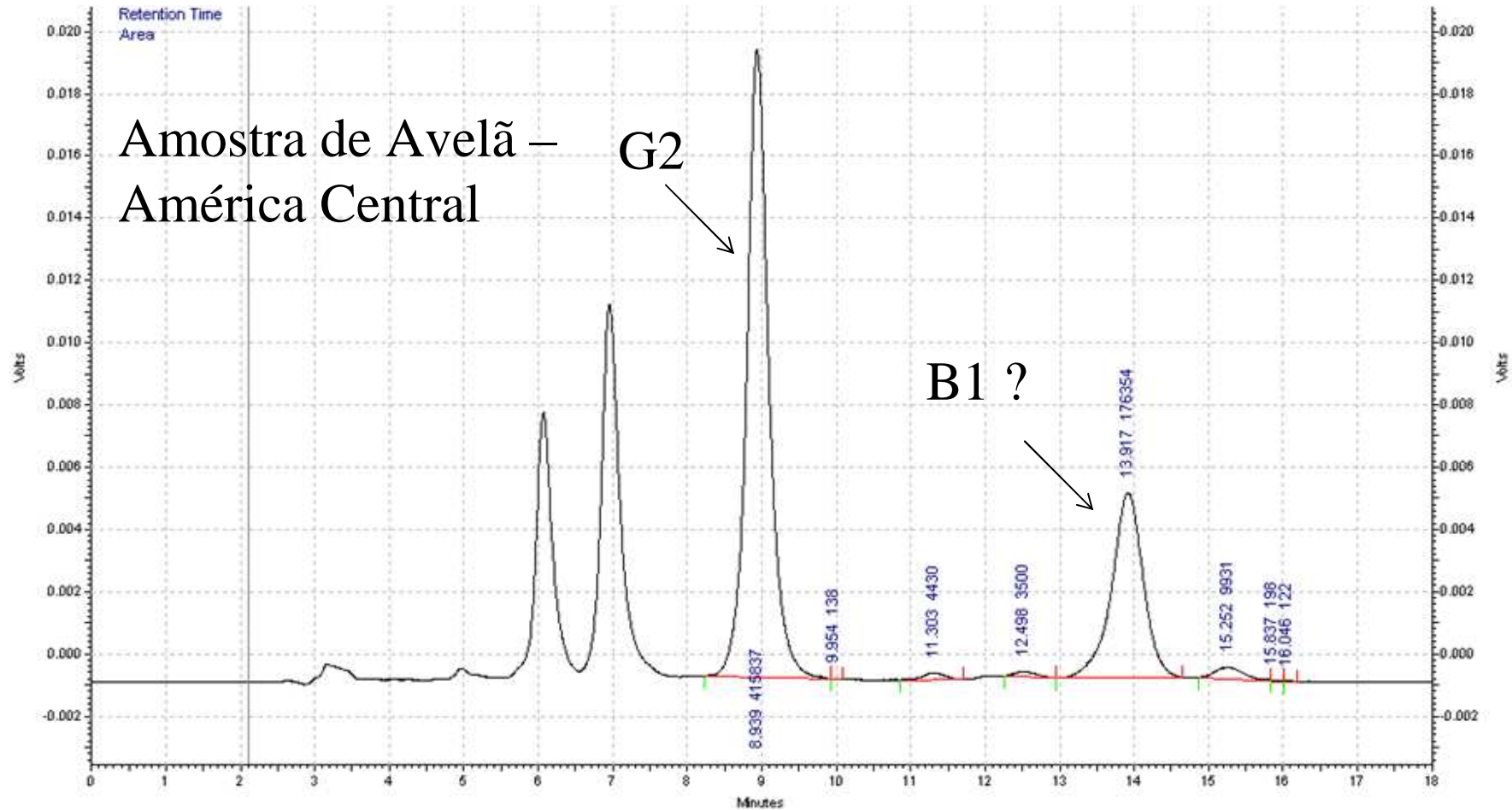
Estudo de Casos

Aflatoxinas



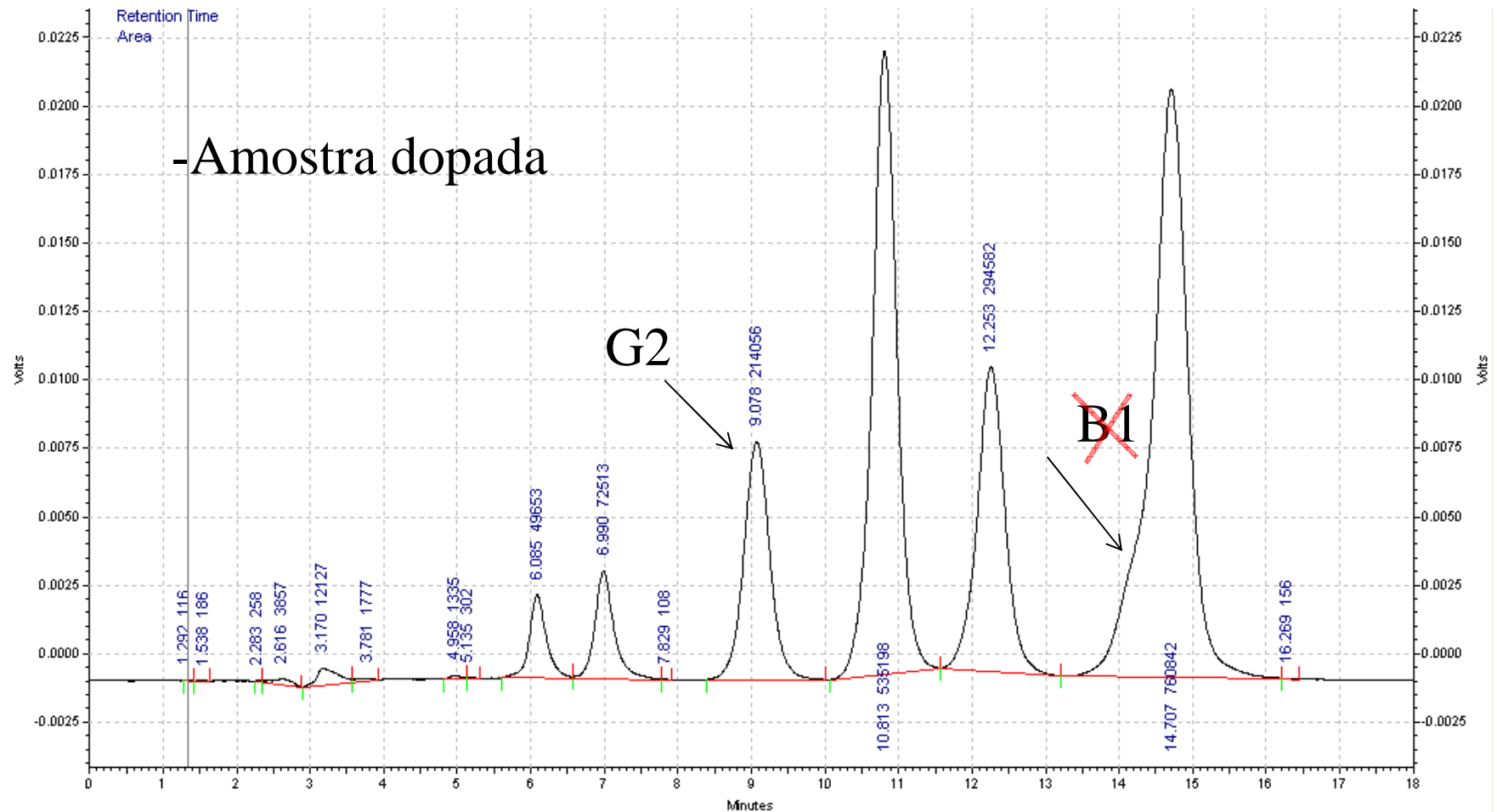
Estudo de Casos

Aflatoxinas



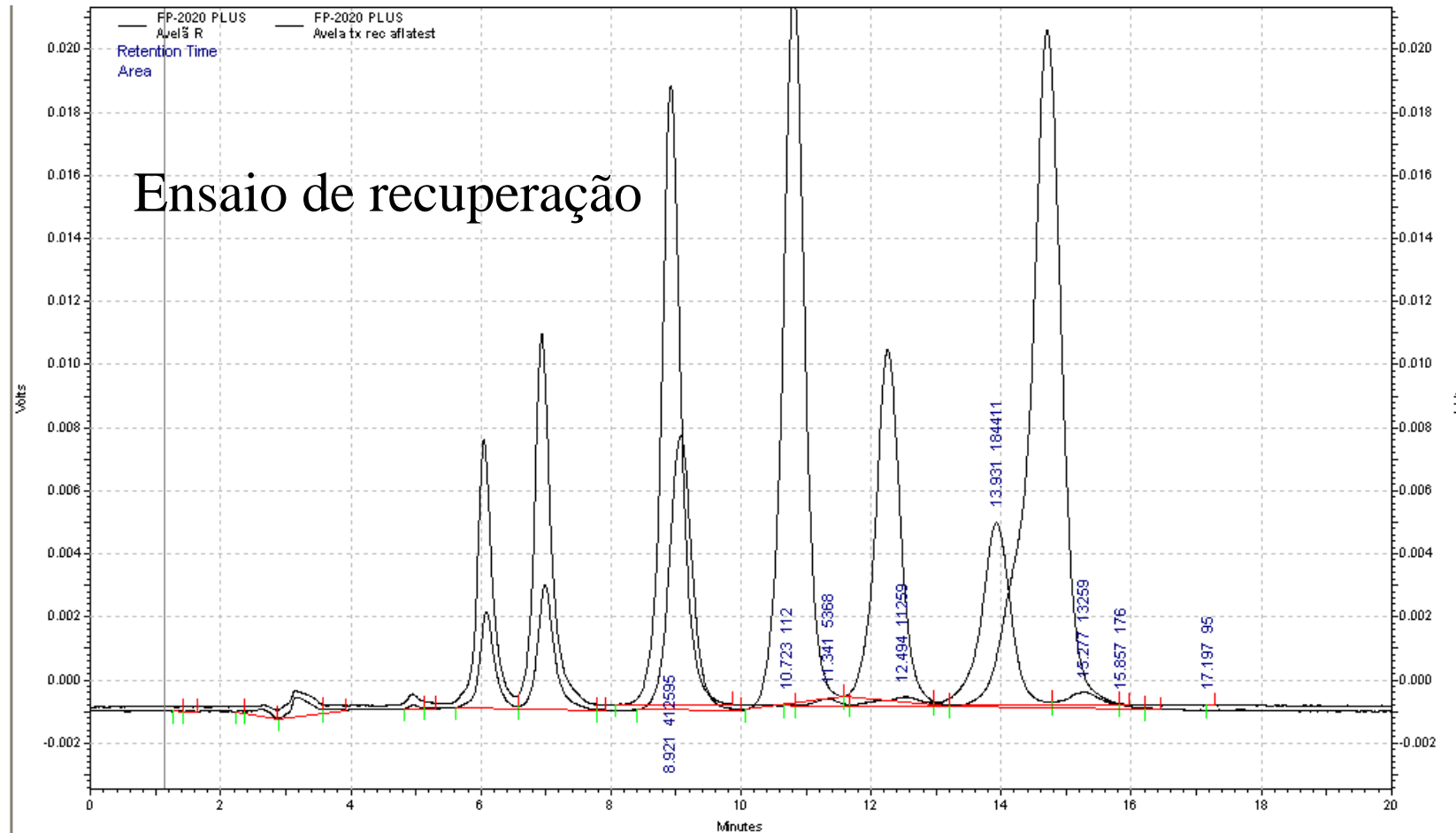
Estudo de Casos

Aflatoxinas



Estudo de Casos

Aflatoxinas



Estudo de Casos

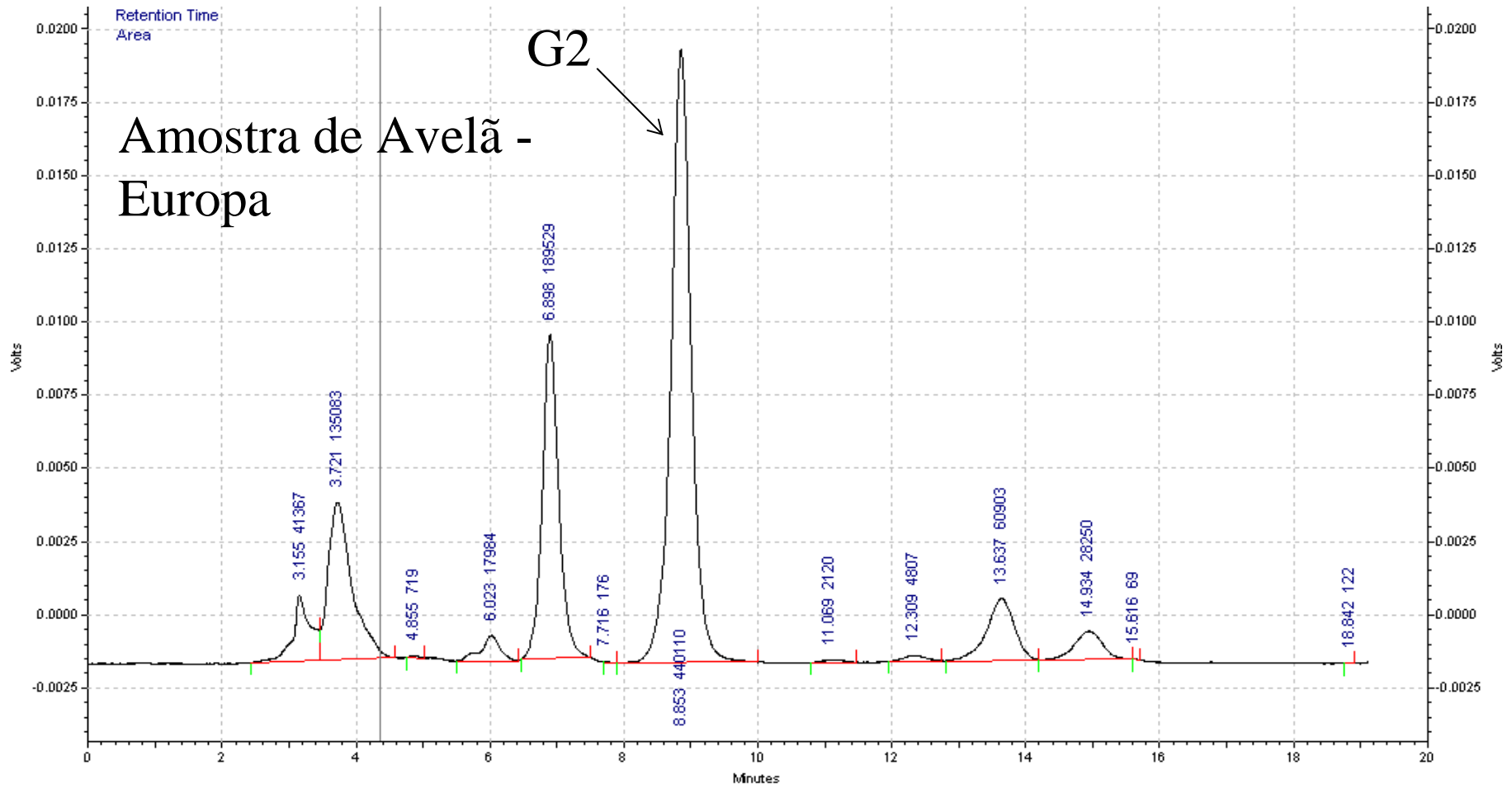
Aflatoxinas

A amostra de avelã apresenta um teor de G2 muito superior ao limite máximo legal, não sendo detectadas G1, B2 e B1



Estudo de Casos

Aflatoxinas



Estudo de Casos

Aflatoxinas

