

VALIDAÇÃO INTRALABORATORIAL DE MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE AFLATOXINA M₁ EM LEITE POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA¹

Scheilla V. C. de SOUZA², Eugênia A. VARGAS³, Luciana de CASTRO³, Roberto G. JUNQUEIRA^{4,*}

RESUMO

Um método para determinação de aflatoxina M₁ em leite empregando cromatografia em camada delgada foi otimizado e validado por procedimentos intralaboratoriais. Foram realizados testes para otimização das etapas de extração, purificação, detecção e quantificação por análise visual e densitométrica. Para validação do método foram realizados ensaios de recuperação com soluções padrões e amostras artificialmente contaminadas em níveis entre 0,027µg/L e 0,970µg/L. Foram avaliados linearidade, especificidade, exatidão, precisão, limites de detecção e quantificação. Os valores de porcentagem de recuperação na faixa de quantificação do método variaram de 84,2% a 99,0% na análise visual e de 85,2% a 105,2% na análise densitométrica, com coeficientes de variação de 2,3% a 9,8% e de 3,6% a 13,9%, respectivamente. O limite de detecção foi de 0,036µg/L e o de quantificação de 0,045µg/L, contemplando os níveis de tolerância estabelecidos na legislação nacional e internacional para aflatoxina M₁ em leite.

Palavras-chave: leite; aflatoxina M₁; validação; CCD.

SUMMARY

IN HOUSE VALIDATION OF A METHOD FOR AFLATOXIN M₁ DETERMINATION IN MILK BY THIN LAYER CHROMATOGRAPHY. A method for aflatoxin M₁ determination in milk by thin layer chromatography was optimized and in house validated. Steps of extraction, clean-up, detection and quantification by visual and densitometric analysis were standardized. In method validation were employed standard solutions and spiked samples in levels varying from 0.027µg/L to 0.970µg/L. Linearity, specificity, trueness, precision, detection and quantification limits were the parameters evaluated. Average recovery values in quantification range were from 84.2% to 99.0% for visual analysis and from 85.2% to 105.2% for densitometric analysis, with CVs values from 2.3% to 9.8% and from 3.6% to 13.9%, respectively. The detection limit was 0.036µg/L and the quantification 0.045µg/L, according to national and international regulations for aflatoxin M₁ in milk.

Keywords: milk; aflatoxin M₁; validation; TLC.

1 - INTRODUÇÃO

A aflatoxina M₁ é o principal metabólito hidroxilado da aflatoxina B₁ presente em leite de animais que ingeriram ração contaminada [17]. Esta toxina apresenta toxicidade semelhante à aflatoxina B₁ [29], além de potencial carcinogênico e genotóxico [8, 36].

Muitos estudos vêm sendo conduzidos para monitorar e controlar o desenvolvimento de fungos toxigênicos e a produção de micotoxinas em alimentos e rações, bem como desenvolver métodos de ensaio simples e eficientes para determinação destes metabólitos, avaliando as doses tóxicas e limites máximos de tolerância para estas substâncias nos diversos produtos [3, 15, 26].

Diante dos resultados obtidos, cada país tem tentado definir regulamentações, sendo considerados aspectos relacionados à saúde pública [3], políticos e econômicos [38]. A União Européia adotou o limite de tolerância

máximo de 0,05µg/L para aflatoxina M₁ em leite fluido [5]. O regulamento técnico do MERCOSUL sobre limites máximos de aflatoxinas estipulou os níveis de 0,5µg/L e 5µg/kg para leite fluido e em pó, respectivamente [23], sendo estes os limites internalizados pelo Brasil [10].

Com relação aos métodos de análise para controles eficientes de aflatoxina M₁ em leite são requeridos elevada sensibilidade, especificidade, precisão e exatidão, além de limites de detecção e quantificação suficientes para avaliação das baixas concentrações em que estas micotoxinas são encontradas [9, 12, 30, 35].

