



Diana Cláudia Brazete Ferreira

Licenciada em Ciências Forenses e Criminais

**Deteção e quantificação de Melamina
em leite pelo Método ELISA no
Laboratório SGS Portugal**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Tecnologia
e Segurança Alimentar

Orientador: Professora Doutora Ana Lúcia Monteiro Durão
Leitão, Professora Auxiliar, FCT/UNL
Co-orientador: Eng^a. Catarina Fernandes, Responsável
Técnica, SGS Portugal

Júri:

Presidente: Prof. Doutora Benilde Mendes

Arguente: Doutora Marina Célia Nunes da Costa Henriques da Silva

Vogal: Prof. Doutora Ana Lúcia Monteiro Durão Leitão



Diana Cláudia Brazete Ferreira

Licenciada em Ciências Forenses e Criminais



**Deteção e quantificação de Melamina em leite
pelo Método ELISA no Laboratório SGS
Portugal**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Tecnologia Segurança Alimentar

Orientador: Professora Doutora Ana Lúcia Monteiro Durão Leitão,
Professora Auxiliar, FCT/UNL

Co-orientador: Eng^a. Catarina Fernandes, Responsável Técnica, SGS
Portugal

Júri:

Presidente: Prof. Doutora Benilde Simões Mendes

Arguente: Doutora Marina Célia Nunes da Costa Henriques da Silva

Vogal: Prof. Doutora Ana Lúcia Monteiro Durão Leitão



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Setembro 2017

Deteção e quantificação de melamina em leite pelo Método ELISA no Laboratório SGS Portugal
Copyright © 2017 – Diana Cláudia Brazete Ferreira, Faculdade de Ciências e Tecnologias e
Universidade Nova de Lisboa.

A Faculdade de Ciências e Tecnologias e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Agradecimentos

Ao terminar esta dissertação sinto o dever e a necessidade de expressar os meus sinceros agradecimentos a todos aqueles que, direta ou indiretamente contribuíram com o seu apoio e incentivo para que fosse possível alcançar o final desta etapa da minha formação.

Em primeiro lugar gostaria de agradecer à professora Ana Lúcia Leitão a oportunidade e o privilégio de tê-la como orientadora, disponibilizando a oportunidade em realizar este projeto.

Gostaria também de agradecer à SGS e à sua equipa de laboratório pela disponibilidade que tiveram em ensinar e por terem proporcionado os meios para a conclusão deste trabalho. Em destaque quero agradecer ao meu co-orientador inicial Mauro Conde e à atual co-orientadora Catarina Fernandes, pela disponibilidade em que ambos tiveram em partilhar os seus conhecimentos, não só na área em estudo, mas em todas as outras.

À Rita Boleto e à Inês Almeida por me terem aturado e apoiado incondicionalmente. Agradeço por tudo aquilo que me ensinaram e pela amizade.

Ao meu namorado Filipe Velez, que apesar da distância, agradeço todo o apoio. Agradeço principalmente paciência que teve nas alturas em que quis desistir. Obrigada por teres acreditado que eu era capaz de concluir esta dissertação.

Por último, aos meus pais, Carlos Ferreira e Rosário Ferreira, a quem agradeço tudo o que fizeram por mim. Pela força e coragem que sempre transmitiram.

Mais uma vez, a todos, os meus sinceros agradecimentos.

Resumo

A prática de adulteração de alimentos é uma atividade muito antiga, tendo como intuito o aumento da matéria prima e do lucro. As adulterações podem colocar em causa a segurança alimentar dos consumidores, originando produtos de baixa qualidade nutritiva. Entre os anos 2007 e 2008, foram relatados casos de hospitalização por insuficiência renal e até de mortes de animais domésticos, que tinham consumido alimentos adulterados com melamina. A melamina é um produto químico amplamente utilizado em processos industriais. Possui uma massa de azoto idêntica à das proteínas e é facilmente aplicado, ilegalmente, em alimentos para aumentar o conteúdo aparente de proteínas, dando falsas leituras a métodos de determinação de azoto total. De modo a colmatar esta situação, existem métodos de deteção e quantificação de melamina. O ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) é um teste imunoenzimático que deteta anticorpos e antigénios específicos, sendo possível detetar e quantificar as proteínas presentes nos alimentos analisados através da interação entre anticorpo e antigénio. A sua elevada especificidade e sensibilidade permite a deteção e a quantificação seletiva de moléculas. O método ELISA é amplamente utilizado na forma de kit comercial – validado pelo fornecedor, sendo necessário um equipamento específico para leitura da absorvância final. Devido à elevada necessidade de identificar a presença de melamina nos alimentos e garantir a segurança alimentar dos consumidores, o principal objetivo do presente estudo foi implementar a deteção e a quantificação de melamina pelo método ELISA através dos parâmetros: gama de trabalho, curva de calibração, limite de deteção (LD) e limite de quantificação (LQ), repetibilidade, reprodutibilidade e exatidão. Assim, o método foi implementado para leite no laboratório da SGS Portugal, demonstrando que o método ELISA é adequado para o objetivo proposto.

Palavras-chave: adulteração, deteção, quantificação, ELISA, melamina.

Abstract

The food adulteration is an old activity, with the objective of increasing the raw material and the profit. These adulterations can constitute a food safety concerns, since originate products with low nutritive quality. In 2007 and 2008 multiple cases of hospitalization by renal failure and even deaths were reported, in people and animals who had consumed food adulterated by melamine. Melamine is a chemical product widely used in industrial processes. It presents an identical nitrogen mass to the protein ones, and it is easily applied illegally in some products to increase the apparent protein content, originating false readings in nitrogen determination methods. To solve this situation, there are methods to detect and quantify melamine. The enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) is an enzyme immunoassay that detects specific antibodies and antigens, making it possible to detect and quantify the proteins present in the products through the interaction between antibodies and antigens. The method has high specificity and sensitivity and allows the detection and selective quantification of molecules. The ELISA method is widely used as a commercial kit validated by suppliers, being required a specific equipment to read the final absorbance. Due to its relevance of food melamine identification in order to guarantee consumer food safety, the main objective of the present study was to implement the detection and quantification of melamine by the ELISA method through the parameters: work range, calibration curve, detection limit (DL) and quantification limit (QL), repeatability, reproducibility and accuracy. The method was implemented for milk in SGS Portugal's laboratory, demonstrating that the ELISA method is adequate for the required purpose.

Key words: adulteration, detection, quantification, ELISA, melamine.

Índice de matéria

Introdução	1
1. Societé Générable de Surveillance	3
1.1. A Empresa	3
1.2. A História	3
1.3. Competências	4
1.4. SGS em Portugal	4
1.4.1. Laboratórios em Portugal	5
2. Melamina	7
2.1. A composição da Melamina	7
2.2. Utilização de melamina	8
2.3. Contaminação e adulteração de géneros alimentícios e alimento para animais por melamina.	
Toxicidade	9
3. Métodos de deteção de Melamina em alimentos	13
3.1. Métodos de determinação de Azoto Total	13
3.2. Métodos de Rastreio	14
3.3. Métodos de Confirmação	15
4. Ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA)	17
4.1. História	17
4.2. Imunoensaios Enzimáticos (EIA)	18
4.3. Fundamentos	19
4.4. Tipos de ELISA	21
4.4.1. ELISA Direto	21
4.4.2. ELISA Indireto	21
4.4.3. ELISA Sandwich	22
4.4.4. ELISA Competitivo	23
5. Validação do Método	25
5.1. Materiais e Métodos	25
5.1.1. Kit ELISA	25
5.1.2. Equipamentos	27
5.1.3. Materiais	27
5.2. Preparação de amostras	27
5.3. Extração de melamina	28
5.3.1. Extração em leite	28
5.4. Ensaio ELISA	28
5.4.1. Procedimento	29
5.5. Gama de trabalho	30
5.6. Curva de calibração	30

5.7. Limite de deteção (LD) e Limite de quantificação (LQ)	30
5.8. Precisão	31
5.8.1. Repetibilidade	31
5.8.2. Reprodutibilidade	32
5.9. Exatidão	32
6. Resultados e Discussão	33
6.1. Gama de trabalho	33
6.2. Limite de deteção (LD) e limite de quantificação (LQ)	37
6.3. Repetibilidade	37
6.4. Reprodutibilidade	38
6.5. Exatidão	39
7. Conclusões	43
Referências Bibliograficas	45
Anexo I – Certificado de Controlo de Qualidade	51

Índice de figuras

Figura 1.1: Atual sede da SGS no Lumiar, Lisboa, onde reúne todos os serviços da Grande Lisboa como escritórios e SGS Portugal.....	5
Figura 2.1: Fórmula molecular $C_3H_6N_6$ (Sharma & Paradakar, 2010).....	7
Figura 2.2: Estrutura química da melamina (A) e dos seus metabolitos obtidos por hidrolises 2,4-diamina-6-hidroxi-1,3,5-triazina (B), 6-amina-1,3,5-triazina-2,4-diol (C) e ácido cianúrico (D) (Tyan <i>et al</i> , 2009).....	8
Figura 4.1: Microplaca ELISA com 8 x 12 poços.....	19
Figura 4.2: Leitor ELISA da R-Biopharm® Modelo – 335.....	21
Figura 4.3: ELISA Indireto. (A) O antígeno absorvido no poço; (B) O anticorpo específico liga-se ao antígeno; (C) os anticorpos ligados à enzima ligam-se aos anticorpos secundários; (D) O substrato é adicionado e convertido pela enzima a uma determinada cor (Adaptado de Câmara, 2013).....	22
Figura 4.4: ELISA Sandwich. (A) Anticorpo absorvido no poço; (B) Antígeno introduzido para ser medido; (C) Adição do conjugado enzimático ao anticorpo secundário; (D) O substrato é adicionado e convertido pela enzima a uma determinada cor (Adaptado de Pokhrel, 2015).....	23
Figura 4.5: ELISA Competitivo. (A) Incubação do anticorpo com o antígeno a ser medido; (B) A mistura antígeno-anticorpo é adicionada ao poço para ser revestida pelo antígeno absorvido; (C) Adição do conjugado enzimático ao anticorpo secundário; (D) O substrato é adicionado e convertido pela enzima a uma determinada cor (Adaptado de Pokhrel, 2015).....	23
Figura 5.1: MaxSignal® Melamine ELISA Test kit.....	26
Figura 5.2: Soluções tampão de extração. (A) Solução tampão de extração concentrado 10x; (B) Solução tampão de extração diluído (diluição de 1:10).....	27
Figura 5.3: Microplaca ELISA com os poços preenchidos com os padrões e as amostras.....	29
Figura 5.4: A coloração azul ocorre durante a reação enzimática. Quanto menor a intensidade da cor maior é a concentração de melamina.....	29

Figura 6.1: Curva de calibração obtida na leitura das 6 soluções padrão no primeiro dia. Com recta logarítmica, $y = -16,81 \ln(x) + 119,95$ é feita a determinação da concentração obtida de cada solução padrão.....34

Figura 6.2: Curva de calibração obtida na leitura das 6 soluções padrão no segundo dia. Com recta de calibração logarítmica, $y = -17,35 \ln(x) + 123,5$ é feita a determinação da concentração obtida de cada solução padrão.....35

Figura 6.3: Curva de calibração obtida na leitura das 6 soluções padrão no terceiro dia. Com recta de calibração logarítmica, $y = -16,93 \ln(x) + 119,26$ é feita a determinação da concentração obtida de cada solução padrão.....36

Índice de tabelas

Tabela 6.1: Análise dos resultados obtidos para as 6 soluções padrões no primeiro dia, sendo Padrão 1 (0 ng/mL) o padrão negativo; a percentagem da absorvância relativa para a construção da curva padrão; concentração obtida determinada a partir da recta logarítmica obtida; percentagem do desvio entre a concentração obtida e a concentração padronizada. As absorvâncias lidas em duplicado.....	33
Tabela 6.2: Análise dos resultados obtidos para as 6 soluções padrões no segundo dia; a percentagem da absorvância relativa para a construção da curva padrão; concentração obtida determinada a partir da recta logarítmica obtida; percentagem do desvio entre a concentração obtida e a concentração padronizada. As absorvâncias lidas em duplicado.....	34
Tabela 6.3: Análise dos resultados obtidos para as 6 soluções padrões no terceiro dia; a percentagem da absorvância relativa para a construção da curva padrão; concentração obtida determinada a partir da recta logarítmica obtida; percentagem do desvio entre a concentração obtida e a concentração padronizada. As absorvâncias lidas em duplicado.....	35
Tabela 6.4: Valores de LD e LQ obtidos através do calculo $LD = 3,3 \times SD$ e $LOQ = 10 \times SD$	37
Tabela 6.5: Análise da repetibilidade após a leitura de 10 amostras fortificadas com 150,0 ng/mL e os respetivo coeficiente de variação para o leite.....	38
Tabela 6.6: Análise da reprodutibilidade após a leitura de 10 amostras fortificadas com 150,0 ng/mL em dias diferentes para leite.....	39
Tabela 6.7: Valores teóricos da concentração, da absorvância e da taxa de absorvância relativa dos 6 padrões. Estes valores podem ser confirmados no Anexo I – Certificado de Controlo de Qualidade. Percentagens de recuperações obtidas das absorvâncias relativas reais versus as absorvâncias relativas teóricas, referentes às três leituras dos padrões.....	40
Tabela 6.8: Percentagem de recuperação da amostra fortificada com 50,0 ng/mL, tendo como referencia uma amostra de leite.....	41
Tabela 6.9: Percentagem de recuperação das amostras fortificadas com 150,0 ng/mL, tendo como referencia uma amostra de leite.....	41
Tabela 6.10: Análise da estabilidade para a fortificação de 150,0 ng/mL.....	42

Lista de abreviaturas, siglas e símbolos

C₃H₆N₆	Melamina
CO₂	Dióxido de carbono
cv	Coefficiente de variação
EIA	Enzimoimunoensaios (<i>Enzyme Immunoassay</i>)
ELISA	Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>)
EMIT	Imunoensaio multiplicado por enzima (<i>Immunoassay Multiplied by Enzyme</i>)
FD	Fator de diluição
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GC	Cromatografia Gasosa (<i>Gas chromatography</i>)
H₂O	Água
HCl	Ácido clorídrico
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (<i>High-performance liquid chromatography</i>)
H₂SO₄	Ácido sulfúrico
LC	Cromatografia Líquida (<i>Liquid chromatography</i>)
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
MS	Espectrometria de Massa (<i>Mass spectrometry</i>)
NaOH	Hidróxido de sódio
O₂	Oxigênio
OMS	Organização Mundial de Saúde
RIA	Radioimunoensaio (<i>Radioimmunoassay</i>)
rpm	Rotações por minuto
SGS	<i>Société Générale de Surveillance</i>
UV	Ultra-violeta

Introdução

A prática de adulteração de alimentos é uma atividade tão antiga como comprar e vender produtos alimentares, tendo como intuito o aumento da matéria prima e do lucro (Sharma & Paradakar, 2010; Souza *et al.*, 2011). As adulterações podem colocar em causa a segurança alimentar dos consumidores, originando produtos de baixa qualidade nutritiva, sendo os produtos alimentares processados os mais sujeitos a adulteração (Barui *et al.*, 2012; Sharma & Paradakar, 2010; Souza *et al.*, 2011).