A amostra de avelã apresenta um teor de G2 muito superior ao limite máximo legal!



Estudo de Casos

Aflatoxinas

Causas possíveis

- Factores climatéricos e/ou geográficos?
- Más condições de transporte?
- Mau armazenamento?
- Problema da matriz/metodologia?



Estudo de Casos

Aflatoxinas

Causas possíveis

-Factores climatéricos e/ou geográficos



ano excepcionalmente chuvoso, mas proveniente de produtores diferentes e países distantes!

-Más condições de transporte/ Armazenamento



a empresa afirmava que se havia certificado que tudo estava conforme!

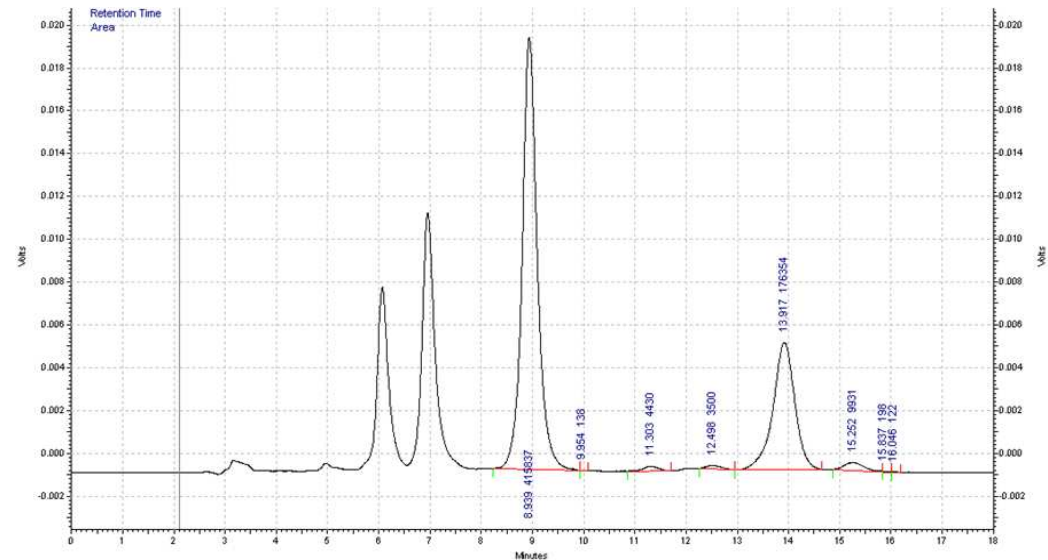


Estudo de Casos

Aflatoxinas

Amostra de Avelã –
Europa Leste

A amostra de avelã apresenta um teor de G2 muito superior ao limite máximo legal



O que se passa?



Estudo de Casos

Aflatoxinas

Causas possíveis

➔ **Problema no ensaio?**

Controlo da qualidade externo

Todos os interlaboratoriais OK

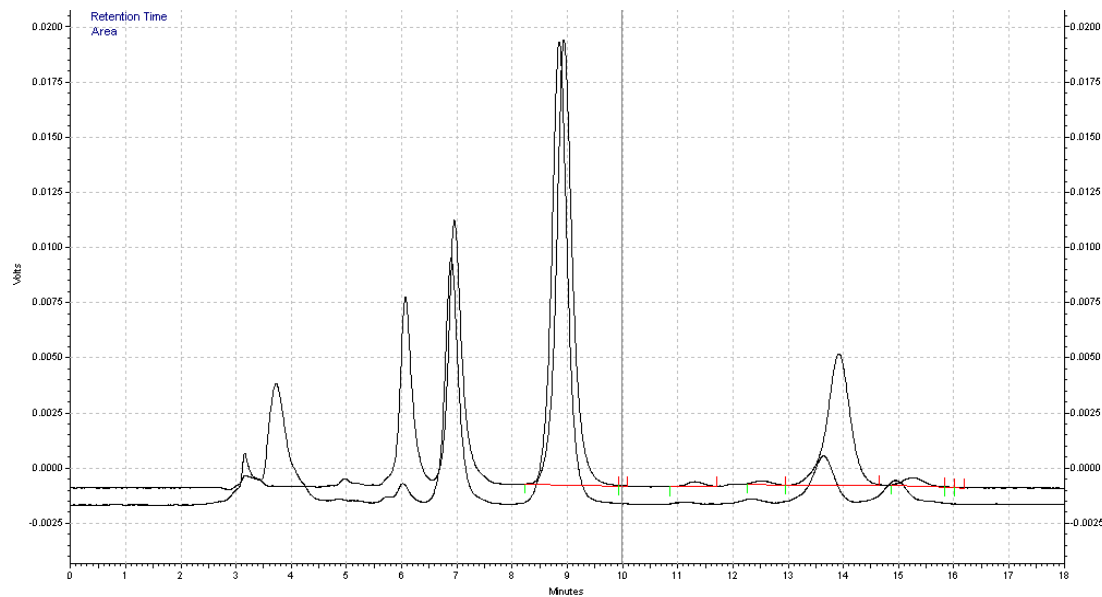
Controlo da qualidade interno - Revisão



Estudo de Casos

Aflatoxinas

- Comparação dos cromatogramas obtidos nos diferentes ensaios sobre a amostras de avelãs



