

## AVALIAÇÃO DE PROCEDIMENTOS DE PREPARO DE AMOSTRA DE AMENDOIM *in natura* PARA ANÁLISE DE AFLATOXINAS

**Maria Antonia Calori-Domingues\***, **Rafael Condino Rechdan**, **Ademar Moretti**, **Eduardo Micotti da Gloria** e **Ivani Valarini Zambello**

Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, CP 09, 13418-900 Piracicaba – SP, Brasil

**José Eduardo Corrente**

Departamento de Bioestatística, Universidade Estadual de São Paulo, CP 510, 18618-000 Botucatu – SP, Brasil

**Carlos Tadeu dos Santos Dias**

Departamento de Ciências Exatas, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, CP 09, 13418-900 Piracicaba – SP, Brasil

Recebido em 7/10/09; aceito em 6/4/10; publicado na web em 9/8/10

EVALUATION OF SAMPLE PREPARATION PROCEDURES FOR AFLATOXIN ANALYSIS IN RAW PEANUT. The variability in aflatoxin B<sub>1</sub> concentration among peanut subsamples of 4 sample preparation procedures was evaluated. For each procedure, 18 samples were prepared involving dry comminuting/homogenization or dry roughly comminuting followed by the preparation of a aqueous slurry. Ten analytical samples were withdrawn from each sample/procedure and analyzed by thin layer chromatography. The coefficient of variation (CV%) among each set of 10 analytical samples was assumed to be associated with the sample preparation procedure. The procedure that made use of a subsample mill and preparation of a subsample slurry, showed lower variability (CV%) among the analytical subsamples.

Keywords: sample preparation; aflatoxin; variability.

### INTRODUÇÃO

As micotoxinas são frequentemente encontradas em grãos, como amendoim, milho, castanha do Brasil, caroço de algodão etc.<sup>1</sup> No amendoim devido às condições de produção, práticas de pós-colheita e armazenamento, as micotoxinas mais encontradas são as aflatoxinas produzidas principalmente pelos fungos *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus* e *A. nomius*.<sup>2</sup> No Brasil o limite legal máximo de aflatoxinas em amendoim *in natura* é de 20 µg kg<sup>-1</sup> para a somatória das aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub>.<sup>3</sup>

A avaliação da estimativa da contaminação com aflatoxinas de um lote de amendoim é um problema conhecido há tempo e tem recebido atenção de diversos pesquisadores desde os primeiros estudos com aflatoxinas até hoje, devido à complexidade do assunto.<sup>4-7</sup> A dificuldade dessa estimativa está associada à heterogeneidade da distribuição da contaminação dentro do lote, uma vez que os grãos de amendoim contaminados com aflatoxinas estão distribuídos em uma baixa proporção e ocorre uma considerável variação no teor de contaminação individual desses grãos, como já demonstrado nos estudos realizados inicialmente.<sup>4</sup>

A variância total dos dados de um procedimento para avaliação da contaminação com aflatoxinas de um lote de amendoim é composta por no mínimo três componentes: a amostragem, o método de preparo da amostra, que envolve a trituração da amostra e subsequente retirada de uma subamostra analítica e o método analítico empregado.<sup>5</sup>

A variância que ocorre na etapa da amostragem está na retirada das amostras do lote, que é causada pela heterogeneidade do nível de aflatoxinas nos grãos.<sup>8,9</sup> No preparo/subamostragem a variância pode ocorrer na etapa de trituração e retirada da subamostra analítica devido à distribuição heterogênea na concentração das aflatoxinas nas pequenas partículas obtidas nesta etapa. A variância devido à

análise pode ocorrer por erros analíticos, ocorrência de substâncias interferentes na própria matriz que dificultam o processo ou por erro mecânico, quando se empregam instrumentos.<sup>8</sup>

Para grãos e produtos peletizados é fundamental que a amostra toda seja triturada para se conseguir mais partículas por unidade de massa (partículas < 1 mm) e realizar intensa homogeneização, antes da retirada da subamostra para que a mesma seja representativa da amostra original.<sup>10</sup>

O grau de trituração da amostra é dependente do moinho e/ou equipamento utilizado e, além disso, a concentração de aflatoxinas entre as partículas fracionadas também pode apresentar variações.<sup>1</sup> Assim pode ocorrer variação de resultados entre as subamostras analíticas retiradas de uma mesma amostra triturada, no entanto, esta não é tão grande quanto à que ocorre na amostragem devido ao maior número de partículas obtidas pela trituração.<sup>5,6,10</sup> Diminuindo-se o tamanho da partícula obtida na trituração, ou seja, mais partículas por unidade de massa, diminui-se a variância da subamostragem.<sup>7,10</sup>

Dorner e Cole<sup>6</sup> determinaram o coeficiente de variação do procedimento de preparo de amostra (subamostragem) para análise de aflatoxinas, avaliando 4 tipos de equipamentos empregados na trituração de amendoim contaminado e dois tamanhos de amostras. Os resultados obtidos mostraram que os coeficientes de variação (CV) variaram de acordo com o tamanho da amostra empregada (2 ou 4 kg) e que para as amostras de 4 kg os CV entre as repetições foram menores para os equipamentos que formavam uma massa homogênea de amendoim triturado (tipo *vertical cutter mixer*) quando comparados com um moinho subamostrador.

