

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E
TECNOLOGIA DOS ALIMENTOS**

**VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA
ANÁLISE DE AFLATOXINA M₁ E SUA OCORRÊNCIA
EM LEITE BOVINO COMERCIALIZADO
NO SUL DO BRASIL**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Maurício Schneider Oliveira

Santa Maria, RS, Brasil

2010

**VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA
ANÁLISE DE AFLATOXINA M₁ E SUA OCORRÊNCIA NO
LEITE BOVINO COMERCIALIZADO NO SUL DO BRASIL**

por

Maurício Schneider Oliveira

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, área de concentração em Ciência Tecnologia de Alimentos, linha de pesquisa em Qualidade dos Alimentos, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos**

Orientador: Prof. Dr. Ernesto Hashime Kubota

Santa Maria, RS, Brasil

2010

Oliveira, Maurício Schneider, 1985-
O48v Validação de metodologia analítica para análise de aflatoxina M₁ e sua ocorrência no leite bovino comercializado no sul do Brasil / Maurício Schneider Oliveira. – Santa Maria, 2010.
105 f. ; il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos, 2010.
“Orientador: Prof. Dr. Ernesto Hashine Kubota”

1. Ciência e Tecnologia dos Alimentos 2. Leite
3. Aflatoxina M₁ 4. Validação I. Kubota, Ernesto Hashine II. Título

CDU: 637.12

Ficha catalográfica elaborada por
Patrícia da Rosa Corrêa – CRB 10/1652
Biblioteca Setorial do Centro de Ciências Rurais/UFSM

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Rurais
Programa de Pós-Graduação em
Ciência e Tecnologia de Alimentos**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

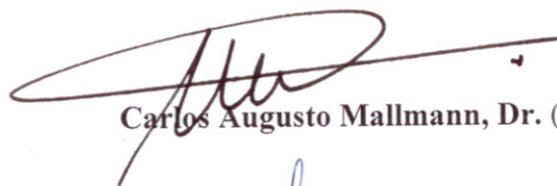
**VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA ANÁLISE DE
AFLATOXINA M₁ E SUA OCORRÊNCIA NO LEITE BOVINO
COMERCIALIZADO NO SUL DO BRASIL**

elaborada por
Maurício Schneider Oliveira

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos

COMISSÃO EXAMINADORA:

Ernesto Hashime Kubota, Dr. (UFSM)
(Presidente/Orientador)



Carlos Augusto Mallmann, Dr. (UFSM)



Maria José Moreira Batatinha, Dr^a. (UFBA)

Santa Maria, 11 de março de 2010

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Ney e Rosa, por tudo que eles me ensinaram e ensinam a cada dia, sendo exemplos de vida para mim.

Ao amigo e professor Carlos Augusto Mallmann, muito obrigado pela amizade e aprendizado proporcionado ao longo da realização deste trabalho.

A minha namorada Fernanda Maria Butzen, muito obrigado pelo carinho, apoio, incentivo e principalmente paciência.

Ao Mauro e a Ana Flávia, meu irmão e minha cunhada, exemplos a serem seguidos.

Ao professor Ernesto Hashime Kubota, muito obrigado pela orientação e parceria no desenvolvimento deste trabalho.

A todos meus amigos e colegas de LAMIC, muito obrigado por auxiliarem a realização deste trabalho através de orientações, discussões científicas e momentos de descontração.

Agradeço a Universidade Federal de Santa Maria e ao Curso de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos pela oportunidade de fazer parte de seu corpo discente.

Ao Laboratório de Análises Micotoxicológicas (LAMIC) por viabilizar o desenvolvimento deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos
Universidade Federal de Santa Maria

VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA ANÁLISE DE AFLATOXINA M₁ E SUA OCORRÊNCIA NO LEITE BOVINO

COMERCIALIZADO NO SUL DO BRASIL

AUTOR: MAURÍCIO SCHNEIDER OLIVEIRA

ORIENTADOR: ERNESTO HASHIME KUBOTA

Local e Data da Defesa: Santa Maria, 11 de março de 2010

Micotoxinas são substâncias tóxicas resultantes do metabolismo secundário de diversas linhagens de fungos. Dentre as micotoxinas conhecidas, as aflatoxinas são consideradas as de maior importância devido a sua presença e magnitude de contaminação em alimentos destinados ao consumo humano e animal. A partir da observação de que animais produtores de leite que consumam ração contaminada com aflatoxina B₁ irão excretar aflatoxina M₁ em seu leite, faz-se necessário o desenvolvimento de mecanismos seguros e confiáveis para análise deste contaminante. O leite é um dos mais completos alimentos disponíveis “*in natura*” para o homem, apresentando uma balanceada composição em nutrientes, sendo seu consumo recomendado em todas as etapas de desenvolvimento do ser humano, principalmente nas fases iniciais da vida. Neste trabalho foi validada uma metodologia de análise de aflatoxina M₁ em leite fluido e em pó, baseada em extração e purificação com coluna de imunoafinidade com posterior separação e detecção por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas sequencial. Os limites de detecção e quantificação determinados foram 0,003 e 0,007 µg L⁻¹ para leite fluido e 0,003 e 0,125 µg L⁻¹ para leite em pó. Os coeficientes de recuperação globais para o método de extração de aflatoxina M₁ foram 95,2% para leite fluido e 95,9% para leite em pó, com desvio padrão relativo de 5,7% e 5,3%, respectivamente. Em seguida ao desenvolvimento e validação do método analítico foi realizado um estudo de ocorrência de aflatoxina M₁ em amostras de leite fluido e de leite em pó. No total foram analisadas 173 amostras, sendo 123 de leite fluido, divididas em: 23 amostras de leite cru, 21 amostras de leite pasteurizado e 79 amostras de leite UHT, obtidas em estabelecimentos comerciais nos três estados da região sul do Brasil e 50 amostras de leite em pó, obtidas em estabelecimentos comerciais do estado do Rio Grande do sul. Os resultados encontrados mostram uma ocorrência de positividade de 90,2% (111) nas amostras de leite fluido, em níveis de concentração de 0,01 - 0,60 µg L⁻¹ com contaminação média de 0,07 µg L⁻¹. Para as amostras de leite em pó, 100% (50) estavam contaminadas, em níveis de concentração de 0,06 - 1,58 µg L⁻¹ com contaminação média de 0,54 µg L⁻¹. Das amostras de leite fluido 46% (57) excederam os limites máximos permitidos de aflatoxina M₁ em leite, propostos pela legislação da União Européia (0,05 µg L⁻¹) e 0,8% (1) excederam os limites máximos permitidos propostos pela legislação brasileira (0,5 µg L⁻¹). Em relação às amostras de leite em pó, 98% (49) excederam os limites máximos permitidos propostos pela legislação da União Européia. Baseado nos resultados encontrados o método mostrou-se sensível e adequado para determinação de aflatoxina M₁ nos níveis propostos pelas legislações brasileira e européia. A alta ocorrência de aflatoxina M₁ nas amostras analisadas sugere que o monitoramento da aflatoxina M₁ em leite deve ser um procedimento contínuo em nossa região.

Palavras-chave: aflatoxina M₁, leite, validação.

ABSTRACT

Master Dissertation
Post-Graduate Program in Food Technology and Science
Federal University of Santa Maria

VALIDATION OF ANALYTICAL METHOD FOR ANALYSIS OF AFLATOXIN M₁ AND MILK CONTAMINATION TRADED IN THE SOUTH OF BRAZIL

AUTHOR: MAURÍCIO SCHNEIDER OLIVEIRA

ADVISER: ERNESTO HASHIME KUBOTA

Date and Place of defense: Santa Maria, March 11, 2010

Mycotoxins are toxic substances resulting from the secondary metabolism of different strains of fungi. Among the known mycotoxins, aflatoxins are considered the most important, due to its presence and magnitude of contamination in food intended for human consumption and animal. From the observation that milk-producing animals that consume feed contaminated with aflatoxin B₁ aflatoxin M₁ will excrete in their milk, it is necessary to develop mechanisms for accurate and reliable analysis of this contaminant. Milk is one of the most complete foods "naturally" available for man, with a balanced composition of nutrients; their consumption is recommended for all stages of human development, especially in the early stages of life. This work validated a methodology for analysis of aflatoxin M₁ in fluid milk and milk powder, based on the extraction and purification with immunoaffinity column with subsequent separation and detection by liquid chromatography coupled to high performance tandem mass spectrometry. The limits of detection and quantification were determined 0.003 and 0.007 µg L⁻¹ for fluid milk and 0.003 and 0.125 µg L⁻¹ for milk powder. The coefficients of global recovery for the method of extraction of aflatoxin M₁ were 95.2% for fluid milk and 95.9% for milk powder, with a standard deviation of 5.7% and 5.3% respectively. Following the development and validation of the analytical method was a study of the occurrence of aflatoxin M₁ in milk samples and fluid samples of milk powder. At a total, 173 samples were analyzed, being 123 of them for fluid milk, divided into: 23 raw milk samples, 21 samples of pasteurized milk, and 79 samples of milk UHT; obtained from outlets in the three states of southern Brazil. For milk powder were analyzed 50 samples obtained from retailers in the state of Rio Grande do Sul. The results showed an incidence of positivity of 90.2% (111) in samples of fluid milk in concentration levels from 0.01 - 0.60 µg L⁻¹ with an average contamination of 0.07 µg L⁻¹. For samples of milk powder, 100% (50) were contaminated at levels of concentration from 0.06 - 1.58 µg L⁻¹ with average contamination of 0.54 µg L⁻¹. For samples of liquid milk, 46% (57) exceeded the maximum permitted levels of aflatoxin M₁ in milk, proposed by the European Union legislation (0.05 µg L⁻¹) and 0.8% (1) exceeded the proposed maximum permitted by Brazilian legislation (0.5 µg L⁻¹). For the samples of milk powder, 98% (49) exceeded the maximum allowed by the proposed European Union legislation. Based on these results, the method was sensitive and suitable for determination of aflatoxin M₁ levels proposed by the Brazilian and European legislations. The high occurrence of aflatoxin M₁ in the samples suggests that the monitoring of aflatoxin M₁ in milk should be a continuous process in our region.

Keywords: aflatoxin M₁, milk, validation

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura química das principais aflatoxinas	19
Figura 2 – Mecanismos de biotransformação da aflatoxina B ₁	24
Figura 3 – Princípio de extração e purificação utilizando colunas de imunoafinidade ..	39
Figura 4 – Experimento Q1 MS, ionização, ESI, modo positivo [M+H] ⁺	68
Figura 5 – Experimento Q1 MS, ionização, APCI, modo positivo [M+H] ⁺	69
Figura 6 – Experimento de fragmentação e identificação dos íons produtos (<i>m/z</i> 273; <i>m/z</i> 259; <i>m/z</i> 229) da molécula <i>m/z</i> 329,1.....	69
Figura 7 – Experimento Precursor íon para confirmação da origem dos íons produtos Prec.ion 273 > 329 (A), Prec. ion 259 > 320 (B) e Prec. ion 229 > 329(C).....	70
Figura 8 – Experimento neutral loss, confirmação da perda molecular e geração do fragmento NL 56 329 > 273 (A), NL 70 329 > 259 (B) e NL 100 329 > 229 (C).....	72
Figura 9 – Manifold para extração e purificação da aflatoxina M ₁	103
Figura 10 – Cartucho IAC com solvente de eluição	103
Figura 11 – Sistema de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas sequencial.....	103
Figura 12 – Curva para quantificação de leite fluido (A) e curva para quantificação de leite em pó (B)	104
Figura 13 – Cromatograma de um padrão de aflatoxina M ₁ (A), cromatograma de uma amostra “branco” (B) e cromatograma de uma amostra fortificada (C)	105

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Principais efeitos e sintomas da exposição as micotoxinas em três diferentes espécies animais	23
Tabela 2 – Percentuais de transferência de aflatoxina M ₁ para o leite	27
Tabela 3 – Composição média do leite de vaca	30
Tabela 4 – Limites máximos permitidos para aflatoxinas no Brasil, União Européia e Estados Unidos	34
Tabela 5 – Parâmetros de validação de métodos analíticos segundo a 2002/657/EC e ANVISA	51
Tabela 6 – Níveis de concentração e volumes adicionados as amostras de leite fluido e leite em pó, para preparo das fortificações, 0,5, 1 e 1,5 vezes	61
Tabela 7 – Parâmetros fonte-dependentes e composto-dependentes otimizados	74
Tabela 8 – Pontos de identificação – aflatoxina M ₁	74
Tabela 9 – Intensidade relativa dos íons produto e <i>RSD</i> (%)	74
Tabela 10 – Parâmetros das curvas analíticas para leite fluido e leite em pó, coeficiente angular, coeficiente linear e coeficiente de determinação r^2	75
Tabela 11 – Resultados para avaliação da linearidade dos níveis das curvas analíticas para leite fluido e leite em pó pelo teste (S/Q)	77
Tabela 12 – Valores obtidos para limite de detecção e quantificação instrumental (LOD _i e LOQ _i) e limite de detecção e quantificação do método (LOD _m e LOQ _m) em $\mu\text{g L}^{-1}$	77
Tabela 13 – Resultados obtidos para o ensaio de exatidão	79
Tabela 14 – Resultados repetitividade do instrumento (<i>RSD</i> _{ri}) e precisão intermediária do instrumento (<i>RSD</i> _{pri})	80
Tabela 15 – Resultados repetitividade do método (<i>RSD</i> _{rm}) e precisão intermediária do método (<i>RSD</i> _{pim})	80
Tabela 16 – Valores obtidos para o ensaio de recuperação (%) e <i>RSD</i>	81
Tabela 17 – Resultados obtidos para o ensaio de robustez. Os parâmetros avaliados foram vazão da fase móvel (alteração $\pm 5\%$) e temperatura do forno da coluna ($\pm 8\%$) .	82
Tabela 18 – Resultados para o teste de proficiência inter-laboratorial FAPAS [®] leite em pó	83

Tabela 19 – Ocorrência de aflatoxina M₁ em amostras de leite cru, leite pasteurizado, leite UHT e leite em pó	83
Tabela 20 – Estudos de ocorrência de aflatoxina M₁ em leite	88

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Af	– Aflatoxina
AfB ₁	– Aflatoxina B ₁
AfB ₂	– Aflatoxina B ₂
AfG ₁	– Aflatoxina G ₁
AfG ₂	– Aflatoxina G ₂
AfM ₁	– Aflatoxina M ₁
AfB _{2a}	– Aflatoxina B-2-alfa
AfQ ₁	– Aflatoxina Q ₁
ANVISA	– Agencia Nacional de Vigilância Sanitária
AOAC	– <i>Association of Oficial Agricultural Chemists</i>
API	– Ionização a pressão atmosférica
APCI	– Ionização química a pressão atmosférica
APPI	– Fotoionização a pressão atmosférica
A _w	– Atividade de água
°C	– <i>Celsius</i>
CAD	– <i>CAD Gas</i>
CRM	– <i>Certified Reference Material</i>
CUR	– <i>Curtain gas</i>
CXP	– <i>Collision Cell Exit Potential</i>
DP	– <i>Declustering Potential</i>
EAL	– <i>European Cooperation for Accreditation of Laboratories</i>
ELISA	– <i>Enzyme-Linked Immunosorbent-Assay</i>
EMBRAPA	– Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
EP	– <i>Entrance Potential</i>
ESI	– Ionização por <i>electrospray</i>
FAO	– <i>Food and Agriculture Organization</i>
FDA	– <i>Food and Drug Administration</i>
FIA	– <i>Flow Injection Analysis</i>
GS1	– Gás 1
GS2	– Gas 2
IAC	– <i>Immunoaffinity Chromatoraphy</i>

IARC	– <i>International Agency for Research on Câncer</i>
ICH	– <i>International Conference on Harmonization</i>
IEC	– <i>International Electrotechnical Commission</i>
INMETRO	– Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial
IS	– <i>Ionspray voltage</i>
ISO	– <i>International Organization for Standardization</i>
IUF	– Imuno-Ultrafiltração
IUPAC	– <i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
JEFCA	– <i>Joint Expert Commmittee on Food Additives</i>
LAMIC	– Laboratório de Análises Micotoxicológicas
LOD _i	– Limite de detecção do instrumento
LOQ _i	– Limite de quantificação do instrumento
LOD _m	– Limite de detecção do método
LOQ _m	– Limite de quantificação do método
MERCOSUL	– Mercado Comum do Sul
MRM	– <i>Multiple Reaction Monitoring</i>
nm	– Nanômetro
OMS	– Organização Mundial da Saúde
ppb	– Partes por bilhão
ppm	– Partes por milhão
RIISPOA	– Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal
RIA	– <i>Radio-Imuno-Assay</i>
rpm	– Rotações por minuto
RSD	– Desvio padrão relativo, do inglês <i>Relative Standard Deviation</i>
RSD _{pim}	– Desvio padrão relativo para precisão intermediária do método
RSD _{rm}	– Desvio padrão relativo para repetitividade do método
RSD _{pii}	– Desvio padrão relativo para precisão intermediária do instrumento
RSD _{ri}	– Desvio padrão relativo para repetitividade do instrumento
SIF	– Sistema Inspeção Federal
TEM -	– Temperatura
UFSM	– Universidade Federal de Santa Maria
UHT	– <i>Ultra-High Temperature</i>
WCRF	– <i>World Cancer Research Fundation</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 Objetivos	15
1.1.1 Objetivos Gerais	15
1.1.2 Objetivos Específicos	15
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1 Micotoxinas	16
2.2 Aflatoxinas	17
2.3 Toxicidade das aflatoxinas	20
2.3.1 Toxicidade das aflatoxinas – Humanos	20
2.3.2 Toxicidade das aflatoxinas – Animais	22
2.4 Metabolismo das aflatoxinas	22
2.5 Taxa de passagem da aflatoxina M₁ para o leite	25
2.6 Importância econômica e nutricional do leite	28
2.7 Estabilidade da aflatoxina M₁	30
2.8 Legislação	31
2.9 Amostragem	33
2.10 Métodos de triagem	35
2.11 Métodos quantitativos	36
2.12 Extração de aflatoxina M₁	36
2.13 Espectrometria de massas	40
2.13.1 Modos de ionização	41
2.13.1.1 Electrospray (ESI)	41
2.13.1.2 Ionização química a pressão atmosférica (APCI)	42
2.13.1.3 Fotoionização a pressão atmosférica (APPI)	42
2.14 Tipos de espectrômetros de massas	43
2.14.1 Quadrupolo	43
2.14.2 Triplo quadrupolo	43
2.14.3 <i>Time-of-flight</i>	44
2.14.4 <i>Íon trap</i>	44
2.14.5 Setor magnético	44

2.15 Técnicas de <i>scan</i>	45
2.15.1 Tipos de <i>scan</i> MS/MS	45
2.16 Validação de métodos analíticos	49
2.17 Controle de qualidade do método analítico	51
2.18 Parâmetros analíticos	52
2.18.1 Faixa de trabalho	52
2.18.2 Curva analítica e linearidade	53
2.18.3 Seletividade	54
2.18.4 Limite de detecção e limite de quantificação	55
2.18.5 Exatidão	55
2.18.6 Precisão	56
2.18.7 Recuperação	57
2.18.8 Robustez	57
3 MATERIAIS E MÉTODOS	59
3.1 Instrumentação	59
3.2 Materiais	59
3.3 Solventes, reagentes e padrões	60
3.4 Preparo das soluções analíticas	60
3.5 Preparo da curva analítica	61
3.6 Preparo das fortificações	61
3.7 Amostras de leite fluido e de leite em pó	62
3.8 Extração	62
3.8.1 Procedimento de extração de aflatoxina M ₁ para amostras de leite fluido	62
3.8.2 Procedimento de extração de aflatoxina M ₁ para amostras de leite em pó	62
3.9 Otimização do espectrômetro de massas	63
3.9.1 Modo de ionização	63
3.9.2 Intensidade relativa das transições	63
3.9.3 Pontos de identificação	64
3.10 Validação do procedimento analítico	64
3.10.1 Curva analítica e linearidade	64
3.10.2 Limite de detecção e limite de quantificação	65
3.10.3 Seletividade	65
3.10.4 Exatidão	65
3.10.5 Precisão	66

3.10.5.1 Repetitividade.....	66
3.10.5.2 Precisão intermediária	66
3.10.6 Recuperação	66
3.10.7 Robustez	67
3.10.8 Ensaio de proficiência	67
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	68
4.1 Otimização do espectrômetro de massas	68
4.2 Validação do procedimento analítico.....	75
4.2.1 Curva analítica e linearidade	75
4.2.2 Limite de detecção e limite de quantificação	76
4.2.3 Seletividade	77
4.2.4 Exatidão	78
4.2.5 Precisão	79
4.2.6 Recuperação	80
4.2.7 Robustez	82
4.2.8 Ensaio de proficiência	83
4.3 Aplicação do procedimento validado	83
5 CONCLUSÕES	90
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	91
APÊNDICES	103

1 INTRODUÇÃO

Muitos alimentos destinados ao consumo humano e animal são susceptíveis ao ataque fúngico em nível de campo e durante o seu armazenamento. Encontrando condições favoráveis estes fungos podem produzir micotoxinas como produtos de seu metabolismo secundário. A contaminação por micotoxinas é altamente variável e dependente de muitos fatores.

Entre as micotoxinas conhecidas, as aflatoxinas são consideradas as de maior importância no Brasil devido a sua presença e magnitude de contaminação dos alimentos. A presença de aflatoxinas na dieta causam impactos econômicos devido a perdas com a produtividade do animal ou destruição de produtos contaminados. Além de danos econômicos, as aflatoxinas podem causar sérios danos à saúde humana. A IARC classificou a aflatoxina B₁ como classe 1 (carcinogênico para humanos) e a aflatoxina M₁ como classe 2B (possivelmente carcinogênico para humanos).

A partir da observação de que animais produtores de leite que consumam ração contaminada com aflatoxina B₁ irão excretar aflatoxina M₁ em seu leite tornou-se necessário o desenvolvimento de metodologias analíticas sensíveis e confiáveis para determinação deste contaminante no leite e produtos lácteos. Mesmo as legislações adotando limites máximos permitidos cada vez mais baixos, não são possíveis prevenir quanto aos efeitos crônicos da aflatoxina M₁.

O leite é um dos mais completos e bem balanceados alimentos disponíveis para o homem, sendo seu consumo recomendado em todas as etapas de desenvolvimento do ser humano. Com a observação de que os processos a que o leite é submetido na indústria não parecem alterar os níveis de aflatoxina M₁ presentes no leite, um monitoramento contínuo deste contaminante parece ser a ferramenta mais adequada para garantia da segurança alimentar dos consumidores.

Este trabalho teve como objetivo a validação de uma metodologia de análise para aflatoxina M₁ em leite e leite em pó sensível e confiável para atender aos limites máximos permitidos propostos pelas legislações vigentes.

A validação corresponde a estudos analíticos que permitem a avaliação do desempenho do método com um número considerável de experimentos, utilizando diferentes concentrações e matrizes, facilmente adequado as diferentes situações. Depois de

desenvolvido e validado o método foi aplicado para realização de um inquérito para verificação dos níveis de aflatoxina M_1 presentes em leite fluido e leite em pó comercialmente disponíveis.

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivos gerais

Desenvolver e validar metodologia de análise de aflatoxina M_1 em leite e leite em pó através de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas sequencial e realizar um inquérito para determinação da contaminação do leite comercializado na região sul do Brasil.

1.1.2 Objetivos específicos

- otimização das condições do espectrômetro de massas para detecção de aflatoxina M_1 ;
- desenvolver e validar um método seguindo as figuras de mérito propostas pelas agências regulamentadoras;
- disponibilizar um método para análise de aflatoxina M_1 que atenda a legislação brasileira e internacional para leite e leite em pó;
- analisar amostras de leite fluido (cru, pasteurizado e UHT) e leite em pó adquiridas em estabelecimentos comerciais do sul do Brasil

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Micotoxinas

Micotoxinas são substâncias tóxicas resultantes do metabolismo secundário de diversas linhagens de fungos filamentosos. São de ocorrência universal, porém predominam em climas tropicais e subtropicais, nos quais o desenvolvimento fúngico é favorecido pelas condições ambientais (MALLMANN, 2007).

Mais de quinhentas micotoxinas, produzidas por aproximadamente uma centena de fungos, são conhecidas atualmente. As principais podem ser divididas em três grupos: as aflatoxinas produzidas por fungos do gênero *Aspergillus* como o *A. flavus* e *parasiticus*, as ocratoxinas, produzidas por fungos do gênero *Aspergillus* e *Penicillium* e as fusariotoxinas que possuem como principais representantes os tricotecenos, zearalenona e fumonisinas, produzidas por diversas espécies do gênero *Fusarium* (MALLMANN, 2007).

Os primeiros casos relatados de contaminação alimentar por micotoxinas foram devido a contaminação de centeio com alcalóides do ergot, produzidos pelo fungo *Claviceps purpurea* durante a idade média. Em 1912 foi descrito na Argentina a ação de metabólitos tóxicos presentes no milho sobre diversas espécies animais, o que constituiu a primeira observação científica da ação das micotoxinas na América do Sul (LILLEJOH, 1991).

As micotoxinas começaram a receber maior importância científica a partir de 1960, devido a mortalidade de um grande número de aves na Europa, principalmente na Inglaterra. Os testes realizados revelaram que a causa da mortalidade era uma toxina presente na ração fornecida aos animais. Posteriormente, essas toxinas foram identificadas como sendo toxinas produzidas por fungos da espécie *A. flavus*, sendo por isso denominadas aflatoxinas. Com o avanço das pesquisas, ficou evidente que elas possuem propriedades extremamente tóxicas a aves, e mamíferos (MALLMANN, 2007).

Atualmente ainda são restritos os conhecimentos sobre fisiologia, produção de toxinas e desenvolvimento de fungos produtores de micotoxinas. O que já se sabe é que o crescimento fúngico e produção de micotoxinas podem ocorrer nas diversas fases do desenvolvimento, maturação, colheita, transporte, processamento ou armazenagem dos alimentos (LILLEJOH, 1991).

A dificuldade de colheita dos cereais no estágio correto de umidade e maturação pode ser o ponto crítico no que tange a formação de micotoxinas. Cereais colhidos com alta umidade facilitam o desenvolvimento fúngico antes da secagem e armazenamento, sobretudo se forem armazenadas sem um correto processo de secagem. Por outro lado, cereais na lavoura, após a maturação fisiológica dos grãos, ficam sujeitos a alta umidade e ao ataque de pragas que propiciam condições favoráveis ao desenvolvimento fúngico (MALLMANN, 2007).

O transporte de cereais com alta umidade por longas distâncias e por períodos prolongados propiciam o desenvolvimento de fungos pela formação de um microclima adequado para tal. A compreensão de uma série de fatores que podem levar a formação de micotoxinas é de fundamental importância para que seja possível a intervenção visando diminuição na sua produção (MALLMANN, 2007).

A produção de micotoxinas está ligada ao crescimento do fungo; sem o crescimento geralmente a produção não ocorre. Entretanto a presença do fungo produtor não indica a presença de micotoxinas (GONÇALEZ, 2001).

A presença de uma micotoxina e o risco associado a ela, só podem ser determinados após identificação e quantificação da mesma, devido ao fato de que os diversos efeitos tóxicos são influenciados por uma série de variáveis: diversidade entre as espécies, raça, sexo, idade, fatores ambientais, condições nutricionais, sinergismos e diferentes organismos animais (CARRILLO, 2008).

2.2 Aflatoxinas

Entre as centenas de micotoxinas conhecidas, as aflatoxinas são consideradas as de maior importância no Brasil devido a sua presença e magnitude de contaminação dos alimentos (MALLMANN, 2009).