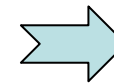
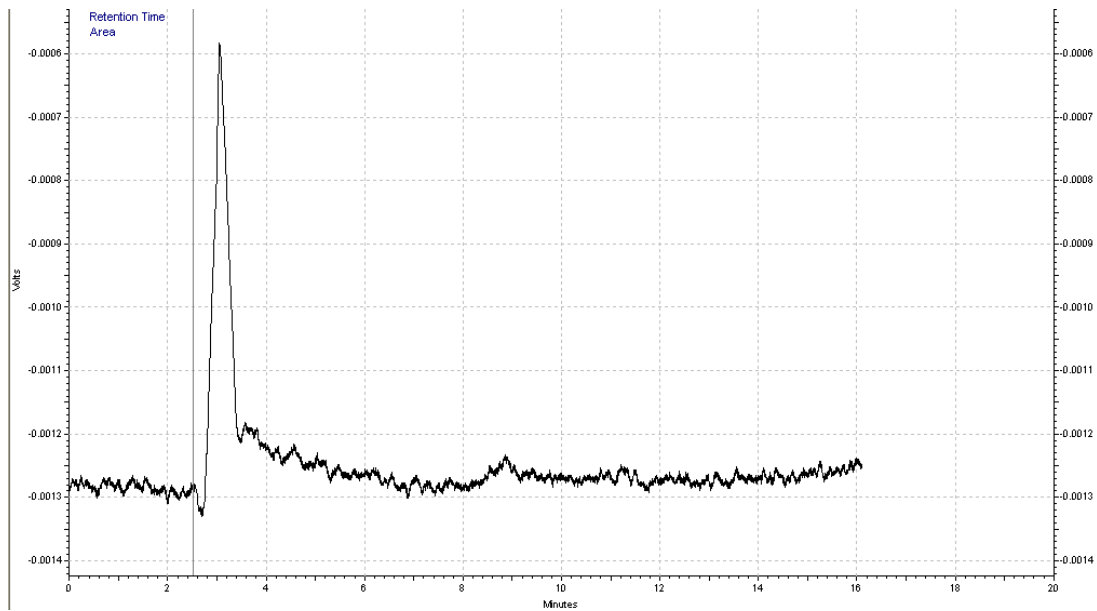
Similares



Estudo de Casos

Aflatoxinas

- Contaminação ?



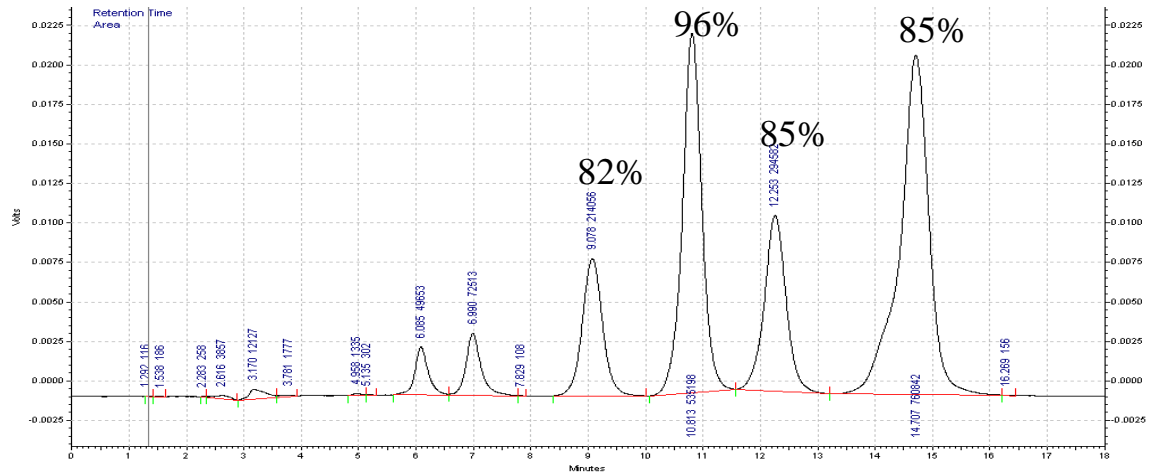
Branco OK



Estudo de Casos

Aflatoxinas

- Recuperação ?



➔ Recuperação OK

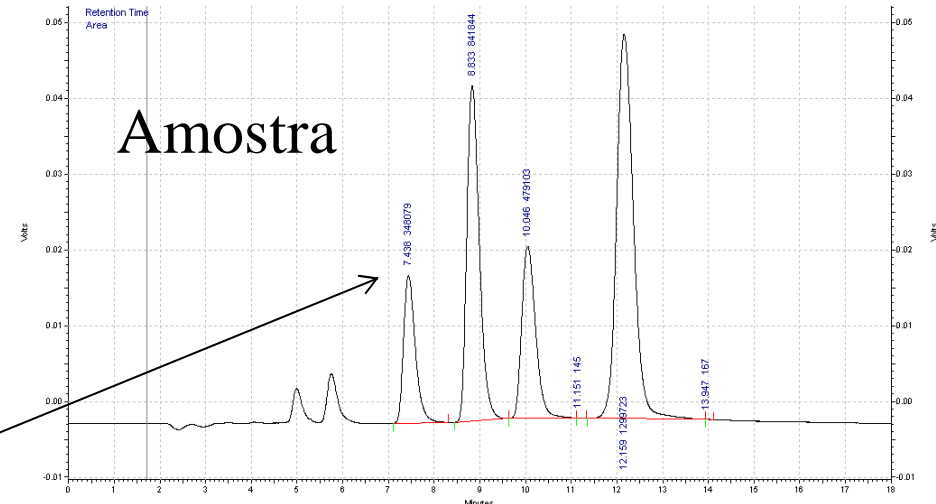
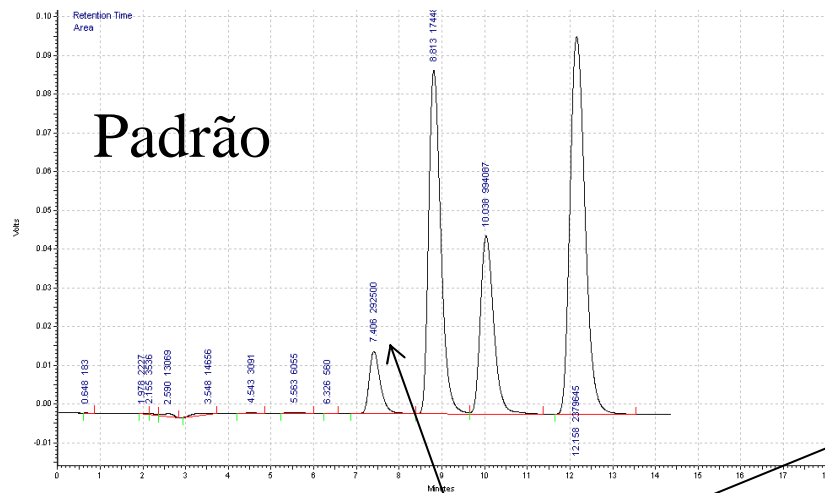


Estudo de Casos

Aflatoxinas

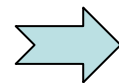
- Separação cromatográfica?

nova coluna de HPLC



Ex: G2

Tempo de retenção = 7,80 min.