O preparo da amostra através da elaboração de uma pasta aquosa de amendoim grosseiramente triturado, método recomendado pela FAO,<sup>1</sup> reduz a variabilidade associada à análise de aflatoxinas porque a distribuição uniforme das partículas é mais eficaz com o preparo de uma pasta do que com o produto moído a seco. Além disso, os grãos com alto teor de óleo são facilmente reduzidos a partículas

\*e-mail: macdomin@esalq.usp.br

finas através da elaboração da pasta aquosa, enquanto apenas uma trituração grosseira (partículas > 2-3 mm) é possível nos moinhos convencionais por causa da ocorrência de entupimento.<sup>11,12</sup>

No Brasil, Calori-Domingues *et al.*,<sup>13</sup> avaliando a variabilidade associada ao preparo de amostras de amendoim naturalmente contaminadas, não observaram diferença estatisticamente significativa entre os resultados da contaminação das subamostras obtidas através da elaboração de uma pasta aquosa de toda a amostra de amendoim previamente triturado e a retirada de subamostras do amendoim moído em moinho subamostrador; no entanto, observaram que a variância existente entre as duplicatas da subamostra obtida do moinho foi o dobro da variância observada nas duplicatas do procedimento que empregou o preparo da pasta. Isto pode ser uma indicação de que no preparo através da elaboração de uma pasta aquosa pode-se obter um preparo de amostra mais homogêneo. Após a retirada da subamostra analítica as aflatoxinas são extraídas e quantificadas ocorrendo, também, variabilidade entre repetições de análise realizadas em um mesmo extrato.<sup>14,15</sup> A etapa de quantificação na cromatografia em camada delgada (CCD) é a maior fonte de variação no processo analítico.<sup>14</sup> No Brasil, a CCD é utilizada por muitos laboratórios como técnica de análise de aflatoxinas em produtos agrícolas e em produtos processados.<sup>16</sup>

Dessa forma, o objetivo dessa pesquisa foi verificar a magnitude da variação da contaminação com aflatoxina B<sub>1</sub>, medida pelo coeficiente de variação, que ocorre na etapa de preparo da amostra para retirada da subamostra analítica empregando 4 diferentes procedimentos de preparo, análise por cromatografia em camada delgada e avaliar a distribuição do tamanho de partículas obtidas nos procedimentos de preparo de amostras.

## PARTE EXPERIMENTAL

Dezoito amostras contendo 20 kg de amendoim descascado dos cultivares IAC Tatu e IAC Runner 886, naturalmente contaminado com aflatoxina B<sub>1</sub> e percentual de umidade < 8,0%, foram obtidas de 18 diferentes lotes beneficiados de maneira usual em unidades processadoras no Estado de São Paulo (beneficiadores, fábricas de doces, etc.). A amostra de 20 kg, representativa de cada lote, foi subdividida através do subamostrador tipo *Gamet*, em 4 porções de 5,0 kg. Cada uma das porções foi processada por um dos quatro procedimentos de preparo de amostras avaliados, descritos a seguir, e apresentados no fluxograma de execução do estudo (Figura 1).

### Procedimentos de preparo das porções para retirada da subamostra analítica

#### *Procedimento moinho de martelo/quarteador (Proc. MQ)*

A porção foi triturada em moinho de martelo com peneira de malha 3,4 mm, manualmente homogeneizada e subdividida em quarteador tipo *riffle* de 20 canaletas de 22 mm, até se obter uma subamostra de aproximadamente 1,25 kg, da qual foram retiradas 10 subamostras analíticas de 50 g cada.

#### *Procedimento pasta aquosa (Proc. PA)*

A porção foi triturada grosseiramente (partículas > 2,0 mm) em moinho de disco seguindo-se a elaboração de uma pasta aquosa na proporção 1:1 (amendoim:H<sub>2</sub>O destilada) empregando-se equipamento tipo *mixer* (5.000 rpm durante 2 min), com capacidade de triturar/homogeneizar até 6,0 kg de pasta aquosa. O preparo foi realizado em 2 etapas, com 2,5 kg de amendoim + 2,5 L de H<sub>2</sub>O, retirando-se 1,5 kg da pasta formada em cada etapa, que foram em seguida homogeneizadas empregando-se o próprio equipamento para formar a pasta final, da qual foram retiradas 10 subamostras analíticas de 100 g (50 g de amendoim:50 mL de H<sub>2</sub>O).

