



Projeto MYCOTOX-PALOP  
Multi-actor partnership for the risk  
assessment of mycotoxins along the food  
chain in African Portuguese-speaking  
countries (PALOP)

Curso de formação avançada  
**Fungos e micotoxinas  
em alimentos e  
produtos armazenados**  
07 – 25 novembro 2022

**Componente laboratorial PRESENCIAL**

**17 – 25 novembro**

**Local:** Laboratório de Micologia Aplicada e Laboratório de Micotoxicologia Alimentar, Universidade do Minho, Campus de Gualtar, Braga

**Caderno de Laboratório**

Parceiros



Financiamento



AGA KHAN DEVELOPMENT NETWORK

Apoio





AGA KHAN DEVELOPMENT NETWORK

**FCT** Fundação  
para a Ciência  
e a Tecnologia

---



**Autores:**

Ana Guimarães, Centro de Engenharia Biológica, Universidade do Minho, Portugal

Armando Venâncio, Centro de Engenharia Biológica, Universidade do Minho, Portugal

Carla Santos, Centro de Engenharia Biológica, Universidade do Minho, Portugal

Célia Soares, Centro de Engenharia Biológica, Universidade do Minho, Portugal

Joana Santos, Centro de Engenharia Biológica, Universidade do Minho, Portugal

Paula Rodrigues, Centro de Investigação de Montanha, Instituto Politécnico de Bragança, Portugal

Teresa Dias, Centro de Engenharia Biológica, Universidade do Minho, Portugal

Thalita Calado, Centro de Engenharia Biológica, Universidade do Minho, Portugal

**Novembro 202**

## Índice

Protocolo 1 - Preparação de meios de cultura .....	1
1.1 Introdução.....	1
1.2 Objetivos .....	1
1.3 Material e Reagentes .....	1
1.4 Procedimento.....	2
1.4.1 Malt Extract Agar (MEA) .....	2
1.4.2 Malt Extract Glucose Yeast Extract Peptone Medium (MGYP).....	2
1.4.3 Czapek Yeast Agar (CYA) .....	3
1.4.4 Coconut Agar Medium (CAM).....	4
1.4.5 Potato Dextrose Agar (PDA).....	4
1.4.6 Dichloran Rose Bengal Agar (DRBC).....	4
1.4.7 Dichloran-Glycerol Agar Base (DG18) .....	5
1.4.8 <i>Aspergillus flavus</i> and <i>parasiticus</i> agar (AFPA) .....	5
1.4.9 Água Peptonada 0,1 %, 0,05% Tween 80.....	6
1.4.10 Agar Semi-sólido 0,2%, 0,05% Tween 80 .....	6
Protocolo 2 - Enumeração de bolores e leveduras e de bolores toxigénicos em diferentes tipos de alimentos e produtos armazenados .....	7
2.1 Introdução.....	7
2.2 Objetivos .....	7
2.3 Material e Reagentes .....	7
2.4 Procedimento.....	8
2.5 Bibliografia .....	10
Protocolo 3 - Isolamento de Fungos.....	11
3.1 Introdução.....	11
3.2 Objetivos .....	11
3.3 Material e Reagentes .....	11
3.4 Procedimento.....	11
Protocolo 4 - Identificação Morfológica de Fungos Filamentosos .....	13
4.1 Introdução.....	13

4.2	Objetivos .....	13
4.3	Material e Reagentes: .....	13
4.4	Procedimento.....	14
4.4.1	Identificação Macroscópica de Fungos Filamentosos.....	14
4.4.2	Identificação Microscópica de Fungos Filamentosos.....	14
Protocolo 5	- Preparação de biomassa para extração de ADN.....	17
5.1	Introdução.....	17
5.2	Objetivos .....	17
5.3	Material e Reagentes .....	17
5.4	Procedimento.....	18
5.4.1	Crescimento de biomassa em meio líquido.....	18
5.4.2	Filtração da Biomassa .....	18
Protocolo 6	- Extração de ADN .....	19
6.1	Introdução.....	19
6.2	Objetivos .....	19
6.3	Material e Reagentes .....	19
6.4	Procedimento.....	20
Protocolo 7	- Controlo de qualidade de ADN .....	23
7.1	Introdução.....	23
7.2	Objetivos .....	23
7.3	Material e Reagentes .....	23
7.4	Procedimento.....	24
Protocolo 8	- Reação de PCR para identificação de fungos.....	27
8.1	Introdução.....	27
8.2	Objetivos .....	27
8.3	Material e Reagentes .....	27
8.4	Procedimento.....	28
Protocolo 9	- Detecção e quantificação de Aflatoxinas totais com sistema AgraStrip .....	31
9.1	Introdução.....	31
9.2	Objetivos .....	31
9.3	Material e Reagentes .....	31
9.4	Procedimento.....	31

Protocolo 10	- Detecção e quantificação de Fumonisinas totais com sistema AgraStrip .....	33
10.1	Introdução.....	33
10.2	Objetivos .....	33
10.3	Material e Reagentes .....	33
10.4	Procedimento.....	33
Protocolo 11	- Detecção e quantificação de Deoxinivalenol com sistema AgraStrip .....	35
11.1	Introdução.....	35
11.2	Objetivos .....	35
11.3	Material e Reagentes .....	35
11.4	Procedimento.....	35
Protocolo 12	- Detecção e quantificação de Zearalenona com sistema AgraStrip .....	37
12.1	Introdução.....	37
12.2	Objetivos .....	37
12.3	Material e Reagentes .....	37
12.4	Procedimento.....	37
Protocolo 13	- Detecção e quantificação de Ocratoxina A com sistema AgraStrip .....	39
13.1	Introdução.....	39
13.2	Objetivos .....	39
13.3	Material e Reagentes .....	39
13.4	Procedimento.....	39
Protocolo 14	- Extração e “Clean-up” de Ocratoxina A em amostras alimentares .....	41
14.1	Introdução.....	41
14.2	Objetivos .....	41
14.3	Material e Reagentes .....	41
14.4	Procedimento.....	42
Protocolo 15	- Quantificação de Ocratoxina A (OTA) em amostras alimentares por HPLC-FL .....	43
15.1	Introdução.....	43
15.2	Objetivos .....	43
15.3	Material e Reagentes .....	43
15.4	Procedimento.....	43

## **Protocolo 1 - Preparação de meios de cultura**

### **1.1 Introdução**

No laboratório, os fungos são cultivados em culturas puras, ou seja, em condições não naturais. Isto origina uma pressão seletiva sobre o microrganismo e leva à necessidade de otimizar as condições de cultura para que este não perca as suas características. Cada espécie tem requisitos diferentes e a seleção de um meio de cultura em particular depende do objetivo pretendido. Por exemplo, há meios que favorecem a esporulação enquanto outros favorecem o crescimento vegetativo.

Os meios de cultura para o exame micológico de alimentos têm de ter em conta a atividade da água dos alimentos em causa, a presença ou ausência de conservantes, e o facto de se pretender examinar bolores, leveduras ou ambos. A par das propriedades dos alimentos a examinar, a formulação de meios genéricos para enumeração de fungos deve seguir algumas regras: serem nutricionalmente adequados permitindo o crescimento de fungos fastidiosos e o crescimento bacteriano deve ser suprimido. Os meios DRBC e DG18 são recomendados como meios genéricos de isolamento e enumeração. O diclorano tem como função inibir o desenvolvimento de fungos invasores e o rosa de bengal retarda o crescimento das colónias. Ambos os meios são formulados com cloranfenicol, que é um antibiótico, inibindo o crescimento de bactérias. Existem ainda outros meios de isolamentos seletivos, que permitem selecionar grupos específicos de organismos ou espécies em particular, como o AFPA e o CAM.

### **1.2 Objetivos**

- Preparação de meios de cultura para o isolamento, enumeração e caracterização morfológica de fungos.

### **1.3 Material e Reagentes**

- Balança;
- Gobelé;
- Proveta;
- Recipiente próprio para autoclave;
- Água destilada;
- Agitador magnético;
- Colher/ Espátula;

- Micro-ondas;
- Agulha e seringa;
- Álcool 100 %;
- Reagentes próprios de cada meio (enumerados nos procedimentos)

## 1.4 Procedimento

### 1.4.1 Malt Extract Agar (MEA)

- Agar ----- 20 g/L
- Glucose ----- 20 g/L
- Extrato de Malte ----- 20 g/L
- Peptona ----- 1 g/L

Água destilada	1000 mL	500 mL	250 mL
Agar	20 g	10 g	5 g
Glucose	20 g	10 g	5 g
Extrato de Malte	20 g	10 g	5 g
Peptona	1 g	0,5 g	0,25 g

1. Pesar todos os reagentes num gobelé à exceção do extrato de malte.
2. Suspender em água destilada, no volume pretendido, e aquecer até dissolver completamente.
3. Adicionar o extrato de malte e mexer para dissolver (pode ser usado um agitador magnético para ajudar com a dissolução).
4. Transferir a suspensão para um recipiente autoclavável, e esterilizar no autoclave a 121 °C por 15 minutos.

### 1.4.2 Malt Extract Glucose Yeast Extract Peptone Medium (MGYP)

- Extrato de Malte ----- 3 g/L
- Glucose ----- 10 g/L
- Extrato de levedura ----- 3 g/L
- Peptona ----- 5 g/L

Água destilada	1000 mL	500 mL	250 mL
Extrato De Malte	3 g	1,5 g	0,75 g
Glucose	10 g	5 g	2,5 g
Extrato de levedura	3 g	1,5 g	0,75 g
Peptona	5 g	2,5 g	1,25 g

1. Pesar todos os reagentes num gobelé à exceção do extrato de malte.
2. Suspender em água destilada, no volume pretendido, e aquecer até dissolver completamente.

3. Adicionar o extrato de malte e mexer para dissolver (pode ser usado um agitador magnético para ajudar com a dissolução).
4. Transferir a suspensão para um recipiente autoclavável, e esterilizar no autoclave a 121 °C por 15 minutos.