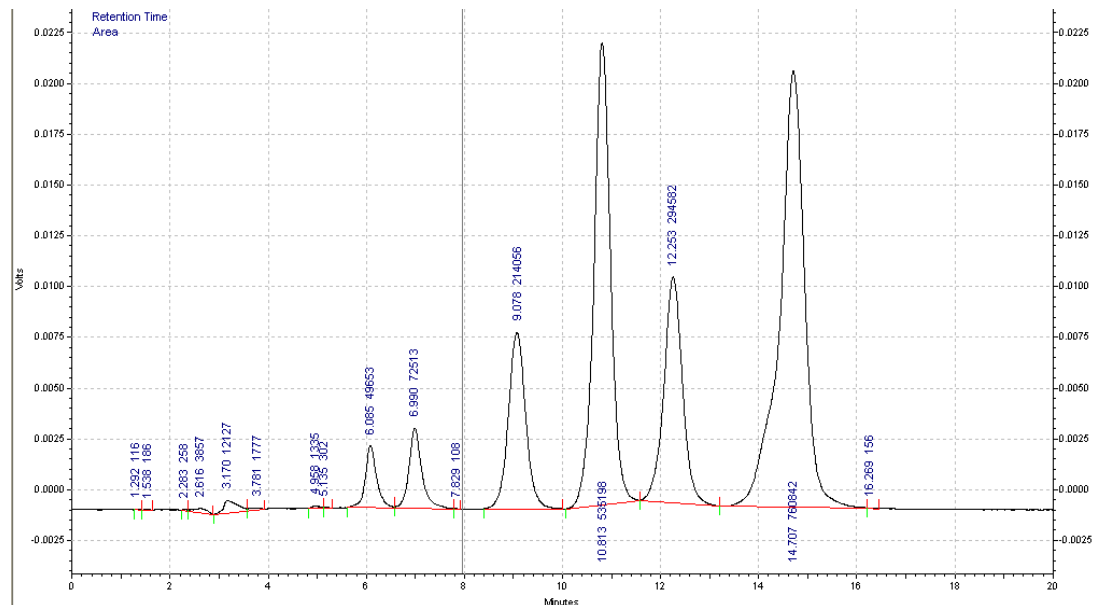
Separação OK



Estudo de Casos

Aflatoxinas

-Problema na coluna de imunoafinidade?



cumpe todos
critérios
EN 12955:1999
e 14123:2003

Apenas 2 marcas de colunas no mercado, ambas credíveis!



Estudo de Casos

Aflatoxinas

-Problema na coluna de imunoafinidade?

Trigo OK, Milho OK, Cevada OK, Pistáchios OK, Figos OK, Amendoins OK, Especiarias OK, Nozes OK, Cajus OK, Arroz OK, Uva Passa OK, Alimentos Compostos OK, etc...

Problema na coluna de imunoafinidade para a avelã?



Estudo de Casos

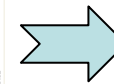
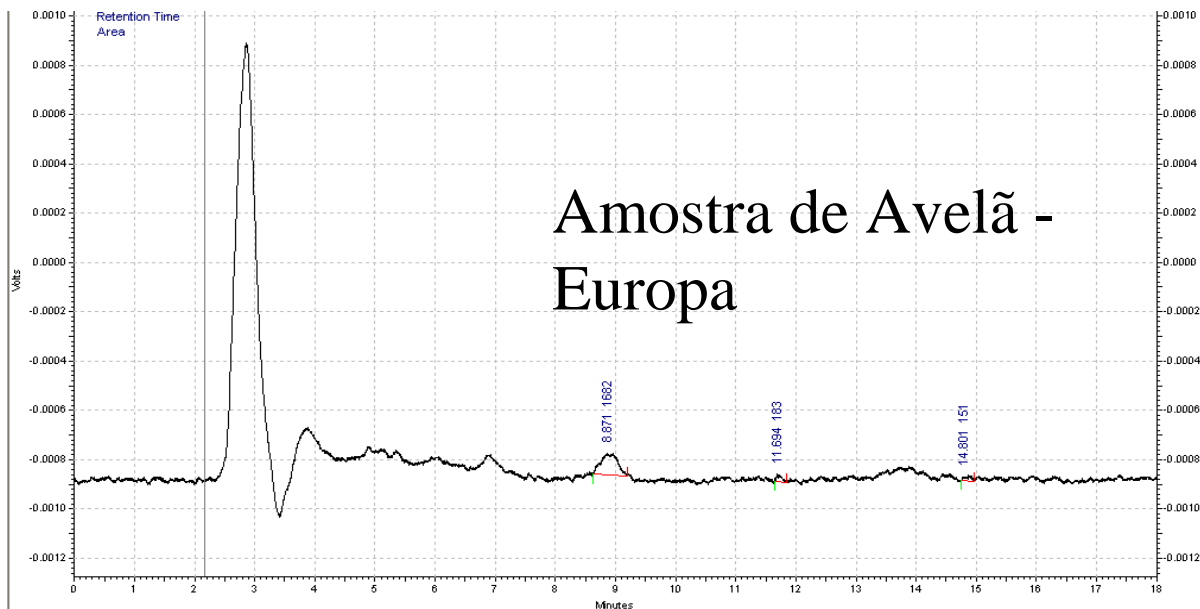
Aflatoxinas



Estudo de Casos

Aflatoxinas

Utilização de coluna imunoafinidade **marca 2**



Resultados
diferentes!