Aflatoxinas (Af) são metabólitos secundários de linhagens de fungos toxígenos, sendo conhecidas mais de vinte substâncias do grupo das aflatoxinas. As mais comuns nos alimentos são as aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂. Outras aflatoxinas já foram isoladas em leite, carne e urina de animais, como é o caso das aflatoxinas M₁ e M₂, que são metabólitos das aflatoxinas B₁ e B₂, respectivamente (MALLMANN, 2007).

As aflatoxinas podem ser produzidas por três espécies de *Aspergillus* que contaminam alimentos – *A. flavus*, *A. parasiticus*, e raramente por *A. nomius*. Na maioria dos isolados fúngicos de *A. flavus* ocorre maior produção de aflatoxina B₁ (AfB₁) e aflatoxina B₂ (AfB₂), enquanto que em isolados de *A. parasiticus* ocorre a produção das quatro aflatoxinas (AfB₁, AfB₂, AfG₁ e AfG₂) em quantidades semelhantes (DILKIN et al., 2000).

Quimicamente as aflatoxinas apresentam um grupo de compostos heterocíclicos oxigenados. Sua estrutura consiste de um núcleo cumarínico fundido com um anel bifurano e mais um anel pentanona, no caso das aflatoxinas B e M, ou um anel 6-lactona, no caso das aflatoxinas G, Figura 1 (APPLEBAUM et al., 1982).

As aflatoxinas são fluorescentes a luz ultravioleta (365 nm), sendo que as aflatoxinas B₁ e B₂ recebem este nome por emitirem fluorescência azul (do inglês, *blue*) e as aflatoxinas G₁ e G₂ devido a sua fluorescência verde (do inglês, *green*). Já a aflatoxina M₁ recebeu este nome por ser excretada no leite, recebendo a denominação de “toxina do leite” (do inglês, *milk toxin*) (CREPPY, 2002).

As aflatoxinas são bastante solúveis em solventes polares como clorofórmio, metanol e acetonitrila, característica que fez o uso destes solventes serem amplamente utilizados em metodologias de análise.

A presença e a magnitude da contaminação dos alimentos por aflatoxinas variam em razão de fatores geográficos, estacionais e também devido a condições de cultivo, colheita e armazenagem. Em geral, a contaminação dos alimentos por aflatoxinas acontece de forma direta e natural, em praticamente todas as fases de obtenção, desde a produção, com a contaminação das culturas no campo, ao longo da colheita, transporte, processamento, armazenamento, até seu consumo (TAVEIRA, 1999).

Os cultivos em zonas tropicais e subtropicais são mais propensos a contaminação por micotoxinas em relação a regiões temperadas, pois as condições ótimas para a produção de micotoxinas predominam nas regiões com elevada umidade.

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS, 1983), a temperatura mínima para a produção de aflatoxinas é de 12 °C, sendo a máxima 40 °C. Temperaturas ideais para produção de aflatoxinas giram em torno de 24-35 °C. Em relação à umidade relativa do ar, são citados como valores ideais para a produção de aflatoxinas, valores situados na faixa entre 80-85%. Já no que diz respeito à atividade de água (A_w), é necessário valores superiores a 0,7. Outro fator que influencia a ocorrência de aflatoxinas é o tipo de substrato disponível para o fungo, pois cada fungo necessita de determinados componentes nutricionais para se desenvolver.

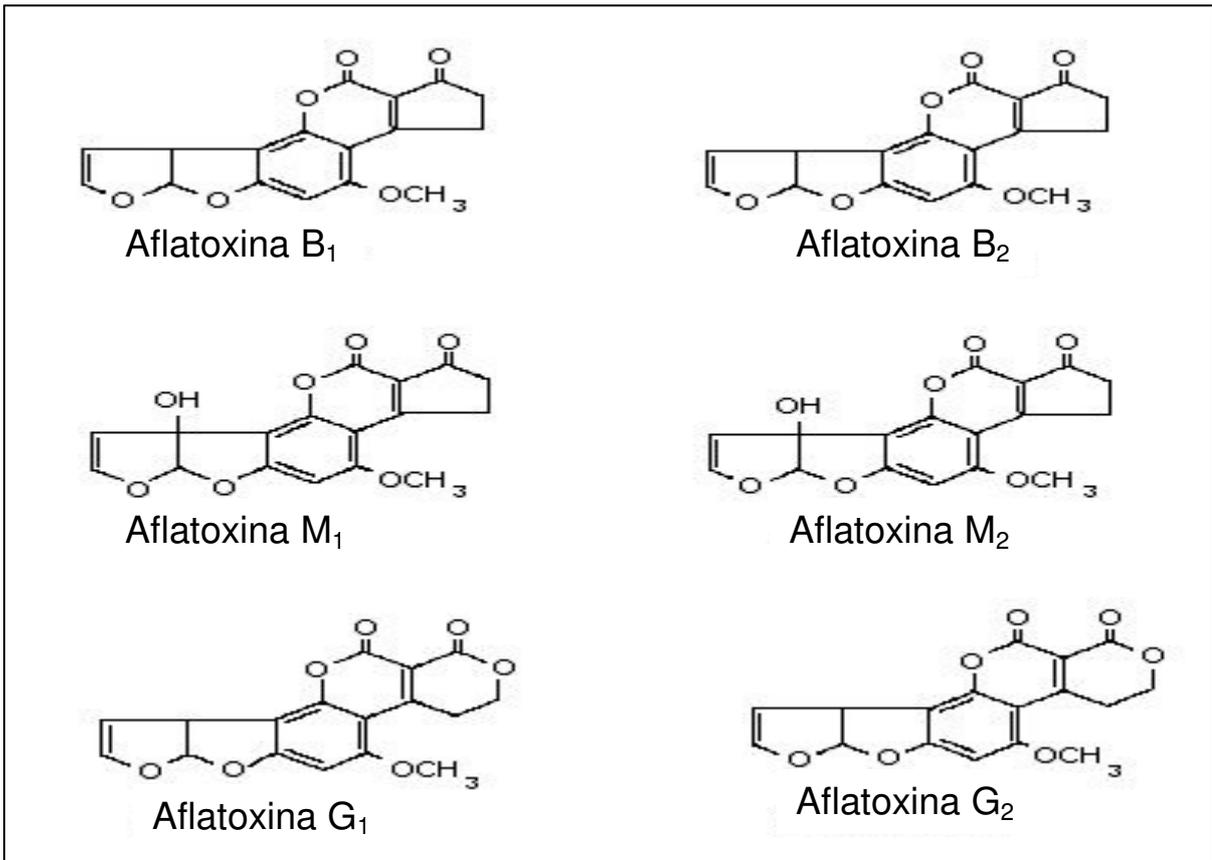


Figura 1 – Estrutura química das principais aflatoxinas.

A ocorrência simultânea de aflatoxinas com outras micotoxinas foi constatada em diversos alimentos e produtos agrícolas. Esse achado assume importância significativa a partir do momento em que os efeitos tóxicos destas micotoxinas podem exercer atividades sinérgicas. Esta co-ocorrência de diferentes micotoxinas também é de interesse quando se realizam experimentos *in vivo* com micotoxinas. As diferenças encontradas entre experimentos realizados em condições controladas e experimentos a campo podem ter explicação na co-ocorrência de micotoxinas (MALLMANN, 2007).

Segundo Applebaum e Marth (1982), o fornecimento de 13 mg/dia de aflatoxina B₁ (por volta de 8 mg Kg⁻¹ no alimento) para vacas em lactação, não afetou a ingestão de alimento. No entanto, quando os autores forneceram aos animais, aflatoxina B₁ misturada com outras aflatoxinas e metabolitos fúngicos, verificou-se flutuações na ingestão de alimento para as vacas que receberam 13 mg/dia de aflatoxinas impuras, indicando um possível efeito sinérgico no modo de ação das micotoxinas.

No período de atividade (1986 – 2010) do Laboratório de Análises Micotoxicológicas da Universidade Federal de Santa Maria (LAMIC/UFSM) foram analisadas 28.567 amostras de ração, oriundas de várias empresas agropecuárias do Brasil. Destas amostras, 42,9% apresentaram contaminação por aflatoxinas com uma média de contaminação de 17,6 $\mu\text{g Kg}^{-1}$.

No mesmo período foram analisadas 58.963 amostras de milho destinadas à alimentação animal. Destas, foi encontrado uma positividade de 48,6% nas amostras analisadas com uma contaminação média de 19,7 $\mu\text{g Kg}^{-1}$ (LAMIC, 2010).

2.3 Toxicidade das aflatoxinas

Nos países onde existem legislações para micotoxinas e, que façam uso das boas práticas de produção além de realizem um monitoramento adequado da presença de micotoxinas em alimentos destinados ao consumo humano, raramente ocorre contaminação por micotoxinas em concentrações que possam causar danos agudos em humanos. Por isso, os estudos de toxicidade em humanos são em sua maioria focados no potencial carcinogênico a longo prazo que as micotoxinas podem causar (U. S. FDA, 2009a).

As manifestações agudas ocorrem quando são consumidas doses moderadas a altas de aflatoxinas, apresentando os primeiros sinais clínicos em poucas horas a uma semana após o início do consumo do alimento contaminado. Os sinais clínicos apareceram dependendo também, da susceptibilidade da espécie animal. As lesões mais encontradas estão relacionadas a hepatite, hemorragia, nefrite e enterite seguidas de morte (MALLMANN, 2007).

As manifestações crônicas ocorrem quando existe um consumo de doses moderadas a baixas incapazes de levar ao quadro clínico de uma aflatoxicose aguda.

2.3.1 Toxicidade das aflatoxinas - Humanos

Muitas micotoxinas e fungos toxicogênicos de importância econômica foram descobertos porque foram associados a micotoxicoses que afetam os seres humanos: ergotismo, câncer de fígado, doença do arroz amarelo, aleucia tóxica alimentar, nefropatia

endêmica dos Bálcãs e intoxicação por bolor vermelho. Todas estas doenças têm como causa a presença de micotoxinas nos alimentos (MAGAN, 2004).

Das quatro principais aflatoxinas do grupo, a AfB₁ é a mais tóxica, seguida pela AfG₁, AfB₂ e AfG₂ com toxicidade de 50%, 20% e 10%, respectivamente, em relação a primeira, tendo como principal órgão alvo o fígado. Além de serem hepatotóxicas, as aflatoxinas são mutagênicas, carcinogênicas e possivelmente teratogênicas para os animais (DILKIN et al., 2000; SYLOS, 1996; ORDIN, 1998).

A Agência Internacional para Pesquisa sobre Câncer (IARC, do inglês, *International Agency for Research on Cancer*), classificou aflatoxina B₁ e aflatoxina M₁ como classe 1 (carcinogênico para humanos) e classe 2B (possivelmente carcinogênico para humanos) respectivamente.

As aflatoxinas têm sido identificadas como fatores envolvidos na etiologia do câncer hepático no homem conseqüentemente a ingestão de alimentos contaminados. O carcinoma hepatocelular é, mundialmente, um dos tipos mais comuns de câncer, apresentando, porém, uma acentuada variação geográfica no que concerne à incidência, com predomínio em alguns países da África, Ásia e Ilhas do Pacífico (PARKIN, 1984).

A ocorrência do carcinoma hepatocelular é maior nos homens do que nas mulheres, predominantemente na faixa etária de 30-50 anos. Entre os países com maior incidência estão Moçambique, Zimbábue, Etiópia, China (costa sudoeste) e Taiwan. Os países com incidência intermediária incluem Japão e os da parte central e sudoeste da Europa (KEEHN, 1991). As diferenças observadas na incidência do carcinoma hepatocelular entre os diversos países sugerem o envolvimento de fatores ambientais em sua etiologia. Dentre os fatores identificados, os que apresentam maior importância são as aflatoxinas e o vírus da hepatite B (HARRIS, 1991).

A teratogênese provocada por determinadas concentrações de aflatoxina B₁ já foi observada em animais, através de alguns efeitos durante o curso da gravidez, principalmente durante a primeira fase embrionária (ELLIS, 1991).

Segundo Scussel (1998) os efeitos teratogênicos das aflatoxinas causam má formação do feto e reabsorção de embriões.

A imunossupressão manifesta-se de diferentes formas, como diminuição dos linfócitos T ou B, supressão dos anticorpos ou retardamento na atividade dos macrófagos e neutrófilos, aumentando a susceptibilidade a determinadas infecções, podendo implicar na transmissão de patógenos ao homem (ELLIS, 1991).

2.3.2 Toxicidade das aflatoxinas – Animais

Nenhuma espécie animal é totalmente resistente aos efeitos tóxicos causados pelas micotoxinas. As diferentes espécies animais apresentam diferente susceptibilidade a toxicidade aguda e crônica das micotoxinas. Além disso, os fatores ambientais, o nível de exposição e a duração da exposição ao juntamente com a idade, sexo e estado nutricional dos animais podem influenciar os efeitos tóxicos causados pelas micotoxinas (U. S. FDA, 2000a).

Em animais, algumas doenças provocadas por micotoxinas, tiveram sua etiologia confirmada somente após alguns anos de estudo: doença X dos perus provocada por aflatoxinas, nefropatia provocada por ocratoxina A, vulvovaginites em suínos que ingeriram alimento contaminado com zearalenona e leucoencefalomalácia em equinos alimentados com ração contaminada com fumonisinas (MAGAN, 2004).

Os sinais clínicos da aflatoxicose são difíceis de serem percebidos e muitas vezes são confundidos com outras doenças. O quadro de contaminação por aflatoxinas somente é detectado com cuidados especiais ou por meio de um programa de monitoramento permanente e análise das rações fornecidas aos animais. As manifestações clínicas das aflatoxicoses podem ser agudas ou crônicas, dependendo da dose consumida (MALLMANN, 2007).

Geralmente a contaminação se estende por semanas a meses até que seja realizado o diagnóstico. O quadro apresentado pelos animais mostra uma redução na eficiência reprodutiva, piora da conversão alimentar, menor taxa de crescimento e ganho de peso, predisposição a contaminação por outras doenças devido a imunossupressão e redução da produção de leite (CARVALHO, 1995).

A Tabela 1 sumariza os principais efeitos e sinais clínicos provocados pelas aflatoxinas em diferentes espécies animais.

2.4 Metabolismo das aflatoxinas

As diferenças de susceptibilidade entre as diversas espécies aos efeitos tóxicos das aflatoxinas decorrem das variações na absorção, distribuição, biotransformação e eliminação destas toxinas.

Tabela 1 – Principais efeitos e sinais clínicos da exposição as micotoxinas em diferentes espécies animais.

Frango de corte	Poedeiras	Gado de leite
Baixa eficiência alimentar	Baixa produtividade	Perde de apetite
Perda de peso	Redução na qualidade dos ovos	Redução da produção leiteira
Queda da imunidade	Queda na imunidade	Queda na imunidade
Desuniformidade do lote		Aumento de abortos
Descoloração do bico e patas		Diarréia
Palidez das barbelas e pele		

Fonte: SMITH, 1991.

A absorção das aflatoxinas ocorre principalmente no trato gastrointestinal, pela passagem do meio exterior para o interior do organismo através das membranas celulares, alcançando a corrente sanguínea. Devido ao seu baixo peso molecular (aflatoxina B₁ = 312 u e aflatoxina M₁ = 328 u) estas moléculas são rapidamente absorvidas através das membranas. A composição lipídica das membranas facilita este transporte devido a lipossolubilidade da molécula de aflatoxina (MASOERO, 2007).

Depois de absorvidas as aflatoxinas são distribuídas pelo organismo e podem ser encontradas nos músculos, rins e tecido adiposo, Entretanto, as maiores concentrações destas toxinas são encontradas no fígado (OMS, 1983).

As vias de biotransformação da aflatoxina B₁ variam entre espécies animais, tal fato pode justificar os diferentes graus de susceptibilidade à aflatoxina B₁ entre as espécies (WOGAN, 1992).

A biotransformação das aflatoxinas ocorre em sua maior parte no fígado, pela ação das enzimas microssomais do citocromo P-450, localizadas no retículo endoplasmático liso e no citoplasma (OLIVEIRA e GERMANO, 1997). Não há estudos detalhados sobre os tipos e o grau de atividade do citocromo P-450. Klein (2000) relatou que já foram identificados nos mamíferos pelo menos seis diferentes tipos de citocromos (citocromo P-450 1A2, 2A3, 2B7, 2C8, 2K1 e 3A3/4), responsáveis pela ativação da molécula de aflatoxina B₁.

A presença ou ausência de um ou mais desses citocromos, bem como o seu grau de atividade podem determinar a susceptibilidade da espécie animal à aflatoxina B₁, dentre outros fatores (KLEIN, 2000).

O sistema responsável pela biotransformação da aflatoxina B₁ possui basicamente quatro mecanismos, representados por reações de hidratação, epoxidação, hidroxilação e orto-dimetilação, Figura 2 (OLIVEIRA e GERMANO, 1997).

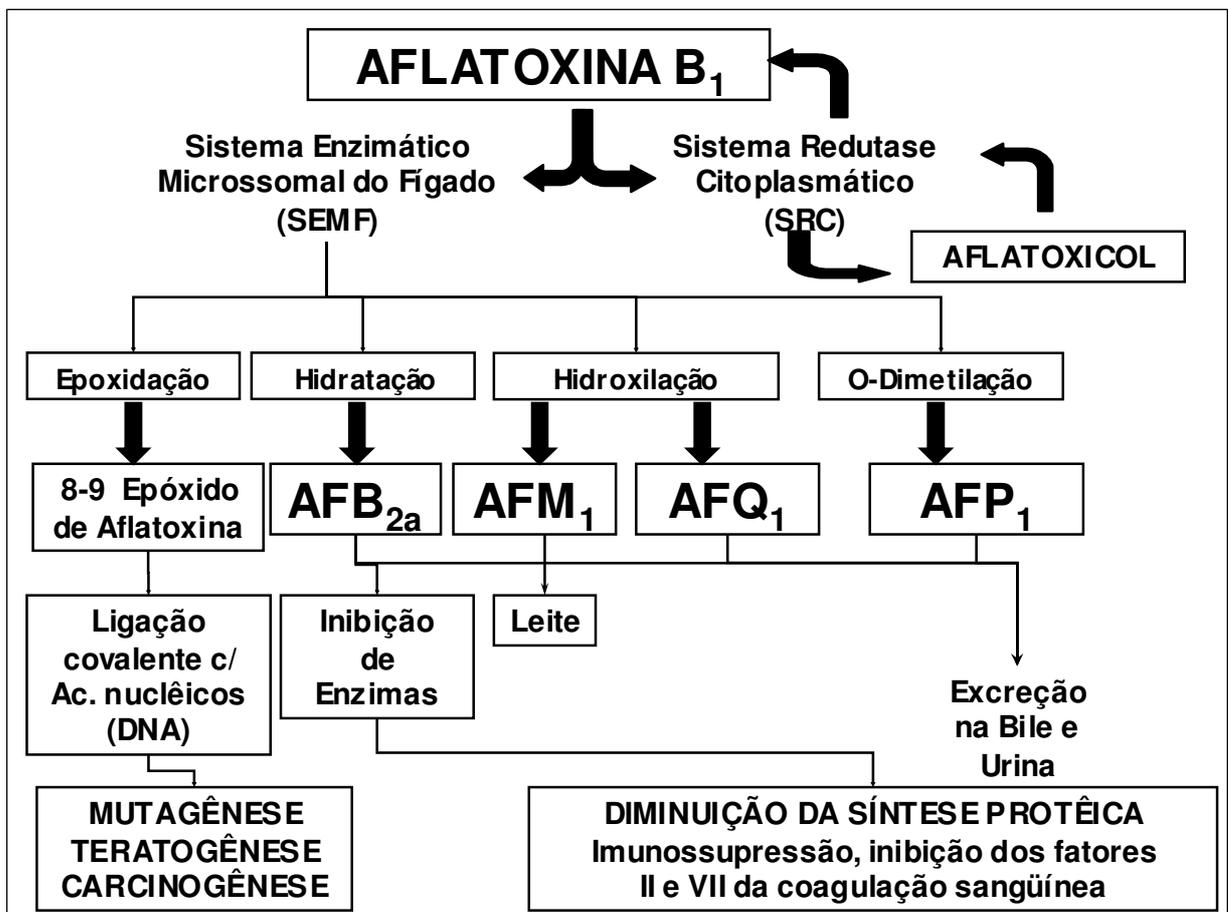


Figura 2 – Mecanismos de biotransformação da aflatoxina B₁ (OMS, 1983).

O processo de hidratação tem como metabólito a aflatoxina B_{2a} (AfB_{2a}). Este composto tem como principal ação a inibição de enzimas, tanto no fígado quanto em outros tecidos, ocasionando uma redução na síntese protéica.

A forma pura da aflatoxina B₁ não apresenta atividade mutagênica. A biotransformação deste composto através da reação de epoxidação é que transforma a aflatoxina B₁ em 8,9 epóxido de aflatoxina, sendo este o mais potente carcinógeno conhecido.

O composto formado pela epoxidação é altamente eletrofílico e capaz de reagir rapidamente, através de ligações covalentes, com sítios nucleofílicos de macromoléculas, como o ácido desoxirribonucléico (DNA), ácido ribonucléico (RNA) e proteínas (OLIVEIRA e GERMANO, 1997). A ligação do 8,9 epóxido de aflatoxina com o DNA é formada com o N7 da guanina, o que determina a formação de adutos Af-N7-guanina na célula-alvo (LILLEHOJ, 1991). Como consequência deste aduto, o par G – T sofre uma transversão no códon 249 do gene supressor de tumores p53 (WANG, 1999). Esses adutos formados na molécula de DNA podem ser retirados da molécula, após a sua formação, deixando sítios vagos, que tendem a ser preenchidos com adenina, resultando um ponto de mutação. O composto 8,9 epóxido de aflatoxina, é responsável por redução na síntese protéica e pelos efeitos mutagênicos, teratogênicos e carcinogênicos.

Na reação de hidroxilação são formadas as aflatoxinas M₁ (AfM₁) e aflatoxina Q₁ (AfQ₁). Estes compostos possuem o grupo hidroxila, permitindo sua conjugação com ácido glicurônico e sulfatos, tornando-as substâncias bastante solúveis em água, podendo ser excretadas na bile, urina e leite (BIEHL, 1987).

2.5 Taxa de passagem de aflatoxina M₁ para o leite

Os alimentos que são fornecidos aos animais são produzidos pelo proprietário dos animais em sua propriedade ou obtidos de indústrias produtoras de rações. Em ambos os casos matéria-prima de baixo custo é utilizada e pode ocorrer desta ser de baixa qualidade e contaminada por micotoxinas. A exigência de rações com baixo custo de produção faz com que muitas vezes o controle de micotoxinas seja pequeno ou inexistente devido ao custo que a realização de análise poderia agregar ao produto final. A falta de um controle contínuo nas rações fornecidas a animais produtores de leite pode levar a uma indesejável contaminação do leite (MAGAN, 2004).

A partir da observação de que animais produtores de leite que consumam ração contaminada com aflatoxina B₁ irão excretar aflatoxina M₁ em seu leite, vários estudos foram

realizados na tentativa de estabelecer uma taxa de passagem (do inglês, *carry-over*) para o consumo de altas e baixas quantidades de ração.

A aflatoxina M₁ pode ser detectada no leite após 12-24 horas da primeira ingestão de ração contaminada com aflatoxina B₁. A ocorrência de aflatoxina M₁ no leite atinge níveis máximos após 2 dias da ingestão da ração contaminada. A aflatoxina M₁ começa a diminuir seus níveis no leite a partir de 4-5 dias após a retirada da ração contaminada fornecida ao animal (DRAGACCI, 1995).

Segundo Munksgaard (1987 apud KUILMANN 2000), o sistema de biotransformação do animal é efetivo para detoxificação da aflatoxina B₁ existente a níveis de 7 a 351 µg/vaca/dia.

A situação encontrada no âmbito da produção de leite no período de 1960 a 1970 era de uma ingestão de ração contaminada com aflatoxina B₁ relativamente alta, produção de leite relativamente baixa e métodos analíticos pouco desenvolvidos. Esse quadro levou ao encontro de resultados variados, sendo encontrada a concentração de aflatoxina M₁ no leite variando entre 0,2 – 4% a concentração de aflatoxina B₁ ingerida na ração (VAN EGMOND, 1989; PETERSON, 1997). Kiermeier (1975, 1977 apud JECFA, 2001), em seus estudos indicaram que a concentração de aflatoxina M₁ no leite variava devido a vários fatores, entre eles de animal para animal (mesmo entre animais da mesma raça), dia entre dia e entre uma ordenha e outra (JEFCA, 2001).

Nos anos de 1980 e 1990, mais informação tornou-se disponível a respeito da taxa de passagem da aflatoxina B₁, ao mesmo tempo em que a produção de leite aumentou consideravelmente e a metodologia analítica disponível melhorou, tornando os resultados dos estudos mais confiáveis. Em estudos mais recentes estimou-se uma maior faixa para a taxa de passagem de aflatoxina M₁ para o leite, com valores de 0,3 – 6,2%. A mais alta porcentagem foi encontrada em animais de grande produção de leite. Os autores concluíram que as taxas de excreção mais elevadas em animais de alta produção foram resultado da maior permeabilidade das membranas celulares dos alvéolos das glândulas mamárias. Outro fator que se encontrou afetar a taxa de passagem da aflatoxina M₁ foi o estágio de lactação do animal (VELDMAN, 1992).

Veldman (1992) propôs uma relação linear entre a ingestão de aflatoxina B₁ e a concentração de aflatoxina M₁ no leite para níveis de ingestão de aflatoxina B₁ na faixa de 5 a 80 µg:

$$\text{Aflatoxina M}_1 (\mu\text{g L}^{-1} \text{ no leite}) = 1,2 \times \text{ ingestão de AfB}_1 (\mu\text{g/vaca por dia}) + 1,9$$

Seguindo essa relação, a produção de leite contaminado contendo $0,05 \mu\text{g L}^{-1}$, requer uma ingestão média de $40 \mu\text{g/vaca}$ por dia. Baseado no consumo diário de 12 Kg/vaca de ração, a ração não pode estar contaminada com níveis acima de $3,4 \mu\text{g Kg}^{-1}$ de aflatoxina B_1 .

Segundo Masoero (2009) a proporção de aflatoxina M_1 excretada no leite pode ser calculada como segue:

$$\text{Taxa de excreção} = \frac{[\text{AfM}_1 (\mu\text{g L}^{-1}) \times \text{produção de leite (Kg/vaca/dia)}]}{\text{AfB}_1 (\mu\text{g/vaca/dia)}}$$

Com base na taxa de excreção determinada em seus estudos (1,6%), Forbisch (1986) propôs a seguinte equação para estimar o nível de contaminação por aflatoxina B_1 no alimento fornecido ao animal:

$$\text{AfB}_1 (\mu\text{g Kg}^{-1}) = [\text{AfM}_1 (\mu\text{g L}^{-1}) \times 100] / (1,6 \times 1000)$$

A Tabela 2 mostra os diferentes valores encontrados na literatura para taxa de passagem de aflatoxina M_1 . A imprecisão dos valores de conversão da aflatoxina B_1 em aflatoxina M_1 reforça a importância da realização de análises rotineiras no leite e em seus derivados, para controle da ocorrência da aflatoxina M_1 (OLIVEIRA, 1997).

Tabela 2 – Percentuais de transferência de aflatoxina M_1 para o leite.

Taxa de passagem (%) AfB1 → AfM1	Referência
0,1	Bluthgen et al. (2004)
0,2	Henry et al. (2004)
0,3	Henry et al. (2004)
4,0	Henry et al. (2004)
6,0	EFSA (2004)
0,3	Yannikouris na Jouany (2002)
0,3	Creppy (2002)
2,2	Yannikouris na Jouany (2002)
1,7	Jones et al. (1994)
2,2	Van Egmond (1989)
1,6	Forbisch et al. (1986)

Fonte: RORY, 2009.

