



## Relatório anual de progresso

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

Identificação de todas as entidades 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**

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: **28/02/2019**

### **A. Execução Física:**

As acções foram desenvolvidas de acordo com o plano de acção previsto.

Neste segundo ano, demos continuidade à instalação dos ensaios de milho na Estação Experimental António Teixeira (Coruche) e nas cinco explorações agrícolas localizadas na zona da Golegã, articulando com os diversos parceiros as variedades de milho a semear, o tipo de adubo a aplicar, o fungicida de solo 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 - Agromais

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 as análises laboratoriais.

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 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 ação das micotoxinas é de 20 ppb e um só grão de milho infectado (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 directivas Europeias para os controlos 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)																					
<b>ToF-MS</b> 5600+ Sciex	ESI+ e ESI- Full-scan 100-920 Da	<i>Coluna:</i> Eclipse Plus C18 - 2,1X50 mm, 1,8 µm <i>Fluxo:</i> 0,5 mL.min <sup>-1</sup> <i>Fase móvel [A]</i> ácido fórmico 0,1% (v/v) em água <i>Fase móvel [B]</i> ácido fórmico 0,1% (v/v) em acetonitrilo <i>T<sub>coluna</sub>:</i> 40 °C <i>V<sub>injeção</sub>:</i> 10 µL <i>Gradiente:</i> <table border="1" style="margin-left: auto; margin-right: auto;"> <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																					
<b>MS/MS</b> 5500+ Sciex	ESI+ e ESI- MRM (duas transições iónicas otimizadas)																						

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 <sup>2</sup> )
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	$y = 964,4x + 977,8$	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 30 amostras recolhidas, 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%.

Por outro lado e de forma a aumentar a garantia dos resultados apurados, foram efectuadas três repetições laboratoriais das amostras recolhidas durante a campanha agrícola 2018, num total de 50 análises.

Tabela 3. Amostras de milho – Campanha Agrícola 2018 (Coruche e Golegã)

Nº Amostra	Exploração Agrícola	Variedade de Milho	Modalidade Fertilização	Sistema de Rega	Humidade à Colheita	Peso Específico	Temp. (°C)
EEAT01	EEAT	P0933	Convencional	Gota	15,9%	77,3	27°C
EEAT02	EEAT	Hellium	Convencional	Gota	14,4%	71,2	26°C
EEAT03	EEAT	P0933	Convencional	Pivot	14,2%	78,5	27°C
EEAT04	EEAT	Hellium	Convencional	Pivot	13,9%	73,1	27°C
EEAT05	EEAT	Ixabel	Convencional	Pivot	19,8%	73,4	25°C
MV01	EEAT	DKC6761	C/MO; S/P	Pivot	19,5%	73,5	23°C
MV02	EEAT	DKC6761	C/MO; S/P; C/Mg	Pivot	18,9%	73,2	25°C
MV03	EEAT	DKC6761	C/MO; S/P; C/Micros	Pivot	19,5%	73	26°C
MV04	EEAT	DKC6761	C/MO; S/P; C/Micros; C/Ca	Pivot	21,3%	71,7	25°C
MV05	EEAT	DKC6761	C/MO; C/P; (C/Micros); C/Ca	Pivot	21,7%	73,4	23°C