Devido à crise de adulteração observada em produtos de fórmula infantil e em alimentos para animais domésticos que levou à hospitalização de bebés na China e à morte de animais, a melamina ganhou notoriedade (An *et al.*, 2017; Ling *et al.*, 2016). Em ambos os casos, bebés e animais, apresentavam o mesmo sintoma, insuficiência renal (Dobson *et al.*, 2008).

Estes acontecimentos tornaram-se uma preocupação alimentar global (Ling *et al.*, 2016), levando a Organização Mundial da Saúde (OMS) e a *Food and Drug Administration* (FDA) (WHO, 2009) a estabelecerem limites máximos de ingestão diária para a melamina em produtos alimentares.

A melamina é um composto sintético, pouco solúvel, que tem sido amplamente utilizada como adulterante de proteína, uma vez que contém um elevado teor em azoto (66%) (Abernethy & Higgs, 2013), originando falsas leituras nos métodos tradicionais de determinação do teor de proteína (Sharma & Paradakar, 2010). A determinação do teor de proteína, normalmente, é feita pelos métodos Kjeldahl e Dumas, baseados na quantificação de azoto total (Ohlsson *et al.*, 2012), mas estes apenas determinam a quantidade de azoto e não distinguem o azoto proteico do não proteico (Yhee *et al.*, 2009).

Assim, para a deteção e quantificação de melamina, foram desenvolvidos métodos com elevada sensibilidade e seletividade que podem ser considerados métodos de rastreio e métodos de confirmação (Garber, 2008; Hau, 2009; Lutter *et al.*, 2011). Os ensaios de imunoabsorção enzimática (ELISA) e a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) são considerados métodos de rastreio. São muito utilizados na indústria alimentar para a identificação e quantificação de alergénios, contaminantes e adulterantes. A cromatografia gasosa (GC) e a cromatografia líquida (LC) acopladas à espetrometria de massa (MS) são considerados métodos confirmatórios (Garber, 2008; Hau, 2009; Lutter *et al.*, 2011; Wu & Zhang, 2013).

Para lidar com o problema melamina, foram desenvolvidos os kits de ensaio imunoenzimáticos comerciais para tornar possível a determinação quantitativa rápida, oferecendo uma solução que satisfazia os requisitos de rastreio de um grande número de amostras (Wu & Zhang, 2013; Garber, 2008; Hau, 2009). Este método é atualmente o mais utilizado nas indústrias alimentares e agências oficiais de controlo de alimentos para a monitorização da contaminação acidental de produtos alimentares (Montserrat *et al.*, 2015).

Neste tipo de método, ELISA, a melamina se estiver presente na amostra, competirá pelo anticorpo, impedindo deste modo que o anticorpo se ligue à substância ligada ao poço na microplaca. O conjugado de enzima ligar-se-á ao anticorpo primário que é envolto com o revestimento de melamina nos poços da microplaca. Após a adição do substrato, obtém-se uma cor azul cuja intensidade será inversamente proporcional à concentração do analito, ou seja, exibe assim uma diminuição na resposta (absorvância) devido à presença de analito na amostra (MaxSignal®, 2013).

Devido à elevada necessidade de identificar a presença de melamina e de distinguir as diferentes formas de azoto presente nas amostras, o principal objetivo do presente estudo foi implementar a deteção e quantificação de melamina no leite pelo método ELISA na SGS Portugal, de modo a ser possível controlar possíveis contaminações ou adulterações na indústria alimentar, garantindo, assim, a segurança alimentar do consumidor.

1. Société Générale de Surveillance

1.1. A Empresa

A Société Générale de Surveillance (SGS) é uma empresa mundialmente conhecida pelos seus serviços prestados nas áreas de inspeção, análise, verificação e certificação (Gomes, 2012; SGS Portugal, 2016). Em janeiro de 2017 foi estimado que a SGS possui aproximadamente 92 mil colaboradores e 2.000 escritórios e laboratórios em todo o mundo (Buman, 2017).

A empresa tem como visão ser a organização de serviços mais competitiva e mais produtiva do mundo, tendo como missão a prestação de serviços de qualidade assegurada e como valores a paixão, integridade, espírito empreendedor e inovação. São estes os valores que guiam a SGS no melhoramento das suas competências, tornando-a uma referência nos seus segmentos (Gomes, 2012; SGS Portugal, 2016; SGS, 2015).

1.2. A História

A fundação SGS nasceu a 12 de dezembro de 1878 em França, após o jovem imigrante lituano, Henri Goldstück, constatar que os exportadores de grãos a granel que chegavam em navios ao porto de Rouen, França, necessitavam de um representante para a verificação da qualidade e quantidade dos grãos na sua chegada, em que a elevada humidade, os roubos ou acidentes que ocorriam durante o trânsito de mercadoria, influenciavam significativamente a qualidade e a quantidade do produto. Assim, em parceria com Joahann A. Hainze, criaram a empresa Goldstück e Hainze & C^a, dando início ao negócio de inspeção a navios carregados de grão que chegavam a Rouen. Em troca do seu serviço, receberiam uma comissão do exportador com base no valor do envio (Gomes, 2012).

Em 1913, a empresa já era responsável pela inspeção de 21 milhões de toneladas de grãos por ano, tornando-se líder neste sector, graças ao seu espírito inovador e empreendedor. Em 1915 a empresa já possuía cerca de 45 escritórios espalhados pela Europa com a Sede em Paris, mas devido à Primeira Guerra Mundial, a Goldstück e Hainze & C^a é forçada a mudar a sua Sede para Genebra (Suíça) uma vez que este era considerado um país neutral, podendo assim continuar a realizar as suas operações. A 19 de julho de 1919, a empresa passa a estar registada com o nome de SGS, *Société Générale de Surveillance* (Gomes, 2012; SGS Portugal, 2017).

1.3. Competências

A SGS tem como competências a realização de inspeções, testes e verificações, em que nos serviços de inspeção podemos encontrar a verificação da quantidade e qualidade dos bens comercializados. Os testes realizados permitem diminuir os riscos e garantir a qualidade e a segurança dos produtos, processos, serviços e sistemas, de modo a assegurar o cumprimento da lei em vigor. A verificação tem como finalidade garantir a conformidade dos produtos e serviços prestados pela empresa (SGS Portugal, 2016).

Em cada uma das áreas de competência da SGS encontram-se análises e ensaios, formações, certificação e auditorias. A SGS realiza a supervisão de cargas e descargas nos portos, entrepostos aduaneiros, segurança alimentar, controlo de qualidade de produtos de consumo, avaliação de aspetos ambientais, avaliação de riscos de saúde e segurança. Ainda exerce inspeções industriais, peritagens e averiguações do sector automobilístico (SGS Portugal, 2016; SGS, 2015).

No sector agroalimentar, a SGS atua na área da agricultura e pescas com análises da produção, de produtos, monitorização e certificação. Na indústria alimentar, efetua análises físico-químicas, nutricionais, sensoriais, de biologia molecular e microbiológicas, auditorias de segurança alimentar, certificação de produtos, da cadeia produtiva e de sistemas. No sector automóvel executa a supervisão de cargas e descargas. Relativamente ao retalho e restauração, a SGS realiza a análises de qualidade, auditorias, apoio técnico e certificação (SGS, 2015).

1.4. SGS em Portugal

A atividade da SGS em Portugal teve início em 1922, onde começou a ser representada pela empresa Garland Leidley, sendo responsável pela supervisão de cargas e descargas de todos os navios. Em 1939, com a aquisição de laboratórios na Europa, os negócios em Portugal expandiram nas áreas de inspeção e análise de matérias primas, minerais e metais (Gomes, 2012; SGS, 2015)

Entre o final da década de 60 e inícios da década de 70, a SGS em Portugal inicia a sua supervisão de produtos petroquímicos, deixando de ser apenas uma representação de Genebra e obtendo assim a sua própria identidade. Para além da supervisão nos produtos petroquímicos, a SGS Portugal passou a realizar inspeções em fábricas de indústrias de calçado, em consequência do acordo celebrado com uma empresa de importação soviética (Gomes, 2012; SGS Portugal, 2016).

Com o aumento de volume de trabalho, a SGS viu-se obrigada a expandir a sua atividade em Portugal e, como tal, em 1980 abriu uma filial no Porto, uma vez que tinha um acordo firmado para inspeções pré-embarque de importações angolanas, que eram expedidas na sua maioria do porto de Leixões (Gomes 2012).

Atualmente a SGS em Portugal, possui vários escritórios presentes no continente e ilhas, laboratórios e entrepostos aduaneiros (Figura 1.1) atuando em inspeções, verificações metrológicas

qualificadas, análises e auditorias técnicas em várias áreas (SGS Portugal, 2016; SGS, 2015; SGS Portugal, 2017)



Figura 1.1: Atual sede da SGS no Lumiar, Lisboa, onde reúne todos os serviços da Grande Lisboa como escritórios e SGS Portugal

1.4.1. Laboratórios em Portugal

De modo a ajudar os exportadores portugueses, a SGS abriu dois laboratórios, o laboratório têxtil no Porto em 1983, e o laboratório agroalimentar em Lisboa em 1988, a SGS MultiLab.

Devido a alterações na legislação portuária da concorrência no sector e a um elevado número de isenções de inspeções pré-embarques das cargas com destino a Angola, a SGS viu-se, no início dos anos 90, forçada a explorar novas estratégias para aumentar a eficiência das operações internas e diversificar o seu portfólio de serviços. Neste sentido, começaram a ser oferecidos serviços laboratoriais, como auditoria e recolha de amostras para verificação de questões de higiene e qualidade, a clientes de grandes cadeias de *Fast Food*, pastelarias, empresas de distribuição e indústrias transformadoras (Gomes, 2012).

Atualmente, a SGS possui laboratório acreditado na área agroalimentar, de detergentes, cosméticos, produtos de higiene, dispositivos médicos, ensaios não destrutivos, segurança ocupacional e ambiental (Gomes, 2012; SGS Portugal, 2016).

2. Melamina

A melamina é um produto químico amplamente utilizado em processos industriais, como a produção de plásticos, revestimentos, filtros comerciais, tintas, retardadores de chamas, entre outros (Lu *et al.*, 2017; Lutter *et al.*, 2011; An *et al.*, 2017). Por este motivo, pode ser encontrada em superfícies de contato com alimentos ou bebidas, através de loiças e outros utensílios de cozinha produzidos com este tipo de plástico. Com o passar do tempo, ocorre a migração de pequenas quantidades de melamina da superfície do material para o alimento, acabando por contaminá-lo (Lu *et al.*, 2017).

2.1. A composição da Melamina

A melamina é um composto orgânico alcalino, considerado um trímico da cianamida, com 66% da sua massa composta por azoto (Sharma & Paradakar, 2010) e é conhecida quimicamente como 2,4,6 – triamina – 1,3,5 – triazina (Ling *et al.*, 2016; Lutter *et al.*, 2011; Tittlemier, 2010), com a fórmula molecular $C_3H_6N_6$ (Figura 2.1) (Tyan *et al.*, 2009).

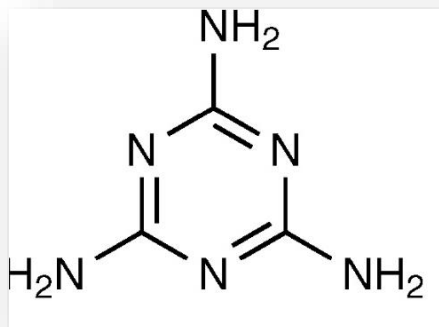


Figura 2.1: Fórmula molecular $C_3H_6N_6$ (Sharma & Paradakar, 2010)

A melamina foi sintetizada pela primeira vez em 1834 por Liebig por aquecimento de tiocianato de potássio com cloreto de amônio. Posteriormente, foi-se obtendo de várias maneiras, aquecendo carbonato de guanidina, tiourea, cianamida ou dicianodiamida (Tyan *et al.*, 2009). Comercialmente, a melamina é fabricada em grande escala a partir do aquecimento de ureia na presença de amoníaco (Sharma & Paradakar, 2010; Tyan *et al.*, 2009)

A melamina pode ser hidrolisada para amilina, amilida e ácido cianúrico (Figura 2.2). Estes derivados são também os subprodutos formados durante a síntese da melamina após a sua ingestão (Tyan *et al.*, 2009).

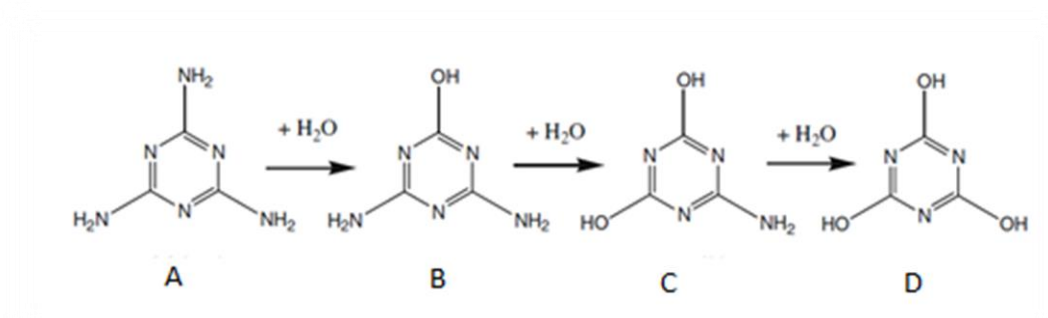


Figura 2.2: Estrutura química da melamina (A) e dos seus metabolitos obtidos por hidrolises 2,4-diamina-6-hidroxi-1,3,5-triazina (B), 6-amina-1,3,5-triazina-2,4-diol (C) e ácido cianúrico (D) (Tyan *et al.*, 2009).

A melamina pode ainda ser produzida como metabolito após a ingestão de ciromazina, ou seja, pode ser produto do metabolismo da ciromazina, um composto usado como pesticida aplicado na agricultura (Sharma & Paradakar, 2010; Tittlemier, 2010).

