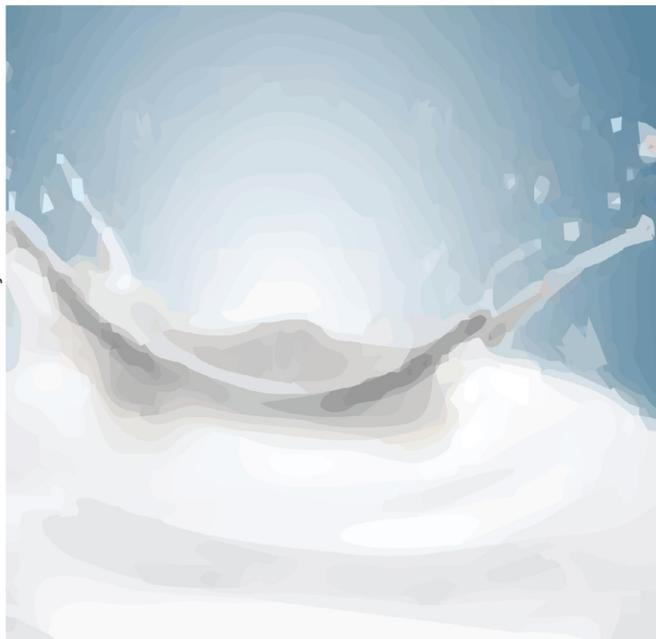


Contaminante em Leite: Análise de Aflatoxina M1 por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detecção por Fluorescência - CLAE/DFL

Izabela Miranda de Castro¹
Alessandra da Silva Teixeira²
Marianna Ramos dos Anjos³
Sabrina Neves Santos⁴

Ilustração: André Luis do N. Gomes



Introdução

As aflatoxinas M1 e M2 são metabólitos hidroxilados das aflatoxinas B1 e B2, respectivamente, produzidas por animais e geralmente excretadas no leite e urina de gado e de outras espécies de mamíferos que consumiram alimento ou ração contaminada por essas aflatoxinas (CREPPY, 2002).

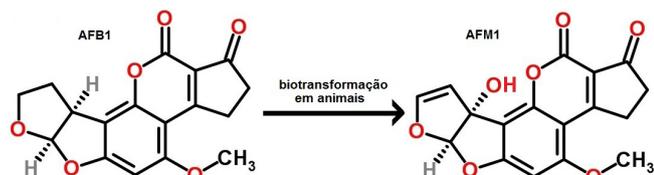


Figura 1. Estrutura das aflatoxinas B1 e M1 (CREPPY, 2002).

A designação “M” origina-se de *milk toxin* por ser uma toxina excretada no leite. A concentração de aflatoxina M1 (AFM1) encontrada no leite é cerca de 1% do valor existente na ração. A aflatoxina M1 possui alta atividade genotóxica, embora seja aproximadamente 10 vezes menos carcinogênica que a aflatoxina B1 (BAGGIO, 2006). Segundo o IARC Working Group on

the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans (2002), a aflatoxina B1 e a aflatoxina M1 estão classificadas como grupo 1, carcinogênicas para humanos, tendo a Organização Mundial de Saúde recomendado a redução dos níveis de AFM1 ao mínimo, de modo a minimizar o risco potencial, desde que até o momento não há informação suficiente para estabelecer um nível de exposição razoável. A maioria dos países regulamenta os níveis máximos de Aflatoxina M1 para leite e seus derivados (BRASIL, 2011; EUROPEAN UNION, 2010).

Leite e derivados são alimentos importantes na dieta humana, sendo a melhor fonte de cálcio para o organismo, e servindo de alimento básico para a alimentação infantil. A pasteurização ou o processamento do leite não destroem a AFM1, uma vez que a mesma associa-se à fração proteica (caseína), ficando nela retida. Porém, a literatura é contraditória quando se refere à influência do processamento no conteúdo de AFM1 no leite (SCUSSEL et al., 2008). A exposição humana à AFM1 pela ingestão de leite contaminado pode trazer riscos à saúde humana, sendo potencializado principalmente na população infantil. Neste contexto, é recomendado um monitoramento para controlar os níveis de contaminação de AFM1 em leite para que, em longo

¹ Química, Ph.D. em Geoquímica Orgânica Molecular, pesquisadora da Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro, RJ, izabela.castro@embrapa.br

² Engenheira de Alimentos, M.Sc. em Ciência e Tecnologia de Alimentos, técnica da Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro, RJ, alessandra.teixeira@embrapa.br

³ Química, analista da Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro, RJ, marianna.anjos@embrapa.br

⁴ Química, bolsista CNPq-Brasil, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, brininha_neves@hotmail.com

prazo, não haja danos à saúde da população. O objetivo deste trabalho foi implantar uma metodologia de análise de AFM1 em amostras de leite bovino fluido e em pó.