2.6 Importância econômica e nutricional do leite

Segundo dados de 2007 da FAO, o Brasil ocupa a sexta colocação entre os principais países produtores de leite de vaca no mundo, com uma produção de 26,9 mil toneladas. Em primeiro lugar estão os Estados Unidos seguidos por Índia, China, Federação Russa e Alemanha (FAO, 2007).

Dentro da América do Sul, o Brasil ocupa a primeira posição, com um volume de leite produzido duas vezes e meia maior que a segunda colocada, a Argentina. Em se tratando do Brasil, o estado de Minas Gerais ocupa a primeira colocação no ranking nacional, seguido por Rio Grande do Sul, Paraná, Goiás, Santa Catarina e São Paulo. Com base nestes dados, percebe-se a importância do leite para economia da região sul do país, que tem seus três estados entre os cinco primeiros colocados no ranking de produção de leite (EMBRAPA, 2009a).

Do total de leite produzido no Brasil, em torno de 70% é adquirido por laticínios que trabalham sob sistema de inspeção federal (SIF). Do total do volume de leite recebido pelos laticínios, 34% é industrializado na forma de queijos, 26% na forma de leite longa vida, 18% em leite em pó e 7% em leite pasteurizado. O restante, 15%, é industrializado em leite condensado, leites fermentados e outros produtos lácteos (EMBRAPA, 2009b).

Segundo EMBRAPA (2009a) a produção de leite no Brasil tem aumentado a cada ano, assim como o tamanho do rebanho brasileiro e a produtividade por animal. Isso reflete uma maior modernização da cadeia produtiva do leite resultado de melhor tecnificação, especialização e preocupação com a qualidade.

O aumento da produção de leite pelo Brasil está levando o país a mudar sua característica de importador de produtos lácteos para uma condição de exportador. Segundo dados referentes a importações brasileira de produtos lácteos, houve uma clara diminuição da quantidade de produtos lácteos que entraram no país na última década. Em relação as exportações de produtos lácteos, tendo o leite em pó lugar de destaque, as exportações destes produtos tem aumentado a cada ano (EMBRAPA, 2009c).

Ainda que o país venha aumentando seu volume de exportação, pode-se imaginar que exista um quadro de excedente de produção, o que na verdade não ocorre. A demanda interna ainda é grande, se considerarmos as recomendações do Ministério da Saúde para consumo de leite. Segundo as recomendações do Ministério da Saúde do Brasil, o consumo de leite, na forma fluida ou de derivados lácteos, varia de acordo com a idade das pessoas. A

recomendação para crianças de até 10 anos é de 400 mL/dia ou 146 L/ano de leite fluido ou equivalente na forma de derivados. Para os jovens da faixa etária entre 11 e 19 anos, o consumo é maior, 700 mL/dia ou 256 L/ano, e para os adultos acima de 20 anos a recomendação é de 600 mL/dia ou 219 L/ano, inclusive para idosos, porém para este último grupo, o consumo deve ser preferencialmente de leite desnatado. Baseada na população brasileira do ano de 2007, o Brasil precisaria aumentar em 50% sua produção de leite, somente para atender o mercado interno (EMBRAPA, 2009d).

Diante deste quadro, podemos perceber a importância que o leite e seus derivados tem na economia do país e a possibilidade que o Brasil tem de crescer em relação a cadeia produtiva do leite.

O leite é um dos mais completos disponíveis “*in natura*” para o homem, apresentando uma balanceada composição em nutrientes que resultam em elevado valor biológico. De acordo com o Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA), art. 475, denomina-se leite, sem outra especificação, o produto normal, fresco, integral, oriundo da completa e ininterrupta de vacas sadias. A composição média de um litro de leite de vaca, segundo Walstra e Jenness (1984) está na Tabela 3.

Nos diferentes períodos da vida humana, o leite apresenta papel fundamental no desenvolvimento e manutenção da vida. Para os recém nascidos e crianças até seis meses de idade o leite materno deve ser o único alimento fornecido. Durante o período que compreende a infância e adolescência do ser humano o consumo de leite é importante por ser uma fase de crescimento e formação óssea. Como o leite é uma fonte de cálcio e este é um mineral de extrema importância para o desenvolvimento da estrutura óssea e dentária da criança e do adolescente, o consumo de leite nesta fase da vida torna-se imprescindível (MACHADO, 2003).

À medida que envelhecemos, os nossos corpos enfrentam dificuldades em termos de saúde, e o consumo de leite e produtos lácteos podem ajudar nosso organismo a responder melhor a estes desafios. A manutenção de uma dieta rica em leite e conseqüentemente cálcio, ajuda a minimizar a perda da densidade mineral óssea, característica do avanço da idade, resultando em um enfraquecimento ósseo (MACHADO, 2003).

Como o leite é a principal fonte de nutrientes nas fases iniciais da vida e tem grande importância nas demais fases de desenvolvimento do ser humano, a presença de aflatoxina M₁ no leite representa um risco a saúde humana ao longo de toda a vida. É importante lembrar que o leite não é somente consumido na forma fluida, sendo por isso importante determinar os

níveis de aflatoxina M_1 em derivados de leite para proteger os consumidores dos riscos associados a aflatoxina M_1 em todas as faixas etárias (GURBAY, 2006).

Tabela 3 – Composição média do leite de vaca.

Componentes	Composição (%)
Água	86,4
Gordura	3,5
Proteínas	3,3
Lactose	4,9
Minerais	0,9
Vitaminas, enzimas, pigmentos e gases dissolvidos	1

Fonte: (Adaptado WALSTRA e JENNESS, 1984).

2.7 Estabilidade da aflatoxina M_1

Os processos utilizados pela indústria de produtos lácteos para industrialização do leite podem ser separados em dois diferentes processos: aqueles que não envolvem a separação dos componentes do leite, como o tratamento térmico, pasteurização ou resfriamento e aqueles que envolvem a separação dos componentes do leite como a concentração ou secagem. Alcroft e Carnaghan (1962) avaliaram a estabilidade da aflatoxina M_1 após pasteurização. Patel (1981) estudou a estabilidade da aflatoxina M_1 após aquecimento direto do leite por 3-4 horas. Ambos os resultados destes estudos indicaram que o tratamento térmico a que o leite foi submetido não alterou o nível de aflatoxina M_1 presente no leite. Yousef e Marth (1989) estudaram a estabilidade da aflatoxina M_1 em leite após resfriamento, congelamento e armazenagem. Os resultados encontrados foram bastante variados, mas indicando que o congelamento e o armazenamento do leite por poucos meses não parecem afetar a concentração de aflatoxina M_1 .

Com a observação de que os processos a que o leite é submetido na indústria não parecem alterar os níveis de aflatoxina M_1 presentes no leite, algumas tentativas de eliminar ou reduzir a concentração de aflatoxina M_1 foram estudadas empregando tratamentos químicos e físicos.

Os produtos químicos estudados ficaram limitados aqueles que são permitidos como aditivos alimentares: sulfitos, bissulfitos e peróxido de hidrogênio (APPLEBAUM e

MARTH, 1982). O tratamento do leite com 0,4% de bissulfito de potássio por 5 horas a 25 °C resultaram numa diminuição de 45% na concentração de aflatoxina M₁. Quando se aumentou a concentração de bissulfito de potássio a redução foi menor.

Os processos físicos estudados para remoção de aflatoxina M₁ do leite foram a adsorção e a radiação. Os resultados indicaram que com a adição de 5% de bentonita ao leite, 89% da aflatoxina M₁ foi absorvida (APPLEBAUM e MARTH, 1982). O uso de radiação ultravioleta foi estudado com e sem a adição de peróxido de hidrogênio. Os níveis de redução do conteúdo de aflatoxina M₁ foram de 3,6-100%, dependendo da duração do tempo a que o leite foi exposto a radiação, o volume tratado e a presença de peróxido de hidrogênio (YOUSEF e MARTH, 1985).

Atualmente os tratamentos químicos e físicos citados não são passíveis de serem aplicados em escala industrial devido a seus altos custos e poucos estudos a respeito de sua eficiência, além de que, muito pouco é sabido a respeito da segurança e do valor nutricional dos produtos tratados (JEFCA, 2001).

2.8 Legislação

Cada vez mais a legislação tem diminuído os limites máximos permitidos de contaminantes em alimentos. Juntamente com o fato que governos e consumidores terem exigido maior qualidade dos alimentos, criou-se a necessidade de utilização de uma metodologia analítica mais sensível e confiável.

Métodos de análise devem ser sensíveis e confiáveis o suficiente para serem utilizados para controle dos limites permitidos e também permitir a detecção de substâncias proibidas de contaminação natural ou intencional, especialmente para compostos potencialmente genotóxicos ou cancerígenos. As avaliações de risco para saúde pública e segurança alimentar requerem que os resultados disponibilizados sejam confiáveis e inequívocos, não levantando dúvida a respeito de sua validade (RIDGWAY et al. 2007).

A determinação de limites máximos permitidos de micotoxinas leva em conta uma série de fatores: distribuição do micotoxina no produto, avaliação dos riscos e do potencial tóxico, limitações inerentes ao método analítico e disponibilidade de alimentos para a população (RAMOS e SANCHIS, 1996). Segundo a resolução MERCOSUL/GMC N° 103/94, acrescentam-se aos fatores já citados para estabelecimento de limites máximos

permitidos de contaminantes em alimentos o uso de normas, diretrizes, recomendações e regulamentações já existentes emitidos por organismos reconhecidos internacionalmente (Comissão do *Codex Alimentarius*, FDA, União Européia, por exemplo), dados existentes na literatura e o uso de boas práticas agrícolas pecuárias e industriais.

O *Joint Expert Committee on Food Additives* (JEFCA) não determinou qual seria a ingestão tolerável de aflatoxina M₁, e recomendou reduzir os níveis de ingestão ao mínimo possível (WCRF, 1997).

A legislação da União Européia estabelece uma concentração máxima permitida de 5 µg Kg⁻¹ para aflatoxina B₁ em alimentos completos destinados ao gado leiteiro (2003/100/EC). Para aflatoxina M₁ a concentração máxima permitida é de 0,05 µg L⁻¹ em leite cru, leite destinado a fabricação de produtos lácteos e leite para consumo humano submetido a tratamento térmico (2003/466/EC). Para produtos lácteos, alimentos dietéticos e produtos com fins nutricionais específicos destinados a lactentes, a concentração máxima permitida de aflatoxina M₁ é de 0,025 µg L⁻¹ (2004/683/EC).

Nos Estados Unidos, a entidade reguladora FDA (*Food and Drug Administration*) estabeleceu uma concentração máxima permitida de 0,5 µg L⁻¹ de aflatoxina M₁ em leite integral, leite semi-desnatado e desnatado (U.S. FDA, 2000a). Para milho, amendoim, farelo de algodão e outros ingredientes destinados a fabricação de ração para consumo animal os níveis máximos estabelecidos para aflatoxinas foram 20 µg Kg⁻¹ (U.S. FDA, 2000b).

No Brasil, as aflatoxinas são as únicas micotoxinas cujos níveis máximos em alimentos estão previstos na legislação. Para alimentos destinados ao consumo humano, o Ministério da Saúde, resolução 274, da ANVISA, de 15 de outubro de 2002, publicada no Diário Oficial da União, de 16/10/2002 estabelece limite máximos de aflatoxinas admissíveis no leite, no amendoim e no milho (BRASIL, 2002).

O Ministério da Agricultura, através da portaria MAARA N°183 de 21 de março de 1996, publicada no Diário Oficial da União de 25 de março de 1996, seção I, página 4929, adotou o regulamento técnico MERCOSUL GMC/RES. N°56/94, sobre limites máximos admissíveis no leite, amendoim e milho (BRASIL, 1996). Para matérias primas e rações destinadas ao consumo animal, o Ministério da Agricultura através da portaria MA/SNAD/SFA N° 07, 09/11/1988, publicada no Diário Oficial da União de 09 de novembro de 1988, seção I, página 21.968, estabeleceu os padrões mínimos para aflatoxinas nas diversas matérias primas empregadas na alimentação animal (BRASIL, 1988).

Assim como o FDA, o Ministério da Agricultura não especifica quais aflatoxinas são consideradas para o caso de matérias-primas e ingredientes destinados ao preparo de ração para consumo animal. Entende-se que seja o somatório de $B_1 + B_2 + G_1 + G_2$.

Muitos países acabam adotando limites e recomendações próprios para micotoxinas, baseados em resultados de estudos realizados internamente (BAKIRCI, 2001).

A Tabela 4 resume os limites máximos permitidos para aflatoxinas no Brasil, União Européia e Estados Unidos.

Mesmo as legislações adotando limites máximos cada vez mais baixos, não são possíveis prevenir quanto aos efeitos crônicos da aflatoxina M_1 , especialmente o efeito carcinogênico, devido a exposição contínua a níveis subagudos de aflatoxina M_1 (GALVANO et al. 1996).

Pelos dados apresentados na Tabela 4 pode-se verificar a não coincidência no valor dos limites máximos permitidos a nível mundial. Este fato vem criar um problema a comercialização de determinados produtos, uma vez que produtos que são aceitos em um país podem não ser aceitos em outro (AMADO, 1999).

2.9 Amostragem

A preparação da amostra deve ser adequada a instrumentação utilizada e ao tipo de resultado exigido, se qualitativo ou quantitativo. A etapa de amostragem não deve ser negligenciada devido a necessidade de uma amostra representativa do todo para análise (RIDGWAY, 2007).

Existem duas maneiras efetivas para controlar a quantidade de aflatoxina M_1 presente no leite. A primeira é analisar a ração fornecida aos animais de produção para verificar os níveis de contaminação de aflatoxina B_1 , a segunda maneira é analisar o leite e verificar diretamente a concentração de aflatoxina M_1 .

No primeiro caso um programa eficaz de amostragem deve estar bem estabelecido, uma vez que a contaminação por micotoxinas em grãos não tem uma distribuição homogênea, o que pode levar a resultados falso-negativos, se a amostragem não for corretamente realizada (PIEIDADE et al. 2002).

Em contrapartida, espera-se que a distribuição de aflatoxina M_1 no leite fluido seja homogênea, por isso amostrar o leite para realização da análise de aflatoxina M_1 , resulta em

resultados mais precisos e com menor probabilidade de erro associado a amostragem. A maior incerteza na análise de aflatoxina M₁ em leite fluido esta associado ao procedimento analítico.

Tabela 4 – Limites máximos permitidos para aflatoxinas no Brasil, União Européia e Estados Unidos.

Órgão	Alimento	Aflatoxina	Limite máximo (µg L ⁻¹ ou µg Kg ⁻¹)
Ministério da Saúde (ANVISA)	Amendoim (com casca, descascado, cru ou tostado), pasta ou manteiga de amendoim	B ₁ + B ₂ + G ₁ + G ₂	20
	Milho em grão (inteiro, partido, amassado, moído, farinhas e sêmolas)	B ₁ + B ₂ + G ₁ + G ₂	20
	Leite fluido	M ₁	0,5
	Leite em pó	M ₁	5,0
Ministério da Agricultura (Brasil)	Matéria prima ou ingrediente para alimento destinado ao consumo animal	Aflatoxinas*	50
União Européia	Matéria prima para rações	B ₁	50
	Ração pronta	B ₁	10
	Ração destinada ao gado leiteiro	B ₁	5
	Leite <i>in natura</i> ou destinado a elaboração de produtos a base de leite**, e leite tratado termicamente	M ₁	0,05
	Produtos lácteos, alimentos dietéticos e produtos com fins nutricionais específicos destinados a lactentes	M ₁	0,025
FDA (Estados Unidos)	Milho, amendoim, farelo de algodão e outros ingredientes para ração destinada a gado de leite	Aflatoxinas*	20
	Leite integral, semi-desnatado e desnatado	M ₁	0,5

* não especifica quais aflatoxinas, subentende-se o somatório de B₁ + B₂ + G₁ + G₂.

** produtos resultantes da aplicação de um tratamento ao leite cru.

A 2006/401/EC propõe amostragem para análise de aflatoxinas em leite. O lote em questão deve ser manualmente ou mecanicamente homogeneizado e deste deve ser retirado uma amostra de no mínimo 9,5 Kg ou L, amostrada de cinco pontos diferentes do tanque (2006/401/EC). Para os Estados Unidos, o FDA estipulou que a amostra deve conter no mínimo 4,5 Kg de leite, amostrada de não menos do que dez porções aleatoriamente selecionadas (U. S. FDA, 2009b).

Na ausência de informações a respeito de amostragem, é recomendado que seja feita uma coleta de cinco porções de 100 mL cada, em diferentes pontos do tanque, totalizando 500 mL. O leite é considerado adequado ao consumo se não exceder os limites permitidos por lei.

Dependendo do tamanho do lote a ser amostrado, a tomada de uma amostra representativa requer uma tomada de amostra relativamente grande. Aumentando o tamanho da amostra resulta da necessidade de eficientes técnicas de extração e purificação. Em geral, quanto maior o tamanho da amostra que é tomada para extração, mais precisos são os resultados.

2.10 Métodos de triagem

Métodos de triagem geralmente são baseados em técnicas de cromatografia em camada delgada ou técnicas imunoquímicas como ELISA (do inglês, *enzyme-linked immunosorbent assay*) (TURNER, 2009).

Os métodos de triagem são utilizados para detecção de aflatoxina M₁ em pequenos volumes de leite para prevenir a contaminação de volumes maiores. Estes métodos têm por características serem rápidos, de fácil execução e economicamente viáveis. Eles devem permitir detectar níveis de aflatoxina M₁ mais baixos do que métodos quantitativos.

Um problema associado ao uso de ensaios imunoquímicas é a possibilidade de resultados subestimados ou superestimados devido ao efeito de interferência da matriz. Isto ocorre porque os ensaios imunoquímicos utilizam anticorpos não específicos para o analito de interesse, podendo ocasionar uma interação com algum componente da matriz, diferente do analito que se procura (ROSI et al. 2007). Para propósitos legais, resultados positivos de um teste imunoquímico, devem ser confirmados por um método de referência. (JEFCA, 2001). Além do método ELISA outros métodos imunoquímicos são utilizados para triagem de micotoxinas. O RIA (do inglês, *radio-immuno-assay*) assim, como o ELISA é baseado na

competição de ligação entre a toxina não marcada proveniente da amostra e a toxina marcada sobre os locais específicos do anticorpo. A técnica IAC (do inglês, *immunoaffinity chromatography*) é uma técnica cromatográfica baseada diretamente na ligação antígeno (toxina) com o anticorpo fixado em uma coluna (FREMY, 1989).

2.11 Métodos quantitativos

Métodos quantitativos são definidos como aqueles capazes de produzir resultados quantitativos com exatidão e precisão aceitáveis.

As metodologias analíticas utilizadas para determinação quantitativas de micotoxinas em alimentos geralmente são compostas pelas etapas de extração, purificação, separação, detecção, quantificação e confirmação. As etapas vão diferir dependendo dos instrumentos e técnicas empregadas pelo procedimento (TURNER, 2009).

2.12 Extração de aflatoxina M₁

A determinação de contaminantes em matrizes complexas, como alimentos, geralmente requer extensiva e morosa preparação e extração da amostra antes da análise propriamente dita.

A quantidade de preparo de amostra necessária é dependente das propriedades químicas da matriz e do analito, do nível a ser detectado e da metodologia analítica utilizada para análise (TURNER, 2009). As etapas típicas de preparo de amostra incluem amostragem/homogeneização, extração, purificação e concentração. Outro passo que pode ser incluído é a etapa de derivatização da amostra, etapa necessária quando o analito em questão não tem característica adequada a análise que se quer realizar.

O ajuste do preparo de amostra é necessário não somente para reduzir o tempo gasto com essa etapa, mas devido ao potencial erro incluído em cada passo utilizado no preparo da amostra. A otimização se torna ainda mais importante quando é necessária a análise de concentrações em nível de partes por milhão (ppm) ou partes por bilhão (ppb), já que o resultado final pode sofrer grande variabilidade com a mínima diferença no preparo da

amostra. Estatisticamente o grau de incerteza em um método esta diretamente relacionada ao número de etapas que este possui, sendo que uma redução no número de etapas tende a reduzir a incerteza do resultado (PRESTES, 2009).

O uso de uma técnica de extração mais seletiva e específica pode eliminar ou reduzir o número de etapas presentes em um método de extração e purificação. A utilização de técnicas automatizadas também leva a uma redução na probabilidade de erro, pois são mais reprodutíveis do que metodologias manuais além de diminuírem o tempo que o analista deve dispensar a preparação da amostra (RIDGWAY, 2007).

Amostras de alimentos abrangem uma grande variedade de tipos físicos de matrizes, desde pós secos, materiais sólidos até líquidos ou soluções. O tamanho das partículas da matriz pode ser um parâmetro importante para reprodutibilidade dos resultados, assim como o tamanho da amostra pode influenciar as taxas de recuperação do método.

Devido ao fato do leite ser uma amostra natural e complexa, a aflatoxina M_1 não é facilmente extraída e purificada. Um processo de extração é necessário para separar a aflatoxina M_1 do leite.

A aflatoxina M_1 é um composto fracamente polar e pode ser extraído com solventes como metanol, acetona, clorofórmio ou uma mistura desses solventes com água.

Stubblefield et al.(1979) desenvolveram um método de extração de aflatoxina M_1 em leite utilizando como solvente clorofórmio junto com uma solução saturada de cloreto de sódio. Após extração a amostra era purificada com um cartucho de sílica-gel, eluída com uma solução acetona-clorofórmio e em seguida aplicada em uma placa de cromatografia em camada delgada (SHEPARD, 1986).

O método de Gauch et al. (1979) estipula que seja feita uma precipitação das proteínas com ácido clorídrico concentrado e aquecimento antes da extração da amostra. Após, a amostra foi filtrada e purificada em uma coluna de interação hidrofílica e eluída com uma solução diclorometano-tolueno (SHEPARD, 1986).

O método desenvolvido por Chang e DeVries (1983) envolve a extração da aflatoxina M_1 do leite, pela mistura do leite com clorofórmio. O solvente foi evaporado e o resíduo e novamente extraído, nesta segunda etapa, com acetonitrila, que foi lavada com hexano. Por fim, o solvente foi novamente evaporado e o resíduo redissolvido em clorofórmio (SHEPARD, 1986).

Chambon et al. (1983) também desenvolveram um método que envolve uma etapa de precipitação de proteínas, diferindo do método anterior pela utilização de uma solução de

sulfato de zinco e hidróxido de sódio ao invés de ácido clorídrico concentrado. Em seguida a filtração, a amostra foi lavada com hexano e extraída com clorofórmio (SHEPARD, 1986).

Ferguson-Foos e Warren (1984) basearam seu método de extração no uso de cartucho de fase reversa Sep-Pak[®]. A amostra de leite aquecida e diluída em água foi transferida para o cartucho, previamente condicionado com metanol. A eluição da aflatoxina M₁ foi realizada com solvente éter dietílico. Para a etapa de purificação foi utilizado um cartucho de sílica gel, onde se utilizou cloreto de metileno como solvente de eluição (SHEPARD, 1986).

O método de Takeda (1984) utiliza o cartucho Sep-Pak[®] como etapa de extração e purificação. A purificação ocorre com lavagens utilizando-se solventes com diferentes polaridades até que a aflatoxina M₁ seja eluída do cartucho com uma solução de ácido de acetonitrila 3:7 (v/v) (SHEPARD, 1986).

Em comum, todos estes métodos utilizam grandes volumes de solventes clorados nas etapas de extração ou purificação. Não é de hoje que existe a preocupação de reduzir ao máximo o uso deste tipo de solventes devido ao risco que eles podem causar ao meio-ambiente. Também como característica comum aos métodos citados acima, esta a complexidade e o grande número de etapas necessárias ao processo de extração e purificação da amostra, ocasionando um elevado tempo para realização da análise e a possibilidade de perda do analito ao longo do processo.

O mais recente avanço em extração e purificação de amostras para análise de aflatoxina M₁ é o uso de colunas de imunoafinidade (IAC). O uso da técnica IAC é muito atraente como passo de purificação, para determinação de poucos ou apenas um analito, particularmente em amostras complexas que podem conter potenciais interferentes (SENYUVA, 2010).

A Figura 3 mostra o princípio de extração e purificação utilizando colunas IAC. Estas colunas são compostas por anticorpos monoclonais específicos para aflatoxina M₁ fixos em uma camada de gel e empacotados em pequenos cartuchos (1). A amostra de leite é condicionada a passar pelo cartucho, e o antígeno, no caso a aflatoxina M₁ é seletivamente complexado pelos anticorpos específicos fixados a camada de gel, formando um complexo antígeno-anticorpo (2). O cartucho é então lavado com água para remover todos os demais componentes da matriz (3). A aflatoxina M₁ é então eluída da coluna com um pequeno volume de solvente orgânico e o eluato é conduzido a próxima etapa do processo de análise (4) (JECFA, 2001).

O processo que utiliza uma coluna IAC combina as etapas de extração e purificação, podendo ser descrito na literatura como imunoextração, extração em fase sólida por

imunoafinidade ou cromatografia de imunoafinidade sol-gel. Imunofiltração ou imunofiltração (IUF) são similares a IAC, exceto pelo fato de que em IUF os anticorpos são usados na forma livre, enquanto que na IAC os anticorpos estão ligados a um suporte sólido (SENYUVA, 2010).

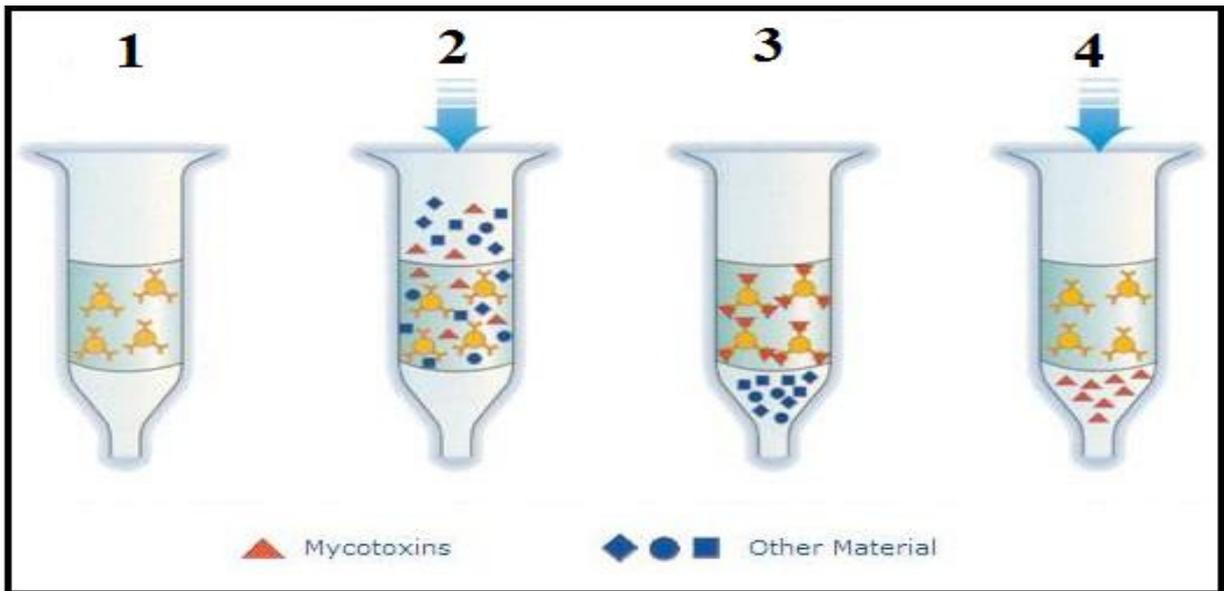


Figura 3 – Princípio de extração e purificação utilizando colunas de imunoafinidade.