#### 1.4.3 Czapek Yeast Agar (CYA)

- Extrato de levedura ----- 5 g/L
- Sacarose ----- 30 g/L
- Concentrado de CZapek ----- 10 mL/L
- Agar ----- 15 g/L
- K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ----- 1 g/L

Água destilada	1000 mL	500 mL	250 mL
Extrato de levedura	5 g	2,5 g	1,25 g
Sacarose	30 g	15 g	7,5 g
Concentrado de CZapek	10 ml	5 ml	2,5 ml
Agar	15 g	7,5 g	3,75 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1 g	0,5 g	0,25 g

Concentrado de CZapek (C-Czapek)	
NaNO <sub>3</sub>	30 g
KCl	5 g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	5 g
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,1 g
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,1 g
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,05 g
Água destilada	100 mL

1. Pesar os componentes para o concentrado de CZapek num gobelé.
2. Adicionar 100 ml de água destilada, dissolver bem e transferir para uma garrafa e conservar no frigorífico até ser necessário.
3. Noutro gobelé, pesar todos os reagentes do CYA e adicionar o concentrado de CZapek. Adicionar a água destilada no volume pretendido. Aquecer até dissolver completamente.
4. Transferir a suspensão para um recipiente autoclavável, e esterilizar no autoclave a 121 °C por 15 minutos.

#### 1.4.4 Coconut Agar Medium (CAM)

- Leite de coco comercial
- Agar ----- 15 g/L

<b>Leite de coco</b>	1000 mL	500 mL	250 mL
<b>Agar</b>	15 g	7,5 g	3,75 g

1. Pesar o agar num gobelé e juntar o leite de coco no volume final pretendido. Misturar bem para dissolver (podendo ser usado o agitador magnético).
2. Transferir a suspensão para um recipiente autoclavável, e esterilizar no autoclave a 121 °C por 15 minutos.

#### 1.4.5 Potato Dextrose Agar (PDA)

<b>Água destilada</b>	1000 mL	500 mL	250 mL
<b>PDA</b>	39 g	19,5 g	9,75 g

1. Pesar a mistura num gobelé. Adicionar água destilada no volume final pretendido.
2. Aquecer até dissolver completamente.
3. Transferir a suspensão para um recipiente autoclavável, e esterilizar no autoclave a 121 °C por 15 minutos.

**Nota:** Este meio já vem previamente preparado e são seguidas as instruções do fabricante para a sua formulação.

#### 1.4.6 Dichloran Rose Bengal Agar (DRBC)

<b>Água destilada</b>	1000 mL	500 mL	250 mL
<b>DRBC</b>	31,5 g	15,75 g	7,875 g
<b>Cloranfenicol</b>	6 mL	3 mL	1,5 mL

1. Pesar a mistura num gobelé. Adicionar água destilada no volume final pretendido.
2. Aquecer até dissolver completamente.
3. Ressuspender um frasco de cloranfenicol com 3 ml de etanol 100% e adicionar ao preparado anterior.
4. Transferir a suspensão para um recipiente autoclavável, e esterilizar no autoclave a 121°C por 15 minutos.

**Nota:** Este meio já vem previamente preparado e são seguidas as instruções do fabricante para a sua formulação.

#### 1.4.7 Dichloran-Glycerol Agar Base (DG18)

<b>Água destilada</b>	1000 mL	500 mL	250 mL
<b>DG 18</b>	31,5 g	15,75 g	7,875 g
<b>Glicerol</b>	220 g	110 g	55 g
<b>Cloranfenicol</b>	6 ml	3 ml	1,5 ml

1. Pesar a mistura em pó num gobelé. Adicionar água destilada no volume final pretendido.
2. Aquecer até dissolver completamente.
3. Adicionar o glicerol.
4. Ressuspender um frasco de cloranfenicol com 3 ml de etanol 100% e adicionar ao preparado anterior.
5. Transferir a suspensão para um recipiente autoclavável, e esterilizar no autoclave a 121°C por 15 minutos.

**Nota:** Este meio já vem previamente preparado e são seguidas as instruções do fabricante para a sua formulação.

#### 1.4.8 *Aspergillus flavus* and *parasiticus* agar (AFPA)

<b>Água destilada</b>	1000 mL	500 mL	250 mL
<b>AFPA</b>	45,5 g	22,75 g	11,375 g
<b>Cloranfenicol</b>	6 ml	3 ml	1,5 ml

1. Pesar a mistura num gobelé. Adicionar água destilada no volume final pretendido e misturar bem (podendo ser usado o agitador magnético).
2. Ressuspender um frasco de cloranfenicol com 3 ml de etanol 100% e adicionar ao preparado anterior.
3. Transferir a suspensão para um recipiente autoclavável, e esterilizar no autoclave a 121°C por 15 minutos.

**Nota:** Este meio já vem previamente preparado e são seguidas as instruções do fabricante para a sua formulação.

## 1.4.9 Água Peptonada 0,1 %, 0,05% Tween 80

<b>Água destilada</b>	1000 mL	500 mL	250 mL
<b>Peptona</b>	1 g	0,5 g	0,25 g
<b>Tween 80</b>	0,5 ml	0,25 ml	0,125 ml

1. Pesar a peptona num gobelé. Adicionar o Tween 80 água destilada no volume final pretendido e misturar bem (podendo ser usado o agitador magnético).
2. Transferir a suspensão para um recipiente autoclavável, e esterilizar no autoclave a 121 °C por 15 minutos.

## 1.4.10 Agar Semi-sólido 0,2%, 0,05% Tween 80

<b>Água destilada</b>	1000 mL	500 mL	250 mL
<b>Agar</b>	2 g	1 g	0,5 g
<b>Tween 80</b>	0,5 ml	0,25 ml	0,125 ml

1. Pesar o agar num gobelé. Adicionar o Tween 80 e água destilada no volume final pretendido e misturar bem (podendo ser usado o agitador magnético).
2. Transferir a suspensão para um recipiente autoclavável, e esterilizar no autoclave a 121 °C por 15 minutos.

## Protocolo 2 - Enumeração de bolores e leveduras e de bolores toxigénicos em diferentes tipos de alimentos e produtos armazenados

### 2.1 Introdução

Existe uma grande variedade de fungos (bolores e leveduras) com capacidade de contaminação e desenvolvimento em alimentos com condições físico-químicas limitativas para o crescimento de bactérias, nomeadamente alimentos com baixa atividade de água. A maioria destes fungos é considerada como microflora de deterioração dos alimentos, pelo que a sua enumeração em algumas indústrias alimentares (e.g. na panificação) serve como controlo da qualidade microbiológica geral dos alimentos e do ambiente industrial. A quantificação da carga total de fungos é geralmente feita pela técnica da contagem em placa usando meios de cultura aos quais são adicionados dois princípios seletivos: inibição do crescimento de bactérias e redução do diâmetro das colónias. Esta metodologia, descrita na série ISO 21527, permite apenas quantificar unidades formadoras de colónias, sem que, no entanto, seja possível a identificação das espécies presentes.

Determinadas espécies de bolores, nomeadamente dos géneros *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium*, são potencialmente toxigénicas devido à produção de metabolitos secundários denominados micotoxinas. Nestes casos, a sua pesquisa, assim como a determinação do seu potencial toxigénico reveste-se de importância principalmente no estabelecimento de condições adequadas de produção e conservação de alguns produtos agrícolas (cereais, frutos secos e de casca rija).

A deteção e quantificação de fungos aflatoxigénicos do género *Aspergillus* é feita com recurso a meios de cultura seletivos e/ou diferenciais. O meio AFPA (*Aspergillus flavus* e *parasiticus* agar) é um meio seletivo e diferencial para os principais fungos produtores de aflatoxinas. Embora permita identificar a espécie, não permite determinar se as estirpes em causa são efetivamente produtoras de toxina. O meio de coco (CAM, *Coconut Agar Medium*) é um meio que permite não só identificar estirpes potencialmente toxigénicas como também permite detetar a produção efetiva de aflatoxinas naquelas condições de cultura, através da observação das placas com radiação UV longa.

### 2.2 Objetivos

- Quantificar fungos totais (bolores e leveduras) em diferentes tipos de alimentos e produtos armazenados (segundo a ISO 21527:2008)
- Quantificar os vários grupos de bolores em função do género ou da capacidade toxigénica

### 2.3 Material e Reagentes

#### A. Método das diluições e espalhamento em placa

- amostras de alimentos variados
- frasco de 250 mL contendo 90 mL de diluente (água peptonada 0,1%) com 0,05% Tween 80
- 4 tubos com 9 mL de diluente

- homogeneizador tipo *Stomacher* (para produtos maceráveis) ou liquidificador de facas (para produtos não maceráveis)
- 10 placas de Petri com meio de cultura DG18 (para amostras com  $aw < 0,95$ )
- 10 placas de Petri com meio de cultura DRBC (para amostras com  $aw > 0,95$ )
- 5 placas de Petri com meio de cultura AFPA (para enumeração de *Aspergillus* secção *Flavi*)
- 5 placas de Petri com meio de cultura CAM com cloranfenicol (para enumeração de AF+ e OTA+)
- saco estéril para *Stomacher*
- pipetas de 1 mL estéreis
- balança
- espátula
- álcool
- espalhador
- estufa a 25 °C
- etiquetas ou caneta de acetato

## B. Método da sementeira direta

- amostras de alimentos variados
- solução de hipoclorito de sódio a 0,4% (lixívia comercial a 10%)
- água estéril
- 5 placas de Petri com meio de cultura DG18 (para amostras com  $aw < 0,95$ )
- 5 placas de Petri com meio de cultura DRBC (para amostras com  $aw > 0,95$ )
- copo ou matraz de 250 mL
- etiquetas ou caneta de acetato
- pinça

## 2.4 Procedimento

### A. Método das diluições e sementeira em placa

Nota 1: As soluções de diluição e as placas contendo meio de cultura devem ser usadas à temperatura ambiente, para evitar o choque térmico dos microrganismos.

Nota 2: Nas pipetagens, a pipeta não deve mergulhar na suspensão mais do que 2 a 3 cm; o líquido aderido à parte exterior da pipeta deve ser eliminado tocando com a pipeta na parede interna do tubo; o descarte do líquido da pipeta para o tubo de diluição deve ser feito tocando com a ponta da pipeta 2 a 3 cm acima do nível da solução de diluição; evitar o contacto da pipeta contendo a suspensão microbiana com o diluente estéril.

Nota 3: O bocal dos tubos e frascos, assim como a tampa, devem ser brevemente passados à chama do bico de Bunsen após remoção da tampa e antes de voltar a colocar a tampa (cuidado com os frascos com tampa plástica).

Nota 4: As placas de Petri devem estar pousadas na bancada e só devem ser abertas o suficiente para permitir o acesso das pipetas.

**Nota 5:** O período que medeia o início das diluições e o fim da sementeira não deve ultrapassar os 25 minutos. As sementeiras em placa devem ser feitas em duplicado (repetição).