Os métodos para a determinação de aflatoxina M₁ em leite utilizam, em sua maioria, extração com solventes orgânicos e purificação cromatográfica em fase sólida ou imunoafinidade [11, 18, 20, 22, 27, 31]. Tanto a cromatografia em camada delgada (CCD) como a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), constituem técnicas adequadas para separação, detecção e quantificação de aflatoxina M₁ em extratos de leite [37]. Embora a espectrometria de massas e a cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas tenham sido estudadas e sugeridas, estas técnicas ainda não são praticadas, possivelmente devido ao alto custo dos equipamentos e à necessidade de pessoal altamente capacitado [16]. Técnicas imunológicas, como enzyme linked immunosorbent assay (ELISA), também têm sido amplamente utilizadas, principalmente em triagens [21, 33]. Como a maioria das micotoxinas não são voláteis, a cromatografia gasosa apresenta limitações [19]. Entretanto, devido à multiplicidade de técnicas utilizadas

¹ Recebido para publicação em 01/02/2003. Aceito para publicação em 21/08/2003 (001084).

² Departamento de Alimentos, Faculdade de Farmácia (FAFAR), Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Tel. (31) 33397634, Fax (31) 33397632, e-mail scheillavitorino@terra.com.br

³ Laboratório de Controle de Qualidade e Segurança Alimentar (LACQSA), Laboratório de Apoio Vegetal (LAV/MG), Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), Tel. (31) 32500398, Fax (31) 32500399, e-mail HYPERLINK mailto:gena@cdlnet.com.br gena@cdlnet.com.br

⁴ Departamento de Alimentos, Faculdade de Farmácia (FAFAR), Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Tel. (31) 33397634, Fax (31) 33397632, e-mail junqueira@dedalus.lcc.ufmg.br

* A quem a correspondência deve ser enviada.

para detecção e quantificação de aflatoxina M₁, variando das mais simples, como CCD por análise visual e densitometria, até as mais complexas, como CLAE com detectores de ultra-violeta, fluorescência e espectrometria de massas, os laboratórios selecionam as técnicas de acordo com sua situação econômica, objetivos da análise e capacidade dos analistas [4].

A CCD constitui a técnica tradicional para determinação de micotoxinas e possui grande importância histórica relacionada a estas substâncias. Graças a CCD as micotoxinas foram detectadas, isoladas e caracterizadas [2]. A AOAC International recomenda esta técnica para determinação de aflatoxinas em diversos produtos [1]. O baixo custo e a simplicidade são as principais vantagens dos procedimentos analíticos baseados na CCD. A capacidade de separação das micotoxinas dos componentes interferentes, em placas de CCD, confere um razoável nível de especificidade e sensibilidade aos métodos. Isto se deve ao fato de que a aflatoxina M₁ fluoresce sob luz UV, o que permite que concentrações da ordem de nanogramas sejam detectadas em uma placa. A principal desvantagem associada a esta técnica é a baixa repetibilidade associada à aplicação das amostras, desenvolvimento e etapas de interpretação, o que pode ser melhorado com a experiência dos analistas [7]. STUBBLEFIELD & VAN EGMOND [34] destacaram que estudos interlaboratoriais com livre escolha do método, demonstraram que a experiência na determinação de aflatoxina M₁, uma análise difícil, é, pelo menos, tão importante quanto a escolha da técnica para obtenção de resultados confiáveis.

Os órgãos de vigilância e as instituições de pesquisa que trabalham com micotoxinas demandam métodos analíticos simples, de baixo custo e com desempenho adequado. O presente trabalho teve como objetivo otimizar e validar, por procedimentos intralaboratoriais, um método para determinação de aflatoxina M₁ em leite por uma técnica acessível e aplicável a grande maioria dos laboratórios e, ao mesmo tempo, capaz de contemplar os limites de tolerância estabelecidos pela legislação nacional e internacional.