Quando se utiliza colunas IAC a especificidade do anticorpo é um fator importante para o reconhecimento do analito, evitando que compostos com estruturas semelhantes se liguem a eles. Outro fator importante é a potência de ligação do antígeno, chamada avidéz. O fator avidéz irá influenciar nos resultados de recuperação durante a etapa de extração. A capacidade da coluna em termos de número de sítios de anticorpos (quantidade de anticorpos) também é um fator importante e que deve ser respeitado, não devendo ocorrer um sobrecarregamento da coluna, podendo resultar em recuperações baixas e dificuldade na aplicação do método, ocasionando também um alto consumo de tempo para realização da etapa de extração e purificação (SENYUVA, 2010).

A recuperação do analito quando se utiliza colunas IAC é dependente, como já dito anteriormente, da especificidade, da quantidade de anticorpos na coluna e da acessibilidade do antígeno ao anticorpo. A acessibilidade é dependente das características do gel utilizado como suporte, e o fluxo utilizado para passar a amostra através da coluna IAC também ganha importância. Altos fluxos não são recomendados, por evitar a ligação do analito ao sítio de

ligação do anticorpo, resultando em recuperações baixas. Geralmente o fluxo de uma gota por segundo é o recomendado. O controle do fluxo da amostra pode ser conseguido utilizando seringas para desenvolver pressão ou utilizar uma bomba de vácuo ligada a um manifold (SENYUVA, 2010).

2.13 Espectrometria de massas

Análise de matrizes complexas requerem técnicas analíticas altamente seletivas para caracterizar e determinar compostos alvo ou caracterizar compostos desconhecidos. O acoplamento de detectores de massas a técnicas cromatográficas tem resolvido um dos principais problemas analíticos encontrados quando se utiliza outros detectores que não apresentem a seletividade de um instrumento de massas (CARERI, 2002) Enquanto dois compostos podem ter similares espectros em uma técnica ultravioleta, dificilmente dois compostos terão espectros de massa similares.

A cromatografia líquida acoplada a detectores de massas resulta em uma poderosa ferramenta em análise alimentar devido à capacidade de separação da cromatografia combinadas a alta sensibilidade e seletividade do espectrômetro de massas. A sensibilidade de um instrumento de massas resulta de eficiência do detector multiplicador de elétrons em detectar a chegada de um simples íon. Já a especificidade resulta da capacidade do espectrômetro medir a massa do composto (GRANDE, 1990).

O estudo e a determinação de contaminantes em alimentos que podem causar impactos a saúde humana tem encontrado na espectrometria de massas uma grande ferramenta de aplicação (CARERI, 2002).

Métodos baseados em espectrometria de massas têm sido propostos para os mais diversos usos, devido ao fato que o espectro de massas gerado poder fornecer informações a respeito do peso molecular, estrutura, identidade e pureza dos compostos além de ser utilizada para análises quantitativas de substâncias a nível traço (AGILENT, 2001).

2.13.1 Modos de Ionização

Espectrômetros de massas trabalham com moléculas ionizadas que são selecionadas e identificadas de acordo com sua relação massa/carga (m/z). Inicialmente a aplicação da espectrometria de massas estava restrita a análise de gases, substâncias voláteis e de substâncias termicamente estáveis, pois as primeiras técnicas de ionização empregadas são processos nos quais os analitos são primeiramente vaporizados e a ionização só ocorre quando a molécula está na fase gasosa e na região do vácuo. Essa restrição impossibilitava a análise de substâncias que não são voláteis e não são estáveis termicamente (KINTER, 2000).

Na década de 80, o desenvolvimento de técnicas de ionização mais brandas e sob condições de pressão atmosférica, causou uma revolução na extensão das aplicações de espectrometria de massas. O termo ionização branda significa que os íons formados possuem baixa energia interna, o que permite a observação de espécies iônicas moleculares com pouca ou nenhuma fragmentação. As técnicas de ionização branda permitem a produção de íons com base em compostos de alta massa molecular e não voláteis, estendendo a aplicação da espectrometria de massas a todos os tipos de moléculas (FERREIRA, 2009).

Nas técnicas de ionização a pressão atmosférica, os analitos são ionizados a pressão atmosférica e depois são mecanicamente ou eletrostaticamente selecionados das moléculas neutras (FERREIRA, 2009).

Diversos tipos de fontes de ionização a pressão atmosférica são disponíveis para o uso com cromatografia líquida. Cada uma tem suas vantagens e desvantagens que dependem do tipo de informação que se deseja. As mais comuns técnicas de ionização a pressão atmosférica são descritas a seguir.

2.13.1.1 Electrospray (ESI)

ESI é uma técnica de ionização a pressão atmosférica (API) aonde o fluxo de fase móvel, vindo do cromatógrafo, passa em uma câmara onde existe um fluxo de gás aquecido e um capilar de pequeno diâmetro, onde é aplicada uma diferença de potencial elétrico criando um campo eletrostático. O campo elétrico criado induz o acúmulo de carga na superfície do líquido no final do capilar, formando gotículas carregadas. O gás aquecido auxilia na

evaporação do solvente. O solvente evapora da gotícula carregada tornando ela instável pelo acúmulo de carga. Quando o acúmulo de carga torna-se maior que a tensão superficial da gota, ocorre um fenômeno chamado explosão de *Coulomb*, onde a molécula do analito reteve a carga da gotícula tornando-se um íon após a vaporização do solvente (CROTTI, 2006).

Para detecção de íons positivos existe o fornecimento de elétrons, ocorrendo oxidação, já para os íons negativos os elétrons são consumidos, ocorrendo redução.

2.13.1.2 Ionização química a pressão atmosférica (APCI)

A ionização química a pressão atmosférica é uma técnica que utiliza reações íon-molécula em fase gasosa sob pressão atmosférica com finalidade de ionizar o analito. Em APCI o fluxo de fase móvel vindo do cromatógrafo é entra em uma câmara aquecida (geralmente 250-400 °C) onde existe um fluxo de gás quente (120 °C). O calor existente vaporiza o solvente resultando em moléculas de solvente no estado gasoso. O fluxo de gás direciona as moléculas e o solvente em estado gasoso para a região da descarga corona. A descarga corona produz íons primários (N_2^+ e O_2^+) por ionização dos elétrons. Esses íons primários colidem com moléculas de solvente vaporizadas para formar íons secundários reativos na fase gasosa (H_3O^+). Os íons secundários reagem com as moléculas dos analitos originando os íons (PRAKASH, 2007).

2.13.1.3 Fotoionização a pressão atmosférica (APPI)

A técnica APPI surgiu a menos de 10 anos , tornando-se uma técnica complementar as técnicas ESI e APCI, pois possibilitou ampliar a faixa de polaridade dos analitos analisados. O modo de ionização é semelhante a APCI, diferindo pelo fato da formação dos íons intermediários ser por fotoionização e não pela descarga corona (AGILENT, 2001).

2.14 Tipos de espectrômetros de massas

2.14.1 Quadrupolo

O quadrupolo é o tipo de analisador de massas mais utilizado em espectrometria de massas. Em um espectrômetro de massas quadrupolar o analisador de massas quadrupolo é o componente do instrumento responsável por filtrar íons, com base em sua relação massa/carga (m/z).

O quadrupolo consiste de quatro cilindros paralelos nos quais se aplicam uma corrente elétrica e um potencial de radio frequência alternante. Os íons são separados com base na estabilidade de suas trajetórias em um campo elétrico. Os íons produzidos na fonte de ionização do instrumento são focalizados ao centro da região entre os quatro cilindros, sendo suas trajetórias dependentes do campo elétrico produzido, onde apenas íons de uma particular relação m/z terão trajetórias estáveis e chegarão ao detector. São comumente acoplados a cromatógrafos a gás e cromatógrafos líquidos como um sistema simples de varredura (AGILENT, 2001).

2.14.2 Triplo quadrupolo

Em um sistema triploquadrupolo, três quadrupolos são dispostos sequencialmente (espectrometria de massas sequencial). O primeiro quadrupolo opera selecionando determinado íon (chamado íon precursor) gerado na fonte de ionização do instrumento. O segundo quadrupolo opera como uma cela de focalização ou como uma cela de fragmentação do íon selecionado no primeiro quadrupolo (íons produto). No terceiro quadrupolo, ocorre novamente um selecionamento dos íons gerados na cela de fragmentação baseado na relação m/z (AGILENT, 2001; APPLIED BIOSYSTEMS, 2005).

2.14.3 Time-of-flight

Em um espectrômetro de massas do tipo time-of-flight (TOF), uma força eletromagnética uniforme é aplicada a todos os íons ao mesmo tempo, fazendo com que eles sejam acelerados em um tubo de vôo. Os íons mais leves, isto é com relação m/z menor viajarão mais rápido pelo tubo de vôo, chegando primeiro ao detector, assim a relação m/z dos íons é determinada pelo tempo de chegada ao detector. Analisadores de massas do tipo TOF tem uma faixa de massas mais ampla e são bastante precisos em suas medidas de massa (AGILENT, 2001).

2.14.4 Íon Trap

Um analisador de massas do tipo íon trap é formado por um eletrodo circular e dois cones, que formam uma câmara. Os íons que entram ou são formados no interior da câmara são aprisionados por campos eletromagnéticos. Aplicando-se diferentes campos eletromagnéticos podem-se ejetar seletivamente os íons em direção ao detector (AGILENT, 2001).

2.14.5 Setor magnético

Este tipo de espectrômetro de massas possui um setor magnético curvo (180, 90 ou 60°) no qual passam os íons formados na fonte de ionização, que são posteriormente acelerados. O raio de trajetória dos íons no setor magnético curvo irá depender de sua razão m/z , gerando uma distribuição em função das massas moleculares, antes de atingirem o detector (SKOOG, 1992).

2.15 Técnicas de scan

MS: em *scan MS*, também chamado como *single MS scan*, os íons são separados de acordo com sua relação massa/carga (m/z). O modo *single MS scan* pode ser usado para determinar ou confirmar o peso molecular de um composto. *MS scan* não fornece qualquer informação a respeito das características químicas de um composto além de sua massa (APPLIED BIOSYSTEMS, 2005).

MS/MS: *scan MS/MS*, são utilizados para identificar espécies moleculares e adquirir mais informações a respeito dos íons. Utilizando o modo *scan MS* consegue-se determinar a massa de um composto, mas não se pode ter certeza de sua identidade. Operando em modo *scan MS/MS* cria-se fragmentos dos íons por dissociação ativada por colisão (CAD). O íon molecular, ou íon precursor, é acelerado em direção a uma cela de colisão onde irá colidir com um gás neutro. Ocorrendo a fragmentação do íon precursor, ele irá gerar íons fragmento característicos, similar a uma impressão digital (APPLIED BIOSYSTEMS, 2005).

2.15.1 Tipos de scan MS/MS

Q1/Q3 scan: operando neste modo, um *scan* completo na faixa de massa selecionada e adquirido, utilizando o primeiro ou terceiro quadrupolo (Q1/Q3). Obtém-se a intensidade de todos os íons presentes na faixa de massa selecionada (APPLIED BIOSYSTEMS, 2005).

Q1/Q3 Multiple ion scan: operando neste modo, um *scan* completo na faixa de massa selecionada e adquirido, utilizando o primeiro ou terceiro quadrupolo (Q1/Q3). Obtém-se a intensidade dos íons com determinada massa selecionada (APPLIED BIOSYSTEMS, 2005).

Product ion scan: neste modo de operação, o primeiro quadrupolo (Q1), é fixado para transmitir um específico íon precursor para a cela de colisão (Q2) onde ocorrerá fragmentação. Em seguida no terceiro quadrupolo (Q3) é realizada uma varredura para identificação dos fragmentos gerados (APPLIED BIOSYSTEMS, 2005).

Precursor ion scan: neste modo de operação, o terceiro quadrupolo (Q3), é fixado para um específico íon com relação massa/carga, e o primeiro quadrupolo (Q1) realiza uma varredura em determinada faixa de massa. Este modo é utilizado para confirmar a origem de determinado fragmento com relação massa/carga (APPLIED BIOSYSTEMS, 2005).

Neutral loss scan: neste modo de varredura MS/MS, o primeiro e o terceiro quadrupolo varrem determinada faixa de massa, buscando uma perda específica selecionada na molécula (APPLIED BIOSYSTEMS, 2005).

MRM (Multiple Reaction Monitoring): é o modo de operação em que o triploquadrupolo atinge maior seletividade. O primeiro quadrupolo é fixado para transmitir apenas determinado íon para a cela de colisão (Q2). Após fragmentação em Q2, os íons são transmitidos para o terceiro quadrupolo (Q3) que também é fixado para somente transmitir determinados íons com relação massa/carga especificada para o detector. Este modo é utilizado para análises de compostos alvo (APPLIED BIOSYSTEMS, 2005).

Resumidamente, a análise por MS consiste na geração de íons com base em compostos (orgânicos ou inorgânicos) por meio de um método de ionização apropriado. Em seguida, os íons são separados por meio de sua relação m/z em um analisador de massas e detectados qualitativamente ou quantitativamente por meio de um detector. A magnitude do sinal elétrico em função da razão m/z é convertida por um processador de dados, o qual gera o espectro de massas correspondente (GROSS, 2004)

Um espectrômetro de massas apropriadamente ajustado e calibrado garante a melhor resposta para qualquer amostra ou analito analisado no instrumento. O ajuste (do inglês, *tuning*) e a calibração são realizados de forma conjunta independente da otimização (APPLIED BIOSYSTEMS, 2005).

O ajuste e a calibração focam em resolução e calibração de massas, já a otimização foca em sensibilidade para o analito de interesse. A realização do ajuste e calibração são operações realizadas periodicamente ou se o instrumento tem queda em seu desempenho, já a otimização do instrumento é realizada quando se quer maximizar a resposta para um novo analito. O ajuste e a calibração são realizados utilizando uma solução padrão de calibração com massas conhecidas. Esta solução padrão é utilizada para calibrar a escala de massa com o objetivo de detectar os íons alvos o mais exato possível, com base na sua relação massa/carga, dentro de uma aceitável variação. Assim que o pico exato é identificado, ocorre o ajuste da

resolução, para adquirir a melhor largura e forma do pico. Após ajuste e calibração, o desempenho do instrumento é maximizado e os parâmetros encontrados são utilizados por todos os experimentos realizados no instrumento (APPLIED BIOSYSTEMS, 2005).

A otimização do instrumento para determinado analito, é realizada ajustando os parâmetros dependentes da fonte (do inglês, *source-dependent parameters*) e os parâmetros dependentes do composto (do inglês, *compound-dependent parameters*).

A otimização dos parâmetros de fonte e composto dependentes podem ser realizados manualmente ou automaticamente, dependendo de quão fino é o ajuste necessário para realização da análise (APPLIED BIOSYSTEMS, 2005).

Para realização da otimização dos parâmetros composto-dependentes pode-se utilizar o método de infusão (do inglês, *infusion*). A infusão consiste na introdução do analito na fonte de ionização, de modo contínuo utilizando uma bomba programada. Esta abordagem é geralmente utilizada quando se tem grandes quantidades de analito, usualmente um padrão analítico. Os parâmetros composto-dependentes consistem nos parâmetros que irão guiar o íon dentro do espectrômetro de massas. Os parâmetros composto-dependentes não dependem das condições cromatográficas (APPLIED BIOSYSTEMS, 2005). Os parâmetros composto-dependentes que necessitam ser otimizados são:

Gás de colisão (CAD do inglês, *CAD Gas*): este parâmetro controla a pressão do gás de colisão dentro da cela de colisão durante a realização de uma varredura Q3 ou MS/MS. Em varredura Q3, o gás de colisão auxilia na focalização do íon para atravessar a cela de colisão; em varredura MS/MS o gás de colisão atua realizando a fragmentação do íon precursor. Quando os íons precursores colidem com o gás de colisão eles geram fragmentos (os íons produto) que serão selecionados no terceiro quadrupolo.

Declustering Potential (DP): o parâmetro DP controla a voltagem aplicada no orifício de entrada do espectrômetro de massas. Esta voltagem é utilizada para minimizar a formação de *clusters* (aglomerados) de moléculas de solvente que podem permanecer após a entrada na região do vácuo ou para realizar a fragmentação dos íons antes de entrarem no espectrômetro de massas.

Potencial de entrada (EP do inglês, *entrance potential*): esta voltagem controla a entrada e focalização dos íons para dentro do quadrupolo.

Potencial de saída da cela de colisão (CXP do inglês, *collision cell exit potential*): esta voltagem controla a saída e focalização dos íons para fora da cela de colisão em direção ao quadrupolo seguinte.

Para otimização dos parâmetros dependentes da fonte, deve se levar em conta as condições cromatográficas. Para realização da otimização destes parâmetros, uma abordagem diferente é aplicada. O método de introdução da amostra não é mais a infusão, agora se utiliza a análise por injeção em fluxo (FIA do inglês, *flow injection analysis*). O método FIA de introdução de amostra requer o uso de uma bomba e um injetor de cromatografia líquida de alta eficiência, além do espectrômetro de massas. Neste método sucessivas injeções de uma pequena quantidade de analito são realizadas enquanto os parâmetros da fonte são variados (APPLIED BIOSYSTEMS, 2005). Os parâmetros dependentes da fonte que devem ser otimizados variam dependendo da fonte utilizada. A seguir temos uma descrição dos parâmetros otimizados para a fonte *electrospray*:

Gás 1 (GS1): o parâmetro GS1 controla o gás de nebulização. O gás de nebulização auxilia geração de pequenas gotas a partir do fluxo do cromatógrafo, afetando a estabilidade e sensibilidade dos íons no *spray*.

Gás 2 (GS2): o parâmetro GS2 controla o gás auxiliar na fonte de *electrospray*. Ele auxilia a evaporação das gotas no *spray* prevenindo que solvente entre no instrumento.

Temperatura (TEM): o parâmetro TEM controla a temperatura do gás auxiliar no fonte *electrospray*. É o responsável por auxiliar a evaporar o solvente para produzir uma fase gasosa da amostra.

Curtain Gas (CUR): este parâmetro controla o fluxo de gás na saída do orifício de entrada do espectrômetro de massas. A “cortina de gás” previne que moléculas de solvente entrem e contaminem o espectrômetro de massas. Deve ser mantida a mais alto possível sem que ocorra perda de sensibilidade.

Ionspray voltage (IS): este parâmetro controla a voltagem aplicada na agulha que ioniza a amostra na fonte. Ele depende da polaridade utilizada e afeta a estabilidade e sensibilidade dos íons no *spray*.

2.16 Validação de métodos analíticos

Segundo Bruce (1998) um processo analítico pode ser dividido nas seguintes etapas: desenvolvimento, otimização, validação, aplicação e revalidação do método. Ainda segundo estes autores a passagem de uma etapa para outra ocorre de forma gradual, embora seja aconselhável que o método proposto esteja claramente descrito antes de iniciar o processo de validação. Alguns autores consideram esta divisão em etapas apenas uma forma didática de tratar o processo analítico, sendo algo difícil de ser alcançado em condições práticas reais. Para estes autores a validação de um método não pode ser separada do seu desenvolvimento, uma vez que o analista não saberá se as condições do método são aceitáveis até que os estudos de validação sejam realizados, além de que o desenvolvimento do método só estará completo após a realização dos estudos de validação e demonstração de desempenho analítico aceitável (GREEN, 1996). Assim a maioria dos autores considera o desenvolvimento e a validação como processos interativos (HUBER, 1998).

O desenvolvimento de métodos pode ocorrer de inúmeras formas, desde adaptações a um método já existente por meio de mudanças mínimas ou partindo de um delineamento experimental para criação de um novo método (EURACHEM, 1998).

A validação deve demonstrar que o método analítico dá cumprimento aos critérios aplicáveis as características relevantes do desempenho (2002/657/CE).

A norma ISO/IEC 17025 contém requisitos de direção e técnicos que devem ser atendidos pelos laboratórios para implementação e manutenção de um sistema de gestão adequado. A parte de direção diz respeito a questões organizacionais e burocráticas. Já os requisitos técnicos abordam condições ambientais e laboratoriais, equipe técnica, metodologia aplicada, validação de métodos e garantia da qualidade dos resultados. Percebe-se então, que a questão de validação do método analítico é um requisito obrigatório para que o laboratório seja acreditado conforme a norma ISO/IEC 17025. Segundo a norma ISO/IEC 17025, validação do método analítico é a confirmação por testes e apresentação de evidências objetivas de que determinados requisitos são preenchidos para um determinado uso intencional.

Os métodos analíticos podem ser divididos em duas categorias principais: métodos normalizados e métodos não normalizados (INMETRO, 2003). Métodos normalizados são aqueles desenvolvidos por um organismo de normalização, cujos métodos são aceitos pelo setor técnico em questão. Já métodos não normalizados são aqueles desenvolvidos pelo

próprio laboratório ou adaptado a partir de métodos normalizados e validados. São métodos publicados em revistas científicas, por fabricantes de instrumentos ou de 'kits' portáteis de análise. A norma ISO/IEC 17025 estabelece que se deve validar métodos não normalizados, métodos criados/desenvolvidos pelo próprio laboratório, métodos normalizados utilizados fora do seu escopo e em ampliações e modificações de métodos normalizados.

A validação corresponde a estudos analíticos que envolvem o laboratório, utilizando o mesmo método para analisar a mesma ou diferentes matrizes, durante um intervalo de tempo determinado. Estes estudos permitem a avaliação do desempenho do método com um número considerável de experimentos, utilizando diferentes concentrações e matrizes, em um curto intervalo de tempo, facilmente adequado as diferentes situações (VAN DER VOET et al. 1999).

Procedimentos de validação intralaboratoriais têm sido internacionalmente aceitos, uma vez que diferentes órgãos oficiais tem proposto protocolos para este tipo de validação. No Brasil os processos de validação têm sido propostos pela ANVISA e pelo INMETRO.

A abrangência de um processo de validação de metodologia deve ser suficiente para atender as necessidades de uma determinada aplicação (ISO/IEC 17025), sendo o nível de detalhamento do processo de validação determinado por circunstâncias como necessidades, possibilidades, riscos, custos e prazos (EAL, 1997). A aplicação da metodologia desenvolvida pode ter diferentes propósitos, desde pesquisa, desenvolvimento e produção até processos de controle de qualidade (BRUCE et al., 1998). Geralmente processos de validação mais aprofundados, que garantam alto grau de confiabilidade e utilizem tecnologia de ponta, são exigidos quando saúde, segurança e grandes valores econômicos estão envolvidos, sendo o que corresponde a realidade da maior parte dos ensaios na área de alimentos (EAL, 1997).

A abrangência do processo de validação também é função do tipo de método desenvolvido, se qualitativo ou quantitativo. Métodos qualitativos são aqueles que permitem identificar um analito com base nas suas propriedades físicas, químicas ou biológicas, já métodos quantitativos são métodos que determinam a quantidade de um determinado analito expresso na forma de um valor numérico com as unidades apropriadas (2002/657/EC).

A validação é única para cada método e aplica-se a protocolos definidos, para determinação de determinados analitos, em determinadas faixas de concentração e para determinados tipos de matrizes. Por isso antes de iniciar o processo de validação o escopo deve estar bem estabelecido, incluindo o protocolo do método, analito, faixa de concentração, tipo de matriz e requisitos analíticos considerados como adequados para desempenho do método (TAVERNIERS et al., 2004).

Os requisitos analíticos de desempenho são definidos como uma qualidade funcional que pode ser atribuída a um método de ensaio. Alguns termos e definições são bem esclarecidos e refinados, enquanto outros são vagos e ambíguos. Diversas tentativas de harmonização tem sido feitas na tentativa de construir um esquema conceitual único e consistente para os termos relacionados a validação. Algumas vezes os guias de validação são intencionalmente vagos, para deixar ao analista a flexibilidade de adaptá-los de acordo com seu uso (RIBANI et al., 2004).

Os parâmetros de validação de métodos analíticos têm sido definidos em diferentes grupos de trabalho de organizações internacionais e nacionais.

Na Tabela 5 podemos visualizar as similaridades e diferenças entre o documento da União Européia 2002/657/EC e a Resolução ANVISA RE nº 899 de 29/05/2003.

Tabela 5 – Parâmetros de validação segundo a 2002/657/EC e ANVISA.

EC 657/2002	ANVISA
Especificidade/Seletividade	Especificidade/Seletividade Intervalos da curva de calibração Linearidade Curva de calibração
Limite de detecção	Limite de detecção
Limite de quantificação	Limite de quantificação
Veracidade/recuperação	Exatidão
Precisão	Precisão Repetibilidade Precisão intermediária Reprodutibilidade
Robustez	Robustez

2.17 Controle de qualidade do método analítico

A existência de estudos colaborativos entre laboratórios para realização de análises de aflatoxina M₁, ainda que os métodos analíticos utilizados atendam determinadas características de desempenho, não são garantia de existência de precisão entre os resultados. Um estudo organizado pela IARC mostrou que pode haver uma grande variação nos resultados (FRIESEN, 1982). Um programa de controle de qualidade deve ser estabelecido, e

a análise de materiais de referência certificados (CRM, do inglês, *Certified Reference Material*) deve fazer parte deste programa.

Outro importante componente para assegurar a qualidade do método analítico é a realização de testes de proficiência. Os ensaios de proficiência são considerados ferramentas de controle de qualidade externo (EURACHEM, 1998). Nestes ensaios, cujos procedimentos são harmonizados entre AOAC *International*, ISO e IUPAC, os laboratórios participantes analisam o material distribuído pelo organizador, utilizando o procedimento analítico adotado em suas rotinas de trabalho. O principal objetivo do teste de proficiência é avaliar o desempenho de um método analítico para determinado analito, desenvolvido por um laboratório (SOUZA, 2007). O desempenho é avaliado com base em *z-score* que indica se o laboratório tem desempenho satisfatório. Os resultados encontrados são considerados corretos se o *z-score* estiver entre +2 e -2, sendo que quanto mais próximo de 0, melhores são os resultados.

2.18 Parâmetros analíticos

2.18.1 Faixa de trabalho

Segundo o INMETRO (2003), a faixa de trabalho é geralmente limitada no extremo inferior pelo limite de detecção ou limite de quantificação, enquanto no limite superior as restrições são impostas por efeitos dependentes do sistema de detecção do instrumento. Dentro da faixa de trabalho deve existir uma faixa de resposta linear.

Thompson (2002) relatou que a faixa de trabalho não é necessariamente idêntica a faixa linear, e destaca que dentro da faixa linear existe uma faixa de trabalho.

Os autores sustentam esta definição baseada em que a faixa linear pode cobrir um intervalo mais amplo de concentração, enquanto a faixa de trabalho cobre uma faixa mais restrita geralmente cobrindo a faixa a ser validada.

2.18.2 Curva analítica e linearidade

A calibração é um dos estágios fundamentais em análise química. A curva analítica é o método de quantificação mais frequentemente utilizado e consiste na determinação da resposta do instrumento às várias concentrações da substância em estudo (PRIMEL, 2003).

A linearidade de um método analítico pode ser definida como sendo a habilidade desse método em gerar resultados diretamente proporcionais a concentração do analito, em uma determinada faixa de concentração (INMETRO, 2003).

As diretrizes da Conferência Internacional de Harmonização, (ICH, do inglês *International Conference on Harmonization*), da União Européia segundo A 2002/657/EC e da ANVISA especificam um mínimo de cinco níveis de concentração para preparo de uma curva analítica. Já a União Internacional de Química Pura e Aplicada, (IUPAC, do inglês *International Union of Pure and Applied Chemistry*) recomenda seis ou mais níveis de concentração para preparo da curva analítica curva.

Para a maioria das técnicas cromatográficas, observa-se uma relação linear de primeira ordem entre a resposta instrumental medida (eixo y, variável dependente) e a concentração do analito (eixo x, variável independente). Essa relação produz uma equação de regressão linear $y = ax + b$, que relaciona as duas variáveis x e y e gera os coeficientes de regressão **a** (inclinação da curva) e **b** (intersecção da curva analítica com o eixo y, quando $x = 0$). Essa equação é válida para um determinado intervalo de concentração do analito (RIBANI et al., 2004).