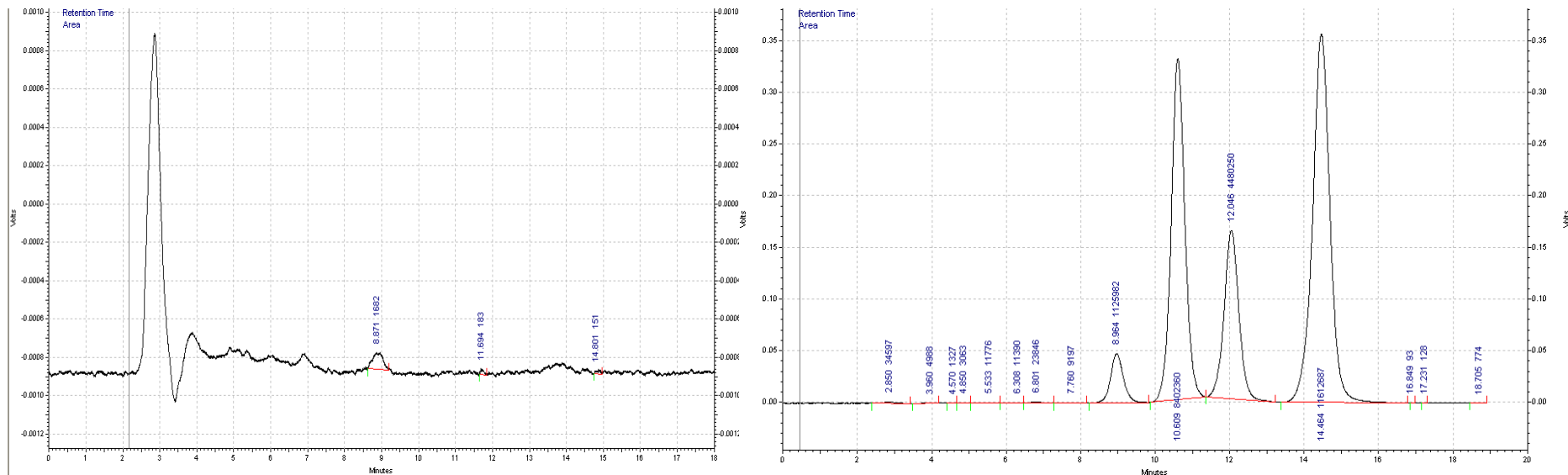
G2 ausente



Estudo de Casos

Aflatoxinas

-Problema na coluna de imunoafinidade **marca 2?**



⇒ Branco OK

⇒ Recuperação OK

⇒ cumpre EN 12955:1999 e 14123:2003



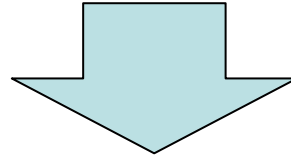
Estudo de Casos

Aflatoxinas



Estudo de Casos

Aflatoxinas



Estamos perante um problema de coluna de afinidade, pois as colunas usadas pelo laboratório retêm interferentes existentes neste tipo de matriz !



Estudo de Casos

Aflatoxinas

Conclusão

Mesmo cumprindo todos os requisitos de garantia da qualidade, podem surgir anomalias, as quais podem falsear os resultados.



Estudo de Casos

Hg EAA-VF e Se EAA-GH

Validação de métodos desenvolvidos pelo laboratório para a determinação de mercúrio e selénio usando um sistema multicomutado MCFIA, com detecção por EAA-VF e EAA-GH, respectivamente.



EAA-VF

- Hatch and Ott, Anal. Chem. 40 (1968)

Determination of Sub-Microgram Quantities of Mercury by Atomic Absorption Spectrophotometry

W. Ronald Hatch and Welland L. Ott

Falconbridge Nickel Mines Limited, Metallurgical Laboratories, Thornhill, Ontario, Canada

The procedure outlined describes an extremely sensitive and accurate method for the determination of mercury down to 1.0 ppb in solution. This procedure has been applied to nickel and cobalt metal as well as rock samples and soil samples containing organic materials. The sample is taken into solution by an oxidizing acid attack. Mercury is then reduced to the elemental state and aerated from solution in a closed system. The mercury vapor passes through a quartz absorption cell of an atomic absorption spectrophotometer where its concentration is measured. The procedure is free from interferences due to organic matter or other volatile constituents of the sample. Large amounts of easily reducible elements must be absent from the solution.

THE following method for the determination of mercury in solution employs a simple reduction-aeration procedure to produce and introduce mercury vapor into a closed system where the absorption of the 2537Å line is measured in a quartz windowed cell.

Several spectrophotometric reagents have been employed for the determination of traces of mercury (1). Of these, dithizone is the most popular because it exhibits a high

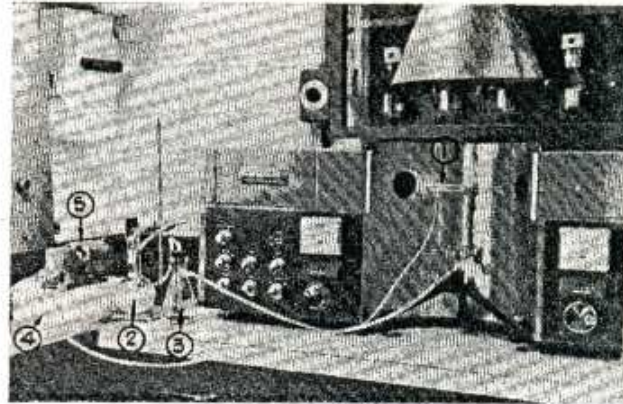
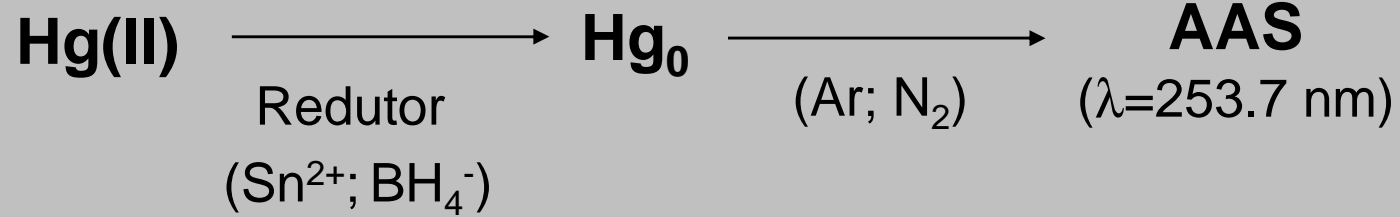


Figure 1. Apparatus used

- (1) Absorption cell
- (2) Reaction flask
- (3) Flask containing drying agent
- (4) Disconnect for bleeding mercury from system
- (5) Neptune Dyna-Pump



EAA-VF



- Holak W., Anal. Chem. 41 (1969)

Gas-Sampling Technique for Arsenic Determination by Atomic Absorption Spectrophotometry

Walter Holak

Food and Drug Administration, 850 Third Ave., Brooklyn, N. Y. 11232

IN CONVENTIONAL atomic absorption spectrophotometry a solution of the sample is introduced into the flame as an aerosol by means of a nebulizer. However, commercial nebulizers are only about 5% efficient in forming fine droplets suitable for atomization by the flame (1). Furthermore, a solution aspirated at a usual rate of 3–5 ml/min for about 10 sec produces a concentration signal extending over the length of aspiration. Theoretically, if the element were introduced into the flame rapidly—e.g., 1 second—with no loss, a high narrow signal should result and the detection limit should improve.