2 - MATERIAL E MÉTODOS

2.1 - Reagentes

Os padrões de aflatoxina M₁ utilizados foram da marca Sigma (St. Louis, MO, EUA), mantidos sob temperatura de congelamento, devidamente protegidos da luz e vedados, até o momento do preparo das soluções. As soluções padrões foram preparadas e padronizadas, em espectrofotômetro, segundo AOAC [1]. Em seguida, foram armazenadas em frascos para padrão, âmbar, devidamente vedados, sob temperatura de congelamento. A estabilidade das soluções foi monitorada, repetindo-se os procedimentos de padronização, durante o período do experimento. As concentrações das soluções estoque foram de 0,4850 µg/mL e 0,4531 µg/mL enquanto as das soluções de trabalho foram 0,09700 µg/mL e 0,09062 µg/mL.

Os solventes grau para análise de resíduos, o sulfato de sódio anidro e o cloreto de sódio foram adquiridos da Merck (Darmstadt, Alemanha). O Florisil e a sílica utilizados para empacotamento das colunas foram Sigma (St. Louis, MO, EUA) e Merck (Darmstadt, Alemanha), respectivamente. Os cartuchos comerciais de sílica e Florisil foram adquiridos da Waters, modelo classic de 0,5g (Milford, EUA). As cromatoplasmas utilizadas foram de 10cm x 20cm, com 250 µm de sílica gel, Whatman 60AK6 (Maidstone, Inglaterra).

2.2 - Equipamentos

Os equipamentos utilizados foram: agitador magnético Fenix AT 56; banho-maria com agitação Yamato BT 25; centrífuga Sorvall Instruments RC 3B; cromatovisor UV Products G 70; densitômetro Camag TLC Scanner II, equipado com lâmpada de mercúrio e registrador / integrador Hewlett Packard 3396; espectrofotômetro Shimadzu UV-Visível 160A; evaporador rotatório Büchi RE 120; *shaker* Eberbach Corporation.

2.3 - Amostras

Amostras de leite cru foram colhidas, após ordenhas manuais diárias, na fazenda experimental do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento/Escola de Veterinária da UFMG. Estas amostras foram artificialmente contaminadas, em quantidades conhecidas, pela adição de soluções padrões de aflatoxina M₁.

2.4 - Otimização do método

O método otimizado foi baseado nos descritos pela AOAC [1] e por KAMIMURA [20], que sugere o emprego de Florisil na etapa de purificação.

2.4.1 - Etapa de extração

Ensaios de recuperação foram realizados com amostras de leite artificialmente contaminadas em níveis correspondentes a 0,8 µg/L de aflatoxina M₁ para otimização da forma de incorporação do solvente de extração, clorofórmio, ao leite. Foram avaliadas: agitação magnética por 1 minuto; agitação em *shaker* recíproco a 80 oscilações, durante 1 minuto; e agitação em *shaker* a 80 oscilações, durante 1 minuto, com posterior centrifugação a 1.800 x g, 30°C por 5 minutos. Os ensaios foram realizados em triplicata para cada forma de incorporação estudada.

2.4.2 - Etapa de purificação

A eficiência da etapa de purificação foi avaliada para colunas e cartuchos de sílica e Florisil.

Colunas de vidro de 33cm de comprimento por 1,3cm de diâmetro foram empacotadas manualmente no laboratório. Nas de Florisil foram adicionados algodão de vidro, 5g de sulfato de sódio anidro, 0,7g de Florisil previamente suspenso em clorofórmio e 0,5g de sulfato de sódio anidro [20]. Para as de sílica foram adicionados algodão de vidro, 5g de sulfato de sódio anidro, 2g de

sílica gel de 70 a 230mesh, previamente ativada e suspensa em clorofórmio e 2g de sulfato de sódio anidro, adaptando-se o procedimento proposto pela AOAC [1].

Foram realizados ensaios de recuperação, variando-se os volumes dos solventes de purificação e a concentração da toxina.