**Nota 6:** Nos alimentos sólidos, a fase de homogeneização da amostra corresponde à preparação da diluição inicial ou suspensão-mãe (diluição 1/10 ou 10<sup>-1</sup>). Nos alimentos líquidos, a suspensão-mãe geralmente corresponde à amostra original, sem qualquer diluição (10<sup>0</sup>). Os alimentos viscosos ou com elevada densidade podem ser considerados alimentos sólidos para efeitos de homogeneização da amostra.

1. Pesar para dentro do saco do homogeneizador (no caso de produtos sólidos maceráveis) ou do liquidificador (no caso de produtos sólidos não maceráveis) a quantidade de amostra necessária, (normalmente 10 g ou 25 g).
2. Juntar o volume de solução diluente necessário para obter uma mistura de 1:9 (p/v) e homogeneizar. A duração da homogeneização dependerá da dureza do produto e do equipamento usado.
3. Deixar em repouso à temperatura ambiente durante alguns minutos.
4. Proceder rapidamente às diluições decimais sucessivas necessárias. Para tal, transferir assepticamente 1 mL da suspensão inicial para um tubo de ensaio contendo 9 mL de diluente. Homogeneizar esta suspensão com vortex ou por rotação do tubo.
5. Com uma nova pipeta, transferir 1 mL desta suspensão para novo tubo de ensaio contendo 9 mL de diluente.
6. Repetir o passo anterior tantas vezes quantas as necessárias até obter a gama de diluições desejada (que dependerá da carga microbiana que se suspeite existir na amostra).
7. Semear 0,2 mL de cada suspensão em placas de Petri contendo o meio adequado (em duplicado). Espalhar com espalhador descartável estéril.
8. Incubar as placas em posição normal (tampa para cima) a 25 °C durante 5 a 7 dias.
9. Após 5 dias de incubação, selecionar as placas que apresentam entre 10 e 150 colónias e contar todas as colónias. No caso de se pretender diferenciar bolores de leveduras, fazer a sua contagem em separado, após 2 dias para as leveduras e após 5 dias para os bolores.
10. Apresentar os resultados em UFC/g ou mL de alimento, aplicando a seguinte fórmula:

$$N = \frac{\sum c}{V \times (n_1 + 0,1 \times n_2) \times d}$$

Onde:

**$\sum c$**  soma das colónias em todas as placas contadas (entre 15 e 150 colónias)

**$d$**  diluição a partir da qual se obtiveram as primeiras contagens

**$n_1$**  número de placas da 1ª diluição contada

**$n_2$**  número de placas da 2ª diluição contada

**$V$**  volume de inóculo semeado em cada placa

## B. Método da sementeira direta

1. Colocar > 50 partículas da amostra num copo ou matraz de 250 mL.
2. Proceder à desinfeção superficial da amostra por imersão das partículas numa solução de hipoclorito de sódio a 0,4% (lixívia a 10%). A solução deve ter um volume correspondente a 10x o volume das partículas, e só deve ser usada uma vez.
3. Deixar atuar durante 2 minutos, mexendo ocasionalmente com uma pinça. Deixar a pinça dentro do recipiente e tapar.
4. Verter a solução e lavar as partículas com água estéril.
5. Secar brevemente as partículas sobre papel absorvente estéril.
6. Usando a pinça desinfetada, semear as partículas na superfície do meio de cultura, à razão de 5 a 10 por placa, dependendo da dimensão das partículas.
7. Incubar as placas em posição normal (tampa para cima) a 25 °C durante 5 a 7 dias,
8. Após 5 dias de incubação, inspecionar as placas visualmente e contar o número de partículas infetadas.
9. Apresentar os resultados como percentagem de partículas infetadas, usando a seguinte fórmula:

$$\%i = \frac{Pi}{Pt} \times 100$$

Onde:

- %i** Percentagem de partículas infetadas  
**Pi** Número de partículas infetadas  
**Pt** Número total de partículas semeadas

## 2.5 Bibliografia

ISO 21527-1 (2008). Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of yeasts and molds. Part 1: Colony count technique in products with water activity less than or equal to 0,95. International Organization of Standardization, Suíça.

ISO 21527-2 (2008). Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of yeasts and molds. Part 2: Colony count technique in products with water activity more than 0,95. International Organization of Standardization, Suíça.

## Protocolo 3 - Isolamento de Fungos

### 3.1 Introdução

Os alimentos são, em geral, muito ricos em nutrientes e por isso propensos à contaminação fúngica. Isto é um problema para a indústria alimentar, pois os alimentos contaminados são descartados, ou, não sendo, podem apresentar riscos para a saúde dos consumidores. Assim sendo, há necessidade de um conhecimento detalhado dos fungos presentes nos alimentos, de forma a criar estratégias para mitigar o seu aparecimento.

As matrizes alimentares podem ser inoculadas em diversos meios de cultura de forma a perceber se estão contaminadas com fungos. Existem diversos meios que permitem a enumeração dos fungos, no entanto, para os poder identificar de forma inequívoca é necessário obter culturas puras, ou seja, é necessário isolar cada fungo individual numa cultura livre de contaminações.

### 3.2 Objetivos

- Isolar e obter culturas puras de fungos contaminantes dos alimentos e produtos armazenados.

### 3.3 Material e Reagentes

- Placas de enumeração de fungos
- Placas de petri com MEA
- Agulha de inoculação
- Lupa
- Agar semi-sólido/ Água destilada em tubo eppendorf
- Estufa
- Lamparina
- Vortex

### 3.4 Procedimento

1. Colocar as placas de enumeração de fungos na platina da lupa binocular (esteriomicroscópio) e localizar os fungos de interesse.
2. Molhar a agulha de inoculação estéril numa solução de agar 0,2% estéril (*eppendorf* com 300 µL de 0,2% agar + 0,05% Tween 80), e tocar cuidadosamente no fungo que se pretende isolar, de forma a recolher uma pequena porção de esporos/ micélio.
3. Transferir os esporos/ micélio da agulha para uma placa (6 cm diâmetro) contendo MEA.
4. Incubar a 25 °C, no escuro, cerca de 5-7 dias, dependendo do fungo.
5. Verificar se se trata de cultura pura e conservar:

- 5.1 Para fungos esporulantes, molhar a ansa numa solução de agar semi-sólido (300  $\mu$ L de 0,2% agar + 0,05% Tween 80) e tocar nas colónias com esporos, misturando bem, no tubo de agar semi-sólido. Homogeneizar a suspensão com a ajuda do vórtex.
- 5.2 Para fungos não esporulantes ou pouco esporulantes retirar pequenas porções de micélio e colocar num tubo com água destilada estéril.

**Nota:** Esta suspensão de esporos/ micélio vai permitir que o fungo esteja isolado e conservado para poder ser usado sempre que necessário.

## Protocolo 4 - Identificação Morfológica de Fungos Filamentosos

### 4.1 Introdução

Os fungos filamentosos apresentam uma enorme variedade entre espécies, assim como uma grande variabilidade intra-específica em função das condições ambientais (plasticidade), pelo que devem ser caracterizados e identificados com base em várias características sob condições padronizadas. A primeira abordagem na caracterização dos fungos é o estudo da sua morfologia, que deve ser feito aos níveis macroscópico e microscópico. A caracterização macroscópica baseia-se principalmente na cor da colónia, capacidade de crescimento em diversos meios de cultura e produção de pigmentos. Ao nível microscópico, a sua caracterização assenta na observação das hifas vegetativas (septadas ou não septadas), das estruturas reprodutivas e no tipo de esporos (sexuados e assexuados).

### 4.2 Objetivos

- - Compreender e dominar as diferentes técnicas de manipulação de fungos filamentosos.
- - Caracterizar fungos filamentosos a nível macro e microscópico
- - Identificar as diferentes estruturas que constituem os fungos filamentosos.
- - Utilizar as características morfológicas para identificar os diferentes géneros e espécies de fungos contaminantes dos alimentos e produtos armazenados

### 4.3 Material e Reagentes:

- Estirpes fúngicas
- Ansa de inoculação
- Placas de Petri com Meio
- Agar Semi-sólido
- Conta-gotas com azul de algodão
- Conta-gotas com álcool a 70%
- Conta gotas com água
- Conta gotas com azul de metileno
- Lâminas e lamelas
- Agulha de inoculação
- Pinça
- Bisturi
- Papel absorvente
- Fita-cola transparente
- Lamparina e isqueiro
- Microscópio ótico
- Lupa

## 4.4 Procedimento

### 4.4.1 Identificação Macroscópica de Fungos Filamentosos

1. Mergulhar a ansa na suspensão de esporos (previamente preparada em agar semi-sólido a partir das placas de isolamentos) e fazer a inoculação em 3 pontos, em placas de petri com diferentes meios de cultura.
2. Incubar 5 - 7 dias a 25 °C.
3. Observar as culturas de fungos à lupa e anotar para cada uma delas a cor (obverso e reverso), textura, recorte e diâmetro das colónias e ainda produção de exsudados, pigmentos ou estruturas específicas.
4. Após observação decidir o tipo de montagem adequado para cada um dos fungos.

### 4.4.2 Identificação Microscópica de Fungos Filamentosos

#### Método para fungos esporulantes

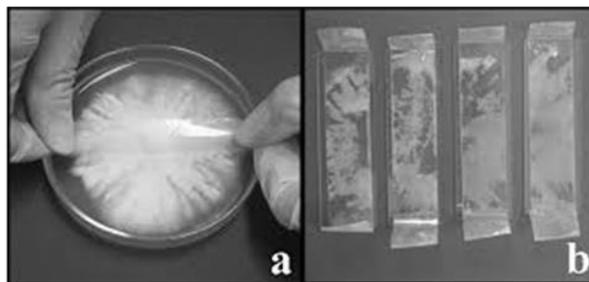
1. Recolher, com uma agulha de inoculação previamente esterilizada e arrefecida na extremidade da placa, uma pequena quantidade de material da periferia da colónia (raspar junto ao agar num movimento do centro para a periferia de modo a recolher estruturas em diferentes estados de maturação).
2. Colocar o material no centro de uma lâmina com o auxílio de uma segunda agulha ou o canto da lamela, caso seja necessário.
3. Remover o excesso de esporos com uma gota de álcool, se necessário bater levemente com a agulha sobre a superfície.
4. Levantar ligeiramente a lâmina para remover os esporos.
5. Colocar uma gota de corante (azul de algodão) sobre o material e cobrir com uma lamela.
6. Se necessário, limpar o excesso de corante em redor da lamela pressionando com papel absorvente sem provocar o deslocamento da lamela.
7. Observar a preparação no microscópio ótico composto.



