



Relatório anual de progresso

Nº do grupo operacional: **PDR2020 - 101-031291 (Líder)**

Nº dos projetos que integram o grupo operacional:

- ✓ ANPROMIS – PDR2020-101-031291
- ✓ AGROMAIS - PDR2020-101-031292
- ✓ Instituto de Soldadura e Qualidade - PDR2020-101-031293
- ✓ INIAV - PDR2020-101-031295
- ✓ Sociedade Agrícola da Quinta da Labruja S.A. - PDR2020-101-031298
- ✓ Sociedade Agrícola de São João de Brito S.A. - PDR2020-101-031300
- ✓ Quinta da Cholda, S.A. - PDR2020-101-031302
- ✓ Arminda Aurora Domingos Henriques de Sousa Luz - PDR2020-101-031304
- ✓ Maria Francisca Henriques da Luz Lino Caetano - PDR2020-101-031306

Designação do plano de acção: **QualiMilho - Novas estratégias de integração sustentáveis que garantam a qualidade e segurança na fileira do milho nacional**

Identificação de todas as entidades que integram o grupo operacional:

- ✓ **ANPROMIS - Associação Nacional dos Produção de Milho e Sorgo**
- ✓ **AGROMAIS- Entrepósito Comercial Agrícola CRL**
- ✓ **Instituto de Soldadura e Qualidade (ISQ)**
- ✓ **Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária IP (INIAV)**
- ✓ **Sociedade Agrícola da Quinta da Labruja S.A.**
- ✓ **Sociedade Agrícola de São João de Brito S.A.**
- ✓ **Quinta da Cholda, S.A.**
- ✓ **Arminda Aurora Domingos Henriques de Sousa Luz**
- ✓ **Maria Francisca Henriques da Luz Lino Caetano**

Data de início do plano de acção: **01/03/2017**

Data de conclusão do plano de acção: **31/08/2020**

Data do relatório de progresso: **29/03/2018**

A. Execução Física:

As acções foram desenvolvidas de acordo com o plano de acção proposto, tendo-se dado início ao projecto dentro dos timings inicialmente previstos.

Neste primeiro ano foi objectivo da equipe do projecto definir os ensaios a instalar nos diversos campos de ensaio previstos, articulando com os diversos parceiros as variedades de milho a semear, o tipo de adubo a aplicar e o plano de herbicidas a implementar.

De seguida definiram-se os pontos de recolha das amostras tanto no campo, como no circuito que o milho faz até ao local de armazenagem.

No local de armazenagem procedeu-se à definição tanto dos pontos de recolha das amostras, como da periodicidade da amostragem.

No decorrer da campanha de colheita do milho, as amostras foram recolhidas de acordo com o plano previsto e remetidas para os laboratórios do INIAV localizados no Vairão (Vila do Conde) e Oeiras, onde foram efectuadas análises laboratoriais.

Como se trata de uma nova metodologia para apuramento das diferentes micotoxinas no milho, foi necessário aferir-se todo o circuito e adequá-lo às nossas condições de produção.

Durante o processo de armazenagem nos silos da Agromais, foram colocadas sondas de humidade e temperatura, para acompanhamento e monitorização destas duas variáveis ao longo de todo o período em que o grão permanece armazenado.

Face ao plano inicialmente previsto, confirmamos assim a realização das acções a seguir discriminadas:

1. Definição dos parâmetros qualitativos (espécies de fungos e micotoxinas) a avaliar. As micotoxinas a avaliar foram as explicitadas para milho ou cereais no anexo do Reg. (CE) N.º 1881/2006: aflatoxina B1, aflatoxina B2, aflatoxina G1, aflatoxina G2, ocratoxina A, desoxinivalenol, zearalenona, fumoninsina B1, fumonisina B2, toxina T2, toxina HT-2.
2. Definição do plano e método de amostragem. De acordo com a norma Americana AACC 45-01.01 o nível de acção das micotoxinas é de 20 ppb e um só grão de milho infetado (com 100 000 ppb de aflatoxina) pode levar 5000 grãos (cerca de 1500 g) a esse limite. Portanto, para tentar fazer com que cada amostra de 1,5 g seja representada, uma semente contaminada deve ser reduzida para cerca de 1000 partes e é por esse motivo que as diretrizes de amostragem e preparação de amostras devem ser cuidadosamente seguidas. De fato, as diretivas Europeias para os controles oficiais das micotoxinas requerem métodos de amostragem padronizados de modo a que as amostras recolhidas sejam homogéneas e representativas dos lotes armazenados. No âmbito do QualiMilho, adoptamos o Método 64-70.02 da AACC para a recolha de tomas tendo em vista a constituição de uma amostra final de 5 kg que deverá ser moída na íntegra antes

de ser analisada, processo esse que é o recomendado pelo método AACC 45-01.01.