O grau de concordância entre a variável independente x e a variável dependente y é dado pelo coeficiente de correlação r, que deve assumir valores o mais próximo possível de -1 e +1 (JEFFERY et al., 1992). Mais comumente utilizado para determinar a adequação do ajuste dos dados, usa-se o coeficiente de determinação r^2 , que é o quadrado do coeficiente de correlação e indica o percentual da variabilidade de y explicado pela variação de x. Valores iguais ou superiores a 0,99 e 0,90 são recomendados, respectivamente pela ANVISA e pelo INMETRO.

Para verificar se os pontos encontram-se dentro da região linear da curva analítica utiliza-se o teste da razão entre o sinal (S) e a concentração (Q) definida pela Equação 1:

$$(S/Q) \% = [(S-b) /Q] \times 100/a \quad (1)$$

onde:

S = sinal obtido (área ou altura do pico);

Q = concentração do analito injetada;

b = coeficiente linear;

a = coeficiente angular

A definição dos valores S e Q dependem da técnica analítica utilizada, no caso da cromatografia a curva analítica é geralmente construída através dos parâmetros área ou altura do pico cromatográfico e concentração do analito (PRIMEL, 2003).

Nos casos em que ($r^2 = 1$) e dentro da faixa linear, pode-se provar que $(S/Q) = a$, para todos os valores experimentais utilizados para construir a curva. Quando ($r^2 < 1$) e dentro da faixa linear, o resultado para a razão $(S/Q) \approx a$. Conforme normas da IUPAC são considerados dentro da faixa linear, os pontos cujas razões (S/Q) , não ultrapassem mais de 5% do coeficiente angular da reta (CLIFTON e MELOAN, 1996).

2.18.3 Seletividade

A seletividade de um método representa a sua capacidade de avaliar de forma inequívoca a substância em exame na presença de componentes que poderiam interferir na sua determinação. A seletividade avalia o grau de interferência de outros compostos com propriedades semelhantes a substância de interesse que porventura podem estar presentes na amostra a ser analisada (RIBANI et al., 2004).

Uma forma de avaliar a seletividade de um método instrumental de análise e comparar a matriz isenta da substância de interesse com a matriz adicionada com esta substância (padrão). Neste caso, nenhum interferente deve eluir no tempo de retenção da substância de interesse, que deve estar separada dos demais compostos presentes na amostra.

Outra forma de avaliar a seletividade é através de detectores do tipo arranjo de diodos ou espectrômetros de massas, que comparam o espectro do pico obtido na separação com o de um padrão e o resultado é utilizado como uma indicação da presença do composto puro (RIBANI et al., 2004).

2.18.4 Limite de detecção e limite de quantificação

O limite de detecção representa a menor concentração da substância de interesse que pode ser detectada pelo método utilizado, mas não necessariamente quantificada.

O limite de quantificação representa a concentração mínima a qual um analito pode ser quantificado em uma amostra com precisão e exatidão aceitáveis nas condições experimentais. Assim como o limite de detecção, o limite de quantificação geralmente é expresso em unidades de concentração (FRANCOTTE, 1996).

Para cálculo do limite de detecção e do limite de quantificação podem ser utilizados o Método visual, o Método da Relação Sinal-Ruído e o Método Baseado em Parâmetros da Curva Analítica.

O método visual consiste na adição de concentrações conhecidas da substância de interesse a matriz a ser analisada, até que se possa distinguir entre ruído e sinal analítico a menor concentração adicionada.

Já o método da relação sinal-ruído utiliza-se de amostras em branco (matriz isenta da substância de interesse) e amostras adicionadas de padrão e faz-se uma comparação entre estas amostras. Assim é estabelecida uma concentração mínima a qual a substância gera uma relação sinal-ruído de 3:1 para o limite de detecção e uma relação sinal-ruído 10:1 para o limite de quantificação.

Por fim o método baseado em parâmetros da curva analítica utiliza-se da expressão $LD = 3,3 \times (s/S)$ ou $LQ = 10 \times (s/S)$ onde, s é a estimativa do desvio padrão do branco, da equação da linha de regressão ou do coeficiente linear da equação e S o coeficiente angular da curva (RIBANI et al., 2004).

2.18.5 Exatidão

A exatidão representa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados em um determinado ensaio e um valor de referência aceito como verdadeiro (INMETRO, 2003).

A exatidão é expressa em porcentagem de erro sistemático, podendo ser calculada pela Equação 2: (ICH, 2008)

$$\text{Erro relativo\%} = [(\text{valor real} - \text{valor obtido})/\text{valor real}] \times 100 \quad (2)$$

Os processos mais utilizados para avaliação da exatidão são o uso de materiais de referência certificados e ensaios de recuperação. Os materiais de referência certificados (CRM) são amostras fornecidas por organismos reconhecidos e confiáveis, acompanhados de um certificado que possui o valor de concentração da substância. Os resultados obtidos através do método que está sendo proposta a validação são comparados com os resultados expressos no certificado do material de referência para verificar a exatidão do método.

Os ensaios de recuperação são os mais comuns de serem realizados devido a dificuldade em se obterem CRM, que muitas vezes nem existem. A recuperação é definida como a proporção da quantidade da substância de interesse adicionada a porção analítica do material teste, que é extraída e passível de ser quantificada. A limitação do procedimento de recuperação é a de que a substância adicionada não está, necessariamente, na mesma forma que a presente na amostra (BURNS et al., 2002)

2.18.6 Precisão

A precisão representa a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões sob condições definidas. É expressa através da estimativa do desvio padrão relativo (*RSD*, do inglês *Relative Standard Deviation*), calculado pela Equação 3 (INMETRO, 2003).

$$RSD = (s / x) \times 100 \quad (3)$$

onde:

s = estimativa do desvio padrão absoluto;

x = média de uma série de medidas.

A precisão em validação de métodos é considerada em três níveis: repetitividade, precisão intermediária e reprodutibilidade. A repetitividade representa a concordância entre os resultados de medições sucessivas de um mesmo método efetuadas sob as mesmas condições

de medição: mesmo procedimento, mesmo analista, mesmo instrumento, repetições em um curto intervalo de tempo (INMETRO, 2003).

A precisão intermediária indica o efeito das variações dentro do laboratório: diferentes analistas, diferentes instrumentos, amostras analisadas em dias diferentes. O objetivo da validação da precisão intermediária é verificar que no mesmo laboratório o método fornecerá os mesmos resultados.

Reprodutibilidade refere-se aos resultados obtidos em estudos de colaboração entre laboratórios e deve ser considerada somente em situações como padronização de procedimentos analíticos a serem incluídos e adotados como métodos de referência

2.18.7 Recuperação

A recuperação (ou fator de recuperação), R, é definida como a proporção da quantidade de analito, presente ou adicionada na porção analítica do material teste, que é extraída e passível de ser quantificada (THOMPSON, 2002). A recuperação é calculada pela Equação 4:

$$R(\%) = (\text{concentração medida}/\text{concentração adicionada}) \times 100 \quad (4)$$

2.18.8 Robustez

Robustez de um método mede a sensibilidade que este apresenta frente a pequenas variações nos seus parâmetros. As mudanças avaliadas refletem as alterações que podem ocorrer quando o método é executado em diferentes instrumentos ou por diferentes analistas ou alterações no ambiente de análise. Segundo a ANVISA, quando se utiliza a cromatografia líquida, os principais parâmetros que podem resultar em variação na resposta do método são: vazão da fase móvel, temperatura da coluna, diferentes lotes ou fabricantes de colunas, variação no Ph da fase móvel e variação na composição da fase móvel (ANVISA, 2003). O método é considerado robusto se a variação entre os resultados encontrados com os

parâmetros alterados não diferir em $\pm 5\%$ dos resultados encontrados com os parâmetros inalterados. A variação é calculada com a Equação 5 que segue:

$$\text{Variação\%} = [(Rec2*100)/Rec1]-100 \quad (5)$$

Onde:

Rec1 = recuperação do método inalterado;

Rec2 = recuperação do método alterado.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Instrumentação

Cromatógrafo líquido de alta eficiência *Agilent Technologies* modelo 1200 (Estados Unidos), equipado com degasseificador modelo 1200 (G1379B), bomba binária modelo 1200 (G1312A), amostrador automático de ultra-performance modelo 1200 (G1367B) e compartimento de coluna modelo 1200 (G1316B);

Coluna cromatográfica *Agilent Technologies* XDB-C18 150 x 4,6 mm com tamanho de partícula de 5 µm;

Espectrômetro de massas *Applied Biosystems* modelo API 4000 *Qtrap* (Canadá) com fonte de ionização por *electrospray* (ESI);

Sistema de aquisição de dados *Analyst* versão 1.4.1 (*Applied Biosystems*, Estados Unidos);

Sistema de purificação de água Milli-Q[®] (Millipore, Brasil) com módulo Elix, e sistema de contagem de carbono orgânico total;

Sistema Manifold marca CRS (Estados Unidos) para *clean-up* simultâneo de 24 amostras;

Bomba de vácuo Marconi modelo MA 057/3 (Brasil);

Centrífuga LS-3 Plus Celm (Brasil);

Micropipetas automáticas de volume variável Eppendorf (Alemanha);

Multivórtex vector inverter Marconi modelo CFW08 (Brasil);

Balança analítica com precisão de quatro casas decimais Sartorius modelo BP2215 (Alemanha);

Banho de ultrassom Odontobrás modelo 1440 (Brasil).

3.2 Materiais

Cartuchos de imunoafinidade Aflaprep-M, R-Biopharm (Alemanha);

Tubos de polipropileno, com tampas rosqueadas, com capacidade para 50 mL;
Tubos de ensaio de vidro com capacidade para 5 mL;
Vials *Agilent Technologies* (Estados Unidos) com capacidade para 2 mL.

3.3 Solventes, reagentes e padrões

Água purificada em sistema Milli-Q®;
Acetonitrila grau HPLC, marca J.T. Baker (Estados Unidos);
Metanol grau HPLC, marca J.T.Baker (Estados Unidos);
Acetato de amônio p.a., marca J.T.Baker (Estados Unidos).
Padrão de Aflatoxina M₁ sólido 10 µg, Sigma-Aldrich A6428 (Alemanha);

3.4 Preparo das soluções analíticas

Para preparo da solução analítica estoque, foi adicionado ao frasco de padrão de aflatoxina M₁ o volume necessário de acetonitrila para obter-se uma concentração final de 10 µg mL⁻¹.

Para isso foi adicionado, com o auxílio de micropipeta, o volume de 1 mL no frasco contendo 10 µg de padrão sólido de aflatoxina M₁. O frasco com o padrão e o solvente foi homogeneizado em banho de ultrassom por 5 minutos. A solução estoque foi armazenada em freezer a - 8 °C.

A solução intermediária com concentração de 0,1 µg mL⁻¹, foi preparada cada dia em que fossem ser realizadas análises, a partir da solução estoque, transferindo-se uma alíquota de 10 µL para um vial já contendo 990 µL de solução diluente metanol:água 1:1 (v/v).

A solução intermediária foi utilizada para preparação da curva analítica e para avaliação dos parâmetros analíticos.

3.5 Preparo da curva analítica

As curvas analíticas foram preparadas através da diluição de volumes adequados da solução intermediária nas concentrações de 0,05, 0,1, 0,2, 0,5, 1,0 e 2,0 para leite fluido e 1,0, 2,0, 4,0, 5,0, 8,0, 10,0, para leite em pó. O diluente utilizado foi uma solução de metanol:água 1:1 (v/v).

Assim como a solução intermediária, as curvas analíticas foram preparadas diariamente.

3.6 Preparo das fortificações

Foram escolhidos três níveis de concentração para realização das fortificações em leite fluido e leite em pó. Os níveis foram escolhidos baseados na 2002/657/EC que preconiza que sejam feitos ensaios de recuperação com 0,5, 1,0 e 1,5 vezes o limite permitido. Para a União Européia o limite permitido de aflatoxina M₁ em leite fluido é 0,05 µg L⁻¹. O leite em pó possui um índice de conversão médio de produto em equivalente leite fluido de dez vezes. Por isso, para validação do método para leite em pó foi utilizado o valor de 0,5 µg L⁻¹.

Na Tabela 6 são mostrados os volumes utilizados para as fortificações de leite fluido e leite em pó.

Tabela 6 – Níveis de concentração e volumes adicionados as amostras de leite fluido e leite em pó, para preparo das fortificações, 0,5, 1 e 1,5 vezes.

Leite Fluido (limite permitido 0,05 µg L ⁻¹)	Níveis de concentração (µg L ⁻¹)	Volume adicionado da solução intermediária (µL)
0,5	0,025	5
1,0	0,05	10
1,5	0,075	15
Leite em pó (0,5 µg L ⁻¹)		
0,5	0,25	2,5
1,0	0,5	5
1,5	0,75	7,5

3.7 Amostras de leite fluido e de leite em pó

Para este estudo 123 amostras foram adquiridas de leite fluido cru, pasteurizadas e UHT, nas formas integral, semi-desnatado e desnatado, oriundas de diversas localidades dos estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná. As amostras de leite em pó, totalizando 50 amostras, foram todas adquiridas em estabelecimentos comerciais do Rio Grande do Sul. As amostras foram adquiridas entre o período de 2008-2010.

3.8 Extração

3.8.1 Procedimento de extração de aflatoxina M₁ para amostras de leite fluido

A amostra de leite fluida em temperatura ambiente foi homogeneizada e em seguida uma alíquota foi centrifugada por 10 minutos a 2500 rpm. Descartando-se o sobrenadante 20 mL foram conduzidos a extração e purificação com colunas de imunoafinidade a um fluxo constante de 2 -3 mL por minuto seguindo-se uma lavagem com 10 mL de água ultra-pura. Após descarte da fase aquosa procedeu-se a eluição com 1,25 mL de solução acetonitrila:metanol 2:3 (v/v). Concluindo o processo, a coluna foi lavada com 1,25 mL de água ultra-pura obtendo-se um extrato com 2,5 mL. Após homogeneizado o extrato foi colocado em um vial e conduzido a análise. No Apêndice Figura 4, 5 e 6 encontram-se o processo de extração.

3.8.2 Procedimento de extração de Aflatoxina M₁ para amostras de leite em pó

A amostra de leite pó destinada a análise foi homogeneizada no próprio recipiente em que se encontrava. Após, foi pesada em tubos de polipropileno 1,00 ± 0,001 g em balança analítica e este foi reconstituída em 20 mL de água purificada aquecida a temperatura em

torno de 40 °C. Após reconstituída, a amostra foi centrifugada por 10 minutos a 2500 rpm. O restante do processo é idêntico ao procedimento para análise de leite fluido.

3.9 Otimização do espectrômetro de massas

3.9.1 Modo de ionização

A escolha do modo de ionização foi realizada através de experimentos de varredura em modo MS e MS/MS utilizando soluções padrão de aflatoxina M₁. Foram testados os modos de ionização *electrospray* e ionização química a pressão atmosférica.

A otimização do espectrômetro de massas para os parâmetros composto-dependentes e fonte-dependentes foi realizada de maneira automática e em seguida os parâmetros fonte-dependentes setados pelo instrumento foram avaliados de modo manual.

A escolha dos íons a serem monitorados para quantificação e qualificação será feita através de experimentos de varredura em modo MS/MS.

3.9.2 Intensidade relativa das transições

A razão entre intensidades relativas das transições dos íons produtos utilizados para quantificação e qualificação, expressas em porcentagem deve se manter constante.

Segundo a 2002/657/EC, para uma razão entre as intensidades maior que cinquenta por cento, o desvio padrão relativo não deve ser maior que 20%.

A razão em porcentagem entre as intensidades dos íons produtos é calculada segundo a Equação 6:

$$\text{Intensidade (\%)} = [(H1/H2)]*100 \quad (6)$$

onde:

H1 = intensidade do íon de qualificação;

H2 = intensidade do íon de quantificação.

Para cálculo do desvio padrao relativo é utilizada a Equação 3.

3.9.3 Pontos de identificação

Para a técnica de espectrometria de massas sequencial em modo *MRM*, a confirmação da identificação dos analitos é feita por um sistema de pontos.

Os pontos de identificação são obtidos através da combinação de diferentes técnicas analíticas ou no caso da espectrometria de massas sequencial através do monitoramento de íon precursor e produto. Segundo a 2002/657/EC para cada íon precursor é somado 1 pontos e para cada íon produto são somados 1,5 pontos.

Para confirmação de substâncias enumeradas no grupo B do anexo I da Diretiva 96/23/CE, que é onde esta classificada a aflatoxina M₁, são necessários um mínimo de 3 pontos de identificação.

3.10 Validação do procedimento analítico

3.10.1 Curva analítica e Linearidade

A aflatoxina M₁ foi quantificada utilizando-se o método de padronização externa. As curvas analíticas foram obtidas conforme item 3.5, injetado um nível subseqüente ao outro, em ordem crescente do nível de concentração, obtendo-se as áreas e o tempo de retenção da aflatoxina M₁. Plotando-se os valores de concentração no eixo das abscissas (x) e os valores das áreas no eixo das ordenadas (y) foram construídas as curvas analíticas.

Através do *software* foram obtidos a equação da reta, coeficiente de determinação (r^2) e verificado através da Equação 1, se os pontos estavam dentro da região linear da curva analítica.

3.10.2 Limite de detecção e limite de quantificação

Para determinar o limite de detecção e o limite de quantificação foi utilizado o método da relação sinal-ruído. Para isso foram empregadas soluções analíticas preparadas no diluente a partir da solução intermediária e extratos das amostras fortificadas.

Na determinação do limite de quantificação do instrumento foram feitas injeções das soluções analíticas preparadas no diluente até que se obtivesse uma relação 3:1 entre o pico do analito e o ruído da linha base nas proximidades do tempo de retenção do pico de aflatoxina M_1 . Para o limite de quantificação injetou-se as soluções analíticas preparadas no diluente até que se obtivesse uma relação de 10:1 entre o pico do analito e o ruído da linha base nas proximidades do tempo de retenção do pico de aflatoxina M_1 .

Para determinação do limite de detecção e limite de quantificação do método foram injetados os extratos das amostras fortificadas até que se obtivesse a mesma relação descrita para os limites instrumentais.

3.10.3 Seletividade

A avaliação da seletividade foi realizada através da comparação da matriz isenta da substância de interesse com a matriz adicionada de padrão de aflatoxina M_1 .

Também uso do espectrômetro de massas operando em modo *MRM* foi utilizado.

3.10.4 Exatidão

A exatidão do método foi verificada através de ensaios de recuperação. O ensaio de exatidão foi realizado com no mínimo 9 amostras de pelo menos um nível de concentração da faixa linear do método. O resultado foi expresso como erro relativo%, sendo calculado através da Equação 2. As amostras das diferentes matrizes foram fortificadas conforme item 3.6, para o nível médio de concentração.

3.10.5 Precisão

3.10.5.1 Repetitividade

Para a repetitividade do instrumento injetou-se cada nível das curvas analíticas três vezes no sistema cromatográfico (n=18). O resultado foi avaliado em termos de desvio padrão relativo entre as áreas dos picos.

Para a determinação da repetitividade do método foram extraídas em triplicata amostra de cada nível de fortificação e injetadas três vezes no sistema cromatográfico (n=27). O resultado foi avaliado em termos de desvio padrão relativo (Equação 3) entre as áreas dos picos.

3.10.5.2 Precisão intermediária

A precisão intermediária do instrumento foi avaliada injetando-se cada um dos níveis das curvas analíticas três vezes no sistema cromatográfico (n=18) em dias diferentes. O resultado foi avaliado em termos de desvio padrão relativo entre as áreas dos picos.

Para o ensaio de precisão intermediária do método foram fortificadas as amostras conforme item 3.6. Três amostras de cada nível de concentração foram extraídas e o extrato foi injetado três vezes no sistema cromatográfico (n=27). Este procedimento foi realizado em dois dias diferentes e por dois analistas diferentes.

3.10.6 Recuperação

Para realização dos ensaios de recuperação da aflatoxina M₁, as amostras foram fortificadas com conforme item 3.6.

Os resultados foram avaliados conforme 2006/401/EC, em termos de porcentagem de recuperação através da Equação 4 e desvio padrão relativo através da Equação 3.

Os ensaios para avaliação da recuperação foram realizados conforme a 2002/657/EC, alterando somente o número de amostras sugeridas pela decisão.

3.10.7 Robustez

Estudos de robustez foram realizados variando em $\pm 5\%$ a condição cromatográfica vazão de fase móvel e $\pm 8\%$ a temperatura do forno da coluna cromatográfica. Foram preparadas fortificações conforme item 3.6 em triplicata do nível médio de concentração para ambas as matrizes. Os resultados foram avaliados em termos de recuperações conforme item 3.10.6.

3.10.8 Ensaio de proficiência

O teste de proficiência realizado neste estudo foi organizado pelo FAPAS[®] (do inglês, *Food Analysis Performance Assessment Scheme*). Foram realizados três ensaios de proficiência com amostras de leite em pó.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Otimização do espectrômetro de massas

Mesmo com características físicas e químicas que indicariam uma possível e melhor ionização por APCI, na prática o modo que apresentou maior sensibilidade foi o ESI. A Figura 4 apresenta um experimento Q1 MS com ionização por ESI onde é possível visualizar o íon da aflatoxina M_1 ionizado em modo positivo $[M+H]^+$. Na Figura 5 o mesmo experimento Q1 MS realizado com uma fonte de ionização APCI não apresenta o íon da aflatoxina M_1 .

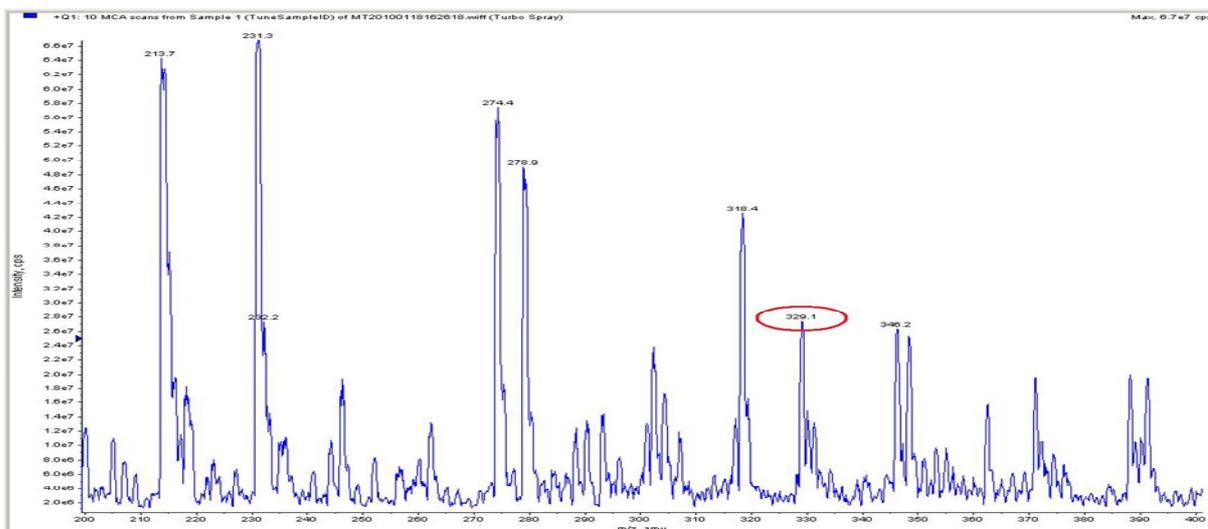


Figura 4 – Experimento Q1 MS, ionização, ESI, modo positivo $[M+H]^+$.

Em seguida a escolha do modo de ionização foram realizados experimentos de varredura em modo MS/MS para determinação dos íons a serem monitorados para quantificação e qualificação. A partir de um experimento *product ion* foram selecionados os possíveis íons produtos da fragmentação da molécula de aflatoxina M_1 .

A Figura 6 mostra o resultado deste experimento onde é possível identificar três principais íons produtos gerados a partir da molécula de aflatoxina M_1 ($m/z= 329,1$): $m/z= 273$, $m/z= 229$ e $m/z= 259$.

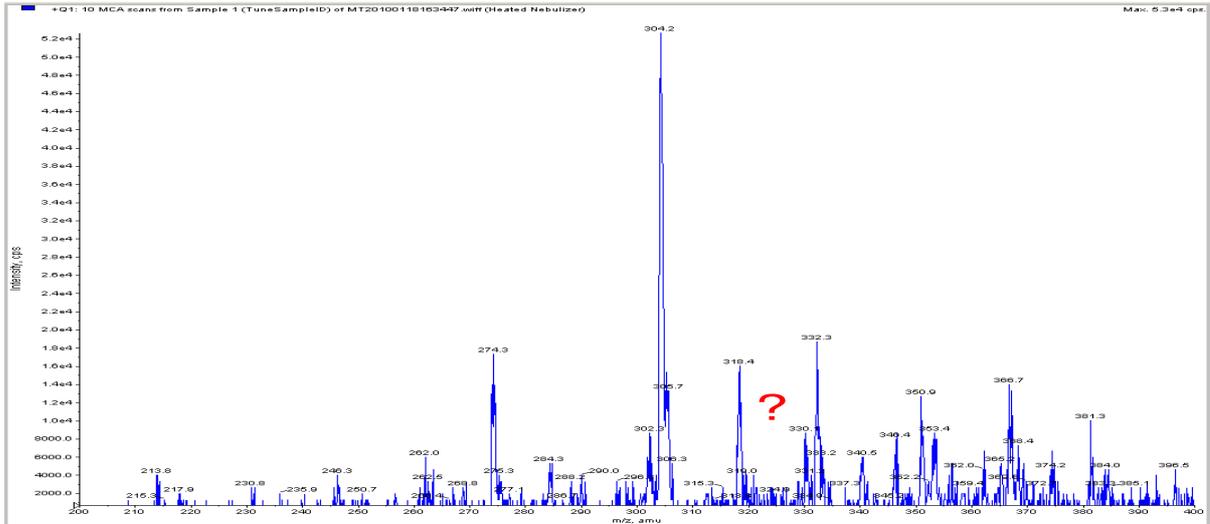


Figura 5 – Experimento Q1 MS, ionização, APCI, modo positivo $[M+H]^+$.