Figura 1 - Preparação para análise microscópica.

**Método para fungos pouco esporulantes**

1. Colocar uma gota de azul de algodão na lâmina.
2. Cortar um pequeno quadrado de fita-cola transparente.
3. Com o auxílio de uma pinça pressionar ligeiramente a parte da fita que cola sobre o fungo.
4. Colocar a fita-cola sobre o de azul de algodão na lâmina com a face que cola virada para baixo. Efetuar este passo com o máximo de cuidado para evitar que a deslocação do corante danifique as estruturas do fungo.
5. Numa lamela diferente, repetir o passo anterior, mas colocando a fita-cola virada para cima. Deitar uma gota de azul de algodão por cima da fita cola.
6. Cobrir a preparação com uma lamela.
7. Se necessário, limpar o excesso de corante em redor da lamela pressionando com papel absorvente sem provocar o deslocamento da lamela.
8. Observar a preparação no microscópio ótico.



*Figura 2 - Preparação para análise microscópica.*



## **Protocolo 5 - Preparação de biomassa para extração de ADN**

### **5.1 Introdução**

Os fungos são muito diversos a vários níveis, incluindo na sua morfologia, nos seus nichos ecológicos, no seu metabolismo secundário e também a nível de posicionamento filogenético. Para estudar e identificar os diferentes géneros e espécies de fungos contaminantes dos alimentos e produtos armazenados utilizando técnicas de biologia molecular é necessário extrair os ácidos nucleicos, especificamente o ADN. O processo de extração ácidos nucleicos começa com o isolamento e crescimento da amostra para obter biomassa. Normalmente utilizamos biomassa crescida em meio líquido com agitação. Isto porque, de forma geral, as condições de agitação favorecem a produção de micélio, enquanto as condições estáticas, ou seja, em placa, favorecem a esporulação. Em muitas espécies de fungos os esporos apresentam coloração, a qual resulta da acumulação de melanina na parede celular. Apesar de nos passos finais do processo de extração se poderem realizar passos de lavagem, a melanina pode ser difícil de limpar, pelo que preferimos evitar a sua presença desde o início.

### **5.2 Objetivos**

- Obter biomassa pura e em quantidade suficiente para extrair ADN de espécies de fungos contaminantes dos alimentos e produtos armazenados.

### **5.3 Material e Reagentes**

- Estirpes fúngicas puras
- Tubo falcon de 50 ml ou erlenmeyer estéril
- Meio de cultura MGYD
- Ansa de inoculação
- Agitador orbital
- Aparelho de filtração e acessórios
- Kitasato
- Bomba de vácuo
- Pinça
- Espátula
- Filtros de papel
- Papel de alumínio
- Fita cola de papel
- Álcool 70%
- Papel para limpar os aparelhos

## 5.4 Procedimento

### 5.4.1 Crescimento de biomassa em meio líquido

1. Num tubo falcon de 50 mL ou num erlenmeyer, colocar cerca de 30 mL/ 100 mL de meio líquido MGYB;
2. Inocular o meio com uma ansada da solução de esporos em agar semi-sólido (preparada previamente das placas de isolamentos);
3. Deixar crescer com agitação (125 rpm), a 25 °C (ou temperatura ambiente) cerca de 4 dias (o tempo exato depende de cada espécie, pois há fungos de crescimento rápido e outros de crescimento mais lento);
4. Após o crescimento, retirar os falcons/erlenmeyer do agitador e filtrar o conteúdo e guardar apenas a biomassa.

### 5.4.2 Filtração da Biomassa

1. Montar a bomba a vácuo num kitasato, com os acessórios de filtragem;
2. Ligar a bomba de vácuo e borrifar bastante álcool no copo de filtragem para ficar tudo desinfetado. Retirar o tubo que liga o kitasato à bomba e desligar a bomba;
3. Limpar com papel a parte de cima do sistema de filtração e colocar um papel de filtro novo;
4. Voltar a colocar o tubo que une o kitasato à bomba de vácuo;
5. Ligar a bomba e despejar lentamente o conteúdo do falcons/erlenmeyer (que contém meio de cultura e biomassa) dentro do copo do sistema de filtragem, em cima do papel de filtro. Esperar até que o líquido seja filtrado para o kitasato e a biomassa tenha um aspeto seco;
6. Retirar o tubo que liga o kitasato à bomba de vácuo e desligar a bomba;
7. Com o auxílio de uma pinça/espátula retirar o filtro e colocá-lo num pouco de papel de alumínio. Fechar como se fosse um envelope, com fita cola, e identificar;
8. Voltar a colocar o tubo que une o kitasato à bomba de vácuo e ligar a bomba. Desinfetar tudo com álcool novamente e repetir o processo quantas vezes forem necessárias (não esquecendo de que entre cada falcon/erlenmeyer deve ser tudo desinfetado com álcool);
9. No final guarda-se a biomassa no congelador (-20 °C).

**Nota:** É muito importante retirar sempre o tubo do kitasato antes de desligar a bomba!

## Protocolo 6 - Extração de ADN

### 6.1 Introdução

Para extrair ácidos nucleicos, em particular o ADN, a partir de amostras de fungos é necessário seguir um protocolo composto por vários passos, cada qual com uma função específica. Primeiro faz-se a lise celular, ou seja, a destruição da parede e membrana celular e das membranas dos organelos celulares como o núcleo, o que liberta o ADN para a solução. Normalmente utilizamos uma combinação de métodos químicos, à base de detergentes que ajudam a solubilizar os lípidos das membranas celulares e a dissolver proteínas, com homogeneização mecânica. O passo seguinte permite remover os contaminantes da solução, principalmente as proteínas. Para isto utiliza-se uma solução com uma concentração elevada de sais, como o acetato de sódio, que provoca a agregação e precipitação das proteínas. Este passo é muito importante porque ajuda a eliminar enzimas (nucleases) que destroem os ácidos nucleicos, ajudando a manter a integridade da nossa amostra de ADN. Os ácidos nucleicos são depois recuperados por precipitação utilizando álcool. Normalmente utilizamos isopropanol para precipitar o ADN já que este é mais eficiente. Contudo, este é pouco volátil (e por isso mais difícil de remover da amostra) e mais favorável à co-precipitação de solutos como açúcares ou sais. Por essa razão, realizam-se passos de lavagem com etanol de forma a remover detritos celulares, moléculas e material indesejado da amostra. Por fim, é necessário ressuspender o ADN. Normalmente utilizamos água sem nucleases, uma opção que permite conservar o ADN de forma estável durante muitos anos se as amostras foram mantidas a -20 °C ou a -80 °C. De ter em conta que durante a extração de ADN também se extrai muito ARN. Por este motivo, é aconselhável tratar-se a amostra com a enzima RNase.

### 6.2 Objetivos

- Extrair ADN puro e em quantidade suficiente identificar e caracterizar espécies de fungos contaminantes dos alimentos e produtos armazenados utilizando técnicas de biologia molecular.

### 6.3 Material e Reagentes

- Estirpes fúngicas (biomassa filtrada);
- Tubos de 2 mL com tampa de rosca;
- Esferas de vidro estéreis (425-600 µm);
- Pinça;
- Espátula;
- Micropipetas e respetivas pontas estéreis;
- Tubos eppendorf de 2 mL;
- Centrífuga;
- Homogeneizador (por exemplo, FastPrep);
- SpeedVac (opcional);

- Água ultrapura estéril;
- RNase 10 mg/mL;
- Reagentes descritos nos procedimentos.

## 6.4 Procedimento

### Preparação dos reagentes necessários à extração de ADN:

#### Acetato de Sódio

Acetato de Sódio 3M pH 5.5	250 mL
Acetato de Sódio (M = 82,03 g/mol)	61,522g
Água destilada	Perfazer até 250 mL
*Acertar o pH a 5.5 com ácido acético glacial.	

#### EDTA

EDTA 0,2M pH 8.0	50 ml
EDTA (M = 372,24 g/mol)	3,7224 g
Água destilada	Perfazer até 50 mL
*Acertar o pH a 8.0 com NaOH.	

#### Tris-HCl

Tris HCl 2M pH 8.4	50 ml
Tris (M = 121,14 g/mol)	12,114 g
Água destilada	Perfazer até 50 mL
*Acertar o pH a 8.4 com HCl.	

#### CTAB 2%

CTAB 2%	100 mL	[ ] final
Tris-HCl 2M pH 8.4	5 mL	100 mM
NaCl	8,18 g	1,4 M
EDTA 0,2M pH 8.0	12,48 mL	25 mM
CTAB	2 g	2% (w/v)
Água destilada	Perfazer até 100 mL	Perfazer volume final

\*Agitar com aquecimento ( $\approx 55\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) para ajudar a dissolver o CTAB.

**Extração de ADN a partir de biomassa de fungos:**

1. Preparar tubos para a homogeneização mecânica das amostras: colocar aproximadamente 0,67 g de esferas de vidro em tubos de 2 mL com tampa de rosca. Esterilizar no autoclave.
2. Com a ajuda de uma pinça e espátula estéreis, colocar aproximadamente **200 mg** de biomassa (previamente filtrada – Ver protocolo de filtração) nos tubos para homogeneização mecânica (Nota: a quantidade de biomassa pode ser menor, o valor indicado é o ótimo).
3. Adicionar **1 mL** de tampão de lise (CTAB 2%, por exemplo).
4. Homogeneizar a biomassa no FastPrep Instrument durante 30 segundos a velocidade 6.0. Escolher Matriz de tipo C.
5. Após homogeneização, centrifugar as amostras a 14.000×g durante 8 minutos para precipitar as esferas e os resíduos celulares.
6. Transferir cerca de **800 µL** de sobrenadante para um tubo eppendorf de 2 ml limpo.
7. Adicionar **1 mL** de Acetato de Sódio (3M, ph 5.5) frio, para precipitar polissacarídeos e proteínas.  
(a solução de acetato deve ser armazenada no frigorífico, no entanto no início do protocolo, cerca de **40 minutos antes deste passo, deve ser colocado a -20 °C**).
8. Misturar cuidadosamente por inversão e incubar a -20°C durante 10 minutos.
9. Centrifugar a 14.000×g durante 10 minutos.
10. **Transferir 1 mL** do sobrenadante para um novo tubo eppendorf de 2 mL e adicionar **1 mL** de isopropanol frio (-20 °C), para precipitar o DNA.
11. Misturar cuidadosamente por inversão e incubar a -20 °C durante 1 hora (este passo pode ser prolongado por mais tempo).
12. Centrifugar a 14.000×g durante 10 minutos e descartar o sobrenadante.  
(o sobrenadante deve ser descartado como resíduo halogenado).
13. Adicionar **1 mL** de etanol 70% frio (-20°C) para lavar o *pellet* de DNA.  
(o etanol é preparado a partir de etanol a 100%, específico para molecular)
14. Centrifugar a 6.000×g durante 7 minutos.
15. Descartar o sobrenadante e repetir a lavagem (passos 13 e 14).
16. Voltar a descartar o sobrenadante e retirar o etanol. Para isso, secar um pouco o precipitado ao ar e depois usar o SpeedVac durante 5 minutos a 40 °C, para eliminar todo o etanol. (se o SpeedVac não estiver disponível é possível secar as amostras ao ar dentro de uma estufa).
17. Ressuspender o *pellet* de ADN em **100 µL** de água ultrapura estéril (pode ser menos quantidade). Para auxiliar a ressuspensão do ADN, a amostra pode ficar a 56 °C durante pelo menos uma hora.
18. No final guardar as amostras a -20 °C.