MV06	EEAT	DKC6761	C/MO; C/P;	Pivot	19,9%	73,5	24°C
MV07	EEAT	DKC6031	S/MO; c/ adubação	Pivot	16,3%	73,9	25°C
MV08	EEAT	DKC6761	S/MO; C/P;	Pivot	19,6%	72,7	26°C
MV09	EEAT	DKC6761	S/MO; C/P; C/Micros	Pivot	19,4%	74,0	25°C
MV010	EEAT	DKC6031	S/MO C/P; C/Micros	Pivot	16,7%	72,4	25°C
MV011	EEAT	DKC6031	S/MO; C/P; C/Micros; C/Ca	Pivot	16,4%	73,5	25°C
MV012A	EEAT	DKC6761	S/MO; C/P; C/MicroS; C/Ca	Pivot	18,0%	73,3	25°C
MV012B	EEAT	DKC6761	S/MO; C/P; C/MicroS; C/Ca	Pivot	19,9%	71,5	25°C
MV013	EEAT	DKC6761	S/MO; S/P; C/MicroS; C/Ca	Pivot	20,0%	71,6	24°C
MV014	EEAT	DKC6761	S/MO; S/P; C/Micros	Pivot	17,6%	73,4	24°C
MV015	EEAT	DKC6761	S/MO; S/P; C/Mg	Pivot	17,5%	74,0	25°C
MV016	EEAT	DKC6761	S/MO; S/P	Pivot	19,3%	72,2	24°C
L01	Soc. Labruja	P0933	Variação de fósforo	Pivot	15,1%	79,1	14
L02	Soc. Labruja	P0933	Micronutrientes	Pivot	15,0%	78,9	15
L03	Soc. Labruja	P0933	Matéria Orgânica	Pivot	16,6%	78,0	14
JC 4 Test	Cholda	P0933	Convencional	Pivot	19,5%	77,1	14
SJB 8	São João de Brito	P0933	Fósforo	Pivot	19,5%	73,5	15
SJB 6 Test	São João de Brito	P0933	Convencional	Pivot	19,6%	75,5	15
JC 3 E	Cholda	P0933	Micronutrientes	Pivot	18,9%	77,7	16
SJB 7 FB	São João de Brito	P0933	Desinfetante de solo	Pivot	20,0%	74,7	15

Em relação à tarefa 3.1 “Desenvolvimento de um sistema de monitorização (Hr e T - armazenamento) foram instalados pelo ISQ sensores de temperatura e humidade, com comunicação wireless para monitorização do milho armazenado nos silos e no armazém da Agromais.

Estes dados são obtidos remotamente em tempo real e consultados em forma gráfica o que permite uma tomada de decisão assertiva e rápida.

No milho proveniente dos ensaios em campo, sondas de CO<sub>2</sub> foram instaladas, uma vez que este indicador pode ser uma ferramenta válida para detecção precoce das actividades dos fungos.

Na tarefa 4 “Desenvolvimento de um sistema de apoio à decisão” foi desenvolvida toda a base de dados e o *front-end* da plataforma “MICOTOX ALERT”, com classificação de diferentes tipologias de usuários, produtores (exploração agrícola) e agrupamento de produtores (armazenamento).

Os modelos de previsão irão correr nesta plataforma e terão por base os dados que estão a ser recolhidos remotamente pelos sensores, bem como todos os dados provenientes dos cadernos de campo das explorações agrícolas onde decorreram os ensaios.

Informações meteorológicas das explorações agrícolas em estudo foram obtidas através da rede de estações meteorológicas pertencentes à Agromais.

### B. Execução Financeira:

Em relação à execução financeira do projecto, até ao momento apenas falta o INIAV entregar o seu primeiro Pedido de Pagamento, o que será efectuado até ao final do corrente mês.

Designação das entidades	Investimento Elegível Aprovado (€) <sup>(1)</sup>	Investimento Elegível Realizado (€) <sup>(2)</sup>	Taxa de Execução (%) <sup>(3)</sup>
ANPROMIS	120.620,56€	28.672,38	24%
AGROMAIS	74.832,49€	13.412,73	18%
Instituto da Soldadura e Qualidade	94.803,90€	24.747,52	26%
INIAV	146 430,34	--	0%
Sociedade Agrícola da Quinta da Labruja	5.393,66€	640,78	12%
Sociedade Agrícola de S. João de Brito	8.209,39€	623,96	7%
Quinta da Chloda	9.043,78€	1.843,45	20%
Arminda Aurora D. Henriques Sousa Luz	8.715,65€	1.685,40	20%
Maria Francisca H. Luz Lino Caetano	7.775,46€	1.360,67	17%

### C. Desvios:

Como referido ao longo deste relatório, o plano inicialmente previsto foi cumprido na sua quase totalidade.

Os resultados das análises laboratoriais que têm sido obtidos ao longo do projecto, têm-nos permitido orientar as tarefas a implementar de acordo com o melhor interesse para atingir os objectivos que nos propomos atingir.

Ao nível da divulgação do projecto, a ANPROMIS participou em diversos fóruns onde foi divulgada a existência deste projecto, nomeadamente na Cimeira da Inovação “AgroInovação” que teve lugar no passado dia 29 de Outubro, em Oeiras, e que contou com participação de cerca de 400 pessoas.

Lisboa, 28 de Fevereiro de 2019