#### *Procedimento subamostra (Proc. PSUB)*

A porção foi triturada grosseiramente (partículas > 2,0 mm) em moinho subamostrador (Romer – R.A.S.Mill), obtendo-se uma subamostra contendo aproximadamente 20- 25% da amostra inicial. Com essa subamostra foi elaborada uma pasta de amendoim:H<sub>2</sub>O na proporção 1:1, empregando-se o liquidificador industrial (Waring Blender) com capacidade para 5 L (19.000 rpm por 2 min) da qual foram retiradas 10 subamostras analíticas de 100 g (50 g de amendoim:50 g de H<sub>2</sub>O).

#### *Procedimento UM-12 (Proc. UM-12)*

A porção foi triturada empregando a Máquina Universal Polivalente Geiger Modelo UM-12 (tipo *vertical cutter mixer*) que, além da trituração a 3.500 rpm durante 10 min, realiza a homogeneização da amostra através da formação de uma massa (sem adição de água) da qual foram retiradas 10 subamostras analíticas de 50 g.

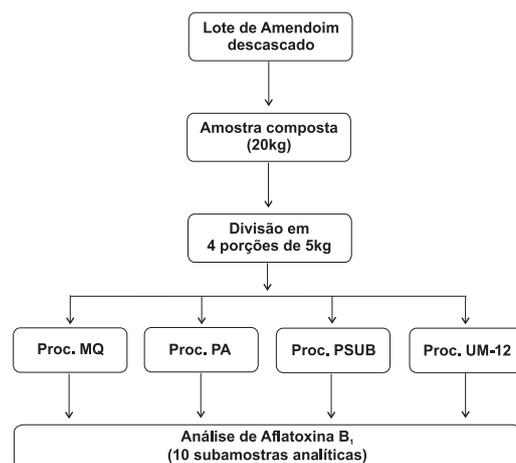


Figura 1. Fluxograma de execução do estudo

### Avaliação da variabilidade nas subamostras

De cada procedimento/lote avaliado foram realizadas 10 análises para se determinar a variabilidade de contaminação com aflatoxina B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>) das subamostras analíticas. A variabilidade foi determinada através do cálculo do coeficiente de variação dos resultados de contaminação obtidos. No total, 720 análises foram realizadas.

### Análise da aflatoxina B<sub>1</sub>

A determinação da aflatoxina B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>) foi realizada de acordo com método de Soares e Rodriguez-Amaya<sup>17</sup> com algumas modificações. Cinquenta gramas do amendoim triturado (Proc. MQ e UM-12) e 100 g da pasta aquosa (Proc. P e PSUB) foram extraídas com 270 mL de metanol + 30 mL da solução a 4% (m vol<sup>-1</sup>) de cloreto de potássio. A purificação do extrato (150 mL) foi realizada empregando-se solução a 30% (m vol<sup>-1</sup>) de sulfato de amônio e terra diatomácea (Celite) seguida por 2 partições com 10 mL de clorofórmio.

A detecção da AFB<sub>1</sub> foi realizada por cromatografia em camada delgada e a quantificação através da comparação visual com padrões quantitativos. As alíquotas dos extratos das amostras (6 ou 3 µL) bem como de padrões (3, 4 e 5 µL) foram aplicadas em cromatofolha da marca Merck (art.5553) utilizando-se aplicador automático Linomat IV (Camag). A eluição foi realizada com a mistura de solventes éter etílico:metanol:H<sub>2</sub>O (96:3:1, v/v/v). A quantificação foi realizada através da análise visual da cromatofolha sob luz UV em λ = 366 nm, comparando-se a intensidade de fluorescência da AFB<sub>1</sub> presente na alíquota do extrato da amostra

com a fluorescência das alíquotas do padrão quantitativo, baseado no procedimento n.º 968.22 (item 49.2.08) da AOAC.<sup>18</sup> No caso de intensidades de fluorescências intermediárias, considerou-se a média dos pontos adjacentes.

A concentração da solução padrão de AFB<sub>1</sub>, empregada na quantificação, foi checada em espectrofotômetro (350 nm) de acordo com o procedimento n.º 970.44 (item 49.2.02) da AOAC.<sup>18</sup>

### Controle de qualidade analítico

O controle de qualidade analítico foi realizado através de testes de recuperação, a cada remessa de amostras analisadas, e da determinação dos limites de detecção e quantificação da metodologia empregada nas condições do laboratório.