2.2. Utilização de melamina

A melamina é utilizada na síntese de resíduos de melamina e formaldeído para a produção industrial de laminados de plástico, revestimentos, resinas, filtros comerciais, adesivos e compostos moldados, tais como loiça e utensílios de cozinha (Sharma & Paradakar, 2010; Tittlemier, 2010; Gossner *et al.*, 2009), intermediário químico para a indústria farmacêutica (Sharma & Paradakar, 2010; An *et al.*, 2017), entre outros.

As resinas de melamina têm propriedades que retardam a propagação de fogo devido à libertação de gás de azoto quando queimado ou carbonizado (Sharma & Paradakar, 2010), sendo utilizada numa ampla gama de materiais à prova de chama, protegendo os usuários de perigos de calor e à propagação de incêndio, como o caso de aeronaves e outros meios de transporte, atuando como bloqueador de incêndio. Para além desta propriedade, um dos produtos derivados da melamina são conhecidos como plásticos termoendurecidos, uma vez que o plástico é fixado após a moldagem, mas se exposto a calor suficiente, as resinas acabam por ceder. Desta forma, a loiça e os utensílios de cozinha constituídos por melamina, não devem ser expostos a temperaturas elevadas (iguais ou superiores a 120 °C), suportando no entanto, um limite superior ao dos outros tipos de plástico (Tyan *et al.*, 2009). Foram testados em condições de simulação, materiais compostos pela policondensação de melamina e formaldeído (por exemplo, tigelas, copos, pratos, talheres, entre outros). Verificou-se que a melamina e o formaldeído migraram dos utensílios para os alimentos após o uso repetido de microondas e exposição ao calor usando um simulador de alimentos ácidos. O reaproveitamento do material de cozinha faz com que sejam uma fonte de contaminação, devido ao aumento da probabilidade de

lixiviação química e ingestão durante a preparação e o consumo de alimentos (Lund & Petersen, 2006; Mannoni *et al.*, 2016). No entanto, as quantidades provenientes destas fontes de contaminação, devem apenas representar uma fração não significativa, contudo a evitar, dos níveis de base aos quais os seres humanos estão expostos diariamente (Ling *et al.*, 2016; Sharma & Paradakar, 2010).

É de salientar, que, devido ao uso, à produção e eliminação a nível industrial a presença de melamina pode surgir nos efluentes, sendo necessário o tratamento para remoção da mesma (Sharma & Paradakar, 2010).

2.3. Contaminação e adulteração de géneros alimentícios e alimento para animais por melamina. Toxicidade

A melamina não é um produto natural e não é autorizada a sua adição nos alimentos. Contudo, ela é utilizada como parte de materiais de cozinha e embalagens que entram em contato com os alimentos (Tyan *et al.*, 2009). Deste modo, a presença de melamina nos alimentos pode ocorrer por fontes de contaminação ou por adulteração (Lutter *et al.*, 2011).

A título de exemplo, estima-se que parte da cadeia alimentar na China Continental foi, ao longo do tempo, contaminada por ciromazina, consequência da elevada utilização desse pesticida. A ciromazina inibe a síntese de quitina e é normalmente adicionada aos alimentos para animais, de modo a controlar as moscas no estrume. Além disso, é utilizada como inseticida em feijão, aipo, cebola, tomate, entre outros, e nas plantas, (EPA, 2013; Yokley *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2011). A ciromazina pode ser absorvida pelas plantas e ao serem consumidas pelos animais, acabou por estar presente na cadeia alimentar (Sharma & Paradakar, 2010; Lutter *et al.*, 2011). Estudos demonstraram que a melamina acumula-se no leite de vacas e cabras após estas ingerirem alimentos expostos a melamina. O composto foi detetado em vários produtos alimentares, incluindo vários produtos lácteos, alimentos congelados processados, ovos e produtos de ovos secos, camarão e peixe. Esta evidência indica que a melamina pode acumular-se numa variedade de animais e culturas vegetais normalmente consumidos, através de alimentos contaminados por melamina e ciromazina nas rações tratadas (Bolden *et al.*, 2017).

A adulteração de alimentos é reconhecida por ser um fenómeno mundial com consequências biológicas adversas. Quase todos os tipos de géneros alimentícios estão sujeitos a adulteração ou a contaminação e os problemas de autenticidade alimentar não são exclusivos dos alimentos para consumo humano. Os alimentos para animais de estimação também foram contaminados com substâncias indesejadas (Rai *et al.*, 2014).

Entre os anos de 2007 e 2008, foram descritos vários casos de hospitalização por insuficiência renal e mortes de animais domésticos e bebés, por consumo de alimentos adulterados com melamina (Sharma & Paradakar, 2010; Lutter *et al.*, 2011; Tittlemier, 2010; Gossner *et al.*, 2009).

Nos Estados Unidos da América, os donos de centenas de animais que morreram e que foram hospitalizados, relataram que estes apresentavam sintomas associados com a insuficiência renal após o consumo de um concentrado de proteína vegetal de origem chinesa (Tittlemier, 2010; Tyan *et al.*, 2009). Este alimento continha a melamina e o ácido cianúrico (Tittlemier, 2010). A insuficiência renal foi provocada pela digestão da melamina que leva à formação de amónia e que por sua vez forma e acumula cristais insolúveis nos rins (Tyan *et al.*, 2009).

A origem da insuficiência renal foi atribuída à adulteração dos alimentos para animais com melamina (Sharma & Paradakar, 2010), a que, foi intencionalmente adicionada durante a produção dos alimentos para aumentar o seu conteúdo aparente em proteína. De acordo com uma pesquisa dos Estados Unidos da América, a adulteração resultou em efeitos na saúde e morte em animais domésticos em 35 estados, em Porto Rico e em quatro províncias canadenses (Rumbeiha *et al.*, 2010). Esta prática foi associada a fins lucrativos, uma vez que a melamina é um produto químico barato e que se encontra facilmente disponível no mercado (Lutter *et al.*, 2011; Tittlemier, 2010; Gossner *et al.*, 2009).

Outro grande incidente ocorreu na China no ano de 2008, foi relatado, a hospitalização de bebés. Este teve uma ampla cobertura mediática e despertou a consciência do público para os perigos da contaminação com melamina. De acordo com Pei e seus colaboradores (2011), as causas deste incidente estão intimamente ligadas com o crescimento pouco regulado da indústria laticínia na China, que levou a que um dos maiores produtores de productos lacticínios Chinês, a Sanlu Company, começasse a adulterar as suas fórmulas de leite em pó para criança e por conseguinte causar uma epidemia de casos de insuficiencia renal neste segmento da população (Wu *et al.*, 2009).

A propósito desta contaminação, Zhang e colaboradores fizeram um estudo num hospital com crianças que tinham consumido a fórmula adulterada, e detectaram que cerca de 3,6% dessas crianças desenvolveram pedras renais (Zhang, *et al.*, 2009). Outro dado importante e que demonstra a importância da detecção da melamina foi providenciado por Liu e colaboradores, que noutro estudo numa região da China em que grande parte da população infantil foi exposta ao leite contaminado, mostraram que sem tratamento médico, 12% das crianças ainda mostravam sintomas passados seis meses (Liu, *et al.*, 2010). Por exemplo, a melamina foi encontrada numa fórmula infantil chinesa em concentrações até 2563 mg/kg, o que ultrapassa a dose máxima diária tolerável de 0,2 mg/kg estipulada pela Organização Mundial de Saúde (Wang *et al.*, 2014).

Um dos casos mediáticos da retirada de produtos por grande empresas, foram os chocolates da Cadbury. Estes contém leite na sua composição e com suspeitas de contaminação com melamina na fábrica instalada na China, a empresa britânica Cadbury, decidiu retirar os onze produtos de chocolate feitos em Pequim (Público, 2008).

Estes acontecimentos resultaram num grande número de estudos sobre o impacto da exposição à melamina na função renal. Contudo, de acordo com Bolden e colaboradores, a melamina pode ter outros efeitos negativos na saúde humana para além da disfunção renal. Estes realizaram uma análise

abragente da literatura existente sobre o impacto a nível neurológico, na função reprodutora e atropométrica após exposição à melamina. Os resultados obtidos não forneceram uma base sólida sobre quais os efeitos nestas três áreas. No entanto, este estudo pioneiro serve como base para que no futuro sejam feitas pesquisas mais aprofundadas sobre o impacto na saúde associados à exposição de melamina (Bolden *et al.*, 2017).

O teor de proteína muitas vezes é medido indiretamente pelo método Kjeldahl, o qual quantifica a presença de azoto, contudo não distingue o azoto das moléculas não proteicas como é o caso da melamina, levando a resultados erróneos e facilitando desta forma a adulteração dos produtos alimentares (Tittlemier, 2010; Tyan *et al.*, 2009). Como exemplo, temos a adição de melamina no glúten de trigo, proteína de arroz e nos produtos lácteos (Andersen *et al.*, 2008; Chan *et al.*, 2011).

Antes dos incidentes ocorrerem, a melamina era considerada não tóxica ou minimamente tóxica (Tyan *et al.*, 2009). Posteriormente, houve um aumento da necessidade de aplicar um controlo apropriado na cadeia de suplementos de leite e derivados, e nos alimentos para animais, estabelecendo regulamentos com limites de concentração (Lutter *et al.*, 2011).

A OMS e a *Food and Drug Administration* (FDA) estabeleceram limites máximos de 2,5 e 1,0 mg/kg de melamina para ingestão diária por adultos e crianças, respetivamente, para leites e produtos derivados de leite (WHO, 2009; Chansuvarna *et al.*, 2013). Consequentemente, a Comunidade Europeia aplicou o Regulamento (CE) nº 1881/2006 da Comissão de 19 de dezembro de 2006 que fixa os teores máximos de certos contaminantes presentes nos géneros alimentícios. Para a melamina e análogos estruturais fixaram-se os teores máximos de 2,5 mg/kg para os géneros alimentícios, e de 1 mg/kg para as fórmulas para lactentes e de transição em pó.

Contudo, o teor máximo não se aplica aos alimentos em que se prove que o teor de melamina é superior aos 2,5 mg/kg devido à utilização autorizada do pesticida ciromazina. Nestes casos, o teor de melamina não deverá exceder os teores de ciromazina que deverão ser consultados no Regulamento (UE) 2016 / 1 da Comissão de 3 de dezembro de 2015 para diversas matrizes.

Com o crescimento generalizado da adulteração de alimentos, a segurança alimentar surgiu como um conceito importante e de maneira a assegurá-la, foram desenvolvidos métodos sofisticados para deteção de adulterantes alimentares (Rai *et al.*, 2014).

3. Métodos de detecção de Melamina em alimentos

Devido ao elevado nível de azoto que a melamina apresenta na sua massa, esta é utilizada ilegalmente para aumentar o conteúdo aparente de proteína nos alimentos, dando falsas leituras a métodos de determinação de azoto total (Sharma & Paradakar, 2010; Abernethy *et al.*, 2008), como é o caso do método por via húmida, Kjeldahl (Domini *et al.*, 2009; Sharifi *et al.*, 2009), e por via seca, Dumas (Sharifi *et al.*, 2009; Saint-Denis & Groupy, 2004). Ambos não conseguem ser seletivos para azoto proteico e com a crise da melamina houve uma forte necessidade dos laboratórios adquirirem métodos alternativos para a monitorização desta substância (Wu & Zhang, 2013). O tipo de matriz pode influenciar a escolha da análise, isto porque os alimentos apresentam vários interferentes tais como elevadas concentrações de proteínas, hidratos de carbono ou aglomerados de gordura que requerem diferentes etapas adicionais de separação, pré-concentração ou derivatização para posteriormente prosseguir com o método selecionado (Sun *et al.*, 2010). Dependendo da produção dos alimentos, a técnica ou o equipamento instrumental a utilizar para a análise de melamina pode ser muito diferente e, deste modo, limitar a implementação dos métodos para a quantificação desta substância (Lutter *et al.*, 2011). De forma a colmatar esta situação, existem métodos de detecção de melamina que, de acordo com as suas características básicas de desempenho e seletividade, podem ser discriminados como métodos de rastreio ou métodos de confirmação (Lutter *et al.*, 2011; Wu & Zhang, 2013; Garber, 2008).

Nos métodos de rastreio encontram-se os ensaios de imunoabsorção enzimática (ELISA) e a cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à detecção ultravioleta (HPLC-UV), enquanto os métodos confirmatórios são baseados em técnicas de cromatografia líquida (LC) e cromatografia gasosa (GC) acopladas à espectrometria de massa (MS), devido à sua elevada seletividade e sensibilidade (Sharma & Paradakar, 2010; Cheng *et al.*, 2009)

3.1. Métodos de determinação de Azoto Total

O método de Kjeldahl consiste na determinação de azoto total e, indiretamente, o teor de proteínas, com base na digestão completa das amostras com ácido sulfúrico concentrado a altas temperaturas, na presença de catalisadores como o cobre, o mercúrio, o selénio e o titânio. O azoto orgânico é convertido no ião amónio que é separado por destilação de amónia, após a alcalinização do meio. Posteriormente, a quantificação da amónia é realizada, indiretamente, através de uma titulação com o ácido padronizado para a mesma (Domini *et al.*, 2009; Sharifi *et al.*, 2009).

O método de Dumas é totalmente automatizado e é utilizado para medir especificamente o teor de azoto num tempo inferior ao do método Kjeldahl. Consiste na oxidação das substâncias orgânicas num forno com temperatura elevada (1050 °C). Os gases de combustão (O₂, CO₂ e H₂O) são eliminados e o óxido de azoto é convertido a azoto, utilizando um catalisador de cobre. A mistura é

transportada para uma célula de condutividade térmica, gerando uma resposta proporcional à quantidade de azoto (Saint-Denis & Goupy, 2004).

Contudo, e para além da não seletividade do azoto proteico, os métodos de Kjeldahl e Dumas apresentam desvantagens associadas ao próprio método. O primeiro, apesar de ser muito utilizado, apresenta um elevado tempo de digestão, toxicidade dos catalisadores, riscos de perda de amostra durante a digestão, produção de gases nocivos e de resíduos tóxicos, além da decomposição incompleta de alguns compostos (Domini *et al.*, 2009; Sharifi *et al.*, 2009), e o segundo método, tem como inconvenientes o alto custo do equipamento e a sua manutenção (Saint-Denis & Groupy, 2004).

3.2. Métodos de Rastreio

O método ELISA é um teste imunoenzimático que deteta anticorpos e antígenos específicos, sendo possível detetar e quantificar as proteínas presentes nos alimentos analisados através da interação entre o anticorpo e antígeno. Este método é amplamente utilizado na forma de kit comercial – testado pelo fornecedor, sendo necessário equipamento específico para a leitura da absorvância final (Montserrat *et al.*, 2015). Este método é simples e económico, e permite controlar a adulteração potencial de um grande número de amostras sem uma extensa preparação prévia das matrizes (Garber, 2008; Lutter *et al.*, 2011) No entanto, pode originar falsos positivos em amostras contaminadas com o pesticida ciromazina (Wu & Zhang, 2013).