Mantendo-se fixos os volumes de eluição em 10mL para os cartuchos e 30mL para as colunas, determinou-se a influência do volume dos solventes de purificação sobre a recuperação do método. Quantidades de toxina, correspondentes a 0,35µg/L, foram adicionadas diretamente aos cartuchos e colunas. Quatro repetições foram realizadas para cada volume testado e em cada ensaio foram empregados os mesmos volumes para cada solvente de purificação. Os volumes empregados no caso dos cartuchos foram 10; 6; 5; 4; 3 e 2mL enquanto para as colunas foram 60; 50; 40; 30; 20 e 10mL.

Posteriormente ao estudo dos volumes, quatro diferentes níveis de toxina correspondentes a 0,10; 0,14; 0,19 e 0,40µg/L foram adicionados diretamente às colunas de Florisil, cartuchos de sílica e cartuchos de Florisil, com três repetições para cada nível de concentração.

2.4.3 – Etapa de detecção e quantificação

Foram comparados os resultados obtidos nas detecções e quantificações por análise visual e densitométrica, para avaliação da correlação.

Na análise densitométrica foi verificada a interferência dos parâmetros área e altura no cálculo da concentração de toxina e na escolha da forma de integração, sendo realizados estudos de recuperação, em dez repetições. Empregou-se uma solução padrão diluída em benzeno:acetonitrila (9:1, v/v) para simular um extrato purificado de amostra contaminada, sendo que 10µL desta solução, aplicados em placa, deveriam conter a massa de aflatoxina M₁ correspondente ao ponto intermediário da curva padrão adotada. Em cada repetição, a integração por área e por altura dos picos foi testada.

O erro referente a esta etapa, devido à variabilidade do equipamento, foi avaliado pela leitura, em triplicata, de dezoito pontos de padrão. Aplicaram-se seis repetições de 4µL, 5µL e 10µL de solução trabalho, correspondentes, em massa, a 0,3880ng; 0,4850ng e 0,9700ng de aflatoxina M₁, respectivamente. A variabilidade das três leituras para cada ponto aplicado foi calculada em termos de coeficiente de variação.

2.5 – Procedimento analítico

O procedimento analítico estabelecido na otimização do método encontra-se detalhado a seguir.

2.5.1 – Extração

Aliquotas de 50mL de amostras de leite, à temperatura ambiente, foram pipetadas e transferidas para frascos de polipropileno, com tampas, previamente identificados e protegidos da luz. Adicionou-se 10mL de solução salina NaCl 40 % e 120mL de clorofórmio a 35°C. Em

seguida, o clorofórmio foi incorporado durante 1 minuto por agitação magnética. Após repouso de 2 minutos, a camada aquosa superior foi aspirada, adicionando-se à camada clorofórmica restante 12g de sulfato de sódio anidro, com agitação ocasional por 3 minutos. A mistura obtida foi então filtrada através de papel de filtro, recolhendo-se os primeiros 60mL filtrados. O filtrado obtido foi evaporado em evaporador rotatório, a aproximadamente 40°C, até um resíduo de 1mL a 2mL.

2.5.2 – Purificação

O resíduo do extrato foi transferido para o cartucho de Florisil de 0,5g adaptado a uma seringa de vidro de 10mL e colocado sobre tubos de 15mL, utilizando cerca de 10mL de clorofórmio. O cartucho foi lavado, utilizando fluxo da gravidade, com 4mL de clorofórmio:hexano (1:1, v/v) e 4mL de clorofórmio:metanol (9:1, v/v), descartando-se os lavados. Posteriormente, em um outro tubo, a aflatoxina M₁ foi eluída com 10mL de acetona:água (99:1, v/v) e o eluato foi evaporado até securo sob nitrogênio, em banho-maria com agitação, a aproximadamente 40°C.