Para os testes de recuperação, amostras de amendoim com nível não detectado de AFB<sub>1</sub> foram artificialmente contaminadas adicionando-se quantidades de padrão para se obter as contaminações, em triplicata.

O limite de detecção (LD) foi determinado nas condições da realização do método. Primeiramente, aplicaram-se em cromatofolha quantidades decrescentes do padrão de AFB<sub>1</sub> até se obter o limite visual de observação do padrão. Em seguida, adicionou-se quantidade suficiente do padrão em uma amostra de amendoim, previamente analisada, na qual não se detectou a presença de AFB<sub>1</sub>, para se obter a contaminação correspondente em µg kg<sup>-1</sup> do que foi considerado limite visual. Considerou-se como limite de detecção o nível no qual, após análise, a toxina adicionada foi observada de forma inequívoca por, no mínimo, 2 analistas. Esse procedimento foi realizado com 5 repetições.

O limite de quantificação foi avaliado considerando-se 2 x LD em µg kg<sup>-1</sup> empregando-se material previamente analisado, no qual não se detectou a presença de AFB<sub>1</sub>. A extração e quantificação foram realizadas, com 5 repetições, de acordo com o método empregado, calculando-se o valor da recuperação (%R) e o valor do desvio padrão relativo de repetibilidade (DPR<sub>r</sub> ou RSD<sub>r</sub>).

Avaliou-se também a variabilidade analítica, ou seja, aquela referente à análise propriamente dita. Assim, para realização dessa medida obteve-se quantidade suficiente de extrato, de uma mesma amostra, que foi homogeneizado e 10 alíquotas de 150 mL foram retiradas e só então houve o prosseguimento da análise (purificação, concentração e quantificação). No total 18 amostras, com concentrações de AFB<sub>1</sub> abrangendo a faixa de contaminação dos lotes analisados, foram avaliadas. A variabilidade analítica do método empregado foi medida através da determinação do desvio padrão relativo de repetibilidade (DPR<sub>r</sub> ou RSD<sub>r</sub>), também denominado coeficiente de variação, das 10 alíquotas retiradas do mesmo extrato, para cada nível de contaminação estudado.

### Avaliação da granulometria

As amostras referentes aos quatro procedimentos de preparo dos 18 lotes foram avaliadas quanto ao tamanho das partículas obtidas. A avaliação foi realizada pela passagem de porções, em triplicata, de 30 g para amostras obtidas para os procedimentos MQ e UM-12 (sem adição de água) e 60 g para amostras utilizadas nos procedimentos PA e PSUB, através de peneiras com malhas de 2,0; 1,2 e 0,85 mm (10, 16 e 20 mesh) colocadas de maneira sequencial.

Para auxiliar a passagem das partículas através das peneiras empregou-se uma leve corrente de água<sup>12</sup> sobre a amostra. O peso seco do material retido nas peneiras foi determinado após secagem em estufa a 105 °C (± 3 °C) por 24 h e o percentual de partículas ≤ 0,85 mm foi calculado como: % partículas ≤ 0,85 mm = 100 - (somatória das % retidas nas demais peneiras).

### Análise estatística

Os resultados de CV obtidos foram avaliados estatisticamente segundo o modelo de blocos (18 lotes) tendo como tratamentos os 4 procedimentos (MQ, PA, PSUB e UM-12) e como covariáveis a concentração de AFB<sub>1</sub> (em µg kg<sup>-1</sup>) e o percentual de partículas ≤ 0,85 mm. Após análise exploratória dos dados os mesmos foram transformados através da potência ótima de Box-Cox<sup>20</sup> e realizou-se a análise de variância. Quando o teste F foi significativo ao nível de 0,05 de probabilidade, as médias foram comparadas pelo teste de Duncan ao nível de 0,05 de probabilidade. Os dados foram analisados pelo programa estatístico SAS.<sup>19</sup>

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Controle de qualidade analítico