O método HPLC é adequado para demonstrar a conformidade do produto, uma vez que a técnica permite dados quantitativos precisos (Lutter *et al.*, 2011). Este apresenta uma sensibilidade adequada para a determinação da melamina em alimentos, tendo um limite de deteção de 5 µg/L e a sua leitura é feita a 240 nm (Wu & Zhang, 2013; Rambla-Alegre *et al.*, 2010). O método requer uma longa preparação das amostras e consumo de solventes e eluentes, como metanol e acetonitrilo, respetivamente (Zheng *et al.*, 2012). Além disto, as amostras separadas por HPLC-UV podem ser consideradas pouco seletivas porque muitos outros compostos orgânicos absorvem no comprimento de onda entre 200 e 270 nm (Wu & Zhang, 2013).

Apesar das limitações apresentadas, o método de rastreio ELISA é simples, barato em comparação com os métodos de confirmação e pode ser estabelecido em quase todos os laboratórios de controlo de qualidade, contudo, é recomendável a utilização de métodos de confirmação na eventualidade de se suspeitar de um resultado positivo (Lutter *et al.*, 2011; Wu & Zhang, 2013).

3.3. Métodos de Confirmação

A cromatografia líquida (LC) com detecção por espectrometria de massa tandem e a cromatografia gasosa (GC) acoplada à espectrometria de massas (MS) (LV *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2012; Lutter *et al.*, 2011) são técnicas analíticas derivadas da MS e são consideradas métodos de confirmação, uma vez que o modo de detecção fornece a informação sobre a estrutura química do analito, através da separação dos iões pela sua razão massa / carga (Lutter *et al.*, 2011). Demonstrou-se que com a combinação de GC com a MS para identificar e quantificar a melamina, existe uma melhoria na seletividade, permitindo a determinação quantitativa e confirmação de resíduos de melamina (Tittlemier, 2010; Miao *et al.*, 2009; Toth & Bardalaye, 1987).

Com a LC-MS/MS, existe uma maior seletividade e fiabilidade, uma vez que evita a quantificação errónea, assegurando a seletividade da detecção através da aquisição seletiva de massa da substância baseada na monitorização da reação e quantificação a nível do fragmento (Lutter *et al.*, 2011).

Ambas as técnicas são altamente exigentes em termos de tratamento de dados e de habilidade do operador, o que pode limitar a utilização deste método, assim como o seu elevado custo. Deste modo, os métodos confirmatórios aqui mencionados são muitas vezes utilizados como mecanismo de confirmação secundário de resultados obtidos por outros métodos (Soares, 2014).

4. Ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA)

O ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) é uma técnica imunológica utilizada para detetar, numa amostra, a presença de um anticorpo ou um antígeno através da interação antígeno-anticorpo (Weemen *et al.*, 1971; Engvall & Perlmann, 1971).

Os anticorpos são proteínas específicas que se ligam a uma parte restrita do antígeno, o epítipo. As suas elevadas especificidades e sensibilidade permitem a deteção, o isolamento e a quantificação seletiva de moléculas. Os antígenos são moléculas estranhas ao organismo que ao entrarem, desencadeiam mecanismos de defesa (resposta do sistema imunitário), produzindo anticorpos (Quintas *et al.*, 2008)

4.1. História

A primeira técnica imunológica a ser introduzida para detetar moléculas a partir de reações imunológicas, a radioimunoensaio (RIA), foi desenvolvida em 1959 por Benson e Yalow, para medir a concentração do nível de insulina no soro, através de isótopos radioativos (Siegle *et al.*, 1980; Yalow & Berson, 1960). Esta técnica baseia-se na competição entre antígeno marcado radioactivamente e não marcado para a ligação ao anticorpo (Quintas *et al.*, 2008).

Em 1971, dois grupos de investigadores, um grupo holandês formado por Van Weemen e Schurs e um grupo sueco por Engvall e Perlman, idealizaram e desenvolveram o método imunoenzimático para a deteção e quantificação de antígenos ou anticorpos específicos (Weemen *et al.*, 1971; Engvall & Perlmann, 1971), designado por o enzimoimunoensaio (EIA). O princípio e o procedimento desta técnica são semelhantes ao RIA, contudo utiliza enzimas em vez de isótopos radioativos (Siegle *et al.*, 1980). Para além da vantagem de não usar isótopos radioativos, também possui a vantagem de ser mais económica que a RIA uma vez que o equipamento utilizado é mais simples (Quintas *et al.*, 2008).

Nesse mesmo ano, os investigadores observaram que as proteínas poderiam ser imobilizadas numa superfície sólida de poliestireno e que a reação anticorpo-antígeno poderia ser revelada através de uma titulação, formando produtos coloridos da reação enzima-substrato, na presença de um componente dador de eletrões, designado por cromogéneo (Siegle *et al.*, 1980; Weemen *et al.*, 1971; Engvall & Perlmann, 1971). A este ensaio deu-se o nome de ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) (Siegle *et al.*, 1980).

Desde a década de 70, que os imunoensaio têm sido amplamente utilizados como métodos imunológicos para a monitorização de moléculas (Lu *et al.*, 2017).

4.2. Imunoensaios Enzimáticos (EIA)

Os Imunoensaios são métodos analíticos semi-quantitativos que mostram uma de duas interações possíveis entre a molécula adsorvida no poço: antígeno-anticorpo ou anticorpo - antígeno, através da mudança de cor obtida em que é utilizado um conjugado enzimático e o substrato enzimático para identificar a presença e a concentração de moléculas (Hornbeck, 2001). As enzimas do conjugado podem ser:

- Fosfatase alcalina;
- Peroxidase;
- B-galactosidade;
- Catalase;
- Glucose oxidase.

No entanto, as mais utilizadas são a fosfatase alcalina e a peroxidase (Engvall, 2010).

Os imunoensaios são adequados para determinar moléculas de muito baixa concentração, como é o caso das proteínas, vitaminas e drogas, uma vez que apresentam um alto nível de especificidade contra anticorpos ou antígenos (Hornbeck, 2001; Engvall, 2010; Lequin, 2005). A especificidade ocorre porque é quase impossível um anticorpo ligar-se a uma molécula diferente do seu próprio antígeno (Engvall, 2010; Hornbeck, 2001).

Os enzimoimunoensaios (EIA) podem ser divididos em dois grupos, os imunoensaios enzimáticos homogêneos, onde encontramos o imunoensaio multiplicado por enzima (EMIT), e Imunoensaios enzimáticos heterogêneos, ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA). Nos métodos homogêneos a reação ocorre num meio líquido homogêneo e as enzimas tornam-se inativas quando são ligadas ao anticorpo, não necessitando do processo de lavagem onde o antígeno é separado do meio. Este método é geralmente utilizado para detetar moléculas pequenas, uma vez que é de fácil e rápida execução. Contudo, é um método caro e com baixa sensibilidade por ser mais propenso a interferentes por falta da etapa de lavagem. Nos métodos Imunoensaio enzimáticos heterogêneos, o processo de lavagem é fundamental para prevenir a presença de qualquer interferente no meio após a ligação do complexo antígeno-anticorpo. O complexo está ligado às paredes dos poços e o que não pertencer ao complexo é removido na lavagem. Assim este método torna-se mais sensível que o imunoensaios enzimáticos homogêneos, acabando por ser o mais utilizado. O ELISA é uma técnica imunológica heterogênea usada para detetar anticorpos específicos e antígenos solúveis, e uma vez que a estrutura e as características das moléculas a serem medidas nem sempre são as mesmas, tornou-se necessário desenvolver vários tipos de ELISA para aumentar a especificidade da medição (O'Kennedy *et al.*, 1990): O ELISA direto, o ELISA indireto, o ELISA sandwich e o ELISA competitivo, que serão abordados mais à frente.

4.3. Fundamentos

O método ELISA funciona através de um kit comercial desenvolvido por uma variedade de fabricantes para uma determinação semi-quantitativa rápida, oferecendo uma solução às necessidades de rastreio. Uma típica microplaca de ELISA permite a análise simultânea de aproximadamente 40 amostras em pouco tempo (Tittlemier, 2010).

Geralmente, é usada uma microplaca de superfície inerte com poços onde são depositados e adsorvidos os antígenos. O antígeno utilizado no método está ligado à fase sólida, os poços da microplaca, e estes devem ter a capacidade de adsorver adequadamente o antígeno e o anticorpo, no sentido de reduzir ou mesmo evitar a ligação inespecífica de componentes da amostra, geradores de reações indesejáveis que possibilitam falsos resultados. Normalmente as moléculas utilizadas para este fim são proteínas (Engvall & Perlmann, 1971; Yalow & Berson, 1960).

A microplaca ou placa de microtitulação consiste numa placa plana com vários compartimentos individuais (poços) dispostos em linhas e colunas (Figura 4.1). Os formatos mais utilizados possuem 96 poços individuais dispostos em 8 linhas e 12 colunas. São fabricadas a partir de um polímero (poliestireno ou polipropileno), sendo o poliestireno o mais utilizado por ser de alta transparência e o fundo chato e plano (Banks, 2009; Fraisse *et al.*, 2002).



Figura 4.1: Microplaca ELISA com 8 x 12 poços.

Em suma, as microplacas facilitam a realização de ensaios, diminuindo o tempo de execução, pois é possível efetuar vários ensaios em simultâneo, aumentando o rendimento dos laboratórios e diminuindo a quantidade de reagentes necessários por cada ensaio (Banks, 2009).

Após a aplicação das amostras nos poços e antes da adição da solução reveladora, é realizado o processo de lavagem que irá remover os antígenos livres do complexo antígeno-anticorpo (O'Kennedy *et al.*, 1990).

A solução reveladora deteta o consumo de substratos cromogénicos que alteram a cor durante o curso da reação (no caso de alguns substratos não serem naturalmente cromogénicos, podem ser ligados a uma molécula cromogénica) (Lodish *et al.*, 2005).

Os efeitos catabólicos das enzimas determinam a aceleração e a especificidade da reação imunológica durante a reação enzima-substrato que, geralmente, é completada num intervalo de tempo de 30 a 60 minutos e deve estar protegido da luz (Engvall, 2010). A velocidade de reação fornece uma medida da quantidade de enzimas presente na amostra (Lodish *et al.*, 2005).

A reação é interrompida com a introdução da Solução Stop que pode ser composta por (Hornbeck, 2001):

- Hidróxido de Sódio (NaOH);
- Ácido Clorídrico (HCl);
- Ácido Sulfúrico (H₂SO₄).

Ao ser adicionada a solução Stop, as microplacas devem ser lidas num período inferior a 30 minutos num Leitor de ELISA.

A leitura pode ser feita de forma visual ou instrumental. De forma visual, é simplesmente feita pela observação da alteração da coloração dos poços. De modo instrumental, é através de um espectrofotómetro apropriado para a leitura de microplacas de ELISA (Figura 4.2) onde é realizada a leitura da absorvância da suspensão presente nos poços, de acordo com a intensidade da cor desenvolvida após adição do cromogéneo (este é proporcional ou inversamente proporcional à concentração do analito). A absorvância é a capacidade intrínseca que um meio tem para absorver radiações a uma frequência ou comprimento de onda específico. A leitura que é feita no comprimento de onda 450 nm (MaxSignal®, 2013).



Figura 4.2: Leitor ELISA da R-Biopharm® Modelo – 335.

4.4. Tipos de ELISA

4.4.1. ELISA Direto

O método ELISA Direto foi pioneiro entre os outros tipos de ELISA, foi desenvolvido em 1971 por Engvall e Perlmann (Engvall & Perlmann, 1971) e simultaneamente por Van Weeman e Schuurs (Van Weemen & Schuurs, 1971). Este método é adequado para determinar a quantidade de antígenos de alto peso molecular. A superfície da placa é revestida diretamente com o anticorpo ou o antígeno e o processo de lavagem ocorre após um período de incubação que remove os antígenos livres ou os anticorpos do meio. Em seguida, o substrato apropriado é adicionado ao meio para produzir um sinal através da coloração. O sinal é medido através da leitura da absorvância para determinar a quantidade de antígeno ou anticorpo (Engvall, 2010; Hornbeck, 2001).

4.4.2. ELISA Indireto

O método ELISA Indireto foi desenvolvido por Lindström e Wager, em 1978. A diferença entre este método e o método ELISA direto é que este utiliza um anticorpo secundário que estará ligado à enzima, ou seja, o que determina e separa o antígeno a ser medido não será o anticorpo primário mas sim o que vai ser adicionado no meio.

A amostra é adicionada aos poços que são revestidos com antígeno e os mesmos são incubados. Durante a incubação, os anticorpos formados contra os antígenos dos poços irão formar um complexo antígeno-anticorpo. O anticorpo ligado ao antígeno vai ser detectado pelo anticorpo secundário ligado covalentemente a uma enzima, responsável pelo sinal. Em seguida, o substrato da enzima é adicionado ao meio para produzir a cor e posteriormente a concentração será determinada (Figura 4.3). Este método é utilizado para identificar o antígeno (Lindström & Wager, 1978).

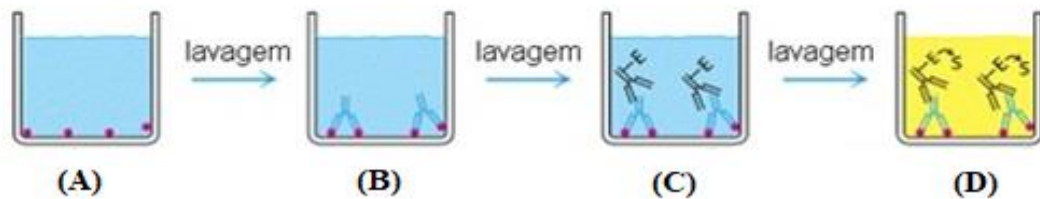


Figura 4.3: ELISA Indireto. (A) O antígeno absorvido no poço; (B) O anticorpo específico liga-se ao antígeno; (C) os anticorpos ligados à enzima ligam-se aos anticorpos primários; (D) O substrato é adicionado e convertido pela enzima a uma determinada cor (Adaptado de Câmara, 2013)

4.4.3. ELISA Sandwich

Em 1977, Kato e a sua equipa desenvolveram um novo método de ELISA em que os poços são revestidos com um anticorpo de captura. A amostra é adicionada aos poços e incubada por algum tempo. Posteriormente, os poços são lavados e ocorre a remoção dos antígenos livres. Quando os antígenos específicos são encontrados pelos anticorpos, eles não podem ser removidos no processo de lavagem. Após esse passo, os anticorpos são marcados com enzimas a eles ligados. Para revelar a atividade enzimática, o substrato / cromogénio é adicionado ao meio e a coloração surge mostrando um resultado positivo (Figura 4.4). A sua ausência pode indicar a falta de enzima ou um resultado negativo. Uma vez que a proteína é presa entre duas moléculas de anticorpo, o método é designado por ELISA Sandwich (Kato *et al.*, 1977).