### **Tratamento do DNA com RNase**

1. Aos 100  $\mu\text{L}$  de amostra de ADN adicionar 2  $\mu\text{L}$  de RNase (10 mg/mL).
2. Incubar 1 hora a 56 °C.
3. Guardar o DNA a -20 °C até ser necessário.

## **Protocolo 7 - Controlo de qualidade de ADN**

### **7.1 Introdução**

Após a extração de ADN é sempre conveniente realizar o controlo de qualidade das amostras, ou seja, deve-se verificar a qualidade, integridade e quantidade de ácidos nucleicos presentes na amostra.

Para verificar a qualidade e integridade utilizamos a técnica de eletroforese em gel de agarose. O princípio desta técnica baseia-se no facto dos ácidos nucleicos terem carga negativa e de a agarose formar uma espécie de rede cujo tamanho do poro varia em função da sua concentração. Assim, quando se aplica uma corrente elétrica ao gel os ácidos nucleicos migram em direção ao eletrodo positivo. As moléculas mais pequenas migram mais rapidamente do que as maiores, pelo que os fragmentos ficam organizados pelo seu tamanho. Para estimar o tamanho dos fragmentos presentes na nossa amostra devemos utilizar um marcador de peso molecular, ou seja, uma solução de fragmentos de ADN com tamanhos conhecidos.

Um dos métodos mais utilizados para quantificar o ADN é o da absorvância dos ácidos nucleicos quando excitados por luz ultravioleta e visível. O equipamento mais conhecido é o NanoDrop. A base desta técnica é que os ácidos nucleicos absorvem luz, principalmente a 260 nm. Dependendo da quantidade de ácidos nucleicos presentes na amostra, a quantidade de luz neste comprimento de onde que passa através da amostra até ao detetor varia, sendo por isso possível inferir a sua concentração. Outros compostos presentes na amostra também absorvem luz mas a diferentes comprimentos de onda. Assim, é possível calcular rácios que indicam possíveis contaminantes presentes nas amostras (as proteínas e o fenol absorvem principalmente a 280 nm; já os sais e outros compostos orgânicos absorvem principalmente a 230 nm). Mas é importante ter em conta que este método não diferencia ADN de ARN e é conhecido por sobrestimar as concentrações devido a interferências que as moléculas em solução podem provocar no caminho da luz.

### **7.2 Objetivos**

- Extrair ADN puro e em quantidade suficiente identificar e caracterizar espécies de fungos contaminantes dos alimentos e produtos armazenados utilizando técnicas de biologia molecular

### **7.3 Material e Reagentes**

- Amostras de ADN extraídas anteriormente;
- Suporte para gel e respetivos pentes;
- Erlenmeyer e proveta;
- Micropipetas e respetivas pontas estéreis;
- Agarose;
- Água ultrapura;
- Tampão TAE 0,5x (preparado por diluição 1:100 da solução stock a 50x descrita abaixo);

- Reagente Greensafe Premium (corante que se liga aos ácidos nucleicos e emite fluorescência sob luz ultravioleta a 254 nm);
- Reagente loading dye 2x (este corante dá densidade à amostra e permite acompanhar a posição da amostra no gel durante a corrida);
- Marcador de peso molecular (0.2 - 10 kb);
- Papel macio;
- Balança;
- Micro-ondas;
- Fonte e tina de electroforese;
- Transiluminador;
- NanoDrop.

## 7.4 Procedimento

### Preparação da solução stock do tampão TAE 50x

TAE 50x	1000 mL
Tris base	242 g
EDTA	18,61 g
Ácido acético glacial	57,1 mL
Água destilada	Perfazer até 1000 mL

1. Num gobelé, adicionar o Tris e o EDTA a aproximadamente 700 ml de água.
2. Agitar até dissolução completa dos sais.
3. Adicionar o ácido acético, transferir a mistura para um balão volumétrico de 1 L e ajustar até um volume total de 1000 mL.

### Preparação de um gel de electroforese e sua corrida

A preparação de um gel depende do tamanho do suporte que temos e do objetivo para o qual estamos a realizar o gel. Neste caso, para controlo de qualidade de amostras de ADN, fazemos um gel com 1% (peso/volume) de agarose.

1. Montar o suporte com os pentes necessários.
2. Pesar, num erlenmeyer, agarose para um gel a 1% – 0,3 g (suporte pequeno, volume de 30 ml) ou 0,6 g (suporte grande, volume de 60 ml).
3. Adicionar 30 ml (suporte pequeno) ou 60 ml (suporte grande) de uma solução tampão (usualmente TAE 0,5x).
4. Dissolver a agarose levando ao micro-ondas por breves momentos de cada vez até se obter um líquido homogéneo. (Neste passo é necessário ter cuidado para não deixar a mistura demasiado tempo seguido no micro-ondas pois caso contrário pode verter)

- Retirar o recipiente do micro-ondas, deixar arrefecer um pouco (sem deixar solidificar). Acrescentar 1,6  $\mu\text{L}$  (suporte pequeno) ou 3,2  $\mu\text{L}$  (suporte grande) de Greensafe Premium e agitar para homogeneizar.
- Verter a agarose no suporte, com cuidado, garantindo que todo o suporte é preenchido e não são criadas bolhas de ar.
- Deixar o gel solidificar, à temperatura ambiente ou no frigorífico (aproximadamente 20 a 30 minutos).
- Quando o gel estiver bem solidificado, montar o suporte na tina de eletroforese (a qual se encontra cheia com a mesma solução tampão que foi utilizada para preparar o gel), garantindo que a superfície do gel fica totalmente coberta pela solução tampão.
- Para cada amostra, adicionar igual quantidade de ADN e loading dye 2x (por exemplo 1  $\mu\text{L}$  de cada).
- Carrega-se cada poço do gel com a mistura de ADN com loading dye 2x preparada no ponto 9.
- Adicionar o marcador de peso molecular (cerca de 3  $\mu\text{L}$ ) no primeiro poço do gel, para verificar o tamanho das bandas e usar como controlo de qualidade da corrida.
- Fechar a tina de eletroforese e iniciar a corrida a 120 V por 6 minutos. Passado este tempo, correr o gel por mais 30 minutos a 70V (estes valores podem variar).

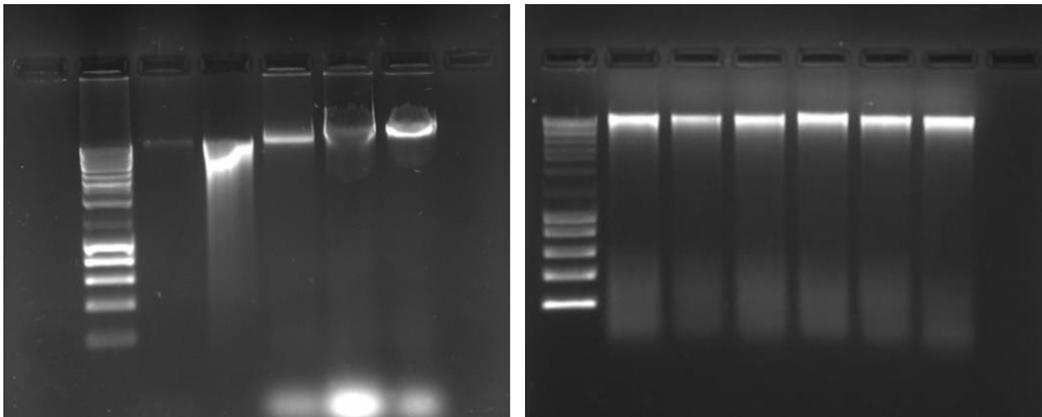


Figura 3 - Imagens de géis exemplificativos da extração de DNA.

### Quantificação de ADN utilizando o NanoDrop:

- Abrir o programa do equipamento NanoDrop no computador que está na sala da Plataforma de Biologia Molecular para este efeito. Selecionar a hipótese “Nucleic Acids”.
- Pipetar 5  $\mu\text{L}$  de água ultrapura no sensor do equipamento, baixar cuidadosamente o braço do equipamento e deixar atuar durante pelo menos 30 segundos. Este passo serve para limpar o sensor. Após este tempo, secar o sensor utilizando o papel macio que se encontra no local para o efeito.
- Para iniciar o sistema, pipetar 2  $\mu\text{L}$  de água ultrapura, fechar o sensor e carregar no “OK” da mensagem que apareceu no ecrã após abrir o programa. Após o sistema iniciar, voltar a secar o sensor com o papel.

4. Pipetar, novamente, 2  $\mu\text{L}$  do branco (neste caso será também água ultrapura uma vez que se ressuspendeu a amostra de ADN nesta solução). Para medir o branco carregar em “Blank”. Secar o sensor com o papel.
  5. Após estes passos, é possível fazer a medição de cada amostra à vez: pipetar 2  $\mu\text{L}$  de amostra no sensor e carregar em “Measure”. Limpar sempre o sensor com o papel entre cada amostra. (Se forem medidas muitas amostras, pode-se voltar a fazer o branco, ou uma medição com o branco, para ter a certeza de que o aparelho continua calibrado.)
  6. No final termina-se com uma nova lavagem com água ultrapura (5  $\mu\text{L}$ ) e passa-se novamente o papel para deixar o sensor seco.
- É importante registar os valores da quantidade de ácidos nucleicos ( $\text{ng}/\mu\text{L}$ ) e as razões 260/280 e 260/230:
- a razão de absorvância 260/280 é um bom indicador de contaminação proteica (quando  $\geq 1,8$  os ácidos nucleicos consideram-se puros; se  $\leq 1,6$  pode indicar presença de proteínas, fenol ou outros contaminantes que absorvem a 280 nm);
  - a razão de absorvância 260/230, quando  $\leq 1,8$ , indica contaminação por compostos orgânicos ou agentes caotrópicos, que absorvem a 230 nm.