Several devices aimed at improving the efficiency of atomic absorption sampling have been described in the literature. One scheme, developed by Brandenberger and Bader (2) was used to determine nanogram amounts of mercury. In their technique, mercury in solution was deposited on a copper wire and placed in the arm of a specially constructed cell with quartz windows. An electrical potential applied across the wire volatilized the mercury instantaneously. The mercury vapors were then swept through the cell with air and the atomic

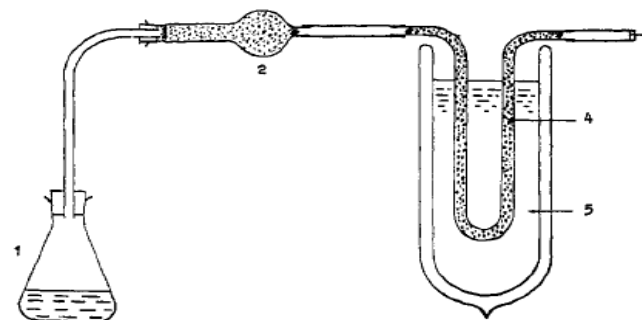
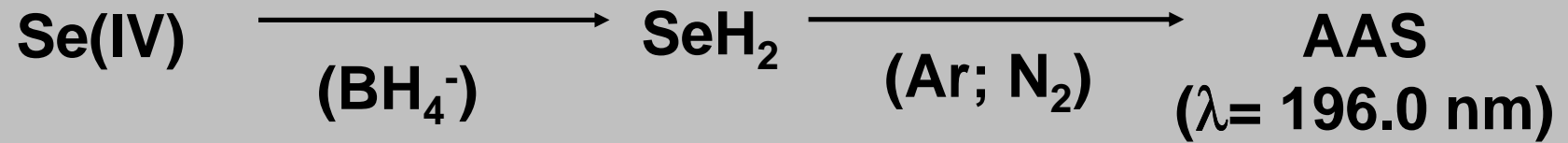


Figure 1. Arsine generator and liquid nitrogen trap

1. Arsine generator
2. Calcium chloride
3. Needle
4. Glass beads
5. Liquid nitrogen



EAA-GH



Multicomutação (MC)

Reis et al, ACA 293(1994)129.

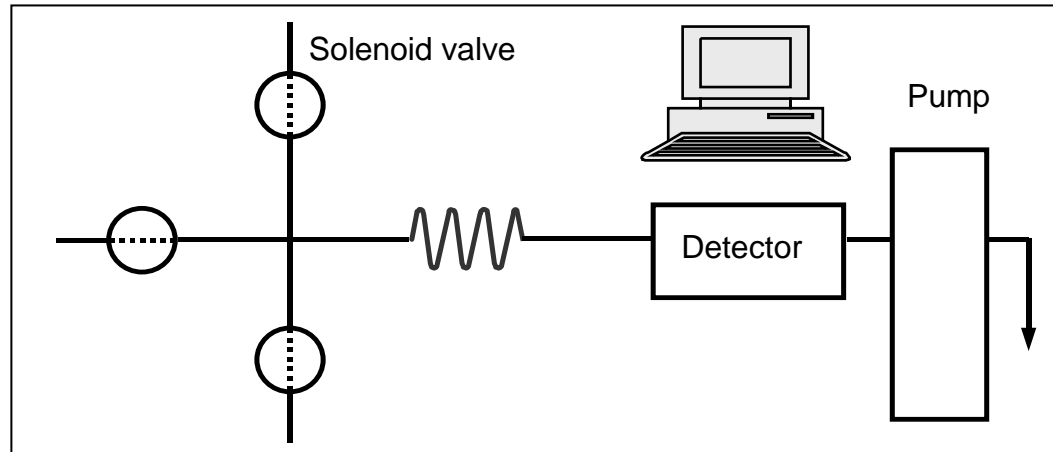


Válvula solenoide de 3 vias da NResearch Inc.

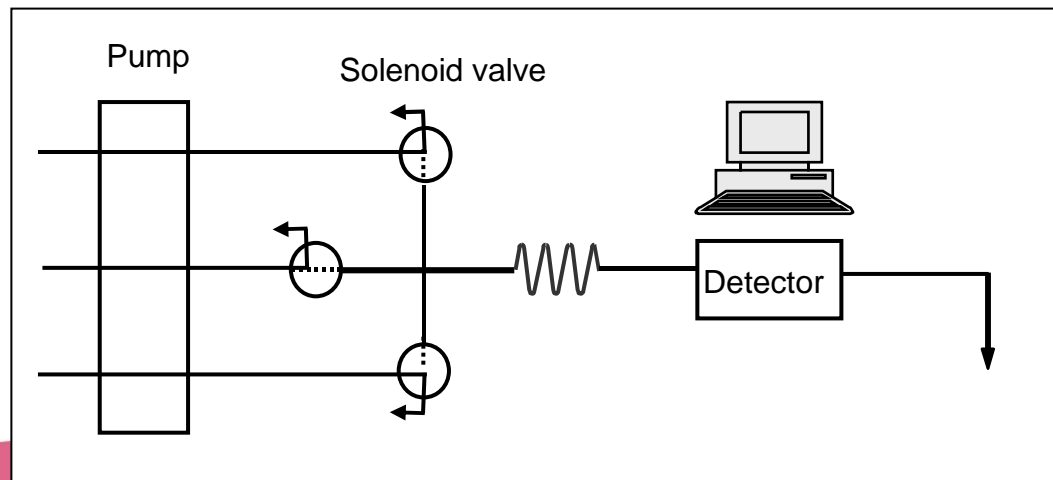


Multicomutação (MC)

Aspiração



Propulsão



Multicomutação (MC)