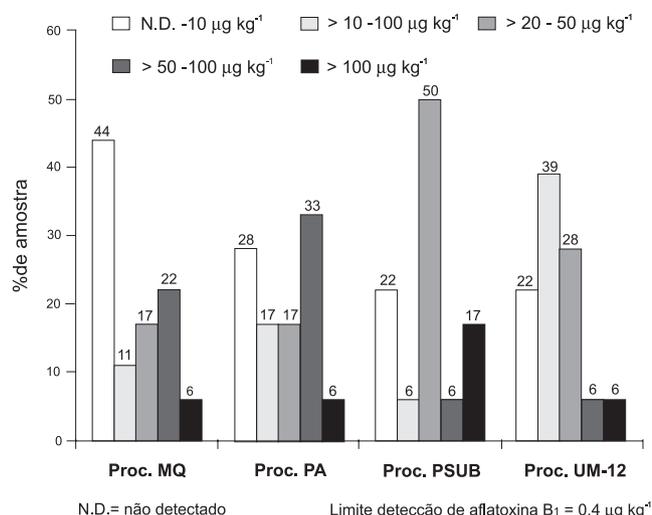
Na avaliação da variabilidade analítica do método empregado a faixa de contaminação dos extratos provenientes de 18 amostras variou de 2,7 a 467,0 µg kg<sup>-1</sup> e os valores de RSD<sub>r</sub> obtidos variaram de 0,7 a 13,4% com média de 4,2%. Todos os valores de RSD<sub>r</sub> observados encontravam-se dentro do aceitável. Os valores aceitáveis de RSD<sub>r</sub>, calculados pela equação de Horwitz,<sup>21</sup> poderiam variar de 11,8% para a contaminação de 2,7 µg kg<sup>-1</sup> de AFB<sub>1</sub> até 25,7% para a contaminação de 467,0 µg kg<sup>-1</sup>.

O limite de detecção do método por cromatografia de camada delgada foi de 0,4 µg kg<sup>-1</sup> e o limite de quantificação foi de 0,8 µg kg<sup>-1</sup>. O valor do RSD<sub>r</sub> no limite de quantificação foi de 7,8% e a recuperação (%R) média foi de 89,7%. Tanto os valores de RSD<sub>r</sub> quanto de %R estão de acordo com os recomendados para determinação de AFB<sub>1</sub> na concentração avaliada, que são: %R = 50 a 120% e RSD<sub>r</sub> = até 30%.<sup>21</sup>

A cada remessa de análise realizou-se o teste de recuperação (%R) como procedimento de controle de qualidade analítico. No total, 72 testes de recuperação foram realizados e os níveis de contaminação de AFB<sub>1</sub> adicionados variaram de 1,7 a 7,6 µg kg<sup>-1</sup>. Para essa faixa de contaminação avaliada os valores aceitáveis<sup>21</sup> de %R são de 70 a 110%. Os valores de %R obtidos variaram de 59 a 115% com média de 86%. Apenas 1 valor, representando 1,4% do total avaliado, apresentou-se acima de 110% de recuperação e 4 valores, representando 5,5% do total avaliado, estavam abaixo de 70%, no entanto estes valores estavam próximos do limite aceitável. Essa diferença pode ter ocorrido devido ao intervalo de detecção na aplicação dos padrões na cromatofolha. Deste modo, os valores observados de %R foram satisfatórios indicando que a metodologia empregada estava adequada.

### Avaliação do coeficiente de variação (CV) de cada procedimento estudado

Na Figura 2 está apresentada a distribuição da contaminação com AFB<sub>1</sub> das 18 porções de 5 kg empregadas em cada procedimento avaliado. Pode-se observar que as porções empregadas, para avaliar cada procedimento, apresentaram contaminação com AFB<sub>1</sub> dentro de uma ampla faixa de concentração. Essa faixa de contaminação foi importante, uma vez que a variabilidade (CV) nos resultado é dependente da concentração<sup>6</sup> e, assim, as diferenças observadas entre os CV devem ser devidas aos procedimentos avaliados e não atribuídas às diferenças extremas entre concentração de AFB<sub>1</sub> nas amostras. Geralmente o CV decresce com o aumento da concentração de aflatoxinas.<sup>5</sup> A concentração de AFB<sub>1</sub> foi avaliada como uma covariável no modelo estatístico empregado e não apresentou efeito significativo (p>0,05) na variabilidade observada nos valores de CV devido aos procedimentos de preparo das amostra, indicando que as diferenças observadas foram devidas aos procedimentos avaliados.



**Figura 2.** Distribuição da concentração de AFB<sub>1</sub> (µg kg<sup>-1</sup>) nas amostras de amendoim empregadas em cada procedimento avaliado

Neste trabalho assumiu-se que as diferenças observadas nos valores do coeficiente de variação (CV) entre as subamostras analíticas estavam associadas ao procedimento de preparo das amostras, uma vez que o procedimento analítico empregado foi o mesmo e também não se considerou a variância da amostragem.

Na Tabela 1 estão apresentadas a faixa de contaminação com AFB<sub>1</sub> das amostras avaliadas e também os valores médios do CV das 10 subamostras analíticas retiradas de cada procedimento e lote estudado.