## Protocolo 8 - Reação de PCR para identificação de fungos

### 8.1 Introdução

A reação em cadeia da polimerase, ou PCR, é uma das técnicas chave para a identificação de fungos por biologia molecular. Esta permite analisar regiões específicas que dão informação sobre a variabilidade intra-específica (por exemplo, *DNA fingerprinting*), sobre a presença ou ausência de um gene (por exemplo, se genes da via metabólica de uma micotoxina estão presentes na nossa amostra), ou sobre a classificação e identificação dos fungos contaminantes (por exemplo, através da análise filogenética de regiões como o ITS – *internal transcribed spacer*; beta tubulina; calmodulina; entre outras).

A PCR promove a amplificação exponencial de regiões de interesse na nossa amostra de ADN genómico através de um protocolo de ciclagem térmica que se repete normalmente de 25 a 35 vezes. Ou seja, para cada molécula alvo de ácido nucleico presente na reação, a sua quantidade aumenta na proporção de  $2^n$ , em que  $n$  é o número de ciclos da PCR. Além da nossa amostra, a PCR utiliza primers, ou seja, oligonucleotídeos específicos que delimitam a região de interesse, nucleótidos, uma polimerase termo-estável, e uma solução tampão que contém cofatores como o magnésio.

Após a PCR é necessário verificar se a reação aconteceu com sucesso. Isto pode ser feito num gel de agarose. Antes de poder sequenciar o produto de PCR é necessário purificá-lo. Isto porque é importante eliminar contaminantes como restos de sais, enzima, nucleótidos ou primers que não foram consumidos durante a PCR e que podem interferir na reação de sequenciação. Existem vários métodos disponíveis para purificação: métodos enzimáticos, em que se utiliza a enzima EXO-SAP (esta é uma combinação de duas enzimas – uma exonuclease que degrada os primers, e uma fosfatase alcalina que degrada os nucleótidos livres); ou kits com colunas de membranas (neste caso os produtos de PCR unem-se à membrana e é possível lavar os contaminantes; depois utiliza-se uma solução tampão para eluir o amplificado puro).

### 8.2 Objetivos

- Amplificar uma região de ADN de interesse para a identificação e caracterização de espécies de fungos contaminantes dos alimentos e produtos armazenados.

### 8.3 Material e Reagentes

- Amostras de ADN extraídas anteriormente;
- Solução de PCR Master Mix 2x;
- Primer forward (10  $\mu$ M);
- Primer reverse (10  $\mu$ M);
- Água ultrapura;
- Agarose;
- Tampão TAE 0,5x;

- Reagente Greensafe Premium;
- Marcador de peso molecular (0.2 - 10 kb);
- Enzima ExoSAP;
- Tubos de PCR esterilizados;
- Micropipetas e respetivas pontas estéreis;
- Suporte para gel e respetivos pentes;
- Erlenmeyer e proveta;
- Termociclador;
- Balança;
- Micro-ondas;
- Fonte e tina de electroforese;
- Transiluminador.

Nota 1: Para preparar a reação de PCR é necessário descongelar e homogeneizar todos os seus componentes.

Nota 2: A PCR é realizada em tubos de PCR estéreis e é importante garantir que todos os materiais estão estéreis e higienizados para não ocorrerem contaminações.

## 8.4 Procedimento

### Amplificação por PCR de ADN extraído de fungos:

1. Para cada amostra, preparar a reação num tubo de PCR colocando o volume de cada reagente como descrito na tabela abaixo. Preparar também um tubo com o controlo negativo, no qual se adiciona água ultrapura em vez de ADN para garantir que nenhum dos componentes da reação está contaminado.

Amostras	Para um volume final de 25 µL
Master Mix	12,5 µL
Primer forward	0,5 µL
Primer reverse	0,5 µL
DNA	25 - 50 ng
Água ultra pura	Perfazer até chegar aos 25 µL

Controlo negativo	Para um volume final de 25 µL
Master Mix	12,5 µL
Primer forward	0,5 µL
Primer reverse	0,5 µL
Água ultra pura	Perfazer até chegar aos 25 µL

2. Após juntar todos os reagentes devemos homogeneizar o preparado e garantir que todo o conteúdo está no fundo do tubo antes de o colocar no termociclador.
3. Para amplificar a região ITS ou o gene beta tubulina utiliza-se o seguinte protocolo de amplificação:

95 °C – 5 min.	
95 °C – 60 seg.	}
56 °C – 45 seg.	
72 °C – 90 seg.	
72 °C – 10 min.	35 X

4. Uma vez o termociclador termine o protocolo de amplificação é necessário fazer um controlo de qualidade para verificar se a reação teve sucesso e se a região de interesse foi amplificada.

### **Realização de gel de eletroforese para controlo de qualidade da reação PCR:**

A preparação de um gel depende do tamanho do suporte que temos e do objetivo para o qual estamos a realizar o gel. Neste caso, para controlo de qualidade de amostras de ADN, fazemos um gel com 1% (peso/volume) de agarose.

1. Montar o suporte com os pentes necessários.
2. Pesar, num erlenmeyer, agarose para um gel a 1% – 0,3 g (suporte pequeno, volume de 30 ml) ou 0,6 g (suporte grande, volume de 60 ml).
3. Adicionar 30 ml (suporte pequeno) ou 60 ml (suporte grande) de uma solução tampão (usualmente TAE 0,5x).
4. Dissolver a agarose levando ao micro-ondas por breves momentos de cada vez até se obter um líquido homogéneo. (Neste passo é necessário ter cuidado para não deixar a mistura demasiado tempo seguido no micro-ondas pois caso contrário pode verter)
5. Retirar o recipiente do micro-ondas, deixar arrefecer um pouco (sem deixar solidificar). Acrescentar 1,6 µL (suporte pequeno) ou 3,2 µL (suporte grande) de Greensafe Premium e agitar para homogeneizar.
6. Verter a agarose no suporte, com cuidado, garantindo que todo o suporte é preenchido e não são criadas bolhas de ar.
7. Deixar o gel solidificar, à temperatura ambiente ou no frigorífico (aproximadamente 20 a 30 minutos).
8. Quando o gel estiver bem solidificado, montar o suporte na tina de eletroforese (a qual se encontra cheia com a mesma solução tampão que foi utilizada para preparar o gel), garantindo que a superfície do gel fica totalmente coberta pela solução tampão.
9. Carregar cada poço do gel com 3 µL de cada amostra (reação de PCR) preparada anteriormente.

10. Adicionar o marcador de peso molecular (cerca de 3  $\mu$ L) no primeiro poço do gel, para verificar o tamanho das bandas e usar como controlo de qualidade da corrida.
11. Fechar a tina de eletroforese e iniciar a corrida a 120 V por 6 minutos. Passado este tempo, correr o gel por mais 30 minutos a 70V (estes valores podem variar).

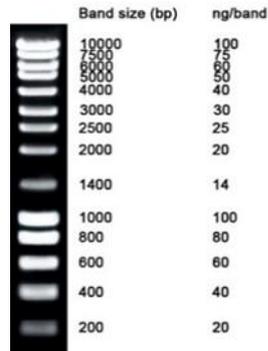


Figura 4 - Marcador molecular por onde é possível confirmar o tamanho dos produtos amplificados.

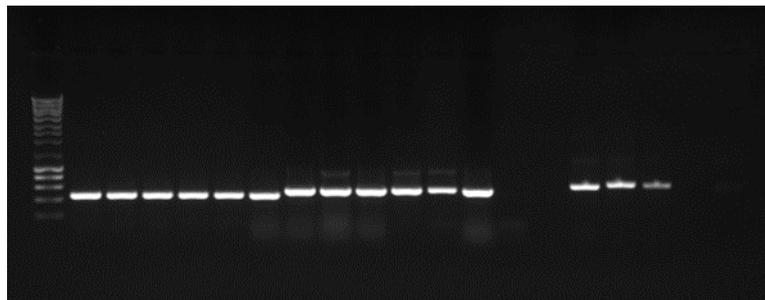


Figura 5 - Gel de eletroforese exemplificativo da amplificação do gene beta tubulina (tamanho esperado: aproximadamente 400 bp).

### Purificação enzimática dos produtos de PCR:

1. Num tubo de PCR, juntar 10  $\mu$ L de produto de PCR e 4  $\mu$ L das enzimas ExoSAP.
2. No termociclador, incubar 10 min a 37 °C e depois 10 min a 80 °C. (Este processo pode também ser feito em banho-maria ou num banho seco).
3. As amostras purificadas podem guardar-se no congelador até serem enviadas para realizar a sequenciação.

## Protocolo 9 - Detecção e quantificação de Aflatoxinas totais com sistema AgraStrip

### 9.1 Introdução

As Aflatoxinas (AFs) são um grupo de micotoxinas produzidas principalmente por fungos do género *Aspergillus*. Estas são consideradas as mais tóxicas de entre as micotoxinas conhecidas. Podem ser divididas em dois grupos principais de acordo com a sua estrutura química: o grupo da ciclopentanona e o grupo pirano. As AFB1, AFB2, AFG1 e AFG2 são consideradas tóxicas para humanos e animais e estão muitas vezes presentes em diversos produtos agroalimentares. Tal como a maioria das micotoxinas conhecidas, são mais preocupantes em regiões com climas tropicais. As condições ambientais mais quentes e húmidas propiciam um maior crescimento fúngico e produção de micotoxinas. Devido a sua toxicidade já comprovada cientificamente, existe legislação que obriga a que os valores fiquem dentro de limites considerados seguros quer para consumo humano, quer para consumo animal. Deste modo, é necessário a aplicação de testes de deteção e quantificação de Afs.