Método de Análise de Aflatoxina M1

O método proposto para quantificação de AFM1 foi validado para a matriz leite bovino, e utiliza, como primeira etapa da análise, a centrifugação da amostra para separar a gordura da parte aquosa do leite, como foi descrito por Dragacci et al. (2001). A AFM1 permanece na fase aquosa e não há extração da aflatoxina com solventes - o analito é quantificado diretamente na parte aquosa da matriz. No presente método, a etapa de *clean up* consiste na purificação da parte aquosa através de colunas de imunoafinidade. A quantificação é feita por padronização externa em sistema de cromatografia líquida de alta eficiência com detector de fluorescência - CLAE/DFL.

Amostras

Foram analisadas 62 amostras de leite fluido do tipo UHT e de leite em pó. Dentre estas amostras, 39 eram de leite integral, sendo 31 de leite fluido e oito em pó (3% de gordura), 17 de leite desnatado (0,5% de gordura) e seis de semidesnatado (2% gordura).

Preparo das amostras

As amostras de leite fluido foram analisadas diretamente, enquanto que as amostras de leite em pó foram reconstituídas com água ultrapura na proporção 1:10 (p/v). Para análise do leite, fluido ou em pó reconstituído, um volume de 100 mL de cada amostra foi pesado em balança analítica. As amostras de leite integral e semidesnatado foram centrifugadas a 5000 g a 4°C por 15 min, sendo retirada a camada de gordura. Para o leite desnatado não foi necessária a etapa de centrifugação.

Purificação

O procedimento de purificação consistiu em passar o volume de 50 mL do leite na coluna de imunoafinidade Aflaprep® M com fluxo de 2-3 mL/min. A seguir as colunas foram lavadas com 10 mL de tampão PBS (*phosphate buffered saline*). A AFM1 retida na coluna foi eluída com 2 mL de metanol. O eluato foi levado à secura, sob atmosfera de nitrogênio, em banho-maria a 40°C. A seguir, ressuspendeu-se com 1 mL da fase móvel água: acetonitrila: metanol (55:30:15).

Quantificação pelo Sistema CLAE/DFL

Curva analítica

Partindo de uma solução padrão certificada, foram preparadas sete soluções com concentrações diferentes da AFM1 para os sete pontos da curva. As concentrações nas curvas de calibração para AFM1 variaram na faixa de 0,05 a 2,50 µg/L.

Sistema CLAE/DFL

Utilizou-se um sistema cromatográfico Waters, composto de amostrador automático WAT717, bomba quaternária WAT600, degasser, forno de colunas a 35°C e detector de fluorescência WAT2475.

Parâmetros cromatográficos

Coluna cromatográfica: X Terra® RP 18, (4,6 x 250 mm; 5 µm); fase móvel: fase ternária composta por acetonitrila, metanol e água ultrapura (30:15:55) com fluxo de 1 mL/min em modo isocrático. Detector de fluorescência: λ excitação - 360nm e λ emissão - 430nm; volume de injeção: 40 µL.

Ensaio de recuperação

Foram conduzidos ensaios de recuperação em três níveis de contaminação com sete replicatas em cada nível. Nestas análises foram usados os procedimentos descritos para o modo de preparo e extração seguidos da quantificação pelo sistema CLAE-DFL. Os níveis de contaminação aplicados foram: 0,012 µg/kg (nível 1), 0,025 µg/kg (nível 2) e 0,050 µg/kg (nível 3). Em cada análise, a concentração encontrada foi comparada à quantidade teórica adicionada em cada nível de fortificação para efeito do cálculo da porcentagem de recuperação.

Avaliação do Método de Análise

O cromatograma obtido para a análise da solução padrão de AFM1 está mostrado na Figura 2. Pode-se observar que o mesmo apresenta uma ótima resolução cromatográfica com as condições cromatográficas aplicadas.