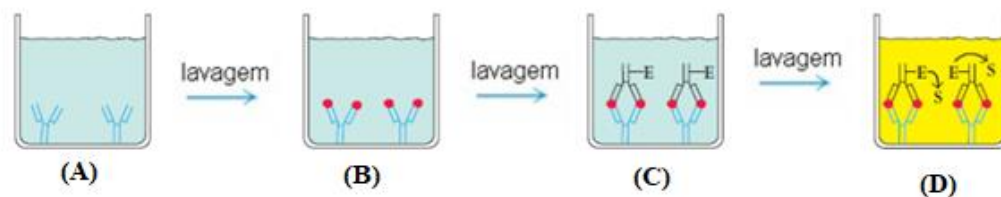


Figura 4.4: ELISA Sandwich. (A) Anticorpo adsorvido no poço; (B) Antígeno introduzido para ser medido; (C) Adição do conjugado enzimático ao anticorpo secundário; (D) O substrato é adicionado e convertido pela enzima a uma determinada cor (Adaptado de Pokhrel, 2015).

4.4.4. ELISA Competitivo

Em 1976, foi desenvolvido por Yorde e a sua equipa, o método de ELISA competitivo, em que a superfície dos poços são revestidos com o anticorpo específico de antígeno (Figura 4.5). A amostra e o conjugado são adicionados na mesma altura nos poços. O conjugado (antígeno ligado à enzima) e o antígeno livre (não marcado), presente na amostra, vão competir pela ligação do anticorpo. No processo de lavagem, os antígenos que não se ligaram ao anticorpo são removidos. Com a adição do substrato da enzima, a atividade enzimática é quantificada. Existe uma proporção inversa entre a concentração do analito e a intensidade da coloração resultante, ou seja, quando a quantidade de antígeno da amostra é baixa, obtém-se uma alta absorvância, enquanto a quantidade de antígeno da amostra é alta, produzem uma absorvância baixa (Yorde *et al.*, 1976). É o caso da deteção de melamina, este é o tipo de ELISA utilizado e quanto mais intensa for a cor, menor será a concentração da melamina (MaxSignal®, 2013).

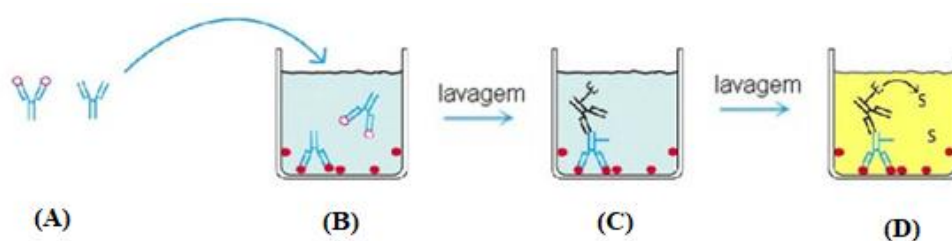


Figura 4.5: ELISA Competitivo. (A) Incubação do anticorpo com o antígeno a ser medido; (B) A mistura antígeno-anticorpo é adicionada ao poço para ser revestida pelo antígeno adsorvido; (C) Adição do conjugado enzimático ao anticorpo secundário; (D) O substrato é adicionado e convertido pela enzima a uma determinada cor (Adaptado de Pokhrel, 2015).

5. Validação do Método

A validação do método consiste numa série de testes que comprovam todos os pressupostos em que o método analítico é baseado. As características de desempenho são determinadas e documentadas, demonstrando se o método é adequado para o uso pretendido. As características de desempenho do método analítico são a aplicabilidade, seletividade ou especificidade, calibração, precisão e exatidão, limite de quantificação, limite de detecção, sensibilidade e robustez.

A implementação e validação do método ELISA para a detecção e quantificação de melamina, teve como base um documento interno e confidencial – *Guidelines for Method Validation of Enzyme-Linked Immunosorbent Assay applied to food samples* - sustentado por “A aptidão para fins de métodos analíticos - um guia de laboratório para validação de métodos e tópicos relacionados” publicado pela Eurachem com diretrizes da Comissão do Codex Alimentarius. Para além deste, ainda foi utilizado o Guia RELACRE 13 de 2000.

Para a realização deste estudo foi utilizado como matriz o leite. A escolha desta matriz teve como base o que foi mencionado no capítulo 2 deste trabalho. Esta matriz poderá apresentar melamina na sua composição através da contaminação ou por uma adulteração.

Para a validação do método ELISA foram necessários os seguintes parâmetros:

- Gama de trabalho;
- Limite de detecção (LD);
- Limite de quantificação (LQ);
- Precisão:
 - Repetibilidade;
 - Reprodutibilidade;
- Exatidão.

A Robustez também é um parâmetro a ter em conta, no entanto, como o kit de determinação de melamina trata-se de um kit comercial validado pelo seu fornecedor, não foi necessário ter em conta este parâmetro.

5.1 Materiais e Métodos

5.1.1. Kit ELISA

O kit ELISA utilizado para a implementação e validação do método foi o MaxSignal® Melamine ELISA Test kit, um ELISA competitivo para a quantificação de melamina em matrizes como o leite, carne, peixe, chocolate, ovo, entre outras.

Este kit contém as soluções necessárias para a extração da melamina nas matrizes e o restante material para a realização do ensaio ELISA, como se pode visualizar na Figura 5.1.



Figura 5.1: MaxSignal® Melamine ELISA Test kit.

O kit é constituído por 2 frascos de 20 mL de solução tampão de extração de amostras 10x concentrado; 1 frasco de 20 mL de solução tampão Clean Up; 1 frasco de 20 mL de solução tampão Balance; 1 frasco de 14 mL de tampão de diluição de amostra concentrado 10x; 1 frasco de 5 mL de solução tampão de extração de leite 10x concentrado (opcional); 1 placa com 96 poços (8 poços x 12 linhas); 6 padrões com 0,8 mL (negativo, 5,0 ng/mL, 20,0 ng/mL, 50,0 ng/mL, 100,0 ng/mL e 200,0 ng/mL); 1 frasco de fortificada com 0,8 mL de 100 µg/mL; 1 frasco de 8 mL de Anticorpo; 1 frasco de 8 mL Conjugado HRP (enzima *Horseradish peroxidase*); 1 frasco de 28 mL de solução de lavagem 20x concentrada; 1 frasco de 12 mL de Substrato TMB (3,3', 5,5'-tetrametilbenzidina que é o substrato adequado para a *horseradish peroxidase*, que irá desenvolver a cor azul); 1 frasco de 14 mL Solução Stop.

O kit tem a capacidade para testar 42 amostras em duplicado (sendo 12 poços para os padrões), com prazo de utilização de 12 meses quando é devidamente armazenado. Este deve estar armazenado a uma temperatura entre 2-8 °C.

As soluções concentradas necessitam de ser diluídas antes de serem utilizadas (Figura 5.2).

As restantes soluções e os padrões encontram-se prontos para uso.

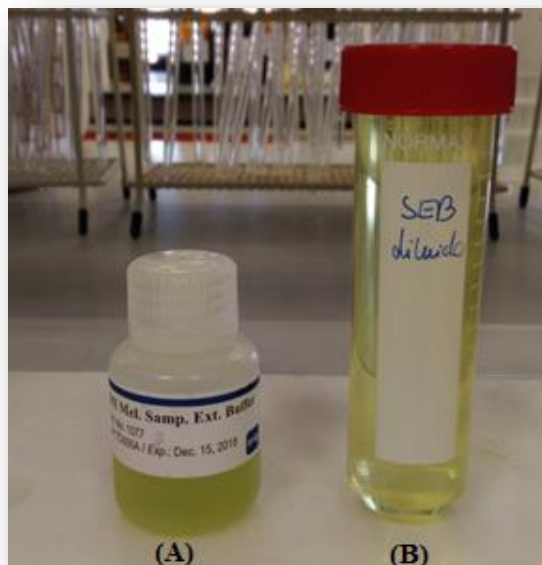


Figura 5.2: Soluções tampão de extração. (A) Solução tampão de extração concentrado 10x; (B) Solução tampão de extração diluído (diluição de 1:10).

5.1.2. Equipamentos

Os equipamentos utilizados para a preparação, extração e leitura da melamina são: Centrifuga Hermle Z 206 A, calibrada anualmente, utilizada para a centrifugação, permitindo a separação de fases das amostras; Micropipetas Transferpette® de 10-100 μL e 100-1000 μL para a pipetagem das amostras, soluções e padrões, calibradas de 2 em 2 anos, e a de 30-300 μL para o processo de lavagem do ensaio; Vortex Ibx instruments v05 series, utilizado para homogeneização das amostras e soluções; Leitor de ELISA R-Biopharm® Modelo - 335. O equipamento não possui uma calibração externa devido ao uso de padrões e como tal, é feita uma calibração interna sempre que se faz o ensaio.

5.1.3. Materiais

Foram utilizados em conjunto com os equipamentos para a preparação das amostras, os seguintes materiais: Tubos falcon de 15 mL estéreis para processo de extração de amostras; pontas estéreis para as micropipetas; tubos eppendorf de 2 mL estéreis; tubos de ensaio.

5.2. Preparação de amostras

Para a análise do método de ELISA é necessário que as matrizes alimentares sejam preparadas para que ocorra a extração da melamina.

Para este estudo, foi utilizada uma matriz de leite que não continha melamina na sua composição. Para que fossem realizados os ensaios de precisão (repetibilidade e reprodutibilidade) e de exatidão para este tipo de análise, a matriz inicial foi fortificada.

5.3. Extração de melamina

Antes de iniciar a extração, foram feitas as diluições necessárias das soluções para que esta fosse realizada.

5.3.1. Extração em leite

Para a extração de melamina em leite, colocou-se 1 mL para um tubo falcon de 15 mL esterilizado e adicionou-se 4 mL da solução tampão de extração diluída (1:10), seguindo-se a agitação durante 5 segundos para que a melamina seja extraída das amostras. De seguida foi adicionado 250 µL da solução tampão Clean up e levado ao vortex durante 3 minutos. Posteriormente, as amostras foram colocadas na centrífuga durante 10 minutos a uma velocidade de 4000 rpm. Após a centrifugação, foram transferidos 250 µL do sobrenadante para outro tubo e adicionados 250 µL da solução tampão Balance. De seguida, levou-se os tubos ao vortex durante 15 segundos e posteriormente à centrífuga durante 2 minutos a 4000 rpm. Este processo permite que haja separação de possíveis interferentes, como os hidratos de carbono, proteínas, lípidos, etc., do sobrenadante que será analisado.

Por fim, foram retirados 50 µL para serem utilizados no ensaio ELISA.

5.4. Ensaio ELISA

Antes da pipetagem nos poços, é necessário preparar a mistura de anticorpo-conjugado HRP (1 volume de anticorpo e 1 volume de conjugado HRP). Após a sua preparação, este tem que ser aplicado no máximo até 5 minutos.

A solução de lavagem também teve de ser preparada previamente uma vez que esta é concentrada 20x (1 volume de solução de lavagem e 19 volumes de água destilada).

5.4.1. Procedimento

Adicionou-se 50 μL de cada padrão de Melamina na concentração mais baixa para a mais alta e 50 μL de cada amostra nos diferentes poços de amostra assim como a amostra em duplicado (Figura 5.4). Posteriormente, adicionou-se 100 μL de mistura de anticorpo-conjugado HRP de melamina e misturou-se bem agitando suavemente a placa manualmente durante 1 minuto. Incubou-se a placa durante 30 minutos à temperatura ambiente (20-25 $^{\circ}\text{C}$). Após os 30 minutos, descartou-se cuidadosamente a solução dos poços. Lavou-se a placa 3 vezes com 250 μL de solução de lavagem diluída. Após a última lavagem, o próximo passo deve ser logo executado para que a placa não seque. Adicionou-se 100 μL de substrato TMB. Misturou-se a solução mexendo suavemente a placa manualmente durante 1 minuto enquanto incubava. Após incubação durante 20 minutos à temperatura ambiente (20-25 $^{\circ}\text{C}$) adicionou-se 100 μL de solução Stop (Figura 5.5). A leitura no leitor de ELISA deve ser feita assim que possível após a adição da solução Stop, a 450 nm.



Figura 5.3: Microplaca ELISA com os poços preenchidos com os padrões e as amostras.

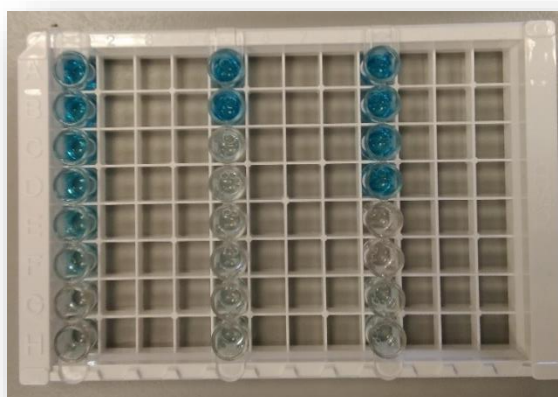


Figura 5.4: A coloração azul ocorre durante a reação enzimática. Quanto menor a intensidade da cor maior é a concentração de melamina.

5.5. Gama de trabalho

A gama de trabalho consiste num conjunto de valores que devem cobrir a gama de valores expectáveis de modo a que os valores calculados se situem na zona central da recta. Os valores medidos devem estar linearmente relacionados com as concentrações, o que implica que os valores medidos perto do valor limite inferior à gama de trabalho devem ser distinguidos dos brancos do método. Isto é, o limite inferior da gama de trabalho deve ser igual ou superior ao limite de deteção do método.

5.6. Curva de calibração

A curva de calibração é o processo pelo qual a resposta de um sistema de medida se relaciona com uma concentração ou uma quantidade de substância conhecida. Esta obtém-se através das soluções padrão disponíveis no kit, em que são conhecidas as suas concentrações, que são medidas num equipamento analítico, nas mesmas condições das amostras a analisar. Esboça-se um gráfico de calibração, em que determina-se a recta de calibração pelo sinal do equipamento em função da concentração. Foram utilizadas 6 diferentes concentrações das soluções padrão, nomeadamente, 0,0, 5,0, 20,0, 50,0, 100,0 e 200,0 ng/mL.