Os kits de teste AgraStrip® Pro são dispositivos de fluxo lateral para a deteção rápida, no próprio local, de micotoxinas numa variedade de produtos agrícolas. Estão disponíveis tiras para aflatoxina total (B1, B2, G1, G2), desoxinivalenol, zearalenona, fumonisina total (B1, B2, B3), ocratoxina, e toxinas H-2/HT-2. O leitor AgraVision™ Pro tem um sistema que apresenta o procedimento de extração e diluição partilhado e permite testes simples para várias micotoxinas diferentes em menos de 10 min. Estas características, para além de eliminarem erros de manuseamento comuns, permitem uma despistagem rápida e *in situ* das condições do produto alimentar.

### 9.2 Objetivos

- Pesquisa e quantificação de aflatoxinas totais em produtos alimentares por métodos rápidos.

### 9.3 Material e Reagentes

- Kit de AgraStrip® Pro para aflatoxinas totais
- Balança analítica com capacidade de pesagem até 400 g
- Proveta graduada com capacidade mínima de 100 mL
- Água destilada, desionizada ou engarrafada para extração
- Centrífuga
- Leitor AgraVision Pro;
- Pipetas de canal único capazes de pipetar até 1000 µL ou menos: pipetas de volume fixo (pipeta fixa de 100 µL e pipeta fixa de 1000 µL)

### 9.4 Procedimento

1. Ligar o leitor *AgraVision Pro* e seguir o procedimento de configuração de acordo com as instruções;

2. Pesar 10 g de amostra representativa adequadamente moída e adicionar um pacote de tampão de extração na lateral do saco de filtro, de preferência no mesmo lado da amostra;
3. Adicionar 50 mL de água destilada ao saco de filtro;
4. Fechar o saco e agitar vigorosamente por 2 minutos;
5. Deixar a amostra assentar por 1 minuto;
6. Pipetar 1000 µL de tampão de diluição para um tubo *ependorf* e adicionar 100 µL de extrato de amostra. Retirar o extrato do lado oposto ao lado em que a amostra foi pesada;
7. Centrifugar o extrato de amostra diluído por 30 segundos. Usar o sobrenadante para análise;
8. Inserir a tira de teste *AgraStrip*<sup>®</sup> Pro no cartucho *AgraVision Pro*. Introduzir o cartucho contendo a tira de teste na porta do leitor;
9. Inserir o código da amostra e selecionar a matriz e o intervalo de quantificação;
10. Adicionar 100 µL de amostra ao cartucho *AgraVision Pro*.

**Intervalos de quantificação**

- LOD: 2,0 ppb (milho)
- LOQ: 3,0 ppb (milho)
- 1º Intervalo de quantificação: 0 – 100 ppb
- 2º Intervalo de quantificação: 57 – 460 ppb

## **Protocolo 10 - Detecção e quantificação de Fumonisinas totais com sistema AgraStrip**

### **10.1 Introdução**

As fumonisinas são produzidas, principalmente, por fungos do género *Fusarium*. Existem pelo menos 28 formas diferentes de fumonisinas, designadas como série A, série B, série C e série P. A série B é a mais abundante e importante quando falamos de toxicidade, principalmente a fumonisina B1. A toxicidade do FB1 é determinada pela presença de duas cadeias laterais na sua estrutura, que são o ácido tricarbálico, e também pela presença de grupos amino livres. O seu mecanismo de toxicidade atua por meio da inibição da biossíntese de esfingolípidos em animais, plantas e leveduras. Podem ocorrer em vários produtos alimentares, sendo encontrada frequentemente em milho. Devido às evidências científicas da sua toxicidade, existe legislação aplicável e o seu teor em alimentos deve ser controlado.

Os kits de teste AgraStrip® Pro têm disponível tiras para deteção de fumonisina total (B1, B2, B3) com limite de deteção para amostras de milho de 0,1 ppm e limites de quantificação para o mesmo tipo de amostra de 0,2 ppm.

### **10.2 Objetivos**

- Pesquisa e quantificação de fumonisinas totais em produtos alimentares por métodos rápidos.

### **10.3 Material e Reagentes**

- Kit de AgraStrip® Pro para fumonisinas totais
- Balança analítica com capacidade de pesagem até 400 g
- Proveta graduada com capacidade mínima de 100 mL
- Água destilada, desionizada ou engarrafada para extração
- Centrífuga
- Leitor AgraVision Pro;
- Pipetas de canal único capazes de pipetar até 1000 µL ou menos: pipetas de volume fixo (pipeta fixa de 100 µL e pipeta fixa de 1000 µL)

### **10.4 Procedimento**

1. Ligar o leitor *AgraVision Pro* e seguir o procedimento de configuração de acordo com as instruções;
2. Pesar 10 g de amostra representativa adequadamente moída e adicionar um pacote de tampão de extração na lateral do saco de filtro, de preferência no mesmo lado da amostra;
3. Adicionar 50 mL de água destilada ao saco de filtro;

4. Fechar o saco e agitar vigorosamente por 2 minutos;
5. Deixar a amostra assentar por 1 minuto;
6. Pipetar 1000  $\mu$ L de tampão de diluição para um tubo *ependorf* e adicionar 100  $\mu$ L de extrato de amostra. Retirar o extrato do lado oposto ao lado em que a amostra foi pesada;
7. Centrifugar o extrato de amostra diluído por 30 segundos. Usar o sobrenadante para análise;
8. Inserir a tira de teste *AgraStrip*<sup>®</sup> Pro no cartucho *AgraVision Pro*. Introduzir o cartucho contendo a tira de teste na porta do leitor;
9. Inserir o código da amostra e selecionar a matriz e o intervalo de quantificação;
10. Adicionar 100  $\mu$ L de amostra ao cartucho *AgraVision Pro*.

**Intervalos de quantificação**

- LOD: 0,1 ppm (milho)
- LOQ: 0,2 ppm (milho)
- 1<sup>º</sup> Intervalo de quantificação: 0 – 4,2 ppm
- 2<sup>º</sup> Intervalo de quantificação: 3,1 – 44 ppm

## Protocolo 11 - Detecção e quantificação de Deoxinivalenol com sistema AgraStrip

### 11.1 Introdução

Dentre as toxinas fúngicas, deoxinivalenol (DON) se destaca pela frequente contaminação de produtos agrícolas e alimentos e pela sua resistência a degradação pelos métodos tradicionais de processamento, o que motiva políticas de controlo na sua ocorrência. Tal como as fumonisinas, é predominantemente produzida por estirpes de *Fusarium*.

Os kits de teste AgraStrip® Pro têm disponível tiras para deteção de Deoxinivalenol com limite de deteção para amostras de milho e trigo de 0,1 ppm e limites de quantificação para o mesmo tipo de amostra de 0,2 ppm.

### 11.2 Objetivos

- Pesquisa e quantificação de Deoxinivalenol em produtos alimentares por métodos rápidos.

### 11.3 Material e Reagentes

- Kit de AgraStrip® Pro para Deoxinivalenol
- Balança analítica com capacidade de pesagem até 400 g
- Proveta graduada com capacidade mínima de 100 mL
- Água destilada, desionizada ou engarrafada para extração
- Centrífuga
- Leitor AgraVision Pro;
- Pipetas de canal único capazes de pipetar até 1000 µL ou menos: pipetas de volume fixo (pipeta fixa de 100 µL e pipeta fixa de 1000 µL)

### 11.4 Procedimento

1. Ligar o leitor *AgraVision Pro* e seguir o procedimento de configuração de acordo com as instruções;
2. Pesar 10 g de amostra representativa adequadamente moída e adicionar um pacote de tampão de extração na lateral do saco de filtro, de preferência no mesmo lado da amostra;
3. Adicionar 50 mL de água destilada ao saco de filtro;
4. Fechar o saco e agitar vigorosamente por 2 minutos;
5. Deixar a amostra assentar por 1 minuto;

6. Pipetar 1000  $\mu\text{L}$  de tampão de diluição para um tubo *ependorf* e adicionar 100  $\mu\text{L}$  de extrato de amostra. Retirar o extrato do lado oposto ao lado em que a amostra foi pesada;
7. Centrifugar o extrato de amostra diluído por 30 segundos. Usar o sobrenadante para análise;
8. Inserir a tira de teste *AgraStrip*<sup>®</sup> Pro no cartucho *AgraVision Pro*. Introduzir o cartucho contendo a tira de teste na porta do leitor;
9. Inserir o código da amostra e selecionar a matriz e o intervalo de quantificação;
10. Adicionar 100  $\mu\text{L}$  de amostra ao cartucho *AgraVision Pro*.

**Intervalos de quantificação**

- LOD: 0,1 ppm (milho, trigo)
- LOQ: 0,2 ppm (milho, trigo)
- 1º Intervalo de quantificação: 0 – 4,2 ppm
- 2º Intervalo de quantificação: 3,1 – 44 ppm

## Protocolo 12 - Detecção e quantificação de Zearalenona com sistema AgraStrip

### 12.1 Introdução

A zearalenona (ZEA) é uma lactona macrocíclica, produzida principalmente por fungos pertencentes ao género *Fusarium*. Desenvolve-se em plantas que vivem em climas quentes e húmidos, bem como em produtos agrícolas durante as condições de armazenamento. Devido ao poder estrogénico da ZEA, a sua toxicidade está muitas vezes ligada a efeitos graves no aparelho reprodutor e regulação hormonal em animais. Esses efeitos são consequência da semelhança estrutural da zearalenona com o 17-estradiol. Pode ocorrer em cereais e derivados de cereais contaminados.

Os kits de teste AgraStrip® Pro têm disponível tiras para deteção de ZEA com limite de deteção para amostras de milho de 25 ppb e limites de quantificação para o mesmo tipo de amostra de 40 ppb.

### 12.2 Objetivos

- Pesquisa e quantificação de Zearalenona em produtos alimentares por métodos rápidos.

### 12.3 Material e Reagentes

- Kit de AgraStrip® Pro para Zearalenona
- Balança analítica com capacidade de pesagem até 400 g
- Proveta graduada com capacidade mínima de 100 mL
- Água destilada, desionizada ou engarrafada para extração
- Centrífuga
- Leitor AgraVision Pro;
- Pipetas de canal único capazes de pipetar até 1000 µL ou menos: pipetas de volume fixo (pipeta fixa de 100 µL e pipeta fixa de 1000 µL)

### 12.4 Procedimento

1. Ligar o leitor *AgraVision Pro* e seguir o procedimento de configuração de acordo com as instruções;
2. Pesar 10 g de amostra representativa adequadamente moída e adicionar um pacote de tampão de extração na lateral do saco de filtro, de preferência no mesmo lado da amostra;
3. Adicionar 50 mL de água destilada ao saco de filtro;
4. Fechar o saco e agitar vigorosamente por 2 minutos;
5. Deixar a amostra assentar por 1 minuto;
6. Pipetar 1000 µL de tampão de diluição para um tubo *ependorf* e adicionar 100 µL de extrato de amostra. Retirar o extrato do lado oposto ao lado em que a amostra foi pesada;

7. Centrifugar o extrato de amostra diluído por 30 segundos. Usar o sobrenadante para análise;
8. Inserir a tira de teste *AgraStrip*<sup>®</sup> Pro no cartucho *AgraVision Pro*. Introduzir o cartucho contendo a tira de teste na porta do leitor;
9. Inserir o código da amostra e selecionar a matriz e o intervalo de quantificação;
10. Adicionar 100 µL de amostra ao cartucho *AgraVision Pro*.