A validação de um procedimento analítico tem como objetivo a comprovação de que o método a ser utilizado é apropriado à finalidade para a qual foi desenvolvido. Os parâmetros considerados neste trabalho incluem a linearidade (coeficiente de correlação), a taxa de recuperação e os limites de quantificação e de detecção.

A linearidade do método, avaliada para uma determinada faixa de trabalho, corresponde ao intervalo de concentrações do analito usadas na composição da curva de calibração e deve, obrigatoriamente, apresentar coeficiente de correlação (R^2) adequado. A construção das curvas analíticas para a AFM1, que foi realizada através do método de ajuste pelos mínimos quadrados, permite a quantificação da aflatoxina devendo, obrigatoriamente, apresentar linearidade adequada. A curva obtida, com seu respectivo coeficiente de correlação (R^2), encontra-se na Figura 3.

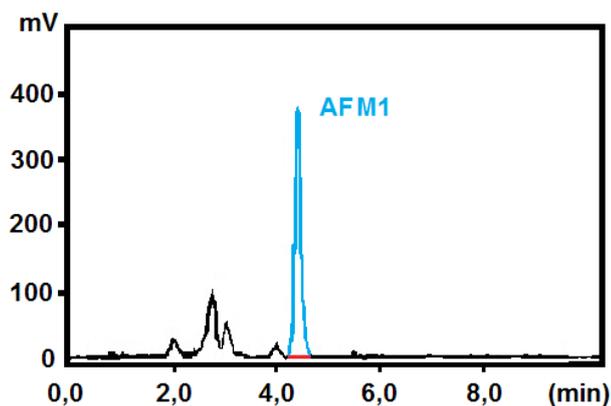


Figura 2. Cromatograma da solução padrão de AFM1 no sistema CLAE-DFL

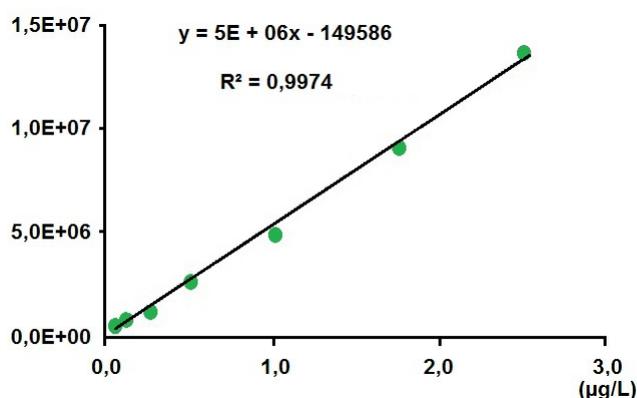


Figura 3. Curva Analítica da AFM1 obtida no sistema CLAE-DFL

O valor obtido de R^2 para a curva de AFM1 (0,997) demonstra a linearidade da curva obtida. Assim, a faixa de trabalho do método, que corresponde ao intervalo de concentrações usado na composição da curva de calibração, foi linear e pode ser usada para quantificação. Outro parâmetro importante na validação de um método é a porcentagem de recuperação. Este valor corresponde à razão entre a quantidade do analito adicionada à amostra e a quantificada pelo método analítico e a quantidade teórica adicionada à matriz antes do procedimento.

$$\% \text{ recuperação} = \frac{\text{massa analito quantificada}}{\text{massa de padrão teórica adicionada}} \times 100\%$$

As médias das recuperações obtidas das sete replicatas para a AFM1 analisada pelo presente método encontram-se na Tabela 1. O valor médio dos ensaios de recuperação foi de 85% e está adequado às exigências da União Europeia, pois todos os valores encontrados se encontram na faixa aceita pelo DG SANCO (METHOD..., 2012) que é de 70 a 120%.

Tabela 1. Taxas de recuperação das aflatoxinas em leite fluido para os três níveis de fortificação.

Aflatoxina M1	Nível 1*	Nível 2*	Nível 3*
Média	92%	83%	80%
RSD	8%	11%	4%

*os valores apresentados representam a média de sete replicatas

Os limites de detecção (LDI) e quantificação (LQI) instrumentais foram calculados através da relação sinal/ ruído do detector de fluorescência para o padrão de AFM1 nas condições da análise. Foram assumidos os valores de 3 e 10 vezes o ruído para os limites de detecção e de quantificação, respectivamente. Os valores de LDI e de LQI da aflatoxina M1 para o método proposto foram 0,001 e 0,003 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

As amostras de leite fluido UHT avaliadas neste estudo mostraram concentração média de 0,039 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de AFM1 e concentrações que variaram na faixa de 0-0,183 $\mu\text{g}/\text{kg}$. O limite máximo tolerado no Brasil para AFM1 em leite fluido é de 0,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$, conforme estabelecido pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (2011).