De modo a verificar se os pontos encontram-se ajustados, faz-se a análise ao valor do coeficiente de correlação, R , que pode estar entre os valores -1 e $+1$. Na maioria dos casos, as curvas de calibração devem ter o valor de $R \geq 0,995$. No entanto, quanto mais próximo este valor estiver de 1 , menor será o valor do desvio padrão e , conseqüentemente, menor será a incerteza associada ao resultado final do ensaio. Para o método de ELISA, o desvio entre as absorvâncias deverá ser inferior a 20% (concentração obtida *versus* concentração teórica).

5.7. Limite de deteção (LD) e Limite de quantificação (LQ)

Não existe uma definição uniforme sobre o limite de deteção (LD). O LD é o teor mínimo medido, a partir do qual é possível detetar a presença do analito na amostra mas não necessariamente quantificável. Uma leitura inferior ao LD não significa a ausência do analito a medir, apenas se pode afirmar que, com uma certeza estatística razoável, a concentração do componente em causa será inferior a um certo valor. Este é calculado através da equação:

$$LD = 3,3 \times SDr,$$

em que o SDr corresponde ao desvio padrão.

O LD também pode ser designado como a concentração líquida mínima detetável, ou o limite de determinação / limite de decisão, que de acordo com a ISO / DIS 11843-1 são definidos como: “a verdadeira concentração líquida ou quantidade do analito no material a ser analisado que conduzirá a probabilidade até a conclusão que a concentração do analito do material analisado é maior que a da matriz em branco”.

No limite de quantificação (LQ) também não existe uma definição uniforme. Este corresponde à menor concentração medida, a partir da qual é possível a quantificação do analito, com uma determinada exatidão e precisão. O LQ pode ser calculado através da equação:

$$LQ = 10 \times SDr$$

Para a validação do método o LD e o LQ são determinados através da medição de um branco pelo menos 6 vezes em condições de reprodutibilidade (diferentes dias).

5.8. Precisão

A precisão depende apenas da distribuição de erros aleatórios e não se relaciona com o valor verdadeiro. Esta pretende avaliar a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos sobre a mesma amostra ou similar, em condições estipuladas (ISO 3534-1).

Para a precisão do método, têm que ser considerados os parâmetros de repetibilidade e de reprodutibilidade.

5.8.1. Repetibilidade

A repetibilidade exprime a precisão de um método efetuado em condições idênticas, isto é, os ensaios foram realizados sobre uma mesma amostra, no mesmo laboratório, pelo mesmo técnico, com o mesmo material e equipamento em curtos intervalos de tempo (ISO 3534-1).

Quando a validação ocorre dentro de um único laboratório, podem ser utilizados dois valores para verificar se os resultados das análises duplicadas estão dentro dos limites de aceitação.

O valor limite de repetibilidade (r) é a diferença absoluta máxima tolerável entre dois resultados obtidos em circunstâncias idênticas de 95% de nível de confiança. O limite é calculado de forma simplificada como:

$$r = 2,8 \times SDr$$

5.8.2. Reprodutibilidade

A reprodutibilidade consiste na precisão de um método, quando realizado em condições diferentes, utilizando o mesmo método de ensaio, sobre a mesma amostra mas em laboratórios diferentes, com técnicos diferentes, equipamentos diferentes e ou em épocas diferentes.

Para limite de reprodutibilidade (R), o valor é obtido pela diferença absoluta máxima tolerável entre dois resultados obtidos em diferentes circunstâncias por diferentes laboratórios com o mesmo método a um nível de 95% de confiança. O limite de reprodutibilidade, R, é calculado como:

$$R = 2,8 \times \text{SDR}$$

5.9. Exatidão

A exatidão consiste no grau de conformidade com o valor médio obtido em relação a uma referência padrão. O cálculo da exatidão é baseado no cálculo da recuperação quando é utilizado material de referência e pode ser obtido através da equação:

$$\% \text{ Recuperação} = \frac{V_{ob} - V_0}{V_t} \times 100$$

em que V_{ob} corresponde ao valor obtido, o V_0 ao valor do branco e o V_t ao valor teórico.

Para determinações em que não são utilizadas amostras de referência, é possível obter um valor de referência através da utilização de fortificadas, como é o caso do *spiking*, em que é aplicada uma concentração conhecida em amostras de comparação.

Para este estudo foram realizadas fortificações com concentrações de 50,0 ng/mL e de 150,0 ng/mL de melamina, para garantir que as concentrações obtidas estejam na gama de trabalho.

6. Resultados e Discussão

6.1. Gama de trabalho

A gama de trabalho é definida pelos padrões utilizados no kit e está definido entre 5,0 ng/mL e 200,0 ng/mL de melamina. A verificação da gama de trabalho é feita sempre quando se procede à análise de amostras, sendo confirmado experimentalmente o padrão correspondente à menor concentração e à maior concentração da gama.

Para a determinação da curva de calibração, as 6 soluções padrão presentes no kit foram lidas em 3 dias diferentes nas mesmas condições e com o mesmo equipamento a 450 nm (Tabelas 6.1, 6.2 e 6.3). Após a leitura, é calculada a percentagem de absorvância relativa com a equação:

$$\% \text{ Absorvância Relativa} = \frac{\text{Absorvância do Padrão}}{\text{Absorvância do Padrão negativo}} \times 100$$

Será através das percentagens de absorvâncias relativas obtidas e das absorvâncias lidas que o gráfico de calibração é construído. Este irá fornecer o coeficiente de correlação e a recta de calibração logarítmica, com a qual serão determinadas as concentrações reais (Figuras 6.1, 6.2 e 6.3).

Tabela 6.1: Análise dos resultados obtidos para as 6 soluções padrões no primeiro dia, sendo Padrão 1 (0 ng/mL) o padrão negativo; a percentagem da absorvância relativa para a construção da curva padrão; concentração obtida determinada a partir da recta logarítmica obtida; percentagem do desvio entre a concentração obtida e a concentração padronizada. As absorvâncias lidas em duplicado.

Conc. (ng/mL)	Abs.		% Abs Relat.	Conc. Obtida	% Desvio Conc. Obtida vs Conc. Teórica
0,0	2,303	2,274	-	-	-
5,0	2,146	2,095	93	5,1	1,0
20,0	1,581	1,634	70	19,2	-4,0
50,0	1,198	1,255	54	51,8	3,6
100,0	0,955	1,001	43	98,8	-1,2
200,0	0,792	0,618	31	200,8	0,4

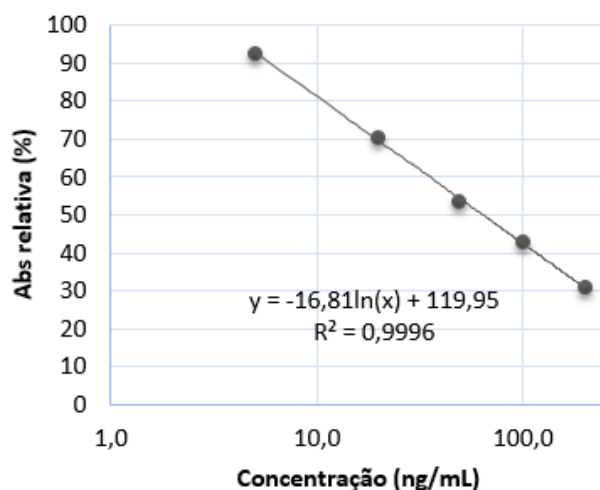


Figura 6.1: Curva de calibração obtida na leitura das 6 soluções padrão no primeiro dia. Com recta logarítmica, $y = -16,81 \ln(x) + 119,95$ é feita a determinação da concentração obtida de cada solução padrão.

Tabela 6.2: Análise dos resultados obtidos para as 6 soluções padrões no segundo dia; a percentagem da absorvância relativa para a construção da curva padrão; concentração obtida determinada a partir da recta logarítmica obtida; percentagem do desvio entre a concentração obtida e a concentração padronizada. As absorvâncias lidas em duplicado.

Concentração (ng/mL)	Absorvâncias		% Abs Relat.	Concentração obtida	% Desvio Conc. Obtida vs Conc. Teórica
0	2,867	2,930	-	-	-
5,0	2,769	2,710	95	5,3	6,0
20,0	2,089	2,144	73	18,3	-8,5
50,0	1,618	1,646	56	48,1	-3,8
100,0	1,272	1,223	43	103,2	3,2
200,0	0,884	0,918	31	205,6	2,8

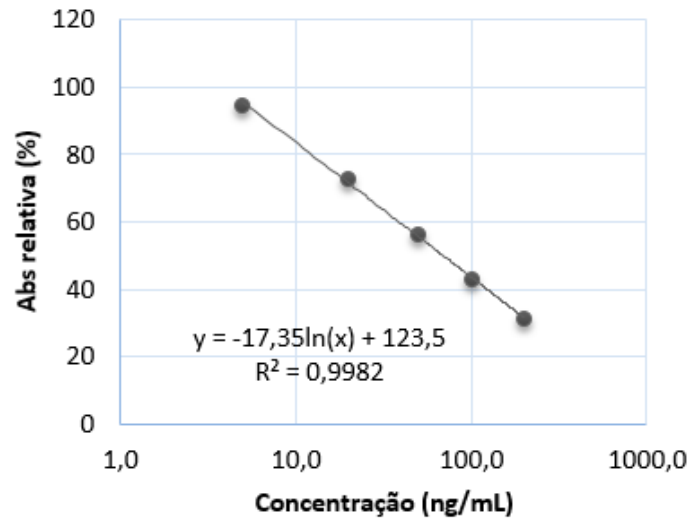


Figura 6.2: Curva de calibração obtida na leitura das 6 soluções padrão no segundo dia. Com recta de calibração logarítmica, $y = -17,35 \ln(x) + 123,5$ é feita a determinação da concentração obtida de cada solução padrão.

Tabela 6.3: Análise dos resultados obtidos para as 6 soluções padrões no terceiro dia; a percentagem da absorvância relativa para a construção da curva padrão; concentração obtida determinada a partir da recta logarítmica obtida; percentagem do desvio entre a concentração obtida e a concentração padronizada. As absorvâncias lidas em duplicado.

Concentração (ng/mL)	Absorvâncias		% Abs Relat.	Concentração obtida	% Desvio Conc. Obtida vs Conc. Teórica
0,0	2,867	2,759	-	-	-
5,0	2,782	2,328	91	5,4	8,0
20,0	1,964	1,934	69	19,1	-4,5
50,0	1,667	1,447	55	43,6	-12,8
100,0	1,153	1,125	40	104,8	4,8
200,0	0,832	0,771	28	212,9	6,4

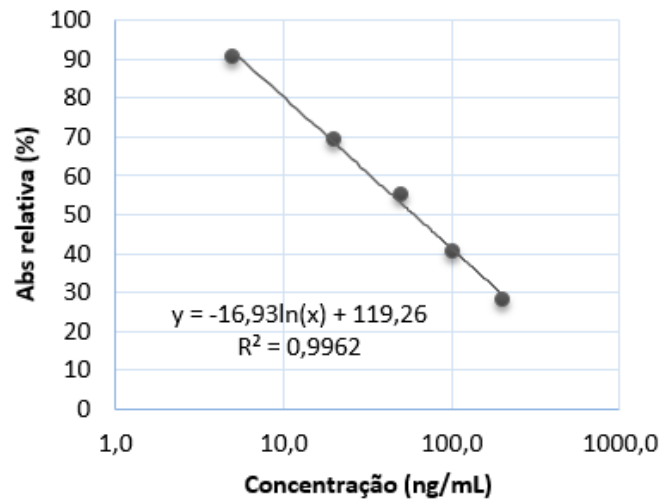


Figura 6.3: Curva de calibração obtida na leitura das 6 soluções padrão no terceiro dia. Com recta de calibração logarítmica, $y = -16,93 \ln(x) + 119,26$ é feita a determinação da concentração obtida de cada solução padrão.

Conforme referido anteriormente, foram efetuadas três leituras de calibração, utilizando os seis padrões disponibilizados no kit. O zero de concentração (padrão 1 – negativo) representa o branco.

No eixo horizontal (eixo x) estão representadas as concentrações obtidas e no eixo vertical (eixo y) a percentagem de absorvância relativa.

A linearidade das curvas de calibração foi estudada com base no coeficiente de correlação (R^2). No primeiro dia obteve-se um $R^2 = 0,9996$, no segundo dia $R^2 = 0,9982$ e no terceiro dia $R^2 = 0,9962$. Como é possível observar, existe uma diminuição do R^2 desde do primeiro dia ao terceiro dia. Isto pode estar associado a erros de operador, como por exemplo, a pipetagem nos poços. Contudo, os valores obtidos nos três dias são bastante satisfatórios uma vez que apresentam um valor de $R \geq 0,9950$.

Em relação à percentagem de desvio entre a concentração obtida e a concentração teórica, também se verifica uma variação entre os três dias de ensaio. No primeiro dia o desvio vai de -4,0 % a 3,6 %, no segundo dia vai de -8,5 % a 6,0 % e no último dia vai de -12,8% a 8,0%. Ao longo dos três dias observa-se um aumento da percentagem de desvio, o que vai ao encontro com o mesmo tipo de erro mencionado na linearidade. Apesar do aumento de percentagem de desvio, esta apresenta, nos três dias, um desvio <20% entre a concentração obtida versus a concentração teórica.

Uma vez que a linearidade e o desvio das concentrações estão relacionados, pode-se afirmar que o dia que teve resultados menos satisfatórios foi o terceiro dia. Contudo, quer a linearidade quer

percentagem de desvio entre a concentração obtida e a concentração teórica cumprem os critérios de aceitação para a implementação do método e que a gama do kit encontra-se ajustada.

6.2. Limite de deteção (LD) e limite de quantificação (LQ)

Para a verificação do limite de deteção (LD) e do limite de quantificação (LQ) do kit, foi calculado o desvio padrão de pelo menos 6 brancos (água destilada) em condições de precisão intermédia. O ensaio foi realizado em dias diferentes nas mesmas condições e com o mesmo equipamento. Os resultados obtidos seguem-se na tabela 6.4.

Tabela 6.4: Valores de LD e LQ obtidos através do cálculo $LD = 3,3 \times SD$ e $LOQ = 10 \times SD$

	Branco						Concentração (ng/mL)		
	B1	B2	B3	B4	B5	B6	SD	LD	LQ
Abs	2,926	2,912	2,933	2,901	3,000	2,928	0,641	2,12	6,41
Abs	2,940	2,957	2,874	2,936	2,859	2,981			

Para determinar o LD e o LQ, foi utilizado um branco. Na prática, obtivemos um LD de 2,12 ng/mL e um LQ de 6,41 ng/mL. Uma vez que se obteve um LQ de 6,41 ng/mL, concentração medida a partir da qual é possível a quantificação do analito, significa que os erros cometidos pelo operador foram pequenos porque de acordo com o manual do kit, este apresenta uma elevada sensibilidade para 5,0 ng/g de melamina (MaxSignal®, 2013).