2.5.3 – Cromatografia em camada delgada

Os resíduos obtidos na purificação foram retomados com volumes de 30µL a 200µL de benzeno:acetonitrila (9:1, v/v), homogeneizados e imediatamente aplicados nas cromatoplasas, sendo duplicatas das amostras e, no mínimo, triplicatas da solução padrão para cada ponto da curva. Foi empregado éter etílico:metanol:água (95:4:1, v/v/v) como fase móvel. A análise visual foi realizada por observação da placa sob luz UV a 366nm em cromatovisor, comparando a intensidade de fluorescência das manchas das amostras com as do padrão. No caso de intensidades intermediárias foi considerada uma média dos pontos adjacentes. Na análise densitométrica foram comparadas as áreas dos picos das amostras com as do padrão obtidas nos cromatogramas, utilizando densitômetro sob as seguintes condições: excitação em 366nm, emissão em 450nm, atenuação 5, velocidade do papel 1,5mm/s, sensibilidade 170 e span 160.

2.6 – Validação do método otimizado

Na validação intralaboratorial foram realizados ensaios com padrões e amostras artificialmente contaminadas [14], segundo procedimentos analíticos determinados na otimização do método.

2.6.1 – Linearidade e limite de detecção do equipamento

Foram realizados ensaios com solução padrão para avaliação da linearidade da resposta, ou seja, da habilidade do sistema de detecção apresentar resultados proporcionais à concentração do analito [14], em uma determinada faixa de concentração, sem interferência da matriz.

O limite de detecção do equipamento e da análise visual também foi determinado aplicando-se volumes

de 1µL a 20µL de solução trabalho para verificação da menor quantidade detectável de aflatoxina M₁ por análise visual e densitométrica.

2.6.2 – Especificidade, exatidão, precisão, limites de detecção e quantificação do método

Foram realizados ensaios com amostras artificialmente contaminadas com solução padrão para avaliação de:

- especificidade ou capacidade do método em determinar exata e especificamente o analito de interesse na presença de outros componentes presentes na matriz [14];
- exatidão, indicada pela diferença entre o valor obtido e o valor real do analito na matriz [14], que foi expressa em termos de porcentagem de recuperação;
- precisão ou a dispersão de diversos valores individuais em torno da média dos valores obtidos [14], expressa em termos de coeficiente de variação;
- limite de detecção, correspondente a menor concentração do analito na matriz que pode ser identificada com nível de confiança especificado [14];
- limite de quantificação, correspondente a menor concentração do analito na matriz que pode ser determinada em níveis considerados aceitáveis de exatidão e precisão [14].

Os níveis de concentração estudados foram 0,045; 0,07; 0,09; 0,37 e 0,97µg/L, em cinco repetições, e 0,027µg/L e 0,036µg/L, em três repetições.

2.6.3 – Valores de referência

Os valores adotados como referência para avaliação da exatidão e precisão foram os específicos para aflatoxina M₁, estabelecidos pelo CEN – EUROPEAN COMMITTEE FOR STANDARTIZATION [6]. Foram considerados aceitáveis, para concentrações de aflatoxina M₁ entre 10ng/L e 50ng/L, valores de porcentagem de recuperação entre 60% e 120%, com coeficientes de variação menores ou iguais a 30%. Nas concentração maiores que 50ng/L foram aceitos valores de porcentagem de recuperação entre 70% e 110%, com coeficientes de variação menores ou iguais a 20%.

2.7 – Análise estatística

Na verificação da influência da variação da concentração de toxina sobre as recuperações obtidas nas diferentes formas de purificação e na comparação das formas de purificação para uma mesma concentração estudada, foi adotado o delineamento de parcelas subdivididas, em experimentos inteiramente casualizados, considerando-se parcelas os níveis de concentração e subparcelas as formas de purificação [28]. Para determinação da consistência dos dados foi realizado o teste de F, sendo as médias comparadas pelo teste de Duncan, a 5% de probabilidade [13]. As formas de detecção e quan-

tificação visual e densitométrica foram comparadas aplicando-se o teste de t para comparações pareadas [32].