**Intervalos de quantificação**

- LOD: 25 ppb (milho)
- LOQ: 40 ppb (milho)
- 1º Intervalo de quantificação: 0 – 1650 ppb

## Protocolo 13 - Detecção e quantificação de Ocratoxina A com sistema AgraStrip

### 13.1 Introdução

A ocratoxina A (OTA) é uma micotoxina produzida naturalmente por fungos dos géneros *Aspergillus* e *Penicillium* e é encontrada como contaminante numa grande variedade de géneros alimentícios, como cereais e produtos à base de cereais, grãos de café, frutos secos, vinho e sumo de uva, especiarias e alcaçuz. Também é frequentemente encontrada em rações. Devido à sua grande toxicidade sobejamente conhecida e estudada, os seus limites em produtos alimentares são regulamentados. O seu controlo em alimentos deve ser efetuado.

Os kits de teste AgraStrip® Pro têm disponível tiras para deteção de OTA em amostras de trigo e de milho.

### 13.2 Objetivos

- Pesquisa e quantificação de Ocratoxina A em produtos alimentares por métodos rápidos.

### 13.3 Material e Reagentes

- Kit de AgraStrip® Pro para Ocratoxina A
- Balança analítica com capacidade de pesagem até 400 g
- Proveta graduada com capacidade mínima de 100 mL
- Água destilada, desionizada ou engarrafada para extração
- Centrífuga
- Leitor AgraVision Pro;
- Pipetas de canal único capazes de pipetar até 1000 µL ou menos: pipetas de volume fixo (pipeta fixa de 100 µL e pipeta fixa de 1000 µL)

### 13.4 Procedimento

1. Ligar o leitor *AgraVision Pro* e seguir o procedimento de configuração de acordo com as instruções;
2. Pesar 10 g de amostra representativa adequadamente moída e adicionar um pacote de tampão de extração na lateral do saco de filtro, de preferência no mesmo lado da amostra;
3. Adicionar 50 mL de água destilada ao saco de filtro;
4. Fechar o saco e agitar vigorosamente por 2 minutos;
5. Deixar a amostra assentar por 1 minuto;

6. Pipetar 1000  $\mu$ L de tampão de diluição para um tubo *ependorf* e adicionar 200  $\mu$ L de extrato de amostra. Retirar o extrato do lado oposto ao lado em que a amostra foi pesada;
7. Centrifugar o extrato de amostra diluído por 30 segundos. Usar o sobrenadante para análise;
8. Inserir a tira de teste *AgraStrip*<sup>®</sup> Pro no cartucho *AgraVision Pro*. Introduzir o cartucho contendo a tira de teste na porta do leitor;
9. Inserir o código da amostra e selecionar a matriz e o intervalo de quantificação;
10. Adicionar 100  $\mu$ L de amostra ao cartucho *AgraVision Pro*.

**Intervalos de quantificação**

- LOD: 2,0 ppb (milho)
- LOQ: 3,0 ppb (milho)
- 1<sup>º</sup> Intervalo de quantificação: 0 – 50 ppb
- 2<sup>º</sup> Intervalo de quantificação: 30 – 100 ppb

**Faixa regular (0-100ppb)**

- LOD: 2,0 ppb (trigo)
- LOQ: 3,0 ppb (trigo)

**Faixa de alta sensibilidade (0-15 ppb)**

- LOD: 2 ppb (trigo)
- LOQ: 3 ppb (trigo)

## Protocolo 14 - Extração e "Clean-up" de Ocratoxina A em amostras alimentares

### 14.1 Introdução

Tal com referido no protocolo para deteção de OTA por método rápido, a Ocratoxina A é uma micotoxina produzida por várias espécies do género *Aspergillus* e *Penicillium* e é encontrada globalmente em vários alimentos e rações. Esta micotoxina pode ter vários efeitos toxicológicos, podendo ser nefrotóxica, hepatotóxica, neurotóxica, teratogénica e imunotóxica.

A utilização de métodos cromatográficos para a deteção de OTA requer técnicas de extração e purificação das amostras como pré-tratamento. Estes passos permitem a separação de componentes presentes nas amostras que podem causar interferências aquando da deteção da micotoxina em estudo, bem como desgaste e degradação dos equipamentos cromatográficos.

### 14.2 Objetivos

- O objetivo deste protocolo é extrair e concentrar a OTA presente amostras alimentares de modo a preparar a amostra para quantificação por HPLC.

### 14.3 Material e Reagentes

- Solução de extração: metanol 70%
- Colunas de imunoafinidade OchraTest WB
- PBS-T (Phosphate buffer saline) 0.1M com Tween 80 a pH 7.0
- Eluente HPLC (fase móvel): acetonitrilo:água:ácido acético (99:99:2 v:v:v)
- Água ultrapura
- Metanol (grau HPLC)
- Acetonitrilo (grau HPLC)
- Ácido acético
- Papel de alumínio
- Papel de filtro Whatman Filter #3 (9 cm de diâmetro)
- Filtro de microfibra de vidro (9 cm de diâmetro)
- Funis
- Falcons de 50 mL
- Erlenmeyers de 100 mL
- Vials de 4 mL
- Provetas
- Micropipetas
- Bomba de vácuo e *manifold*
- Agitador magnético

- Balança

## 14.4 Procedimento

### Considerações de Segurança

Devido à toxicidade da OTA, é necessário seguir atentamente todas os protocolos de segurança durante a manipulação deste composto. As soluções de OTA e solventes (metanol) utilizados na extração devem ser manipuladas na *hotte* química e utilizando equipamento de proteção individual (luvas de nitrilo e bata). Todos os materiais descartáveis contendo OTA devem ser colocados para incinerar; materiais não descartáveis devem ser descontaminados por imersão numa solução de lixívia a 30% durante 24h, imersão em 5% acetona durante 1h hora e lavados de seguida.

1. Adicionar 10 g de amostra triturada a 40 mL da solução de 70% metanol, num erlenmeyer.
2. Cobrir o frasco com papel de alumínio e colocar a agitar, no agitador magnético, durante 20 minutos.
3. Verter o extrato através de um filtro de papel e retirar 10 mL do filtrado para um erlenmeyer limpo.
4. Diluir o filtrado com 40 mL de PBS-T (0.1 M, pH 7.0) e filtrar através de um filtro de fibra de vidro para um recipiente limpo
5. Passar 20 mL do extrato por uma coluna de imunoafinidade OchraTest WB a um fluxo de 1-2 gotas/segundo (por gravidade ou com a ajuda de uma bomba de vácuo) até todo o extrato ter passado pela coluna.
6. Lavar a coluna com 10 mL de PBS-T a um fluxo de 2 gotas/segundo.
7. Lavar novamente a coluna com 10 mL de água ultra-pura, num fluxo a 2 gotas/segundo.
8. Eluir a OTA da coluna passando 1.5 mL de uma solução de metanol:ácido acético (98:2 v/v), através da coluna a um fluxo de 1-2 gotas/segundo. Recolher a OTA purificada para *vials* de 4 mL.
9. Evaporar a solução numa corrente de azoto.
10. Adicionar 1.5 mL de fase móvel. Transferir para um vial de HPLC.

## **Protocolo 15 - Quantificação de Ocratoxina A (OTA) em amostras alimentares por HPLC-FL**

### **15.1 Introdução**

Por serem encontradas em baixas concentrações nos alimentos, as micotoxinas requerem métodos sensíveis e confiáveis para sua detecção. Os métodos de detecção utilizados normalmente baseiam-se nas diferentes características de cada micotoxina como a polaridade, fluorescência, volatilidade e absorção de raios ultravioleta, para reconhecê-las analiticamente. A utilização de cromatografia líquida de elevada eficiência (HPLC) para a detecção e quantificação de micotoxinas é largamente utilizada. Os principais métodos de detecção utilizados são o ultravioleta e a fluorescência, o que possibilita uma alta especificidade e sensibilidade a micotoxinas com fluorescência natural. A sensibilidade dos aparelhos cromatográficos é consideravelmente superior aos métodos de detecção rápida e são os métodos de confirmação de presença/ausência de micotoxina na amostra analisada. A ocratoxina A, uma vez que apresenta fluorescência natural, pode ser detetada por HPLC com detetador de fluorescência.

A quantificação da micotoxina detetada é feita por recurso a uma calibração com padrão externo com concentrações conhecidas de um padrão puro de OTA.

### **15.2 Objetivos**

- Construir uma curva de calibração de OTA
- Determinar a concentração de OTA presente amostras alimentares.

### **15.3 Material e Reagentes**

- Vials de HPLC
- Eluente HPLC (fase móvel): acetonitrilo:água:ácido acético (99:99:2 v:v:v)
- Solução padrão Ocratoxina A (1 mg/mL)
- Acetonitrilo
- HPLC com detetador de fluorescência e coluna C-18 de fase reversa

### **15.4 Procedimento**

1. Preparar uma curva de calibração com padrão de OTA em acetonitrilo com as concentrações 250, 150, 100, 50 e 25 ng/mL.

2. Programar o HPLC para as seguintes condições: temperatura do forno da coluna a 35 °C, fluxo da fase móvel a 1 mL/min; volume de injeção 50 µL, detetor de fluorescências com os comprimentos de onda  $\lambda_{ex}$  333 nm e  $\lambda_{em}$  460 nm.
3. Ligar o equipamento e deixar estabilizar por pelo menos 30 minutos (até a pressão estar estável).
4. Criar uma lista de amostragem, com os padrões de OTA e amostras.
5. Detetar os compostos por comparação com os cromatogramas dos padrões (tempos de retenção).
6. Quantificar os compostos com base na curva de calibração feita com os padrões de OTA.