6.3. Repetibilidade

A repetibilidade foi avaliada através de duplicados, onde é calculado o respetivo desvio padrão de 10 análises fortificadas com 150,0 ng/mL no mesmo dia (Tabela 6.5). O valor analítico aceitável para o coeficiente de variação (cv) da repetibilidade, de forma a estabelecer uma boa *performance* na validação interna deverá ser inferior 5%.

Tabela 6.5: Análise da repetibilidade após a leitura de 10 amostras fortificadas com 150,0 ng/mL e os respetivo coeficiente de variação para o leite.

Dia	Concentração amostra (ppm)	Concentração (ppm)
22-02-2017	<LQ	1,23
		1,22
		1,21
		1,24
		1,20
		1,22
		1,19
		1,20
		1,22
		1,20
Média		1,21
Desvio Padrão		0,02
Repetibilidade		0,06
CV (%)		2

Calculado o coeficiente variação obtido para a matriz em estudo podemos constatar que o valor é menor do que 5%. O critério de aceitação dos futuros duplicados para a matriz leite será de 0,06 µg/g.

6.4. Reprodutibilidade

A reprodutibilidade foi avaliada através de dados que foram recolhidos em dias diferentes, calculando o limite associado à reprodutibilidade através do desvio padrão e o coeficiente de variação.

Tabela 6.6: Análise da reprodutibilidade após a leitura de 10 amostras fortificadas com 150,0 ng/mL em dias diferentes para leite.

Dia	Concentração amostra (ppm)	Concentração (ppm)	Dia	Concentração amostra (ppm)	Concentração (ppm)
22-02-2017	<LQ	1,23	23-02-2017	<LQ	1,12
		1,22			1,07
		1,21			1,10
		1,24			1,12
		1,20			1,13
		1,22			1,09
		1,19			1,12
		1,20			1,07
		1,22			1,17
		1,20			1,19
Média					1,17
Desvio Padrão					0,06
Reprodutibilidade					0,17
CV (%)					5

Calculada a média da reprodutibilidade dos dois dias para a matriz em estudo e o seu coeficiente de variação, podemos constatar que o coeficiente de variação da reprodutibilidade foi igual a 5%. Assim, verificou-se que ao realizar o método em condições diferentes, neste caso, em dias diferentes, este apresenta uma precisão dentro do intervalo de confiança de 95%.

6.5. Exatidão

Para garantir a fiabilidade das leituras das absorvâncias obtidas, foi calculada a percentagem de recuperação da absorvância relativa obtida versus a teórica para os padrões do kit. Os resultados podem ser observados na tabela 6.7. As percentagens de recuperação das absorvâncias relativas referentes aos 5 padrões variaram entre 110% e 120%, encontram-se dentro do critério de aceitação (70% - 120%).

Tabela 6.7: Valores teóricos da concentração, da absorvância e da taxa de absorvância relativa dos 6 padrões. Estes valores podem ser confirmados no Anexo I – Certificado de Controle de Qualidade. Percentagens de recuperações obtidas das absorvâncias relativas reais versus as absorvâncias relativas teóricas, referentes às três leituras dos padrões.

	Padrão	1	2	3	4	5	6
Valores teóricos	Concentração (ng/mL)	0	5,0	20,0	50,0	100,0	200,0
	Absorvância	2,39	1,95	1,46	1,12	0,85	0,62
	% Absorvância Relativa	100	88	68	49	35	23
Dia 1 (valores obtidos)	Concentração (ng/mL)	-	5,1	19,2	51,8	98,8	200,8
	Média de Absorvâncias	2,289	2,121	1,608	1,227	0,978	0,705
	% Absorvância Relativa	-	93	40	54	43	31
	% Recuperação	-	113,0	115,2	114,0	118,7	118,5
Dia 2 (valores obtidos)	Concentração (ng/mL)	-	5,3	18,3	48,1	103,2	205,6
	Média de Absorvâncias	2,899	2,740	2,117	1,632	1,248	0,901
	% Absorvância Relativa	-	95	73	56	43	31
	% Recuperação	-	115,3	119,7	119,8	119,6	119,6
Dia 3 (valores obtidos)	Concentração (ng/mL)	-	5,4	19,1	43,6	104,8	212,9
	Média de Absorvâncias	2,813	2,555	1,949	1,557	1,139	0,802
	% Absorvância Relativa	-	91	69	55	40	28
	% Recuperação	-	110,8	113,6	117,8	112,5	109,6

No primeiro dia obteve-se uma percentagem de recuperação satisfatória, ou seja, entre 113,0% e os 118,5%. No segundo dia de ensaio, a percentagem de recuperação aumentou em todos os padrões, encontrando-se entre 115,3% e 119,6%. No entanto, no terceiro dia, observa-se uma descida nas taxas de recuperação, principalmente no padrão 5 e 6. No padrão 5, a percentagem de recuperação no primeiro e segundo dia encontram-se muito próximas (118,7% e 119,6%). No terceiro dia, esta baixa para os 112,5%. No padrão 6, observa-se uma diferença maior em comparação com o padrão 5. Nos dois primeiros dias, o padrão 6 apresenta uma percentagem de recuperação de 118,6% e 119,6%, respetivamente, e no último dia uma percentagem de 109,6%. Contudo, apesar destas variações na percentagem de recuperação obtida pode-se afirmar que o kit é estável, uma vez que apresenta no geral uma percentagem de recuperação inferior a 120%, indo ao encontro com o critério de aceitação de 70% - 120%.

Para a determinação da exatidão do método, como foi mencionado anteriormente, foi feita através da fortificação da amostra com uma concentração conhecida de 50,0 ng/mL e 150,0 ng/mL.

Tabela 6.8: Percentagem de recuperação da amostra fortificada com 50,0 ng/mL.

Concentração (ng/mL)	Recuperação (%)
41,11	82,21
35,72	71,44
44,35	88,71
35,51	71,02
36,71	73,42
47,03	94,05
49,38	98,75
41,92	83,83
50,35	100,7
44,35	88,71
Média % Recuperação	85,28

Ao analisar a tabela 6.8, verifica-se que as percentagens de recuperação são satisfatórias. Em todas as leituras, a percentagem de recuperação apresenta um valor superior ao mínimo aceitável estipulado pelo fabricante (70%) após a contaminação com 50,0 ng/mL de melamina, sendo a percentagem de recuperação de 85,28%.

Tabela 6.9: Percentagem de recuperação das amostras fortificadas com 150,0 ng/mL

Concentração (ng/mL)	Recuperação (%)
111,9	74,62
110,8	73,89
110,2	73,45
112,4	74,91
109,5	73,02
111,0	74,03
108,0	72,03
108,7	72,45
110,6	73,74
109,3	72,88
Média % Recuperação	73,50

Ao analisar a tabela 6.9, verifica-se que as percentagens de recuperação são satisfatórias. Em todas as leituras, a percentagem de recuperação após a contaminação com 150,0 ng/mL foi de 73,50% sendo superior ao mínimo aceitável estipulado pelo fabricante (70%).

Comparando as percentagens de recuperação entre as duas concentrações de fortificação, verificou-se que a percentagem de recuperação é superior com 50,0 ng/mL (85,28%) do que com 150,0 ng/mL (73,50%).

Para averiguar se existe algum problema de estabilidade nas concentrações mais elevadas do kit, isto é, nas concentrações de 100,0 ng/mL e 200,0 ng/mL, foi feito um segundo ensaio para a fortificação de 150,0 ng/mL.

Tabela 6.10: Análise da estabilidade para a fortificação de 150,0 ng/mL.

<u>Conc ng/mL</u>	<u>% Recup obtida</u>	<u>% Recup anterior</u>
102,0	67,98	74,62
96,9	64,58	73,89
100,2	66,82	73,45
102,2	68,10	74,91
102,7	68,49	73,02
99,5	66,32	74,03
102,0	67,98	72,03
97,4	64,95	72,45
103,3	68,88	73,74
108,1	72,10	72,88
Média % Recuperação	67,62	73,50

Como se pode verificar, neste segundo ensaio a percentagem de recuperação foi de 67,62%, ou seja, encontra-se abaixo da percentagem de recuperação do primeiro ensaio de fortificação com 150,0 ng/mL (73,50%) e abaixo do critério de aceitação (70% - 120%). Estes resultados indicam que há perda de estabilidade para a concentração de 150,0 ng/mL, o que corrobora com os valores obtidos na tabela 6.7 para o padrão 6 de 200,0 ng/mL.

Em suma, tanto nos ensaios com os padrões como nos ensaios com a matriz fortificada, existe uma menor recuperação nas concentrações elevadas face às concentrações mais baixas.

7. Conclusões

A prática de adulteração em alimentos tem sido recorrente, com o intuito de aumentar a matéria prima e o lucro, colocando em causa a segurança alimentar dos consumidores. De modo a contrariar esta situação, são aplicados métodos de análise para a monitorização dos alimentos.

Este estudo teve como objetivo a implementação do método ELISA para a deteção e quantificação de melamina em leite no laboratório da SGS Portugal.

Utilizando como base de implementação o documento interno de implementação de métodos ELISA, foi possível concluir que o método ELISA é indicado para a deteção e quantificação de melamina na matriz leite. Contudo, para garantir a precisão do método, o ideal teria sido a comparação dos resultados das amostras fortificadas com os de outro laboratório.

De acordo com os resultados obtidos, para este kit e fornecedor, pode concluir-se:

- a percentagem de desvio das concentrações teóricas versus obtidas foram inferiores a 20%;
- a linearidade foi verificada entre as concentrações de 5,0 ng/mL e 200,0 ng/mL;
- o método implementado apresenta um LD de 2,12 ng/mL e um LQ de 6,41 ng/mL;
- nos ensaios de repetibilidade e reprodutibilidade o coeficiente de variação foi inferior ou igual a 5%, isto é, o kit apresenta uma elevada precisão;
- apresenta uma percentagem de recuperação satisfatória, tanto para os padrões fornecidos pelo kit como para a matriz em estudo.

Deste modo, para a matriz leite, o kit ELISA melamina encontra-se implementado na SGS como era o objetivo do presente trabalho.

Por fim, como perspetivas futuras, é possível melhorar os ensaios no que diz respeito à exatidão do método, aumentando o número de fortificações dentro da gama de trabalho, de modo a avaliar o grau de conformidade dos valores obtidos. É ainda de se considerar, a validação de um maior número de matrizes como as descritas no manual disponibilizado pelo fornecedor do kit, ampliando a capacidade de deteção de melamina em vários alimentos, como por exemplo, carne, peixe e chocolate.

Referências Bibliográficas

- Abernethy, D., Sheehan, C., Griffiths, J., & Williams, R. (2008). Adulteration of Drugs and Foods: Compensatory Approaches to Lowering Risk. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 85, 444-447.
- Abernethy, G., & Higgs, K. (2013). Rapid detection of economic adulterants in fresh milk by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1288, 10-20.
- Andersen, W.C., Turnipseed, S.B., Karbiwnyk, C.M., Clark, S.B., Madson, M.R., Giesecker, C.A., Miller, R.A., Rummel, N.G., Reimschuessel, R. (2008). Determination and confirmation of melamine residues in catfish, trout, tilapia, salmon, and shrimp by liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56 (12), 4340-4347.
- An, H., Li, X., Yang, Q., Wang, D., Xie, T., Zhao, J., Xu, Q., Chen, F., Zhong, Y., Zeng, G. (2017). The behavior of melamine in biological wastewater treatment system. *Journal of Hazardous Materials*, 322, 445-453.
- Banks, P. (2009). The microplate market past, present and future microplates today - the global market. *Drug Discovery World*. Spring. p. 85-90.
- Barui, A. K., Sharma, R., & Rajput, Y. S. (2012). Detection of non-dairy fat in milk based on quantitative assay of anionic detergent using azure A dye. *International Dairy Journal*, 24, 44-47.
- Bolden, A. L., Rochester, J. R. & Kwiatkowski, C. F. (2017). Melamine, beyond the kidney: A ubiquitous endocrine disruptor and neurotoxicant? *Toxicology Letters*, 280, 181-189.
- Buman, J. L. (2017). SGS Group Results. Full-Year Results Presentation. 56.
- Câmara, B. (2013) Disponível em: www.biomedicinapadiao.com.br/2010/05/elisa.html. Acedido em 20 de Maio de 2017
- Chan, J.Y., Lau, C.M., Ting, T.L., Mak, T.C., Chan, M.H., Lam, C.W., Ho, C.S., Wang, C.C., Fok, T.F., Fung, K.P., 2011. Gestational and lactational transfer of melamine following gavage administration of a single dose to rats. *Food and Chemical Toxicology*, 49 (7), 1544-1548.
- Chansuvarna, W., Panicha, S., & Imyim, A. (2013). Simple spectrophotometric method for determination of melamine in liquid milks based on green Mannich reaction. *Spectrochimica Acta. Part A - Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 113, 154-158.
- Cheng, W. -C., Chen, S. -K., Lin, I. -J., Wang, Y. -M., & Shih, Y. -C. (2009). Determination of urine melamine by validated isotopic ultra-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Communication in Mass Spectrometry*, 23, 1776-1782.
- Dobson, R., Motlagh, S., Quijano, M., Cambron, R., Baker, T., Pullen, A., Regg, B., Bigalow-Kern, A., Vennard, T., Fix, A., Reimschuessel, R., Overmann, G., Shan, Y., Gaston, G. (2008). Identification and Characterization of Toxicity of Contaminants in Pet Food leading to an Outbreak of Renal toxicity in cats and dogs. *Toxicology Sciences*, 106, 251-262.
- Domini, C., Vidal, L., Cravotto, G., & Canals, A. (2009). A simultaneous, direct microwave/ultrasound-assisted digestion procedure for the determination of total Kjeldahl nitrogen. *Ultrasonics Sonochemistry*, 16, 564-569.
- Engvall, E. (2010). The ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay. *Clinical Chemistry*, 56, 319-320.
- Engvall, E., & Perlmann, P. (1971). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) quantitative assay of immunoglobulin G. *Journal of Immunology*, 8, 871-874.