3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 – Otimização do método

3.1.1 – Etapa de extração

A incorporação do clorofórmio por agitação em *shaker* com posterior centrifugação não garantiu ao método boa recuperação, mesmo apresentando aparente separação das fases. Foram obtidas recuperações de 40,0% com coeficiente de variação de 43,3% para análise visual e de 32,8% com coeficiente de variação de 53,2% para análise densitométrica.

Na incorporação empregando *shaker* houve formação de emulsão em duas amostras, o que impossibilitou a continuidade das análises. A amostra que foi possível quantificar apresentou recuperação de 76,7% na análise visual e 85,6% na densitométrica.

Desta forma, a incorporação por agitação magnética foi adotada, visto ter garantido boa recuperação ao método, sem formação de emulsão, além de tratar-se de uma forma de incorporação mais simples que as outras estudadas. Os valores de porcentagem de recuperação obtidos foram de 90,0% e 96,1%, com coeficientes de variação de 11,1% e 20,0%, para as análises visual e densitométrica, respectivamente.

3.1.2 – Etapa de purificação

As variações dos valores médios de recuperação em função do volume dos solventes utilizados na purificação estão representadas na *Figura 1*. No caso da sílica, as recuperações dos métodos que utilizaram cartuchos diminuíram significativamente para volumes inferiores a 4mL e superiores a 5mL, enquanto para as colunas redução na recuperação foi observada em função do aumento do volume ($p < 0,05$, teste de Duncan). Ao contrário, os métodos que empregaram cartuchos e colunas de Florisil não tiveram suas recuperações influenciadas pelo volume ($p > 0,05$, teste de F).

Os resultados confirmam observações do fabricante, que cita possíveis interferências dos volumes de solventes empregados na purificação sobre a recuperação [24] e define a necessidade de uma otimização destes volumes, sempre que a sílica for empregada. O aumento do volume reduziu significativamente a recuperação, sugerindo uma fraca adsorção da toxina pela sílica, permitindo seu deslocamento pelos solventes de purificação, antes da toxina ser eluída. Estes resultados são condizentes com os observados por KAMIMURA [20], que sugere a utilização do Florisil como fase estacionária na etapa de purificação de métodos para determinação de micotoxinas. SYLOS & RODRIGUEZ AMAYA [35] também observaram menores valores de recuperação para métodos empregando a sílica quando comparados com métodos que adotaram C₁₈ como adsorvente na purificação.

Os resultados médios de recuperação e os coeficientes de variação obtidos nos ensaios realizados variando-se a concentração da toxina, estão representados nas *Tabelas 1 e 2*. Nestes estudos foi mantida a sílica como adsorvente, empregando o volume otimizado, para verificação de sua eficiência em relação ao Florisil. Entretanto, somente a forma de cartuchos foi adotada, por apresentar maior homogeneidade das partículas, simplicidade de operação e rapidez que as colunas.

Comparando os valores de recuperação obtidos para cada forma de purificação foram observadas diferenças significativas nos diferentes níveis de concentração estudados. Na detecção e quantificação visual, somente o valor de recuperação obtido no nível de concentração 0,10µg/L, para purificação com cartuchos de Florisil, apresentou-se significativamente menor ($p < 0,05$; teste de Duncan) que os valores obtidos nos outros níveis estudados. As outras formas de purificação não sofreram influência da variação de concentração (*Tabela 1*). Por outro lado, na densitométrica, a purificação empregando cartuchos de Florisil não foi influenciada pela variação da concentração. As outras formas de purificação apresentaram pelo menos um valor de recuperação significativamente menor ($p < 0,05$, teste de Duncan), no nível 0,14µg/L para purificação com cartuchos de sílica e 0,10µg/L para colunas de Florisil (*Tabela 2*). De modo geral, a concentração de aflatoxina M₁ não exerceu grande influência sobre a recuperação, na faixa estudada. Mesmo não sendo observada uma relação direta de redução da recuperação com a diminuição da concentração de aflatoxina M₁, nota-se que, quando obtidas recuperações significativamente menores, estas corresponderam aos níveis de concentração mais baixos.