**Tabela 1.** Faixa de contaminação com AFB<sub>1</sub> das amostras e valores médios do coeficiente de variação (CV) dos procedimentos avaliados

Procedimentos		AFB <sub>1</sub>		CV (%)
		Faixa de contaminação (µg kg <sup>-1</sup> )		Média
MQ	Moinho/quarteador	0,4 – 338,0		16,8 a
PA	Pasta aquosa	1,2 – 295,0		12,1 a
PSUB	Subamostra/pasta aquosa	4,6 – 170,0		4,5 b
UM-12	UM12	1,0 – 223,0		8,6 a

Na coluna CV valores médios seguidos com letras distintas diferem estatisticamente (Duncan, p<0,05)

Os resultados indicaram que o CV médio do Proc. PSUB (4,5%) foi significativamente (p<0,05) menor que os procedimentos MQ (16,8%); PA (12,1%) e UM-12 (8,6%). No entanto, entre os procedimentos MQ, PA e UM-12 não foi observada diferença significativa (p<0,05).

A faixa de variação e a mediana dos valores de CV observados para os procedimentos foram: MQ = 0,0 a 42,2% (mediana = 14,3%); PA = 0,5 a 66,2% (mediana = 8,0%); PSUB = 0,0 a 16,5% (mediana = 2,6%) e UM-12 = 0,5 a 16,4% (mediana = 8,3%).

### Avaliação da granulometria das partículas obtidas em cada procedimento estudado

Na avaliação do percentual de partículas ≤ 0,85 mm (Tabela 2), observou-se que os 4 procedimentos diferiram (p<0,05) entre si e que o procedimento PSUB apresentou o maior percentual de partículas ≤ 0,85 mm. No entanto, essa diferença não explicou a variabilidade de CV observada entre os procedimentos quando o mesmo foi avaliado como uma covariável na análise estatística. Isso pode ter ocorrido pelo fato de que nos 4 procedimentos de preparo o percentual de partículas ≤ 0,85 mm foi igual ou superior a 90%. É recomendado<sup>22</sup>

que, no mínimo, 75% das partículas obtidas após trituração passem pela peneira de 0,85 mm para análise de micotoxinas. Schatzki e Toyofuku<sup>23</sup> observaram diferenças significativas nos resultados em amostras de pistache entre o preparo a seco e o preparo através da obtenção de uma pasta aquosa. No entanto, na moagem a seco apenas 52% das partículas apresentava tamanho < 0,85 mm, enquanto que na pasta aquosa 84% eram < 0,85 mm. Diversos trabalhos realizados por Whitaker<sup>10,24</sup> demonstram que se diminuindo o tamanho das partículas, ou seja, aumentando-se o número de partículas por unidade de massa diminui-se a variabilidade da subamostra analítica.

**Tabela 2.** Resultados médios da avaliação granulométrica das partículas de amendoim obtidas após cada procedimento de preparo de amostra nos 18 lotes avaliados

Proc.	% de Partículas			
	> 2,0 mm	> 1,2 e ≤ 2,0 mm	> 0,85 e ≤ 1,2 mm	≤ 0,85 mm
QM	1,2	3,4	5,4	90,0 d
PA	0,5	1,4	4,2	93,9 c
PSUB	0,0	0,1	1,1	98,8 a
UM-12	0,5	0,8	1,2	97,5 b

Os valores reapresentam a média de 3 repetições para cada procedimento/lote avaliado. Na coluna ≤ 0,85 mm os valores médios seguidos com letras distintas diferem estatisticamente (Duncan, p<0,05)

Nesta pesquisa o menor valor de CV observado no procedimento PSUB moinho subamostrador/pasta aquosa) pode ter ocorrido pelo fato de que, nesse procedimento, se utilizou uma subamostra de no máximo 1,25 kg para elaboração da pasta aquosa. O equipamento empregado para elaboração da pasta devido à sua potência e menor quantidade de material facilitou o preparo da mesma, possibilitando uma maior homogeneização e maior percentual de partículas ≤ 0,85 mm. Já no procedimento MQ (moinho de martelo/quarteador), embora tenha diferido estatisticamente apenas do procedimento SUB, apresentou a maior variabilidade entre os resultados de análise medidos pelo CV além do menor percentual de partículas ≤ 0,85 mm. No procedimento MQ a homogeneização do material triturado foi realizada manualmente e devido ao tamanho relativamente grande da amostra (5 kg) pode ter sido ineficiente. Assim, a homogeneização manual e o simples quarteamento da amostra triturada influenciaram a variabilidade medida pelo CV (RSD<sub>d</sub>) entre as subamostras analíticas nos lotes avaliados.

Spanjer *et al.*,<sup>25</sup> avaliando a variância da subamostragem (preparo da amostra) na análise de micotoxinas, constataram que a homogeneização da amostra é responsável pela diferença entre resultados de uma mesma amostra. Observaram também que quando o procedimento de preparo da amostra envolve a etapa de homogeneização pela elaboração de uma pasta aquosa, o CV entre subamostras analíticas é menor do que quando a moagem é a seco. Dorner<sup>26</sup> observou um CV de 3,6% em amostras de amendoim preparadas através da elaboração de uma pasta aquosa e um CV de 4,6% quando preparada em equipamento semelhante ao empregado no procedimento UM-12 sem adição de H<sub>2</sub>O.