No âmbito das atividades do QualiMilho, o INIAV integrou o grupo de trabalho do CEN TC338 sobre amostragem coordenado pela AFNOR e cujo objetivo é elaborar um guia com recomendações para os controlos oficiais.

3. Desenvolvimento e implementação de métodos de rastreio; Implementar e validar métodos rápidos de rastreio de micotoxinas (imunoenzimáticas-ELISA) em comparação com métodos validados pelo EURL-mycotoxins.

4. Desenvolvimento, implementação e validação de uma metodologia multicomposto para a determinação quantitativa simultânea das várias micotoxinas, por recurso à cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa sequencial (LC-MS/MS);

5. Foram desenvolvidas e implementadas metodologias multicomposto de triagem e de confirmação/quantificação de micotoxinas em amostras de milho. Estes métodos incluem a pesquisa das seguintes moléculas: aflatoxina B1, aflatoxina B2, aflatoxina G1, aflatoxina G2, toxina T2, fumoninsina B1, fumonisina B2, ocratoxina A e zearalenona. O método de triagem implementado foi um método de imunoensaio (kits específicos para a pesquisa de micotoxinas em cereais e rações) com limites de deteção inferiores aos limites máximos estabelecidos na legislação (Reg. (CE) N.º 1881/2006) e com capacidade de obtenção de resultados qualitativos e quantitativos. Para a confirmação de resultados suspeitos em triagem foram desenvolvidos métodos de cromatografia líquida com deteção por espectrometria de massa. Para tal procedeu-se inicialmente à otimização de um procedimento extrativo, tendo-se realizado vários ensaios de extração sólido-líquido com diversas soluções de extração com variação da composição aquoso/orgânico, de pH e com diferentes rácios amostra/solvente. Foi ainda testada a hipótese de se recorrer a métodos de QuEChERS não se tendo obtido resultados tão satisfatórios. A seleção do método mais eficaz teve em consideração estudos de recuperação para as várias moléculas nos diversos ensaios. Em suma, no método otimizado é feita a dupla extração de 2 g de milho (triturado e homogeneizado) com acetonitrilo a 80% (2x10 mL) seguindo passos de agitação e centrifugação. Os sobrenadantes são combinados no final e deste extrato seguem-se dois passos em paralelo, tendo em consideração as diferentes gamas de concentração de acordo com os limites permitidos:

i) Para a quantificação em gamas de concentração mais baixa (aflatoxinas B1, B2, G1 e G2 e ocratoxina A): evaporar à secura 4 mL do extrato e redissolver em 1 mL de acetonitrilo a 40%, filtração e injeção no UHPLC.

ii) Para a quantificação em gamas de concentração elevadas (fumonisinas B1 e B2 e zearalenona): diluição 1:1 do extrato em água, filtração e injeção no UHPLC;

As condições cromatográficas para a confirmação e quantificação de micotoxinas, tanto por UHPLC-ToF-MS como por UHPLC-MS/MS, foram otimizadas por forma a obter uma separação eficiente e tendo em conta a simetria dos picos (Tabela 1). A tabela 2 resume os resultados da linearidade do método UHPLC-ToF-MS.

Tabela 1: Condições dos métodos de UHPLC-ToF-MS e UHPLC-MS/MS para determinação de micotoxinas em milho

		UHPLC (Nexera X2 Shimadzu)																					
ToF-MS 5600+ Sciex	ESI+ e ESI- Full-scan 100-920 Da	Coluna: Eclipse Plus C18 - 2,1X50 mm, 1,8 µm Fluxo: 0,5 mL.min ⁻¹ Fase móvel [A] ácido fórmico 0,1% (v/v) em água Fase móvel [B] ácido fórmico 0,1% (v/v) em acetoneitrilo																					
MS/MS 5500+ Sciex	ESI+ e ESI- MRM (duas transições iónicas otimizadas)	T _{coluna} : 40 °C V _{injeção} : 10 µL Gradiente: <table border="1" style="margin-left: 20px;"> <thead> <tr> <th>T (minutos)</th> <th>%A</th> <th>%B</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0</td> <td>97</td> <td>3</td> </tr> <tr> <td>2</td> <td>97</td> <td>3</td> </tr> <tr> <td>5</td> <td>40</td> <td>60</td> </tr> <tr> <td>9</td> <td>0</td> <td>100</td> </tr> <tr> <td>10</td> <td>97</td> <td>3</td> </tr> <tr> <td>11</td> <td>97</td> <td>3</td> </tr> </tbody> </table>	T (minutos)	%A	%B	0	97	3	2	97	3	5	40	60	9	0	100	10	97	3	11	97	3
T (minutos)	%A	%B																					
0	97	3																					
2	97	3																					
5	40	60																					
9	0	100																					
10	97	3																					
11	97	3																					