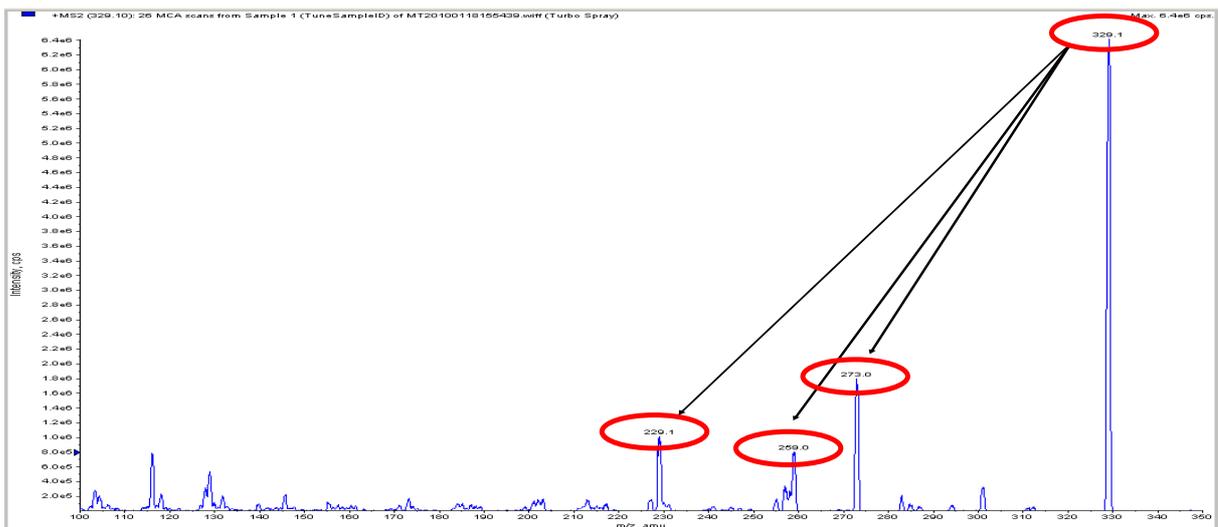
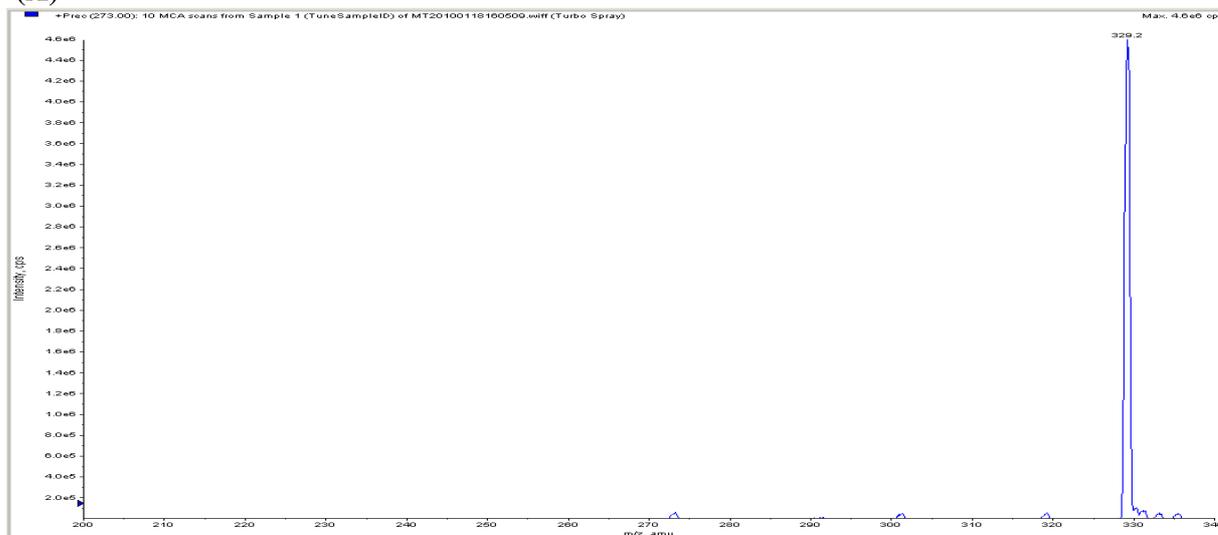


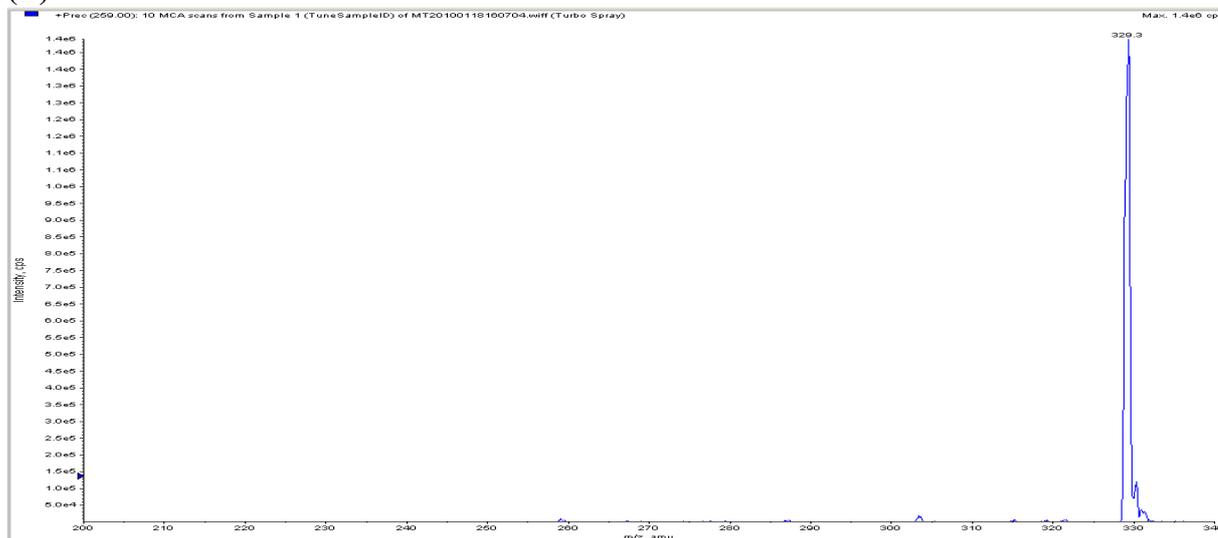
Figura 6 – Experimento de fragmentação e identificação dos íons produtos (m/z 273; m/z 259; m/z 229) da molécula m/z 329,1.

Para confirmação da origem destes íons foi realizado um experimento *precursor ion*, onde o instrumento busca possíveis precursores a partir da informação de produtos gerados. O resultado destes experimentos são mostrados na Figura 7. Para os íons m/z 273 e m/z 259 o resultado mostrou que a origem mais provável destes íons é o íon m/z 329. Já para o íon m/z 229, o resultado do experimento mostrou que este íon não tem somente como precursor a molécula m/z 329.

(A)



(B)



(C)

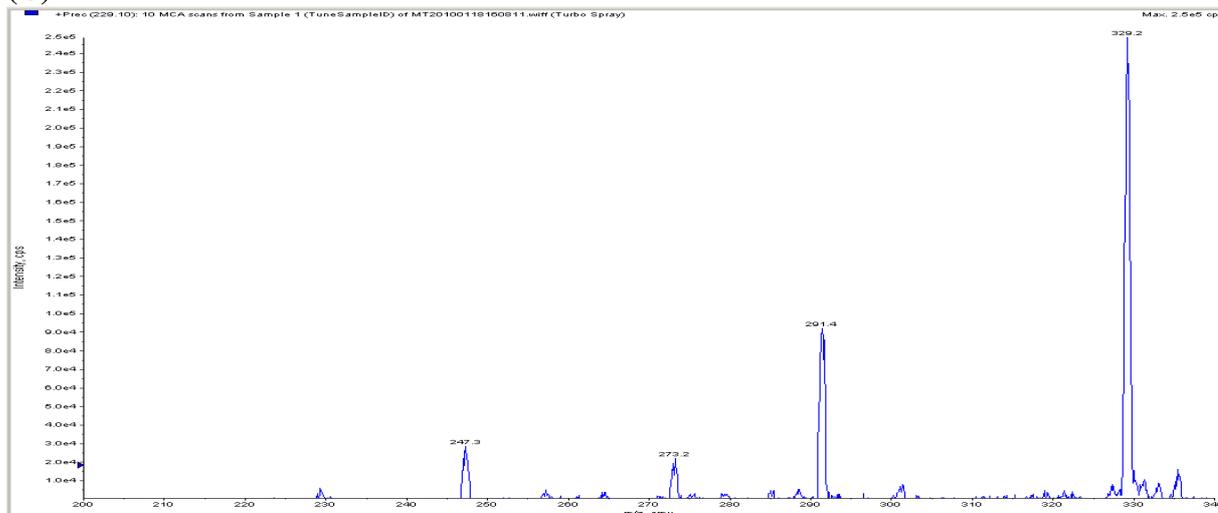


Figura 7 – Experimento Precursor íon para confirmação da origem dos íons produtos Prec.ion 273 > 329 (A), Prec. ion 259 > 329 (B) e Prec. ion 229 > 329(C).

O experimento realizado a seguir foi o *neutral loss*, visando confirmar a perda molecular pela fragmentação do composto. Neste experimento é informado a perda molecular a partir da molécula precursora, e a resposta esperada e o encontro da molécula precursora. Na Figura 8 é possível visualizar que a molécula aflatoxina M₁ $m/z= 329$, gera os íons produtos $m/z= 273$ pela perda de um fragmento com massa 56 e o íon produto $m/z= 259$ pela perda de um fragmento com massa 70. Para o íon $m/z= 229$, a perda molecular necessária é de um fragmento com massa 100, sendo que o experimento *neutral loss* para a perda deste fragmento 100 indicou que esta perda ocorre em maior proporção a partir do íon $m/z= 200$, e em menor proporção a partir do íon $m/z= 329$.

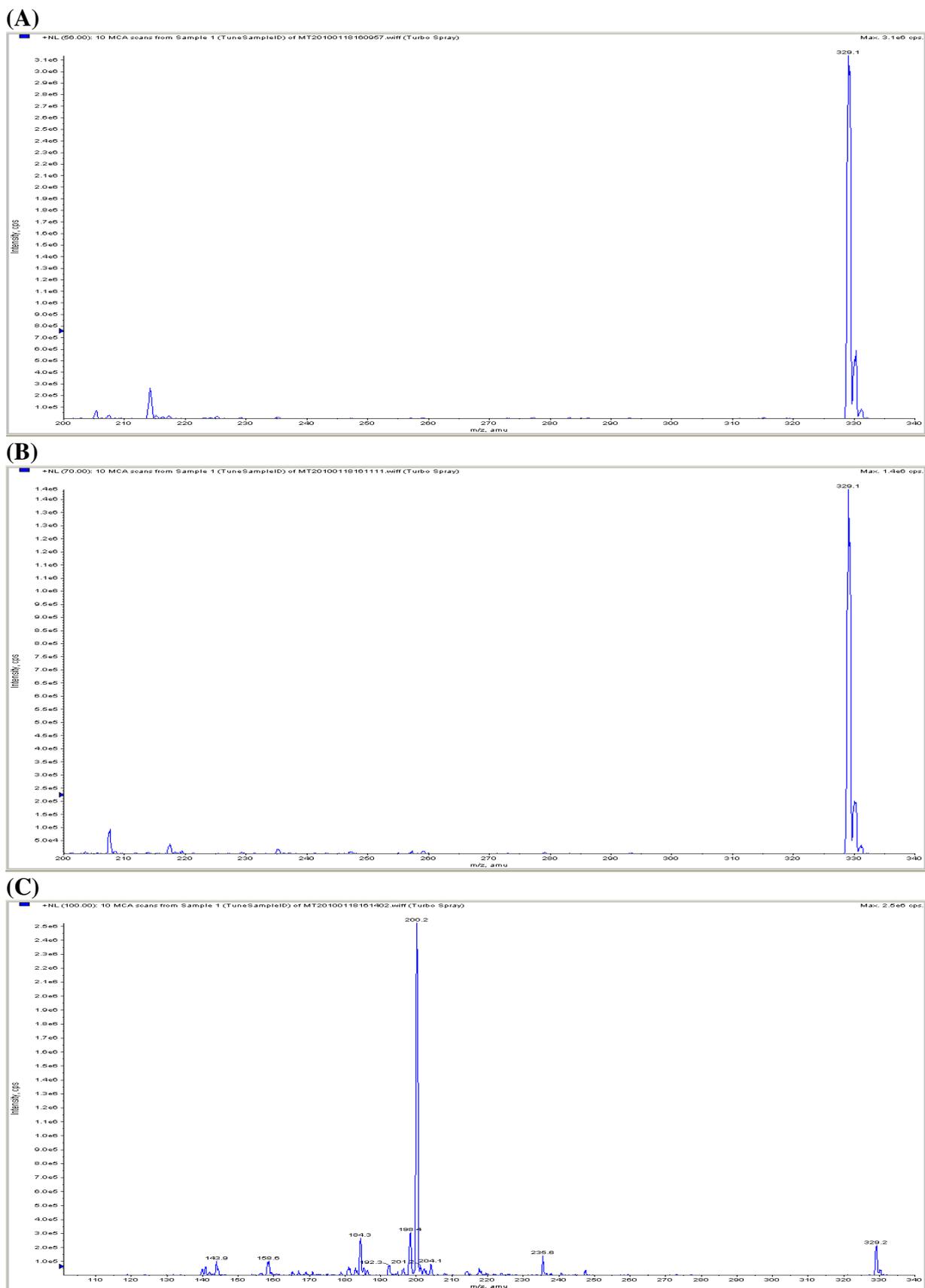


Figura 8 – Experimento neutral loss, confirmação da perda molecular e geração do fragmento NL 56 329 > 273 (A), NL 70 329 > 259 (B) e NL 100 329 > 229 (C).

Com base nos resultados encontrados nestes experimentos foram selecionados os íons produto $m/z= 273$ e $m/z=259$, como os íons a serem monitorados para quantificação e qualificação.

Cavaliere (2006a), comparou os modos de ionização ESI e APPI para determinação de aflatoxina M_1 em leite de vaca. Embora para o modo de ionização APPI eles tenham encontrado um limite de quantificação mais baixo em comparação ao modo ESI, o modo de ionização ESI foi escolhido por ser um modo mais robusto e mais disseminado em laboratórios. Cavaliere (2006b), utilizou o método previamente descrito para determinar a presença de aflatoxina M_1 em queijo utilizando cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas sequencial com ionização ESI, utilizando para quantificação e qualificação os íons produto $m/z= 273$ e $m/z= 259$.

Frenich (2009), desenvolveu um multimétodo de análise de micotoxinas utilizando a técnica de cromatografia líquida de ultra-alta eficiência com detecção por espectrometria de massas sequencial. Entre as micotoxinas incluídas no multimétodo, a aflatoxina M_1 teve como íons produtos monitorados para quantificação e qualificação os íons $m/z= 273$ e $m/z= 259$, respectivamente. Ao final da otimização do espectrômetro de massas e revisão na literatura disponível, foi escolhido como transição de quantificação o íon $m/z= 273$ e para transição de confirmação o íon $m/z= 259$.

Em seguida a escolha das transições a serem monitoradas, foram realizados os experimentos de otimização dos parâmetros composto-dependentes e fonte dependentes.

Após otimização dos parâmetros composto-dependentes e dependentes da fonte realizada de modo automático pelo instrumento, os parâmetros citados na Tabela 7 foram obtidos. Os parâmetros dependentes da fonte foram verificados de maneira manual através da programação do instrumento para este fim. Para cada parâmetro foi criada um rampa com valores crescentes para o parâmetro, sendo escolhido o valor que apresentasse a maior intensidade para o íon precursor. Nenhuma alteração foi realizada a partir dos valores estabelecidos pela otimização automática.

A Tabela 8 mostra o resultado para o critério de pontos de identificação. Seguindo a 2002/657/EC, que diz que para cada íon precursor somam-se 1 ponto, e para cada íon produto monitorado somam-se 1,5 pontos, para o presente método a soma final foi 4. Esse valor está acima da recomendação de 3 pontos, proposta pela 2002/657/EC. Com esse resultado encontrado tem-se a confirmação da identidade do composto analisado.

Tabela 7 – Parâmetros fonte-dependentes e composto-dependentes otimizados.

Parâmetros fonte-dependentes	Fonte de íons	CAD	CUR	GS1	GS2	IS	TEM
	Electrospray	7	20	45	50	5000	750
Parâmetros composto-dependente	Analito	Íon precursor (m/z)	Íons produto (m/z)	EP (v)	DP (v)	CE (v)	CXP (v)
	Aflatoxina M ₁	329.1	273/259	10	156	41/33	20/28

Tabela 8 – Pontos de identificação – aflatoxina M₁

	m/z	Pontos
Íon precursor	329,1	1
Íon produto	273,0	1,5
	259,0	1,5
Pontos totais		4

A análise da intensidade média relativa dos íons produtos é utilizada para identificação inequívoca do composto. Segundo a 2002/657/EC, para íons produto que apresentem uma intensidade média relativa maior que 50%, o desvio padrão relativo não pode variar mais que 20%. A Tabela 9 mostra os resultados encontrados para a medida da intensidade relativa entre os padrões. Para todos os níveis das curvas analíticas utilizadas no método, a relação entre as intensidades de qualificação e quantificação foram maiores que 50% e o *RSD* abaixo de 20%, atendendo assim a recomendação proposta pela 2002/657/EC.

Tabela 9 – Intensidade relativa dos íons produto e *RSD* (%).

Nível de concentração (µg/L ⁻¹)	0,05	0,1	0,2	0,5	1,0	2,0	4,0	5,0	8,0	10,0
Intensidade média relativa dos íons (%)	53,5	51,5	51,2	52,2	54,0	51,3	50,4	52,8	51,3	52,7
<i>RSD</i> (%)	2,3	3,1	1,7	2,8	3,1	1,9	2,5	0,8	1,7	2,9

4.2 Validação do processo analítico

4.2.1 Curva analítica e linearidade

A Tabela 10 contém os dados referentes as equações de reta, coeficiente angular e linear, representados pelas letras **a** e **b**, respectivamente, e coeficiente de determinação, obtidas na construção das curvas analíticas utilizadas para quantificação da aflatoxina M₁ nas diferentes matrizes. No Apêndice Figura 12 encontram as curvas analíticas.

Tabela 10 – Parâmetros das curvas analíticas para leite fluido e leite em pó, coeficiente angular, coeficiente linear e coeficiente de determinação r².

Matriz	Coeficiente angular a	Coeficiente linear b	Coeficiente de determinação r ²
Leite fluido	27958	-278,1	0,9996
Leite em pó	28210	2209,4	0,9996

A construção de uma única curva analítica para quantificação da aflatoxina M₁ em ambas as matrizes, não se mostrou linear para todos os níveis. Assim optou-se pela construção de uma curva analítica para cada matriz. Para o método de leite fluido e leite em pó, construíram-se curvas analíticas seguindo especificações presentes na diretriz 2002/657/EC, que recomenda a adoção de no mínimo cinco níveis de concentração. Os níveis escolhidos para compor a curva basearam-se na determinação da faixa de trabalho determinados por esta diretriz, a qual sugere a adoção de 0,5, 1,0 e 1,5 vezes o limite permitido. Os demais níveis foram adicionados em níveis acima e abaixo dos níveis já estabelecidos para expandir a faixa de trabalho do método.

Para o coeficiente de determinação, seguiu-se a recomendação do ANVISA que diz que o valor do coeficiente de determinação da curva deve ser maior que 0,90.

Uma vez que os limites máximos permitidos para aflatoxina M₁ em leite fluido e leite em pó propostos pela União Européia são mais baixos que os brasileiros e americanos, optou-se por validar o método seguindo a legislação que compreende os limites mais rígidos.

Para avaliação dos níveis que constituíam a faixa linear da curva analítica foi escolhido utilizar o teste da razão entre o sinal (S) e a concentração (Q) definido

anteriormente na Equação 1. Seguindo recomendação da IUPAC, o ponto é considerado dentro da faixa linear se não apresentar variação maior a mais ou menos 5 % o valor do coeficiente angular. Os resultados obtidos para o teste S/Q são demonstrados na Tabela 11.

4.2.2 Limite de detecção e quantificação

O limite de detecção instrumental e do método foram determinados através do método da relação sinal:ruído. Após realização de sucessivas diluições de padrões em diluente, estas foram injetadas no sistema até a concentração que atingisse a relação sinal:ruído de 3:1. Esta relação foi encontrada para a solução que continha a concentração de $0,01 \mu\text{g L}^{-1}$. Para a determinação do limite de quantificação instrumental as mesmas diluições utilizadas para determinação do limite de detecção foram utilizadas. O limite de quantificação instrumental foi estabelecido pela concentração de $0,05 \mu\text{g L}^{-1}$, pois esta apresentou a relação sinal:ruído de 10:1.

O limite de detecção e quantificação do método foram determinados após uma amostra fortificada ser submetida ao procedimento de extração proposto e obtenção da relação sinal:ruído 3:1 e 10:1, para o limite de detecção e quantificação respectivamente.

Ao final da etapa de extração da amostra, calcula-se um fator de concentração de 8 vezes para o analito presente na amostra. Levando-se em conta este fator, foram realizadas fortificações nas amostras de leite fluido e leite em pó, para que ao final do processo a concentração do analito na amostra correspondesse ao ponto mais baixo da curva analítica, sendo este o limite de quantificação. Na Tabela 12 encontram-se resumidos os valores obtidos para os limites de detecção e quantificação instrumentais e do método.

Tabela 11 – Resultados para avaliação da linearidade dos níveis das curvas analíticas para leite fluido e leite em pó pelo teste (S/Q).

Leite fluido						
Concentração ($\mu\text{g/L}^{-1}$)	0,05	0,1	0,2	0,5	1,0	2,0
Área média	1137	2564	5273	13174	28421	55400
S/Q	101,2	101,7	99,3	96,2	102,7	99,6
Leite em pó						
Concentração ($\mu\text{g/L}^{-1}$)	1,0	2,0	4,0	5,0	8,0	10,0
Área média	30050	56454	115611	146467	228552	282424
S/Q	98,7	96,1	100,5	102,3	100,3	99,3

Tabela 12 – Valores obtidos para limite de detecção e quantificação instrumental (LOD_i e LOQ_i) e limite de detecção e quantificação do método (LOD_m e LOQ_m) em $\mu\text{g L}^{-1}$.

Matriz	LOD_i	LOQ_i	LOD_m	LOQ_m
Leite fluido	0,01	0,05	0,003	0,007
Leite em pó	0,01	0,05	0,003	0,125

4.2.3 Seletividade

Conforme a recomendação da diretriz 2002/657/EC a avaliação de seletividade deve ser realizada para verificar a existência de possíveis interferentes ou substâncias similares presentes no amostra que podem interferir na análise.

Para avaliação da seletividade foram submetidas ao processo de análise amostras branco e amostras fortificadas com aflatoxina M_1 . Os cromatogramas do padrão de aflatoxina M_1 , da amostra branco e da amostra fortificada são encontram-se no apêndice Figura 13.

Comparando-se os cromatograma percebe-se, que não existe nenhum interferente eluindo no mesmo tempo de retenção que a aflatoxina M_1 . As aflatoxinas, em particular as aflatoxinas B_1 , B_2 , G_1 e G_2 , possuem estrutura molecular bastante semelhantes a aflatoxina M_1 , podendo serem candidatas a interferentes na análise. Considerando-se que a aflatoxina M_1 é um metabólito da aflatoxina B_1 que é excretada no leite, não é de se esperar a presença de quaisquer outras aflatoxinas no produto de origem animal.

Neste trabalho foram empregadas colunas de imunoafinidade monoclonal como passo de extração e purificação da amostra. Conforme vários autores já relataram, a principal vantagem em fazer uso deste tipo de técnica de extração e purificação é a alta seletividade que os anticorpos monoclonais presentes nas colunas de imunoafinidade conferem a análise. O uso do espectrômetro de massas operando em modo *MRM*, tem por característica amplamente relatada na literatura, ser um modo de varredura bastante seletivo. Neste modo de varredura, o instrumento é otimizado para que no primeiro quadrupolo somente o íon de interesse seja selecionado e transmitido a cela de colisão onde gera fragmentos que serão selecionados no terceiro quadrupolo. No caso da aflatoxina M_1 o primeiro quadrupolo foi otimizado, em modo positivo, para selecionar somente o composto com relação massa/carga 329,1 (aflatoxina M_1 massa molecular 328, 1), na cela de colisão os fragmentos foram gerados e somente aqueles gerados em maior abundância (m/z 273,0 e 259,0) foram selecionados no terceiro quadrupolo para chegar ao detector. Todos estes procedimentos combinados conferem uma alta seletividade ao método.

4.2.4 Exatidão

Os resultados para os ensaios de exatidão são encontrados na Tabela 13. Segundo a resolução da ANVISA, são aceitos variações entre 15-20% para os resultados de ensaios de exatidão considerando o cálculo de erro relativo%. Conforme os dados apresentados na Tabela 13, os valores encontrados estão abaixo desses valores, sendo o método considerado exato.

Tabela 13 – Resultados obtidos para o ensaio de exatidão.

	Amostra	Valor real ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Valor obtido ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Média do valor obtido ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Erro relativo (%)
Leite fluido	I		0,049		
	II		0,051		
	III		0,047		
	IV		0,047		
	V	0,05	0,048	0,047	6,7
	VI		0,045		
	VII		0,041		
	VIII		0,047		
	IX		0,045		
Leite em pó	I		0,50		
	II		0,48		
	III		0,52		
	IV		0,52		
	V	0,5	0,43	0,49	2,7
	VI		0,47		
	VII		0,50		
	VIII		0,50		
	IX		0,46		

4.2.5 Precisão

Segundo a diretiva 2002/657/EC o RSD máximo permitido para testes de precisão devem ser obtidos a partir da aplicação da equação de Horwitz. Conforme já citado anteriormente, quando se realizam ensaios com níveis de concentração inferiores a $100 \mu\text{g L}^{-1}$, a aplicação da equação de Horwitz resulta em valores inaceitavelmente elevados para RSD.

Segundo Huber L. (1998) em métodos de análise de traços, são aceitos RSD de até 20%, dependendo da complexidade da amostra. Conforme os resultados de RSD apresentados nas Tabelas 14 e 15 para os ensaios de precisão do instrumento e do método, os resultados encontram-se abaixo da recomendação proposta por Huber (1998), sendo então considerado que o instrumento e o método fornecem resultados precisos e com uma variação dentro da recomendação proposta para a análise de traços.

Tabela 14 – Resultados repetitividade do instrumento (RSD_{ri}) e precisão intermediária do instrumento (RSD_{pii}).

Matriz	Nível da curva ($\mu\text{g L}^{-1}$)	RSD_{ri} (%)	RSD_{pii} (%)
Leite fluido	0,05	2,7	3,2
	0,1	2,4	0,5
	0,2	1,4	0,3
	0,5	1,9	0,8
	1,0	0,7	0,5
	2,0	0,8	0,2
Leite em pó	1,0	1,5	0,8
	2,0	0,9	0,2
	4,0	0,4	0,2
	5,0	1,9	2,0
	8,0	0,2	3,4
	10,0	0,5	0,7

Tabela 15 – Resultados repetitividade do método (RSD_{rm}) e precisão intermediária do método (RSD_{pim}).

Matriz	Nível de fortificação ($\mu\text{g L}^{-1}$)	RSD_{rm} (%)	RSD_{pim} (%)
Leite fluido	0,025	7,2	1,0
	0,05	4,1	3,4
	0,075	3,6	1,0
Leite em pó	0,025	4,8	5,8
	0,50	4,3	3,9
	0,75	2,2	4,4

4.2.6 Recuperação

A Tabela 16 apresenta os valores obtidos no teste de recuperação com o respectivo RSD , para os três níveis de fortificação preparadas conforme a Tabela 5. Os níveis de concentração escolhidos para realização das fortificações foram 0,025, 0,05 e 0,075 $\mu\text{g L}^{-1}$ para leite fluido e 0,25, 0,50 e 0,75 $\mu\text{g L}^{-1}$ para leite em pó. Estes níveis foram escolhidos baseados na diretriz 2002/657/EC que preconiza a realização dos testes de recuperação com níveis de concentração 0,5, 1,0 e 1,5 vezes o limite máximo permitido.

A diretriz 2006/401/EC fornece as recomendações específicas para performance de ensaios de recuperação de micotoxinas. Segundo esta diretriz, para ensaios de recuperação de

aflatoxina M₁ em níveis de concentrações entre 0,01 – 0,05 µg L⁻¹ o valor recomendado para recuperação é de 60 – 120 %. Já para ensaios de recuperação de aflatoxina M₁ realizados em níveis de concentração maiores que 0,05 µg L⁻¹ o valor de recuperação recomendado é de 70 – 110 %. Para os resultados de ambos os níveis de concentração o *RSD* recomendado é obtido através da equação de Horwitz. Conforme a diretriz 2002/657/EC quando se realizam testes de recuperação com níveis de concentração inferiores a 100 µg L⁻¹, a aplicação da equação de Horwitz resulta em valores inaceitavelmente elevados para *RSD*. Por isso o *RSD* relativo a níveis de concentração abaixo de 100 µg L⁻¹, que é o caso em que se enquadra o presente trabalho, deve ser o mais baixo possível.