Os resultados obtidos nessa pesquisa indicam que mesmo quando no procedimento de preparo de amostras se obtém um alto percentual de partículas ≤ 0,85 mm é fundamental que ocorra uma intensa homogeneização desse material, seja por meio da elaboração de uma pasta aquosa ou empregando equipamentos que permitam a homogeneização sem adição de H<sub>2</sub>O.

### Tempo total de preparo das amostras e equipamentos empregados

Vários fatores influenciam na escolha do melhor procedimento de preparo de amostra além dos resultados da variabilidade entre as

subamostras analíticas. Dentre eles podem-se considerar as facilidades e tempo de preparo, custos de aquisição e facilidade de manutenção.<sup>6</sup> Assim, além dos aspectos analíticos, aqueles de ordem prática também foram observados. O tempo de preparo, incluindo o tempo para limpeza dos equipamentos dos 4 procedimentos avaliados, está apresentado na Tabela 3.

**Tabela 3.** Equipamentos utilizados, tempo de preparo e limpeza nos procedimentos avaliados

Proc.	Equipamentos utilizados	Tempo (min)		
		Preparo	Limpeza	Total
MQ	Moinho de martelo Quarteador	10	12	22
PA	Moinho de disco Mixer	35	23	58
PSUB	Moinho subamostrador Liquidificador industrial importado	14	13	27
UM-12	Máquina universal Polivalente com motorreductor	15	15	30

O procedimento PA foi o mais trabalhoso e demorado por serem necessárias várias etapas para o preparo da pasta, incluindo moagem e limpeza. Além disso, a pasta formada (10 kg para uma amostra de 5 kg de grãos) é um material que se deteriora facilmente devido ao alto teor de umidade e deve ser descartado o mais rápido possível ou armazenado sob refrigeração. Outro fator a ser considerado nesse procedimento é o tamanho da amostra representativa do lote, pois quanto maior o tamanho da mesma maior poderá ser o tempo de preparo e maior a quantidade de material a ser descartado.

O tempo de preparo do procedimento PSUB (27 min) foi semelhante ao UM-12 (30 min). A utilização de moinho subamostrador para amendoim requer uma regulagem no grau de trituração dos grãos (partículas > 2 mm) que facilite a obtenção da subamostra, uma vez que, devido ao teor de óleo do amendoim, pode ocorrer entupimento no subamostrador durante a etapa de moagem. Os cuidados com o descarte da pasta formada da subamostra devem ser os mesmos do procedimento PA, apesar de ser em menor volume.

O procedimento UM-12 apresenta a vantagem de que a massa homogênea formada, sem adição de H<sub>2</sub>O, não se deteriora tão facilmente permitindo o armazenamento do material em condições ambiente até o momento do descarte.

O procedimento MQ (moinho/quarteador) foi o que apresentou menor tempo total de preparo e limpeza (22 min), porém a etapa de homogeneização manual da amostra triturada (5 kg) é dependente do operador e trabalhosa, o que pode ter contribuído com o maior CV desse procedimento.

Vale salientar que as amostras de amendoim empregadas neste estudo eram dos cultivares IAC Tatu e IAC Runner 886 e apresentavam umidade ≤ 8%, o que facilitou a moagem tanto no moinho de martelo quanto no moinho de disco (subamostrador). Quando os grãos de amendoim apresentam percentuais de umidade mais elevados, o que ocorre frequentemente no recebimento do amendoim durante a safra, haverá maior dificuldade de moagem dos grãos e até mesmo impossibilidade de realização da mesma devido à formação de uma massa de amendoim que causa entupimentos e dificulta a homogeneização da amostra. Assim, procedimentos de preparo de amostras de amendoim que não empreguem peneiras/discos de moagem, que o percentual de umidade dos grãos não influencie a trituração, como o proc. UM-12 ou aqueles que possibilitem o preparo da pasta aquosa sem trituração prévia dos grãos são recomendados.