- EPA, 2013. U. Cyromazine Human Health Risk Assessment for Registration Review of Cyromazine. DP No. D387940. p. 56.
- Fraisse, L., Bonnet, M. C., de Farcy, J. P., Agut, C., Dersigny, D., & Bayol, A. (2002). A colorimetric 96-well microtiter plate assay for the determination of urate oxidase activity and its kinetic parameters. *Analytical Biochemistry*, 309, 173-179.
- Garber, E. A. (2008). Detection of melamine using commercial enzyme-linked immunosorbent assay technology. *Food Protection*, 71, 590-594.
- Gomes, P. (2012). SGS Portugal - 90 Anos. *Revista de propriedade do Grupo SGS Portugal*. p. 39.
- Gossner, C. M., Schlundt, J., Embarek, P. B., Hird, S., Lo-Fo-Wong, D., Beltran, J. J.O., Teoh, K.N., Tritscher, A. (2009). The melamine incident: Implications for International Food and Feed Safety. *Environmental Health Perspectives*, 117(12), 1803-1808.
- Hau, A. K. (2009). Melamine toxicity and the kidney. *The American Society Nephrology*, 20, 245-250.
- Hornbeck, P. (2001). Enzyme-linked immunosorbent assays. *Current protocols in immunology*. Chapter 2, unit 2.1, 1-22.
- Kato, K., Hamaguchi, Y., Okawa, S., Ishikawa, E., & Kobayashi, K. (1977). Use of rabbit antibody IgG bound onto plain and aminoalkylsilyl glass surface for the enzyme-linked sandwich immunoassay. *Journal of Biochemistry*, 82, 261-266.
- Lequin, R. (2005). Enzyme immunoassay (EIA)/enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Clinical Chemistry*, 51, 2415-2418.
- Li, X., Hu, J., Han, H., (2011). Determination of cyromazine and its metabolite melamine in milk by cation-selective exhaustive injection and sweeping-capillary micellar electrokinetic chromatography. *Journal of Separation Science*, 34 (3), 323-330.
- Lindström, P., & Wager, O. (1978). IgG autoantibody to human serum albumin studied by the ELISA-technique. *Scandinavian Journal of Immunology*, 7, 419-425.
- Ling, M., Lien, K., & Hsieh, P. (2016). Assessing Risk-Based Upper Limits of Melamine Migration from Food Containers. *Risk Analysis*, 36, 2208-2215.
- Liu, J. m., Ren, A., Yang, L., Gao, J., Pei, L., Ye, R., Qu, Q. & Zheng, X. (2010). Urinary tract abnormalities in chinese rural children who consumed melamine-contaminated dairy products: a population-based screening and follow-up study. *CMAJ*, 185, 439-455.
- Lodish, H., Berk, A., Matsudaira, P., Kaiser, C. A., Krieger, M., Scott, M. P., Zipursky. L., Darnell, J. (2005). *Biologia Celular e Molecular*. Artmed, 5ª edição, p. 92-137.
- Lu, Y., Xia, Y., Liu, G., Pan, M., Li, M., Lee, N. A., & Wang, S. (2017). A review of Methods for Detecting Melamine in Food Samples. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 47(1), 51-66.
- Lund, K. H. & Petersen, J. H. (2006). Migration of formaldehyde and melamine monomers from kitchen- and tableware made of melamine plastic. *Food Additives & Contaminants*, 23(9), 948-955.
- Lutter, P., Savoy-Perroud, M. C., Campos-Gimenez, E., Meyer, L., Goldmann, T., Bertholet, M. C., Mottier, P., Desmarchelier, A., Monard, F., Robert, F., Delatour, T. (2011). Screening and confirmatory methods for the determination of melamine in cow's milk and milk-based powdered infant formula: Validation and proficiency-tests of ELISA, HPLC-UV, GC-MS and LC-MS/MS. *Food Control*, 22, 903-913.

- LV, X., Wang, J., Wu, L., Qiu, J., Li, J., Wu, Z., & Qin, Y. (2010). Tissue Deposition and Residue Depletion in Lambs Exposed to Melamine and Cyanuric Acid-Contaminated Diets. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 943-948.
- Mannoni, V., Padula, G., Panico, O., Maggio, A., Arena, C., Milana, M.R. (2016). Migration of formaldehyde and melamine from melaware and other amino resin tableware in real life service. *Food Additives & Contaminants, Part A Chem. Anal. Control Expo. Risk Assess.* 1-13.
- MaxSignal®. (2013). Melamine ELISA Teste Kit Manual (Vols. 1077-01). ©Bioo Scientific Corp.
- Miao, H., Fan, S., Wu, Y., Zhang, L., Zhou, P., Li, J., Chen, H., Zhao, Y. (2009). Simultaneous Determination of Melamine, Ammelide, Ammeline, and Cyanuric Acid in Milk and Milk Products by Gas Chromatography-tandem Mass Spectrometry. *Biomedical and Environmental Sciences*, 22, 87-94.
- Montserrat, M., Sanz, D., Juan, T., Herrero, A., Sárnchez, L., Calvo, M., & Pérez, M. D. (2015). Detection of peanut (*Arachis hypogaea*) allergens in processed foods by immunoassay: Influence of selected target protein and ELISA format applied. *Food Control*, 54, 300-307.
- Ohlsson, A. H., Fauerbach, J., Sacco, N. J., Bonetto, M., & Cortón, E. (2012). Voltamperometric discrimination of urea and melamine adulterated skimmed milk powder. *Sensors*, 12, 12220-12234.
- O'Kennedy, R., Byrne, M., O'Fagain, C., & Berns, G. (1990). Experimental section: A review of enzyme-immunoassay. *Biochemical Education*, 18, 136-140.
- Pei, X., Tandon, A., Alldrick, A., Giorgi, L., Huang, W., & Yang, R. (2011). The China melamina milk scandal and its implications for food safety regulation. *Food Policy*, 36, 412-420.
- Pokhrel, P. (2015). Disponível em: <http://www.microbiologynotes.com/elisa-principle-types-and-applications/>. Acedido em 20 de Maio de 2017.
- Público (2008). Caso de leite contaminado com Melamina. Obtido de Público em 30 de Setembro de 2017, de <https://www.publico.pt/2008/09/29/sociedade/noticia/cadbury-retira-do-mercado-o-chocolate-feito-na-china-1344301>
- Quintas, A., Freire, A. P., & Halpern, M. J. (2008). *Bioquímica - Organização Molecular da Vida*. Lidel. p. 96-535
- Rai, N. M., Banerjee, D. M., & Bhattacharyya, R. P. (2014). Urinary melamine: Proposed parameter of melamine adulteration of food. *Nutrition*, 30, 380-385.
- Rambla-Alegre, M., Peris-Vicente, J., Marco-Peiro, S., Beltran-Martinavarro, B., & Esteve-Romero, J. (2010). Development of an Analytical Methodology to Quantify Melamine in Milk Using Micellar Liquid Chromatography and Validation According to EU Regulation 2002/654/Ec. *Talanta*, 81, 894-900.
- Rumbeiha, W.K., Agnew, D., Maxie, G., Hoff, B., Page, C., Curran, P., Powers, B. (2010). Analysis of a survey database of pet food-induced poisoning in North America. *Journal of Medical Toxicology*, 6 (2), 172-184.
- Saint-Denis, T., & Groupy, J. (2004). Optimization of a nitrogen analyser based on the Dumas method. *Analytica Chimica Acta*, 515, 191-198.
- SGS. (2015). Soluções para a sustentabilidade da sua organização. Grupo SGS - Portfólio de serviços.
- SGS Portugal. (2016). A SGS de forma resumida. Obtido de <http://www.sgs.pt/pt-PT/Our-Company/About-SGS/SGS-in-Brief.aspx>

- SGS Portugal. (2017). SGS - Liderança e Inovação desde 1878. Obtido em 28 de Janeiro de 2017, de <http://www.sgs.pt/~media/Global/Documents/Brochures/SGS%20Group%20History%20PT.a.shx>
- Sharifi, M., Zebarth, B. J., Burton, D. L., Grant, C. A., Hajabbasi, M. A., & Abbassi-Kalo, G. (2009). Sodium Hydroxide Direct Distillation: A Method for Estimating Total Nitrogen in Soil. *Communications in soil science and Plant Analysis*, 40, 2505-2520.
- Sharma, K., & Paradakar, M. (2010). The melamine adulteration scandal. *Food Security*, 2, 97–107.
- Siegle, R., Jennings, B., Adams, P., & King, L. (1980). Development of a Model Using Polypeptide Antibodies for Scintigraphy of the Pancreas. *Investigative Radiology*, 15, 457-461.
- Soares, H. (2014). Métodos de análises de alérgenicos em alimentos: prós e contras. Disponível em: <http://foodsafetybrazil.org/metodos-de-analises-de-alergenicos-em-alimentos-pros-e-contras/>. Acedido em 01 de Maio de 2017.
- Souza, S., Cruz, A., Walter, E., Faria, J., Celeghini, M.S., R., Ferreira, M. M., Granato, D., Sant'ana, A. S. (15 de Janeiro de 2011). Monitoring the authenticity of brazilian UHT milk: a chemometric approach. *Food Chemistry*, 124, 692-695.
- Sun, F., Ma, W., Xu, L., Zhu, Y., Liu, L., Peng, C., Wang, L., Kuang, H., Xu, C. (2010). Analytical methods and recent developments in the detection of melamine. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 29, 1239-1249.
- Tittlemier, S. A. (2010). Methods for the analysis of melamine and related compounds in foods: a review, *Food Additives & Contaminants: Part A*, 27, 129-145.
- Toth, J. P., & Bardalaye, P. C. (1987). Capillary gas chromatographic separation and mass spectrometric detection of cyromazine and its metabolite melamine. *Journal of Chromatography A*, 408, 335-340.
- Tyan, Y. -C., Yang, M. -H., Jong, S. -B., Wang, C. -K., & Shiea, J. (2009). Melamine contamination. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 395, 729-735.
- Van Weemen, B., & Schuurs, A. (1971). Immunoassay using antigen-enzyme conjugates. *FEBS Letters*, 15, 232-236.
- Wang, P., Lee, R., Chena, C., Chou, C., & Lee, M. (2012). Determination of cyromazine and melamine in chicken eggs using quick, easy, cheap, effective, rugged and safe (QuEChERS) extraction coupled with liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Analytical Chimica Acta*, 752, 78-86.
- Wang, H., Zhao, Z.Y., Zhu, L., Huang, S.J., Zhou, H.H., Zhou, G.Y., Wang, J.P., Jiang, G.P., Chen, X.J., Zhou, X.J. (2014). Growth of children with urolithiasis associated with melamine-contaminated milk powder: a follow-up study. *Hong Kong Journal of Paediatrics* 19(1), 15–21.
- WHO (2009). Toxicological and Health Aspects of Melamine and Cyanuric Acid. Obtido em 21 de Abril de 2017, de http://who.int/iris/bitstream/10665/44106/1/9789241597951_eng.pdf
- World Health Organization. (8 de Dezembro de 2008). Obtido em 13 de Abril de 2017, de http://www.who.int/foodsafety/fs_management/Exec_Summary_melamine.pdf
- Wu, Y., & Zhang, Y. (2013). Analytical chemistry, toxicology, epidemiology and health impact assessment of melamine in infant formula: Recent progress and developments. *Food and Chemical Toxicology*, 56, 325-335.

- Wu, Y. N., Zhao, Y. F., Li, J. G. & Melamine Analysis Group. (2009). A survey on occurrence of Melamine and its analogues in Tainted infant formula in China. *Biomedical and Environmental Sciences*, 22, 95-99.
- Yalow, R., & Berson, S. (1960). Immunoassay of endogenous plasma insulin in man. *The Journal of Clinical Investigation*, 39, 1157-1175.
- Yhee, J. Y., Brown, C., Yu, C., Kim, J., & Poppenga, R. S. (2009). Retrospective study of melamine/cyanuric acid-induced renal failure in dogs in Korea between 2003 and 2004. *Veterinary Pathology*, 46, 348-354.
- Yokley, R.A., Mayer, L.C., Rezaaiyan, R., Manuli, M.E., Cheung, M.W. (2000). Analytical method for the determination of cyromazine and melamine residues in soil using LCUV and GC-MSD. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(8), 3352–3358.
- Yorde, D., Sasse, E., Wang, T., Hussa, R., & Garancis, J. (1976). Competitive enzyme-linked immunoassay with use of soluble enzyme/antibody immune complexes for labeling. I. Measurement of human choriogonadotropin. *Clinical Chemistry*, 22, 1372-1377.
- Zhang, L., Wu, L. L., Wang, Y. P., Liu, A. M., Zou, C. C., & Zhao, Z. Y. (2009). Melamine-contaminated milk products induced urinary tract calculi in children. *World Journal of Pediatrics*, 15, 31-35.
- Zheng, X. L., Yu, B. S., Ke-Xian Li, K. X., & Dai, Y. N. (2012). Determination of melamine in dairy products by HILIC-UV with NH₂ column. *Food Control*, 23, 245-250.

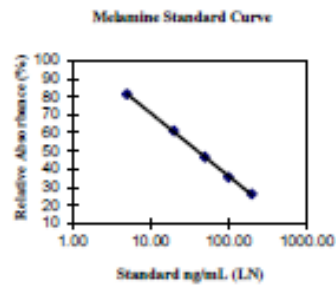
Anexo I – Certificado de Controle de Qualidade



BIOO QUALITY CONTROL CERTIFICATE

MaxSignal® Melamine ELISA Test Kit
Catalog No: 1077; Lot No: 107702031716\$L8835133339; Expiration: 7-Mar-2018

Components	Lot No.	Expiration
Microtiter Plate	L883	3/7/2018
Standards	KZE776	3/7/2018
Ab. #1	KZE774	3/7/2018
100X HRP-Conj. Ab#2	KZE775	3/7/2018
Ab #2 Diluent*	AD1031	12/15/2018
20X Wash Solution*	WS2392	12/15/2018
Stop Buffer*	SB2646	12/15/2018
TMB Substrate*	TS1078	12/15/2018
10X Mel. S. Ext. Buffer	TD005A	12/15/2018
1X Mel. Clean Up Buffer	TD005B	12/15/2018
1X Mel. S. Bal. Bf.	TD005C	12/15/2018
10X Mel. S. Dil. Bf.	TD005D	12/15/2018



* Components with the same BIOO part No within expiration date are interchangeable among BIOO kits.

Standard (ng/mL)	Average OD450	B/B0	CV (%)*
0.00	2.39	100%	0.59
5	1.95	82%	0.76
20	1.46	61%	<0.5
50	1.12	47%	0.57
100	0.85	36%	0.58
200	0.62	26%	<0.5

Note: * Coefficients of variation (CV) were calculated as $CV = (S.D./\mu) \times 100$, where S.D. is the standard deviation of replicates, and μ is the average of replicates.

Quality Control Approval:

Date:

Kevin

March 17, 2016

Bioo Scientific Corp. • 7050 Burleson Rd • Austin, TX 78744 • Tel: 1-888-208-2246
 Fax: (512) 707-8122 • Email: QA/QC@biooscientific.com
 ©Bioo Scientific Corp.
 BIOO QC CERTIFICATE #: 107702031716\$L8835133339