Vantagens

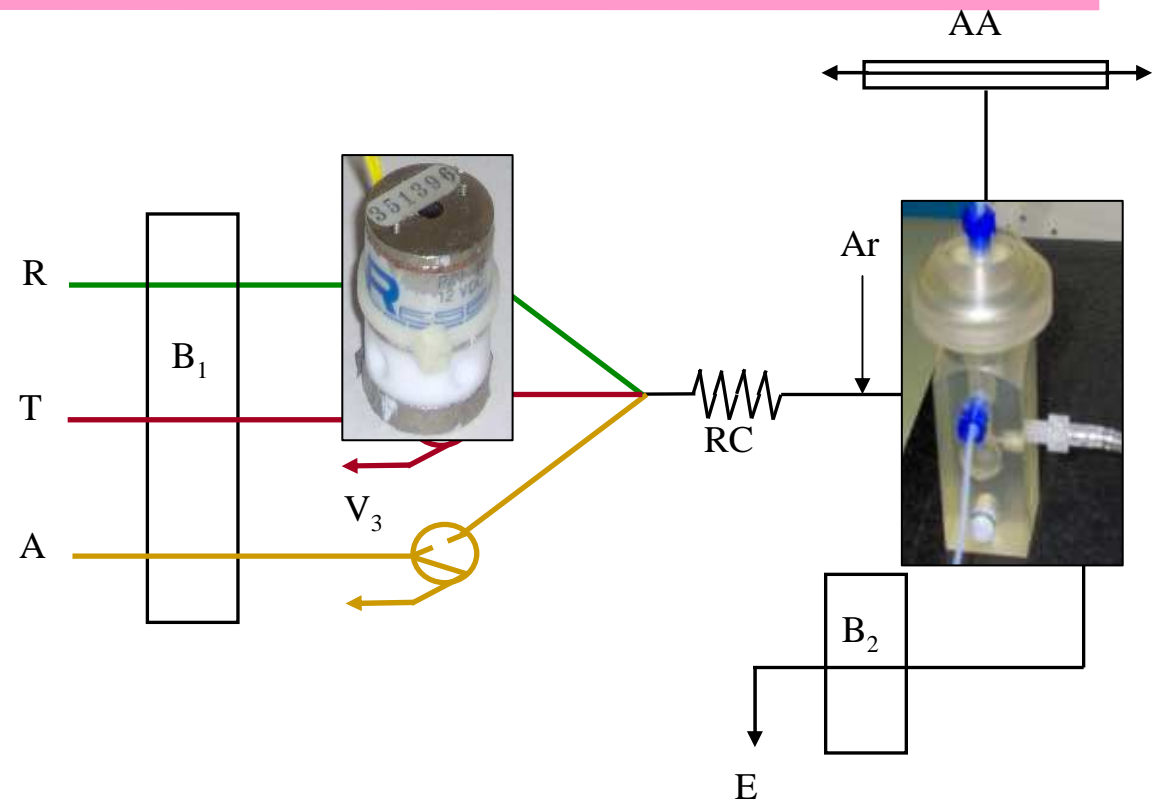
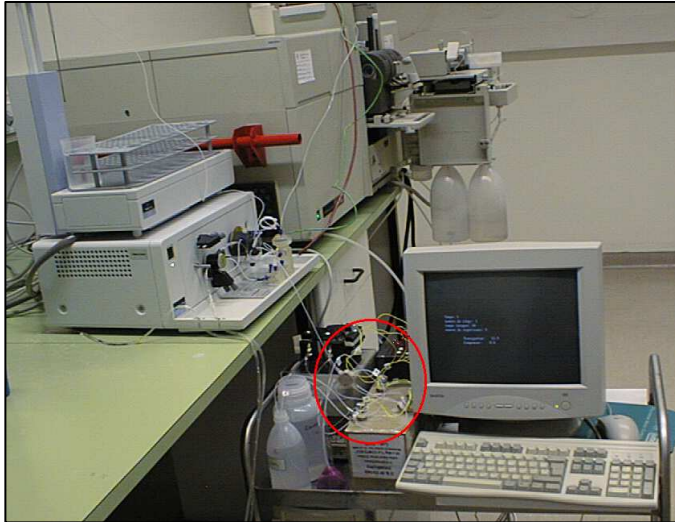
- Miniaturização dos sistemas de fluxo;
- Melhoramento das condições de mistura entre reagentes e amostra;
- Reduzido consumo de reagentes e amostra;
- Minimização da produção de efluentes;
- Flexibilidade.

Limitações

- Escassez de equipamento disponível comercialmente (interfaces electrónicas e software);
- Falta de robustez das válvulas



Equipamento



T: solução transportadora HCl 3% v/v (Hg) e HCl 10% v/v (Se); **R:** solução redutora NaBH_4 0.2% m/v em NaOH 0.05% m/v; **A:** Soluções padrão/amostra; **RC:** reactor, 30 cm (Hg) e 100 cm (Se); **Ar:** árgon 70 mL min^{-1} (Hg) e 100 mL min^{-1} (Se); **AA:** espectrofotometro de absorção atómica; **V₁-V₃:** válvulas solenoides; **SGL:** separador gás-líquido; **B₁, B₂:** Bombas peristálticas; **E:** esgoto.



Validação

Determinação de Selénio

- **Especificidade**
 - Inerente ao método instrumental – EAA-GH
- **Exactidão**
 - MRC's
- **Precisão**
 - Precisão intermédia
- **Gama trabalho**
 - Teste de F de Snedecor-Fisher
- **Linearidade**
 - ISO 8466/1
- **Limiares analíticos**
 - Brancos



Validação

Determinação de Selénio

	Método Desenvolvido (MCFIA)
Gama de trabalho, $\mu\text{g L}^{-1}$	0 - 10 ($F_{\text{exp}} = 1,0$; $F_{\text{crit.}}(95\%) = 9,3$)
Modelo	Linear ($F_{\text{exp}} = 0,14$; $F_{\text{crit.}}(95\%) = 2,66$)
LD, $\mu\text{g L}^{-1}$ ($X_0 + 3S_0$; n = 20)	0,3
LQ, $\mu\text{g L}^{-1}$ ($X_0 + 10S_0$; n = 20)	1,0
C.V.r, %	2,1 (2,81 $\mu\text{g L}^{-1}$) 2,7 (521 $\mu\text{g kg}^{-1}$)
Recuperação MRC ^a , %	89,3 - 112,2
Incerteza, %	11

^a MRC: Sea Lettuce (CRM 279); Spinach leaves (SRM 1570^a); Surface Water (SPS-SW2); Tr-218 (Inter 2000); Dogfish (DORM-2); Pig Kidney (CRM 186); Bovine Liver (CRM 185).



Validação

Determinação de Hg

	Método Desenvolvido (MCFIA)	Método Acreditado (FIA)
Gama Linear, $\mu\text{g L}^{-1}$	0 - 20	0 - 20
LD, $\mu\text{g L}^{-1}$ ($X_0 + 3S_0$; n = 20)	0,24	0,15
LQ, $\mu\text{g L}^{-1}$ ($X_0 + 10S_0$; n = 20)	0,65	0,41
C.V., %	2,7 (1,6 $\mu\text{g L}^{-1}$)	4,7 (1,6 $\mu\text{g L}^{-1}$)
	5,8 (8,1 $\mu\text{g L}^{-1}$)	1,7 (8,1 $\mu\text{g L}^{-1}$)
Calibração, ^a $y = mx + b$		
declive	0,068 ($\pm 0,005$)	0,056 ($\pm 0,003$)
ord. origem	0,002 ($\pm 0,002$)	0,014 ($\pm 0,014$)
	(n = 7)	(n = 7)
Coeficiente correlação	0,9995	0,9998
Recuperação, %	90,7 - 99,8	91,1 - 99,8
Incerteza, %	12	10

^a Média e desvio padrão dos valores dos parâmetros da curva de calibração obtidos em 7 dias (n=7)



Validação

Determinação de Hg

Validação do método desenvolvido (MCFIA) por comparação com o método acreditado do laboratório (FIA)

n	Gama ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	teste <i>t</i> Student (amostras emparelhadas)
12	9 - 300	$t_{\text{exp.}} = 0,012$; $t_{\text{crit.}}(95\%) = 2,20$





Obrigada!



CATÓLICA
UNIVERSIDADE CATÓLICA PORTUGUESA | PORTO
Escola Superior de Biotecnologia