Tabela 16 – Valores obtidos para o ensaio de recuperação (%) e *RSD*.

Matriz	Nível de fortificação (µg L ⁻¹)	Dia 1		Dia 2		Dia 3	
		Recuperação (%)	<i>RSD</i> (%)	Recuperação (%)	<i>RSD</i> (%)	Recuperação (%)	<i>RSD</i> (%)
Leite fluido	0,025	88,0		92,0		84,0	
		92,0	8,8	96,0	4,2	88,0	6,8
		104,0		100,0		96,0	
	0,050	98,0		94,0		82,0	
		102,0	4,1	96,0	3,3	94,0	6,9
		94,0		90,0		90,0	
	0,075	101,3		92,0		105,3	
		96,0	3,6	94,7	5,0	102,7	4,0
		94,7		101,3		97,3	
Leite em pó	0,25	95,2		91,6		88,4	
		104,4	4,8	87,6	4,2	89,2	3,8
		98,0		94,8		94,8	
	0,50	100,4		104,0		100,6	
		95,6	4,3	86,0	3,3	99,4	5,1
		104,2		94,0		91,4	
	0,75	98,5		94,9		102,5	
		96,9	2,2	93,3	5,0	95,1	4,3
		101,2		90,4		95,6	

4.2.7 Robustez

Para os ensaios de robustez do método foram escolhidos para avaliação, os parâmetros cromatográficos vazão de fase móvel e temperatura do forno da coluna. Considerando a variação de $\pm 5\%$ para o parâmetro vazão de fase móvel e $\pm 8\%$ para temperatura do forno, o método mostrou-se robusto pois os resultados encontrados com as condições alteradas não diferiram em $\pm 5\%$ dos resultados encontrados para análise realizada com os parâmetros inalterados. Os resultados para os testes de robustez encontram-se na Tabela 17.

Tabela 17 – Resultados obtidos para o ensaio de robustez. Os parâmetros avaliados foram vazão da fase móvel (alteração $\pm 5\%$) e temperatura do forno da coluna ($\pm 8\%$).

	Amostra	Recuperação método inalterado (%)	Recuperação método alterado (%)	Varição (%)
Vazão da fase móvel alterada em +5% (840 $\mu\text{L min}^{-1}$)				
Leite fluido	I	82,0	84,0	-2,4
	II	94,0	97,0	-3,1
	III	90,0	92,0	-2,2
Leite em pó	I	100,6	98,3	2,3
	II	99,4	96,7	2,8
	III	91,4	93,1	-1,8
Vazão da fase móvel alterada em -5% (760 $\mu\text{L min}^{-1}$)				
Leite fluido	I	82,0	86,2	-4,9
	II	94,0	95,9	-2,0
	III	90,0	88,7	1,5
Leite em pó	I	100,6	96,3	4,5
	II	99,4	102,4	-2,9
	III	91,4	87,9	4,0
Temperatura do forno da coluna alterada +8% (27 °C)				
Leite fluido	I	82,0	83,0	-1,2
	II	94,0	96,0	-2,1
	III	90,0	91,0	-1,1
Leite em pó	I	100,6	97,8	2,9
	II	99,4	96	3,5
	III	91,4	93,5	-2,2
Temperatura do forno da coluna alterada -8% (23 °C)				
Leite fluido	I	82,0	84	-2,4
	II	94,0	97,4	-3,5
	III	90,0	87,4	3,0
Leite em pó	I	100,6	98,2	2,4
	II	99,4	102,3	-2,8
	III	91,4	89,3	2,4

4.2.8 Teste de proficiência

Os resultados para os três testes de proficiência são mostrados na Tabela 17. Conforme o organizador do ensaio de proficiência, os resultados são considerados corretos se o *z-score* estiver entre +2 e -2. Conforme podemos perceber, para os três testes realizados o *z-score* está dentro da faixa recomendada, indicando que os resultados obtidos pela aplicação deste método são confiáveis.

Tabela 18 – Resultados para o teste de proficiência inter-laboratorial FAPAS[®], leite em pó.

Nº relatório	Período do teste	Resultado FAPAS ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Resultado método ($\mu\text{g L}^{-1}$)	<i>z-score</i>
04125	Julho/Agosto 2008	0,693	0,730	0,2
04137	Março/Maio 2009	0,479	0,496	0,2
04142	Junho/Agosto 2009	0,356	0,436	1,0

4.3 Aplicação do procedimento validado

Os resultados encontrados após análise das amostras de leite fluido e leite em pó são resumidos na Tabela 19.

Tabela 19 – Ocorrência de aflatoxina M₁ em amostras de leite cru, pasteurizado, leite UHT e em pó.

Tipo de leite	Número de amostras	Número de amostras contaminadas (%)	Número de amostras contaminadas >0,05 (%)	Contaminação média ($\mu\text{g L}^{-1}$)
Leite cru	23	56,5 (13)	7,7 (1)	0,02
Leite pasteurizado	21	90,4 (19)	57,8 (11)	0,09
Leite UHT	79	100 (79)	56,9 (45)	0,08
TOTAL	123	90,2 (111)		0,07
Leite em pó	50	100 (50)	98 (49)	0,54

No total foram analisadas 173 amostras, divididas em 23 amostras de leite cru, 21 amostras de leite pasteurizado, 79 amostras de leite UHT e 50 amostras de leite em pó. Para as amostras de leite cru, o estudo realizado encontrou 56,5% (n= 13) de positividade para contaminação com aflatoxina M₁, com um nível médio de contaminação de 0,02 (µg L⁻¹). Os resultados são similares aos encontrados por JI EUN LEE (2009), ao avaliar a ocorrência de aflatoxina M₁ em leite cru na Coréia do Sul, utilizando colunas de imunoafinidade e cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por fluorescência (coeficiente de recuperação = 96,3%). Neste estudo um total de 100 amostras foram coletadas em laticínios localizados em três diferentes províncias da Coréia do Sul, dessas 100 amostras analisadas, 48% das amostras analisadas estavam contaminadas com aflatoxina M₁ em níveis variáveis 0,02 – 0,08 µg L⁻¹.

Hussain et al. (2008) utilizaram colunas de imunoafinidade e cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por fluorescência para avaliar a ocorrência de aflatoxina M₁ em amostras de leite cru de búfalos e vacas de localidades urbanas e rural de Punjab, Paquistão. De um total de 480 amostras (n=360 búfalo, e n=120 vaca) analisadas, a porcentagem de contaminação do leite de búfalo e de vaca para aflatoxina M₁ foi 42,5% e 52,%, respectivamente. O valor médio de contaminação para o leite de vaca foi de 0,044 µg L⁻¹.

Nas análises realizadas com leite pasteurizado foi encontrado uma positividade de 90,4% (19), com um nível médio de contaminação de 0,09 µg L⁻¹. Das amostras contaminadas 57,8% (11) apresentaram níveis de contaminação que excederam os limites máximos permitidos pela legislação européia. Estes resultados indicam uma positividade maior para leite pasteurizado do que a encontrada por outros autores.

Shundo (2009) investigou a presença de aflatoxina M₁ em amostras de leite em pó (n=75), leite pasteurizado (n=10) e leite UHT (n=40) adquiridos na cidade de São Paulo, Brasil. As amostras foram analisadas utilizando colunas de imunoafinidade para purificação, seguida de análise por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por fluorescência. Os autores encontraram que 95,2% (119) das amostras estavam contaminadas, com a seguinte distribuição: leite em pó 97,6% (72), leite pasteurizado 70% (7) e leite UHT 100% (40).

Fallah (2010) utilizou o método ELISA para determinar a presença de aflatoxina M₁ em amostras de leite comercializadas na região central do Irã. Em um total de 225 amostras analisadas, 116 eram amostras de leite pasteurizado e 109 amostras de leite UHT. Entre as amostras de leite pasteurizado 71,5% (83) amostras apresentaram contaminação por aflatoxina M₁ em níveis que variaram de 0,05 a 0,52 µg L⁻¹, enquanto que as amostras de leite UHT

62,3% (68) amostras estavam contaminadas com aflatoxina M_1 com níveis variáveis entre 0,05 a $0,51 \mu\text{g L}^{-1}$. Considerando a legislação europeia, 26,7% (31) e 17,4% (19) das amostras de leite pasteurizado e leite UHT, respectivamente, ultrapassaram o limite máximo permitido.

Garrido (2003) realizou um estudo para determinar a incidência de aflatoxinas em leite comercializado em supermercados de Ribeirão Preto, Brasil. As 60 amostras de leite UHT e 79 de leite pasteurizado foram analisadas de acordo com o método 986.16 da AOAC International. A Aflatoxina M_1 foi detectada em níveis acima da legislação europeia em 20,9% (29) das amostras analisadas.

O resultado deste estudo foi similar ao encontrado por Zinedine (2007) em termos de positividade, mas diferente em termos de níveis de concentração. Zinedine (2007) avaliou a presença de aflatoxina M_1 em 54 amostras de leite pasteurizado produzido por cinco diferentes fábricas no Marrocos. Os autores utilizaram colunas de imunoafinidade com posterior análise por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por fluorescência. Os resultados mostraram que 88,8% das amostras analisadas estavam contaminadas com aflatoxina M_1 . Destas, 7,4% estavam com contaminação acima dos limites máximos propostos pela legislação europeia.

Em relação ao leite UHT, 100% (79) das amostras foram determinadas como positivas para contaminação por aflatoxina M_1 , sendo que 56,9% (45) apresentaram níveis superiores aos propostos pela legislação europeia. O nível médio de contaminação encontrado foi $0,08 \mu\text{g L}^{-1}$. Em estudo realizado por Blanco (1988), foram analisadas 47 amostras comerciais de leite UHT, na província de León, Espanha. As amostras foram analisadas pela técnica de cromatografia em camada delgada, com coeficiente de recuperação de 94%. Neste estudo as amostras foram classificadas como positivas, negativas ou duvidosas. Duvidosas foram classificadas as amostras que não puderam ser claramente confirmadas após duas análises, devido a presença de interferentes ou devido a contaminação por aflatoxina M_1 estar próxima ao limite de detecção do método. Das amostras analisadas 29 (61,7%) foram negativas, 14 (29,8%) foram positivas e 4 (8,5%) foram declaradas duvidosas. A faixa de concentração da contaminação de aflatoxina M_1 foi de $0,02 - 0,1 \mu\text{g L}^{-1}$.

Nachtmann (2006) conduziu um estudo na região de Piedmont, norte da Itália com leite UHT vendido nesta região. No total foram analisadas 316 amostras foram analisadas. As amostras foram preparadas com o uso de colunas de imunoafinidade e analisadas através de cromatografia líquida de alta eficiência com detector fluorométrico. O coeficiente de recuperação do método foi de 94,1%. Das amostras analisadas somente 2 (0,6%) estavam fora do limite máximo permitido europeu.

Gurbay (2006) determinou os níveis de aflatoxina M_1 em amostras leite UHT e leite pasteurizado consumidos em Ankara, capital da Turquia. Neste estudo foram utilizadas colunas de imunoafinidade na etapa de purificação da amostra, seguida de análise por cromatografia líquida de alta eficiência com detector de fluorescência. Foram analisadas um total de 27 amostras, sendo 24 amostras de leite UHT e 3 amostras de leite pasteurizado. A Aflatoxina M_1 foi encontrada em 59,3% das amostras, contudo somente uma estava acima do limite máximo permitido estabelecido pela união européia.

Unusan (2006) determinou os níveis de aflatoxina M_1 em leite UHT da região de Anatólia, Turquia, utilizando o método ELISA, e observou que de um total de 129 amostras 58,1% (75) estavam contaminadas. Do total das amostras analisadas, 47% (61), estavam contaminadas com níveis que excedem a legislação européia, e apenas quatro amostras apresentaram níveis que excederam a legislação americana.

Oliveira (2006) determinou a presença de Aflatoxina M_1 em 48 amostras de leite UHT comercializadas na cidade de São Paulo, Brasil. A análise dessa toxina foi feita através de cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por fluorescência, e os resultados mostraram que 77,1% (37) das amostras foram positivas para aflatoxina M_1 a níveis de 0,01 - 0,025 $\mu\text{g L}^{-1}$.

Heshmati e Milani (2010) utilizando o método ELISA, determinaram os níveis de aflatoxina M_1 em 210 amostras de leite UHT obtidas em supermercados, entre janeiro e fevereiro de 2010, na cidade de Teerã, Irã. A Aflatoxina M_1 foi encontrada em 55,2% (116) das amostras analisadas. Dentre as amostras contaminadas, 33,3% (70) estavam contaminadas com níveis acima da legislação adotada pelos países da União Européia.

Os resultados encontrados para as amostras de leite em pó encontram-se na Tabela 19. Para estas amostras, 100% (50), estavam contaminadas com aflatoxina M_1 , sendo que desse total 98% (49) das amostras analisadas apresentaram níveis de contaminação maiores que 0,05 $\mu\text{g L}^{-1}$.

Oliveira e Ferraz (2007) analisaram 12 amostras de leite pasteurizado, 12 amostras de leite UHT e 12 amostras de leite em pó, totalizando 36 amostras, todas elas de leite de cabra, comercializadas em Campinas, Brasil. A porcentagem de positividade para contaminação por aflatoxina M_1 foi 58,3% (7), 83,3% (10) e 66,7% (8) para o leite pasteurizado, leite UHT e leite em pó, respectivamente.

Ghanem e Orfi (2009) investigaram a contaminação por aflatoxina M_1 em amostras de leite obtidas no mercado sírio utilizando o método ELISA, e observaram que de um total de 126 amostras analisadas, compostas por leite cru de vaca (n=74), leite cru de ovelha (n=23),

leite cru de cabra (n=11), leite pasteurizado de vaca (n=10) e leite em pó (n=8), 80% foram positivas para presença de aflatoxina M_1 . Os níveis mais altos de contaminação foram relativamente para o leite pasteurizado de vaca, seguido pelo leite cru de vaca e leite cru de ovelha.

Diversos estudos têm sido feitos em diferentes países para avaliar a ocorrência de aflatoxina M_1 em leite e produtos derivados. A Tabela 20 apresenta o resultado das mais recentes avaliações de ocorrência de aflatoxina M_1 . As fontes de contaminação por aflatoxina B_1 in alimentos destinados a animais pode variar geograficamente. Muitos tipos de rações podem conter aflatoxinas, de maior importância, podemos citar aquelas preparadas a base de amendoim, algodão e milho. A contaminação das diferentes culturas com aflatoxinas é um problema mundial não limitado a países em desenvolvimento, onde as condições climáticas e tecnológicas predispõem a uma maior contaminação por aflatoxinas, o que pode justificar a variação entre os resultados. Baixos níveis de contaminação podem ser resultar de um baixo consumo de alimento contaminado com aflatoxina B_1 .

A variação da contaminação de aflatoxina M_1 em leite encontrada entre os diversos estudos pode ser decorrente de variações sazonais. Durante o verão, as vacas recebem menos concentrado do que durante o inverno, pois existe uma maior disponibilidade de pastagem. Da mesma maneira espera-se que os níveis de contaminação por aflatoxina M_1 sejam maiores no leite produzido por animais em sistema de confinamento.

O leite produzido em pequenas, médias ou grandes propriedades em diferentes localidades é coletado, misturado entre si e conduzido a indústria. Nenhum teste para presença de aflatoxina M_1 é realizado nas fazendas onde o leite é coletado individualmente, não havendo distinção entre o leite contaminado do leite livre de contaminação. Nas pequenas propriedades, os animais geralmente são criados de forma extensiva e alimentados principalmente com pastagens, ao contrário das médias e grandes propriedades onde os animais são criados de forma intensiva sendo o concentrado a principal fonte de alimento, podendo esta ser uma possível variável que afeta a contaminação do leite por aflatoxina M_1 . Ao recolher diferentes quantidades de leite, sem diferenciar entre leite contaminado e leite livre de contaminação, pode ocorrer que um grande volume de leite contaminado, ao ser misturado com pequenos volumes de leite não contaminado, acabe por comprometer o volume final que vai ser processado na indústria, o que justificaria o fato das amostras de leite cru estarem com contaminação baixa e após a industrialização as amostras estarem com contaminação mais elevada.

Nenhum relato sobre a ocorrência de aflatoxina M₁ em leite, utilizando como detector um espectrômetro de massas sequencial tem sido descrito até o momento. A grande maioria dos trabalhos utilizam técnicas de ELISA e cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por fluorescência. Para critérios de legislação, amostras positivas em testes imunológicos devem ser confirmados por um método de referencia. A confirmação da identidade da aflatoxina M₁ em métodos que utilizam a detecção por fluorescência é feita com base no método desenvolvido por Takeda 1984. As amostras positivas são submetidas a um processo de derivatização com ácido trifluoracético para formação do derivado aflatoxina M₁ hemiacetal (AfM_{2a}).

As diferenças existentes entre as metodologias utilizadas para análise de aflatoxina M₁ também deve ser levado em conta quando se compara os resultados encontrados nos diferentes estudos de ocorrência deste contaminante.

Tabela 20 – Estudos de ocorrência de aflatoxina M₁ em leite.

País	Método	Tipo de leite	Número de amostras	Positividade (%)	% > 0,05 (µg L ⁻¹)	Autor
Brasil	AOAC	Pasteurizado e UHT	79; 60	20,9	20,9	Garrido et al. (2003)
Turquia	ELISA	UHT	129	58,1	47,0	Unushan (2006)
Turquia	IAC/FLD	Pasteurizado e UHT	3; 24	59,3	3,7	Gurbay et al. (2006)
Brasil	FLD	UHT	48	77,1	43,2	Oliveira et al. (2006)
Itália	IAC/FLD	UHT	316	45,5	0,6	Nachtmann et al. (2006)
Irã	ELISA	Pasteurizado	624	100,0	17,8	Alborzi (2006)
Turquia	TLC	Cru	90	87,7	44,3	Bakirci (2007)
Itália	ELISA	Cru	341	1,4	*	Decastelli et al. (2007)
França	*	Cru	264	1,1	*	Brouda (2007)
Marrocos	IAC/FLD	Pasteurizado	54	88,8	7,4	Zinedine et al. (2007)
Brasil	IAC/FLD	Pasteurizado, UHT, pó	12; 12; 12	58,3; 83,3; 66,7	36,1	Oliveira e Ferraz (2007)
Turquia	ELISA	UHT	100	67,0	31,0	Tekinsena e Eken (2008)
Eslovênia	ELISA	Cru	60	10,0	10,0	Torkar (2008)
Paquistão	IAC/FLD	Cru (vaca e búfala)	120; 360	52,0; 48,0	13,9	Hussain et al. (2008)
Irã	ELISA	UHT	30	100,0	66,6	Ghazani (2009)
Coréia do Sul	IAC/FLD	Cru	100	48,0	*	Ji Eun Lee et al. (2009)
Brasil	IAC/FLD	Pasteurizado, UHT, pó	10; 40; 75	70,0; 100,0; 97,6	*	Shundo et al. (2009)

País	Método	Tipo de leite	Número de amostras	Positividade (%)	% > 0,05 ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Autor
Irã	ELISA	UHT	210	55,2	33,3	Heshmati e Milani (2010)
Irã	ELISA	Pasteurizado, UHT	116; 109	71,5; 62,3	26,7; 17,4	Fallah (2010)

* dado não fornecido pelo trabalho.

A legislação sobre alimentos serve para proteger a saúde dos consumidores e os interesses econômicos dos produtores e comerciantes de alimentos. Atualmente, quase todos os países produtores de alimentos, sendo estes passíveis de contaminação por micotoxinas, possuem legislação a respeito destas. A legislação a respeito de micotoxinas em alimentos não é a mesma para todos os países, fato esse que implica na restrição de importar ou exportar determinado alimento, além de gerar dúvidas a respeito dos níveis de contaminação que realmente causam problemas ao ser humano. Em relação a aflatoxina M_1 a legislação europeia estabeleceu como limite máximo permitido a concentração de $0,05 \mu\text{g L}^{-1}$, sendo este o limite seguido por todos os membros da União Europeia, existindo ainda dentro do grupo países que possuem legislação específica para aflatoxina M_1 . No Brasil o limite máximo permitido para aflatoxina M_1 em leite é $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$, limite dez vezes maior do que o estabelecido pela legislação europeia. Para as amostras analisadas neste estudo, os resultados encontrados (Tabela 19) indicam uma contaminação por aflatoxina M_1 acima do limite máximo permitido estabelecido pela legislação europeia para as amostras de leite pasteurizado, leite UHT e leite em pó, sendo que a comercialização e consumo destes produtos estaria proibido. Analisando-se os resultados encontrados e considerando-se a legislação vigente no Brasil, a contaminação por aflatoxina M_1 não representa um risco ao comércio interno nem ao consumo de leite fluido nem leite em pó pela população.

5 CONCLUSÕES

- O método validado empregando colunas de imunoafinidade para extração e purificação de amostras de leite fluido e leite em pó com detecção por espectrometria de massas sequencial com ionização por *electrospray* mostrou-se um método rápido, sensível e confiável para determinação de aflatoxina M₁;
- O uso de colunas de imunoafinidade aliada a detecção pelo espectrômetro de massas permitiu redução no número de etapas de preparo de amostra, diminuindo possíveis erros associados as diferentes etapas do processo, redução do tempo de análise e redução do volume de solventes utilizados durante a análise;
- O método validado é adequado para atender as legislações brasileira e europeia em relação aos limites máximos permitidos de aflatoxina M₁ em leite e leite em pó;
- Os resultados encontrados neste estudo informam sobre o perfil de qualidade do leite bovino comercializado na região sul do Brasil, quanto á contaminação por aflatoxina M₁, indicando uma alta positividade para presença desta toxina;
- Os níveis de contaminação por aflatoxina M₁ encontrados nas amostras de leite fluido e em pó analisadas, não apresentam risco á saúde pública por estarem em conformidade com a legislação brasileira embora não poderiam ser aceitas pelas exigências da legislação da comunidade europeia.
- É prudente que se realize um monitoramento contínuo de leite fluido e do leite em pó para contaminação por aflatoxina M₁.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGILENT TECHNOLOGIES. **Basics of LC/MS**. New York, 2001. 36 p.

ALBORZI, S. et al. Aflatoxin M₁ contaminantion in pasteurized milk in Shiraz (south of Iran). **Food Control**, v. 17, p. 582-584, 2006.

ALCROFT, R.; CARNAGHAN, R.B.A. Groundnut toxicity: *Aspergillus flavus* toxin (aflatoxin) in animal products: Preliminary communication. **Veterinary Record**, v. 74, p. 863-864, 1962.

AMADO, M. A. Aflatoxinas: um problema mundial. *Millenium on-line*, n. 16, out. 1999. Disponível em: <http://www.ipv.pt/millenium/16_spec6.htm>. Acesso em: 10 dez. 2009.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE 899, de 29 de maio de 2003. **Guia para a validação de métodos analíticos e bioanalíticos**. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 02 de junho de 2003a.

APPLEBAUM, R.S.; MARTH, E.H. Inactivation of aflatoxin M₁ in milk using hydrogen peroxide and hydrogen peroxide plus riboflavin or lactoperoxidase. **Journal of Food Protection**, v. 45, p. 557-560, 1982.

APPLEBAUM, R.S. et al. Aflatoxin: toxicity to dairy cattle and occurrence in milk and milk products – a review. **Journal of Food Protection**, v. 45, n. 8, p. 752-777, 1982.

APPLIED BIOSYSTEMS. **Operator`s Manual**. 2005. 266 p.

BAKIRCI, I. A. study on the occurrence of a aflatoxin M₁ in milk and milk products produced in Van province of Turkey. **Food Control**, v. 12, p. 41-51, 2001.

BIEHL, M.L.; BUCK, W.B. Chemical contaminants: their metabolism and their residues. **Journal of Food Protection**, v. 50, n. 12, p. 1058-1073, 1987.

BLANCO, J. et al. Presence of Aflatoxin M₁ in Commercial Ultra-High-Temperature-Treated Milk. **Applied and Enviromental Microbiology**, v. 54, n. 6, p. 1622-1623, 1988.

BRASIL. Ministério da Saúde. Resolução RDC nº 274, de 15 de outubro de 2002 da ANVISA. Aprova o Regulamento Técnico Sobre Limites Máximos de Aflatoxinas

Admissíveis no Leite, no Amendoim, no Milho. **Diário Oficial da União** de 16 de outubro de 2002.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Portaria MAARA N°183 de 21 de março de 1996. Adota o regulamento técnico MERCOSUL GMC/RES. N°56/94, sobre limites máximos admissíveis no Leite, Amendoim e Milho. **Diário Oficial da União** seção I, página 4929, de 25 de março de 1996.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Portaria MA/SNAD/SFA N° 07, 09/11/1988, Estabelece os padrões mínimos para aflatoxinas nas diversas matérias primas empregadas na alimentação animal. **Diário Oficial da União** seção I, página 21.968, de 09 de novembro de 1988.

BOUDRA, H. et al. Aflatoxin M₁ and Ochratoxin A in raw milk from french Dairy Herds. **Journal of dairy Science**, v. 90, p. 3197-3201, 2007.

BRUCE, B.; MINKKINEM, P.; RIEKKOLA, M. L. Practical method validation: validation sufficient for an analysis method. **Mikrochimica Acta**, v. 128, p. 93-106, 1998.

BURNS, D.T.; DANZER, K.; TOWNSHEND, A. Use of the terms “Recovery” and “Apparent Recovery” in analytical procedures. **Pure Applied Chemistry**, v. 74, p. 2201-2205, 2002.

CARERI, M.; BIANCHI, F.; CORRADINI, C. Recent advances in the application of mass spectrometry in food-related analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 970, p. 3-64, 2002.

CARRILLO, L. Microbiologia Agrícola. Disponível em: <<http://www.unsa.edu.ar/matbib/hongos/01htextomohos.pdf>>. Acesso em: 27 nov. 2008.

CARVALHO, E.C.Q. Micotoxinas e alimentos: implicações na saúde humana e animal. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 2, n. 1, p. 27-31, 1995.

CAVALIERE, C. et al. Liquid Chromatography/tandem mass spectrometric confirmatory method for determining aflatoxin M₁ in cow milk. Comparison between electrospray and atmospheric pressure photoionization sources. **Journal of Chromatography A**, v. 1101, p. 69-78, 2006a.

CAVALIERE, C. et al. Aflatoxin M₁ determination in cheese by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1135, p. 135-141, 2006b.

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

CROTTI, A.E.M. Espectrometria de massas com ionização por “electrospray”: processos químicos envolvidos na formação de íons de substâncias orgânicas de baixo peso molecular. **Química Nova**, v. 29, p. 287-292, 2006.

DECASATELLI, L. et al. Aflatoxins occurrence in milk and feed in Northern Italy during 2004 - 2005. **Food Control**, v. 18, p. 1263-1266, 2007.

DILKIN, P. et al. Classificação macroscópica, identificação da microbiota fúngica e produção de aflatoxinas em híbridos de milho. **Ciência Rural**, v. 30. n. 1, p. 137-141, 2000.

DRAGACCI et al. Use of immunoaffinity chromatography as a purification step for the determination of aflatoxin M₁ in cheeses. **Food Additives and Contaminants**, v. 12, n. 1, p. 59-65, 1995.

EAL (European Cooperation for Accreditation of Laboratories). EAL-P11. Validation of test method: general principles and concepts. Paris: Eal, 1997. 13 p.

ELLIS, W.O. et al. Aflatoxins in food: occurrence, biosynthesis, effects on organisms, detection, and methods of control. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 30, n. 4, p. 403-439, 1991.

EC (European Commission) Commission Regulation N° 100/2003 31 de outubro de 2003. Altera o anexo I da Directiva 2002/32/CE do Parlamento Europeu e do Conselho relativa às substâncias indesejáveis nos alimentos para animais. **Official Journal of the European**, 2003, L285/33.