## CONCLUSÕES

Dentre os 4 procedimentos de preparo de amostra de amendoim *in natura* avaliados verificou-se que o procedimento no qual se obteve uma pasta aquosa da subamostra obtida do moinho subamostrador (Proc. PSUB) apresentou os menores valores de coeficiente de variação, com média de 4,5% e, portanto, a menor variabilidade ( $p < 0,05$ ) entre as subamostras retiradas, ao acaso, para realização da análise de aflatoxinas. Os demais tratamentos não apresentaram diferenças significativas entre si nos valores do coeficiente de variação. Todos os tratamentos apresentaram percentual de partículas ≤ 0,85 mm igual ou acima de 90%. Para que se tenha baixa variabilidade entre os resultados de alíquotas retiradas de uma mesma amostra após o seu preparo, é fundamental que ocorra uma intensa homogeneização do material triturado, mesmo quando no procedimento de preparo de amostras se obtém um alto percentual de partículas ≤ 0,85 mm.

## AGRADECIMENTOS

À FAPESP - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pelo apoio financeiro (Proc.:03/05718-5) e concessão de bolsa de iniciação científica (Proc. 04/00835-6) e de apoio técnico (Proc.04/08968-5).

## REFERÊNCIAS

1. FAO - Food and Agriculture Organization; *Sampling plans for aflatoxins analysis in peanuts and corn*, Food and Nutrition Paper, 55, FAO: Rome, 1993.
2. Frisvad, J. C.; Thrane, U. Em *Introduction to Food-borne Fungi*; Samson, R. A.; Hoekstra, E. S.; Frisvad, J. C.; Filtenborg, O., eds.; Central Bureau Voor Schimmelcultures: Netherlands, 1996, cap. 4.
3. Brasil, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento; Portaria N° 183, de 21 de março de 1996, *Diário Oficial da União* 25/03/1996.
4. Cucullu, A. F.; Lee, L.S.; Mayne, R. Y.; Goldblatt, A.; *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1966**, *43*, 89.
5. Whitaker, T. B.; Dickens, J. W.; *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1974**, *51*, 214.
6. Dorner, J. W.; Cole, R. J.; *J. AOAC Int.* **1993**, *76*, 983.
7. Whitaker, T. B.; Slate, A. B.; Johansson, A. S. Em *The Mycotoxin Blue Book*; Diaz, D. E., ed.; University Press: Nottingham, 2005, cap. 1.
8. Yamamoto, K.; *Textbook for country focused training course: mycotoxin analysis for Federative Republic of Brazil*, JICA: Kobe, 1999.
9. Knutti, R.; Schlatter, C.; *Z. Lebensmittel Untersuchung und Forsch.* **1982**, *174*, 122.
10. Whitaker, T. B.; Dickens, J. W.; Giesbrecht, F. G. Em *Mycotoxins and Animal Foods*; Smith, J. E.; Henderson, R. S., eds.; CRC Press Inc: Boca Raton, 1991, cap. 8.
11. Velasco, J.; Morris, S. L.; *J. Agric. Food Chem.* 1976, *24*, 86.
12. Whitaker, T. B.; Dickens, J. W.; *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1980**, *57*, 269.
13. Calori-Domingues, M. A.; Zovico, C.; Fonseca, H.; Gloria, E. M.; Barbin, D.; Borguini, R. G.; *Abstract Book of X International IUPAC Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins*, Guarujá, Brasil, 2000.
14. Whitaker, T. B.; Dickens, J.W.; Monroe, R. J.; *Peanut Science* **1981**, *8*, 89.
15. Horwitz, W.; Albert, R.; Nesheim, S.; *J. AOAC Int.* **1993**, *76*, 461.
16. Rodriguez-Amaya, D. B.; Sabino, M.; *Brazilian Journal of Microbiology* **2002**, *33*, 1.
17. Soares, L. M. V.; Rodriguez-Amaya, D. B.; *J. AOAC* **1989**, *72*, 22.
18. AOAC; *Official methods of analysis of AOAC International*, 18<sup>th</sup> ed., USA, 2006.
19. SAS; *SAS/STAT Guide for Personal Computers*, v. 9.1.3, SAS Institute Inc.: Cary, 2003.

20. Box, G. E. P.; Cox, D. R.; *J. Royal Statistical Society, Series B* **1964**, 26, 211.
21. European Communities; Commission Regulation 401/2006; *Off. J. Eur. Commun.* **2006**, 70, 12.
22. Richard, J.; *Sampling and sample preparation for mycotoxin analysis*, Romer Lab's, Inc: Union, 2000, vol. 2.
23. Schatzki, T. F.; Toyofuku, N.; *J. Agric. Food Chem.* **2003**, 51, 6068.
24. Whitaker, T. B.; Springer, J.; Defize, P. R.; Koe, W. J.; Coker, R.; *J. AOAC Int.* **1995**, 78, 1011.
25. Spanjer, M. C.; Scholten, J. M.; Kastrup, S.; Jorissen, U.; Schatzki, T. F.; Toyofuku, N.; *Food Addit. Contam.* **2006**, 23, 73.
26. Dorner, J. W.; *J. AOAC Int.* **2002**, 85, 911.