Tabela 2: Resultados da linearidade do método UHPLC-ToF-MS para determinação de micotoxinas.

Micotoxina	Intervalo de linearidade (ng/L)	Equação da curva	Coefficiente de determinação (R ²)
Aflatoxina B1 (modo positivo)	0,0625-4	$y = 1 \times 10^5 x + 1214,5$	0,9975
Aflatoxina B2 (modo positivo)	0,0313-1	$y = 6,5 \times 10^4 x + 392,6$	0,9954
Aflatoxina G1 (modo positivo)	0,0313-1	$y = 4,5 \times 10^4 x + 1185,2$	0,9955
Aflatoxina G2 (modo positivo)	0,13-4	$y = 2,8 \times 10^4 x + 575,3$	0,9991
Ocratoxina A (modo positivo)	0,38-6	$y = 6729,1 x + 16,2$	0,9855
Ocratoxina A (modo negativo)	0,38-6	$y = 1,1 \times 10^4 x - 5,5$	0,9918
Fuminisina B1 (modo positivo)	7,8-250	$y = 3024,4x - 560,7$	0,9948
Fumonisina B2 (modo positivo)	1,8-250	$y = 1493,8x + 138,4$	0,9923
Zearalenona (modo positivo)	6,25-400	$y = 964,4 x + 977,8$	0,9985

- Determinar a humidade por intermédio de vários métodos de referência e expeditos. Participação no circuito inter-laboratorial para a revisão da ISO 6540 ‘Maize -- Determination of moisture content (on milled grains and on whole grains)’.
- Participámos ainda no exercício de validação interlaboratorial organizado pelo BIPEA para comparar o teor de humidade no milho em grão inteiro e moído de acordo com a ISO 6540. Foram analisadas catorze amostras em catorze laboratórios para rever os valores da repetibilidade e reprodutibilidade do método ISO 6540.

Nas amostras recolhidas pela ANPROMIS, os valores de humidade foram determinados no grão moído de acordo com a metodologia descrita na ISO 6540 e os valores obtidos oscilaram de 12,6% a 18,7%.

B. Execução Financeira:

Em relação à execução financeira do projecto, até ao momento ainda não foi possível às Entidades parceiras entregar qualquer Pedido de Pagamento, o que será efectuado durante as próximas semanas.

Designação das entidades	Investimento Elegível Aprovado (€) ⁽¹⁾	Investimento Elegível Realizado (€) ⁽²⁾	Taxa de Execução (%) ⁽³⁾
ANPROMIS	120.620,56€		
AGROMAIS	74.832,49€		
Instituto da Soldadura e Qualidade	94.803,90€		
INIAV	146 430,34		
Sociedade Agrícola da Quinta da Labruja	5.393,66€		
Sociedade Agrícola de S. João de Brito	8.209,39€		
Quinta da Chloda	9.043,78€		
Arminda Aurora D. Henriques Sousa Luz	8.715,65€		
Maria Francisca H. Luz Lino Caetano	7.775,46€		

C. Desvios:

Como referido ao longo deste relatório e apesar da *Decisão de Aprovação* final da candidatura ter ocorrido em 26/07/2017, o plano inicialmente previsto foi cumprido na sua quase totalidade. No entanto e no diz respeito às detecções dos fungos nas amostras de grão de milho recolhidas e uma vez que o processo de implementação e validação dos métodos requereu mais esforços do que o previsto inicialmente esta tarefa não pode ser concluída na sua totalidade. O “barcoding gene” ITS tem sido de uso generalizado, contudo o mesmo não se passa com outros genes que, inclusivamente, ainda não foram considerados como “barcoding”. As amostras foram assim conservadas em frio e estão em boas condições para a deteção e identificação a realizar durante 2018.

Lisboa, 29 de Março de 2018