EC (European Commission) Commission Regulation N° 683/2004 13 de abril de 2004. Amending regulation EC 466/2001 as regard aflatoxins and ochratoxin A in foods for infants and young children. **Official Journal of the European**, 2004, L106/3.

EC (European Commission) Commission Regulation N° 401/2006 23 de fevereiro de 2006. Laying down the methods of sampling and analysis for the official control of the levels of mycotoxins in foodstuffs. **Official Journal of the European**, 2006, L 70/12.

EC (European Commission) Commission Regulation N° 657/2002 12 de agosto de 2002. Commission Decision implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results. **Official Journal of the European**, 2002, L 221/8.

EMBRAPA (EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA) Informações técnicas > Estatísticas do leite > Produção. Disponível em: <<http://www.cnpqi.embrapa.br/>>. Acesso em: 06 dez. 2009a.

EMBRAPA (EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA) Informações técnicas > Estatísticas do leite > Indústria. Disponível em: <<http://www.cnpqi.embrapa.br/>>. Acesso em: 06 dez. 2009b.

EMBRAPA (EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA) Informações técnicas > Estatísticas do leite > Mercado. Disponível em: <<http://www.cnpqi.embrapa.br/>>. Acesso em: 06 dez. 2009c.

EMBRAPA (EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA) Estatísticas de consumo. Disponível em: <http://www.agencia.cnpqi.embrapa.br/Agencia8/AG01/arvore/AG01_168_21720039245.html>. Acesso em: 06 dez. 2009d.

EURACHEM. The fitness for purpose of analytical methods, a laboratory guide to method validation and related topics, Teddington: LGC, 1998. 61 p.

FALLAH, A.A. Assessment of aflatoxin M₁ contamination in pasteurized and UHT milk marketed in central part of Iran. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, n. 3, p. 988-991, 2010.

FAO (Food and Agriculture Organization). Food and Agricultural commodities production Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>>. Acesso em: 19 dez. 2009.

FERREIRA, C.R. Princípios e Aplicações da espectrometria de massas em produção animal. In: II Simpósio de Biologia Molecular Aplicada a Produção Animal. Embrapa pecuária sudeste, São Carlos, SP, Brasil 2009.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Action levels for Poisonous or Deleterious Substances in Human Food and Animal Feed**. Washington, D.C.: Government Printing Office, 2000a. CPG 527.400.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Action levels for Poisonous or Deleterious Substances in Human Food and Animal Feed**. Washington, D.C.: Government Printing Office, 2000b. CPG 683.100.

FORBISCH, R.A. et al. Aflatoxins residues in milk of dairy cows after ingestion of naturally contaminated grain. **Journal of food Protection**, v. 49, p. 781-785, 1986.

FRANCOTTE, E., DAVATZ, A., RICHERT, P. Development and validation of chiral high-performance liquid chromatographic methods for the quantitation of valsartan and of the tosylate of valinebenzyl ester. **Journal of Chromatography B**, v. 686, n. 1 p. 77-83, 1996.

FREMY, J.M.; CHU, F.S. Immunochemicals methods of analysis for Aflatoxins. In: **Mycotoxins in Dairy Products**. ed. London:Elsevier Applied Science, 1989, p. 97-125.

FRENICH, A.G. et al. Simple and high-throughput method for the multimycotoxin analysis in cereals and related foods by ultra-high performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 117, n. 4, p. 705-712, 2009.

FRIESEN, M.D.; GARREN, L. International mycotoxin check sample programme. Part II. Report on the performance of participating laboratories for the analysis of aflatoxin M₁ in lyophilized milk. **Journal of the Association off Analytical Chemists**, v. 65, p. 864-868, 1982.

GALVANO, F.; GALOFARO, V.; GALVANO, G. Occurrence and stability of aflatoxin M₁ in milk and milk products, A worldwide review. **Journal of Food Protection**, v. 59, p.1079-1090, 1996.

GARRIDO, N.S. et al. Occurrence of aflatoxins M₁ and M₂ in milk commercialized in Ribeirão Preto-SP, Brazil. **Food and Additivies Contaminants**, v. 20, n. 1, p. 70-73, 2003.

GHAZANI, M.H.M. Aflatoxin M₁ contamination in UHT milk in Tabriz (northwest of Iran). **Toxicology Letters**, v. 189, p. 228, 2009.

GHANEM, I.; ORFI, M. Aflatoxin M₁ in raw, pasteurized and powdered milk available in the Syrian market. **Food Control**, v. 20, n. 6, p. 603-605, 2006.

GONÇALEZ, E.; PINTO, M. M.; FELICIO, J. D. Análise de micotoxinas no Instituto Biológico de 1989 a 1999. **O Biológico**, v. 63, n. 1/2, p. 15-19, 2001.

GRANDE, S.M.B.; NETO, F.R.A. A espectrometria de massas acoplada a espectrometria de massas EM-EM. **Química Nova**, v. 13, 1990.

GREEN, J.M. A practical guide to analytical method validation. **Analytical Chemistry**, v. 68, p. 305-309, 1996.

GROSS, J. H. **Mass Spectrometry: a textbook**. Heidelberg, Germany: Springer Verlag, 2004. 518 p.

GURBAY, A. et al. Assessment of aflatoxin M₁ levels in milk in Ankara, Turkey. **Food Control**, v. 17, n. 1, p. 1-4, 2006.

HARRIS, C.C. Chemical and physical carcinogenesis: advances and perspectives for the 1990s. **Cancer Research**, v. 51, n. 18, p. 5023-5044, 1991.

HESHMATI, A.; MILANI, J.M. Contamination of UHT milk by aflatoxin M₁ in Iran. **Food Control**, v. 21, n. 1, p. 19-22, 2010.

HUBER, L.; Validation of analytical methods: review and strategy. **LC/GC International**, fev, p. 96-105, 1998.

HUSSAIN, I. et al. Variation of levels of aflatoxin M₁ in raw Milk from different localities in the central areas of Punjab, Pakistan. **Food Control**, v. 19, n. 12, p. 1126-1129, 2008.

IARC (INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER). Some Naturally Occurring Substances: Food Items and Constituents, Heterocyclic Aromatic Amines and Mycotoxins. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, v. 56, p. 19-23, 1993.

ICH. International Conference on Harmonisation. Q2B, Validation of Analytical Procedures: methodology. Geneva: [s.n.], 1996. Disponível em: <http://www.pharmacontract.ch/support/pdf_support/Q2a.pdf>. Acesso em: 23 nov. 2009.

INMETRO (INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO e QUALIDADE INDUSTRIAL). DOQ-CGCRE-008. Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos. Rio de Janeiro: INMETRO, 2003, 35 p.

ISO (International Standard Organization). ISO/IEC 17025. General requirements for the competence of testing and calibration laboratories. Geneva: ISO, 2005. 28 p.

JEFCA (JOINT FAO/WHO EXPERT COMMITTEE ON FOOD ADDITIVES) Aflatoxin M₁, v.47, 2001. Disponível em: <<http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v47je02.htm>>. Acesso em: 11 dez. 2009.

JEFFERY, G.H., BASSET, J., MENDHAM, J., DENNEY, R.C. VOGEL-Análise Química Quantitativa. 5 ed., Rio de Janeiro: Guanabara Kogan, 1992, p. 120.

KEEHN, D.M.; FRANK-STROMBORG, M. A worldwide perspective on the epidemiology and primary prevention of liver cancer. **Cancer Nursing**, v. 14, n. 4, p. 163-174, 1991.

KINTER, M.; SCHERMAN, N.E. Protein sequence and identification using tandem mass spectrometry. New York, EUA: John Wiley, 2000. 320 p., 2000.

KLEIN, P.J. et al. Biochemical basis for the extreme sensitivity of turkeys to aflatoxin B₁. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 165, n. 1, p. 45-52, 2000.

KUILMAN, M.E.M., MASS, R.F.M., FINK-GREMMELS, J. Cytochrome P450-mediated metabolism and cytotoxicity of aflatoxin B₁ in bovine hepatocytes **Toxicology in vitro** v. 14, n. 4, p. 321-327, 2000.

LAMIC – Laboratório de Análises Micotoxológicas. Disponível em: <<http://www.lamic.ufsm.br/resultadospronto.html>>. Acesso em: 30 fev. 2010.

LEE, J.E. et al. Occurrence of aflatoxin M₁ in raw Milk in South Korea using an immunoaffinity column and liquid chromatography. **Food Control**, v. 20, n. 2, p. 136-138, 2009.

LILLEHOJ, E.B.; Aflatoxins: an ecologically elicited genetic activation signal. In: SMITH, J.E.; HENDERSON, S. **Mycotoxins and Animal Foods**. Boca Raton: Eds. CRC Press, 1991. p. 1-35.

MACHADO, F.M.S. **Estratégias de concorrência da indústria alimentícia e seus desdobramentos na dimensão nutricional**. 2003. 200f. Tese (Doutorado em Nutrição Humana Aplicada – PRONUT) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Economia, Administração e Contabilidade, Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

MAGAN, N.; OLSEN, M. **Mycotoxins in foods**. Boca Raton: Boston, 2004. 496 p.

MALLMANN, C.A.; SANTURIO, J.M.; WENTZ, I. Aflatoxinas – Aspectos clínicos e toxicológicos em suínos. **Ciência Rural**, v. 24, n. 3, p. 635-643, 1994.

MALLMANN, C.A.; DILKIN, P. **Micotoxinas e Micotoxicoses em Suínos**. Santa Maria: Sociedade Vicente Pallotti, 2007. 238 p.

MALLMANN, C.A. et al. Efeitos das Micotoxinas em Pets. Disponível em: <<http://www.lamic.ufsm.br/papers/pet.pdf>>. Acesso em: 20 jan. 2010.

MASOERO, F. et al. Carryover of aflatoxin from feed to milk in dairy cows with low or high somatic cell counts. **Animal**, v. 1, n. 9, p. 1344-1350, 2007.

MASOERO, F. et al. Effects of the procedure of inclusion of a sequestering agent in the total mixed ration on proportional aflatoxin M₁ excretion into milk of lactating dairy cows **Animal Feed Science and Technology**, v. 150, n. 1/2, p. 34-45, 2009.

MELOAN, C.E. (Ed.). **Pesticides laboratory training manual**. Gaithersburg, Maryland, USA: AOAC International, 1996. 484 p.

NACHTMANN, C. et al. Regional monitoring plan regarding the presence of aflatoxin M₁ in pasteurized and UHT milk in Italy. **Food Control**, v. 18, p. 623-629, 2007.

OLIVEIRA, C.A. F.; GERMANO, P.M.L. Aflatoxina M₁ em leite e derivados: ocorrência no Brasil e aspectos relativos à legislação. **Revista Higiene Alimentar**, v.11, n. 48, p. 22-25, 1997.

OLIVEIRA, C.A.; ROSMANINHO, J.; ROSIM, R. Aflatoxin M₁ and cyclopiazonic acid in fluid Milk traded in São Paulo, Brazil. **Food and Additives Contaminants**, v. 23, n. 2, p. 196-201, 2006.

OLIVEIRA, C.A.F.; FERRAZ, J.C.O. Occurrence of aflatoxin M₁ in pasteurised, UHT milk and milk powder from goat origin. **Food Control**, v. 18, n. 4, p. 375-378, 2007.

OMS (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE). Critérios de salud ambiental 11: **Micotoxinas**. Cidade do México: OMS, 1983. 131 p.

ORDIN, N.; LUCHESE, R.H. Detecção de aflatoxina e zearalenona em milho (*Zea mays*), destinado à alimentação animal. **Boletim SBCTA**, v. 32, n. 1, p. 35-39, 1998.

PARKIN, D.M.; STJERNWARD, J.; MUIR, C.S. Estimatives of the worldwide frequency of twelve major cancers. **Bulletin World Health Organization**, v. 62, n. 2, p. 163-182, 1984.

PATEL, P.M. et al. Note on the effect of processing milk into khoa on aflatoxin M₁ content. **Indian Journal Animal Science**, v. 51, p. 791-792, 1981.

PETTERSON, H. Carry-over of aflatoxin from feedingstuffs to milk. Swedish derogations from EC legislation in the area of feedingstuffs. Report 2. Undesirable substances and products. Stockholm: Ministry of Agriculture, p. 23-27, 1997.

PIEIDADE, F. S. et al. Distribution of aflatoxins in corn fractions visually segregated for defects. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 33, n. 3, p. 250-254, 2002.

PRAKASH, C.; SHAFFER, C.L.; NEDDERMAN, A. Analytical strategies for identifying drug metabolites. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 26, p. 340-369, 2007.

PRESTES, O.D.; FRIGGI, C.A.; ADAIME, M.B.; ZANELLA, R. QuEChERS – Um método moderno de preparo de amostra para determinação multirresíduo de pesticidas em alimentos por métodos cromatográficos acoplados a espectrometria de massas. **Química Nova**, v. 32, p. 1620-1634, 2009.

PRIMEL, E.G. **Aplicação de extração em fase sólida e técnicas cromatográficas para determinação de herbicidas em águas de superfície e acompanhamento da degradação a campo e no laboratório**. 2003. 170f. Tese (Doutorado em Química Analítica) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2003.

RAMOS A.J.; SANCHIS V. Micotoxinas: principales criterios para el establecimiento de su legislación. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 13, p. 76-84, 1996.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C.B.G.; COLLINS, C.H., JARDIM, I.C.S.F.; MELO, L.F.C. Validação em Métodos Cromatográficos e Eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27 (5) p. 771-780, 2004.

RIDGWAY, K.; LALLJIE, S.P.D.; SMITH, R.M.; Sample preparation techniques for determination of trace residues and contaminants in foods. **Journal of Chromatography A**, v. 1153, n. 1/2, p. 36-53, 2007.

ROSI, P. et al. Aflatoxin M₁ in milk: Reliability of the immunoenzymatic assay. **International Dairy Journal**, v. 17, p. 429-435, 2007.

SCUSSEL, V. M. **Micotoxinas em alimentos**. Florianópolis: Editora Insular, 1998, 144 p.

SKOOG, D.A., LEARY, J.J. **Principles of Instrumental Analysis**. 4.ed. Orlando: Saunders College Publishing, 1992. 423 p.

SYLOS, C. M.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Estudo comparativo de métodos para determinação de aflatoxina M₁. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 56, p. 87-97, 1996.

RORY, C.; ENDA, C.; SHANE, W. Exposure assessment of mycotoxins in dairy milk. **Food Control**, v. 20, n. 3, p. 239-249, 2009.

SENYUVA, H.; GILBERT, J. Immunoaffinity column clean-up techniques in food analysis: A review. **Journal of Chromatography B**, v. 878, n. 2, p. 115-132, 2010.

SHEPARD, M.J.; HOLMES, M.; GILBERT, J. Comparison and critical evaluation of six published extraction and clean-up procedures for aflatoxin M₁ in liquid milk. **Journal of Chromatography**, v. 354, p. 305-315, 1986.

SHUNDO, L. et al. Estimate of aflatoxin M₁ exposure in Milk and occurrence in Brazil. **Food Control**, v. 20, n. 7, p. 655-657, 2009.

SMITH J.E, HENDERSON R.S. **Mycotoxins and animal foods**. Boca Ráton: CRC Press, 1991. 680 p.

SOUZA, S.V.C. **Procedimento para validação intralaboratorial de métodos de ensaio: delineamento e aplicabilidade em análises de alimento**. Belo Horizonte: Faculdade de farmácia da UFMG, 2007. 293 p.

TAVEIRA, J.A.; MÍDIO, A. F. Aflatoxina M₁: a micotoxina do leite. **Boletim SBCTA**, Campinas, Revisão, v. 33, n. 1, p. 115-126, 1999.

TAVERNIERS, I.; DE LOOSE, M.; van BOCKSTAELE, E. Trends in quality in the analytical laboratory. II. Analytical method validation and quality assurance. **Trends Analytical Chemistry**, v. 23, p. 535-552, 2004.

TEKINSENA, K.K.; EKEN, H.S. Aflatoxin M₁ levels in UHT milk and kashar cheese consumed in Turkey. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 3287-3289, 2008.

THOMPSON, M.; ELLISON, S.L.R.; WOOD, R. Harmonized Guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis. **Pure and Applied Chemistry**, v. 74, p.835-855, 2002.

TORKAR, K.G.; VENGUST, A. The presence of yeasts, moulds and aflatoxin M₁ in raw milk and cheese in Slovenia. **Food Control**, v. 19, p. 570-577, 2008.

TURNER, N.W.; SUBRAHMANYAM, S.; PILETSKY, S.A. Analytical Methods for determination of mycotoxins: A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 632, p. 168-180, 2009.

UNUSHAN, N. Occurrence of aflatoxin M₁ in UHT milk in Turkey. **Food and Chemical Toxicology**, v. 44, n. 11, p. 1897-1900, 2006.

U.S.FDA (Food and Drug Administration) Bad Bug Book: Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins Handbooks Aflatoxins 2009. Disponível em: <<http://www.fda.gov/Food/FoodSafety/FoodborneIllness/FoodborneIllnessFoodbornePaFoodborneIllnessFood/BadBugBook/ucm071020.htm>>. Acesso em: 21 dez. 2009a.

U.S.FDA (Food and Drug Administration). Sample Schedule 6: Mycotoxin Sample Size. Disponível em: <<http://www.fda.gov/ICECI/Inspections/IOM/ucm127685.htm>> Acesso em: 19 nov. 2009b.

VAN DER VOET, H.; VAN RHIJN, J.A.; VAN DE WIEL, H.J. Inter-laboratory, time, and fitness-for-purpose aspects of effective validation. **Analytical Chimica Acta**, v. 391, p. 159-171, 1999.

VAN EGMOND, H.P. Aflatoxin M₁: occurrence, toxicity and regulation. In: _____. **Mycotoxins in Dairy Products**. London: Elsevier Applied Science, 1989. p. 11-55.

VELDMAN, V.A. et al. Carry-over of aflatoxin from cows' food to milk. **Animal Production**, v. 55, p. 163-168, 1992.

WALSTRA, P.; JENNESS, R. **Dairy chemistry and physics**. New York: John Wiley & Sons, 1984. 467 p.

WANG, J.S.; GROOPMAN, J.D. DNA damage by mycotoxins. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 424, n. 1-2, p. 167-181, 1999.

WCRF, WORLD CANCER RESEARCH FOUNDATION. Food, Nutrition and the Prevention of Cancer: a global perspective. Washington: American Institute for Cancer Research, 1997. p. 488-489.

WOGAN, G.N. Aflatoxin carcinogenesis: interspecies potency differences and relevance for human risk assessment. **Progress in Clinical and Biological Research**, v. 374, p. 123-137, 1992.

YOUSEF, A.E.; MARTH, E.H. Degradation of aflatoxin M₁ in milk by ultraviolet energy. **Journal of Food Protection**, v. 48, p. 697-698, 1985.

YOUSEF, A.E.; MARTH, E.H. Stability and degradation of aflatoxin M₁. In: VAN EGMOND, H.P. **Mycotoxins in Dairy Products**. London: Elsevier Applied Science, 1989, p. 127-161.

ZINEDINE, A. et al. Presence of aflatoxin M₁ in pasteurized milk from Morocco International. **Journal of Food Microbiology**, v. 114, n. 1, p. 25-29, 2007.

APÊNDICES

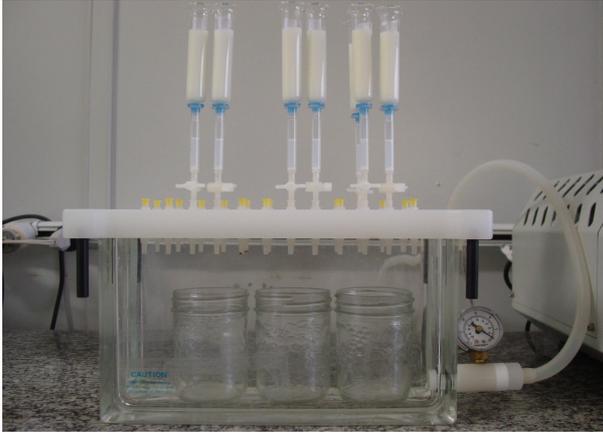


Figura 9 – Manifold para extração e purificação da aflatoxina M₁

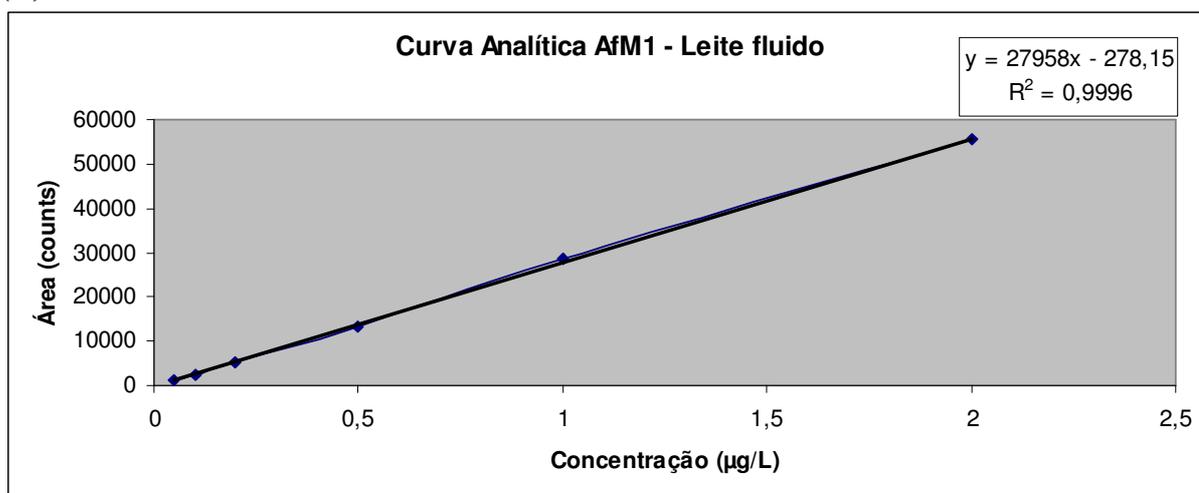


Figura 10 – Cartucho IAC com solvente de eluição



Figura 11 – Sistema de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas seqüencial.

(A)



(B)

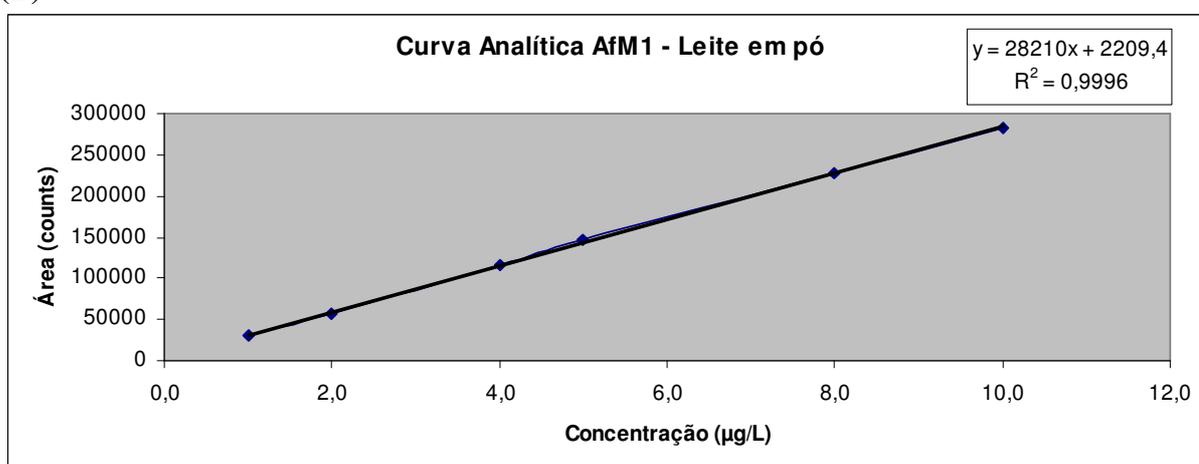


Figura 12 – Curva para quantificação de leite fluido (A) e curva para quantificação de leite em pó (B).

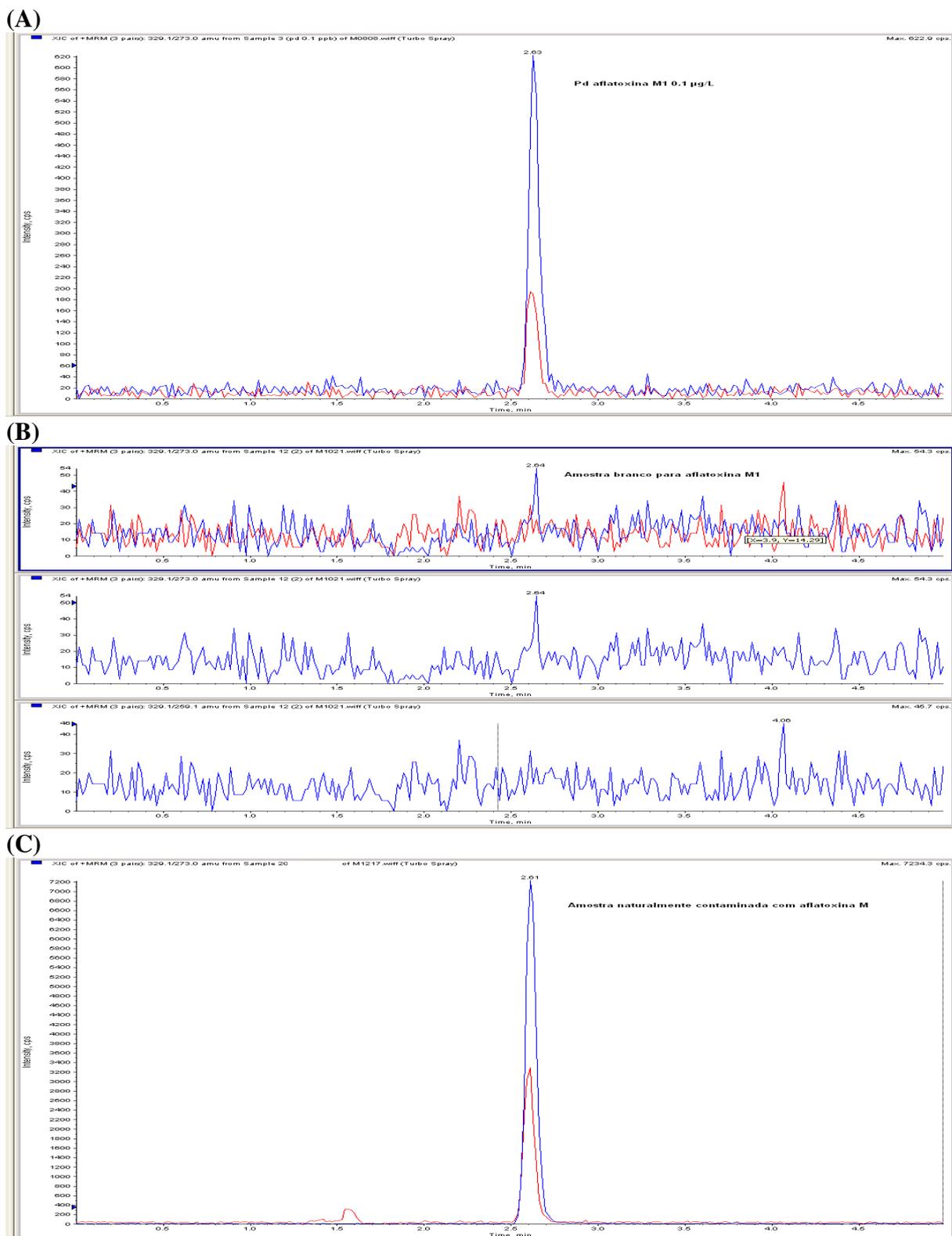


Figura 13 – Cromatograma de um padrão de aflatoxina M₁ (A), cromatograma de uma amostra “branco” (B) e cromatograma de uma amostra fortificada (C).