Considerações Finais

O método proposto para análise de aflatoxina M1 com uma etapa de purificação com colunas de imunoafinidade e posterior análise por CLAE-DFL demonstrou ser adequado para as matrizes de leite bovino fluido e em pó, além de ser de execução relativamente simples. O uso de um detector seletivo e sensível como o detector de fluorescência, permitiu a obtenção de cromatogramas onde a presença de interferentes não prejudicou a quantificação do analito nas amostras. Observou-se comportamento linear para a curva na faixa de trabalho do método e os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) obtidos são apropriados e possibilitam a quantificação desta micotoxina em baixas concentrações, mesmo para a Comunidade Europeia onde o limite máximo tolerável para AFM1 é de 0,05 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (EUROPEAN UNION, 2010), 10 vezes mais baixo que o limite da legislação brasileira (BRASIL, 2011). Desta forma, o método proposto é capaz de atender aos limites mínimos exigidos para quantificação desta aflatoxina para qualquer legislação, além de ser de fácil execução, não envolvendo o uso de solventes para a extração e de ter mostrado alta sensibilidade e precisão.

Referências

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC n° 7, de 18 de fevereiro de 2011. Dispõe sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 9 mar. 2011.

BAGGIO, E. C. R. **Determinação de aflatoxina M1 em leite pasteurizado pelos métodos de CCD e CLAE utilizando coluna de imunoafinidade**. 2006. 95 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

CREPPY, E. E. Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe. **Toxicology Letters**, v. 127, n. 1-3, p. 19-28, Feb. 2002.

DRAGACCI, S.; GROSSO, F.; GILBERT, J. Immunoaffinity column clean up with liquid chromatography for determination of aflatoxin m1 in liquid milk: collaborative study. **Journal of AOAC International**, v. 84, n. 2, p. 437-443, 2001.

EUROPEAN UNION. Commission Regulation (EU) n° 165/2010, of 26 February 2010, amending Regulation (EC) n° 1881/2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs as regards aflatoxins. **Official Journal of the European Union**, L 50, p. 8-12, Feb. 2010.

IARC WORKING GROUP ON THE EVALUATION OF CARCINOGENIC RISKS TO HUMANS. **Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene**. Lyon, 2002. (IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, v. 82).

METHOD validation and quality control procedures for pesticide residues analysis in food and feed: document n. SANCO/12495/2011: supersedes document n. SANCO/10684/2009: implemented by 01/01/2012. Disponível em: <http://ec.europa.eu/food/plant/protection/pesticides/docs/qualcontrol_en.pdf>. Acesso em: 7 jul. 2012.

SCUSSEL, V. M.; ROCHA, M. U. J. da; LORINI, I.; SABINO, M.; ROSA, C. A. da R.; CARVAJAL, M. M. (Ed.). **Atualidades em micotoxinas e armazenagem qualitativa de grãos II**. Florianópolis: Imprensa Universitária, 2008. 586 p.

Comunicado Técnico, 199

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:
Embrapa Agroindústria de Alimentos
Endereço: Av. das Américas, 29.501 - Guaratiba
 23020-470 - Rio de Janeiro - RJ
Fone: (0XX21) 3622-9600
Fax: (0XX21) 3622-9713
Home Page: <http://www.ctaa.embrapa.br>
E-mail: ctaa.sac@embrapa.br

1ª edição

1ª impressão (2013): tiragem (50 exemplares)

Comitê de Publicações

Presidente: Virgínia Martins da Matta
Membros: André Luis do Nascimento Gomes, Daniela De Grandi Castro Freitas, Leda Maria Fortes Gottschalk, Luciana Sampaio de Araújo, Ilana Felberg, Marília Penteado Stephan, Michele Belas Coutinho, Renata Torrezan

Expediente

Supervisão editorial: Daniela De Grandi C. Freitas
Revisão de texto: Janine Passos Lima da Silva
Normalização bibliográfica: Luciana S. de Araújo
Editoração eletrônica: André Luis do N. Gomes e Marcos Moulin