Comparando as recuperações obtidas, em um mesmo nível de concentração, para a detecção e quantificação visual (*Tabela 1*) e densitométrica (*Tabela 2*) foram observadas diferenças significativas entre as três formas de purificação. Entretanto, em todos os casos foram obtidos valores elevados de recuperação (71,0% a 105,8%). Os coeficientes de variação obtidos demonstraram uma menor variabilidade dos resultados quando empregados cartuchos cromatográficos. Isto pode ser justificado devido a uma maior homogeneidade e padronização dos cartuchos, produzidos em escala industrial, quando comparados com as colunas, as quais foram manualmente empacotadas.

3.1.3 – Etapa de detecção

Pode-se observar, pela análise das *Tabelas 1 e 2*, que a detecção e quantificação visual apresentou valores mais elevados de recuperação e mais baixos de CV que os obtidos para a densitometria. Quando estas formas de detecção e quantificação foram analisadas por comparação pareada dos resultados de recuperação obtidos em cada forma de purificação, foi observada diferença significativa entre as análises visual e densitométrica, para a purificação com cartuchos de sílica ($t_{14GL} = 3,13$; $p < 0,01$). Por outro lado, esta diferença não

foi observada na purificação com cartuchos ($t_{14GL} = 0,278$; $p > 0,05$) e colunas de Florisil ($t_{14GL} = 0,197$; $p > 0,05$).

TABELA 1. Efeito da concentração de aflatoxina M₁ sobre as médias de recuperação e coeficientes de variação obtidos nas diferentes formas de purificação empregando análise visual

Concentração (µg/L)	Cartucho de sílica		Cartucho de Florisil		Coluna de Florisil	
	R (%)	CV (%)	R (%)	CV (%)	R (%)	CV (%)
0,10	90,0 ^{ax}	0,0	80,0 ^{by}	0,0	95,0 ^{ax}	0,0
0,14	100,0 ^{ax}	0,0	87,5 ^{ay}	0,0	95,2 ^{ax,y}	8,7
0,19	100,0 ^{ax,y}	0,0	90,0 ^{ay}	0,0	103,3 ^{ax}	19,6
0,40	100,0 ^{ax}	0,0	96,7 ^{ax}	3,0	100,0 ^{ax}	0,0
Global	97,5 ^x	4,6	88,5 ^y	7,2	98,4 ^x	10,2

Numa mesma forma de purificação, médias (obtidas de 3 repetições) indicadas pela mesma letra (a ou b) não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5 % de probabilidade. Para uma mesma concentração, médias indicadas pela mesma letra (x ou y) não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5 % de probabilidade. R = recuperação média; CV = coeficiente de variação. R e CV global obtidos dos 12 ensaios realizados para cada forma de purificação.

TABELA 2. Efeito da concentração de aflatoxina M₁ sobre as médias de recuperação e coeficientes de variação obtidos nas diferentes formas de purificação empregando análise densitométrica

Concentração (µg/L)	Cartucho de sílica		Cartucho de Florisil		Coluna de Florisil	
	R (%)	CV (%)	R (%)	CV (%)	R (%)	CV (%)
0,10	85,2 ^{a,bx}	2,5	94,3 ^{ax}	15,5	80,6 ^{by}	4,5
0,14	71,0 ^{by}	5,2	83,5 ^{ax}	12,8	104,0 ^{ax}	22,6
0,19	95,6 ^{ax}	13,9	94,9 ^{ax}	7,0	99,2 ^{ax}	18,2
0,40	96,7 ^{ax}	4,6	85,8 ^{ax}	18,7	105,8 ^{ax}	10,9
Global	87,1 ^x	14,3	89,6 ^x	13,3	97,4 ^x	17,6

Numa mesma forma de purificação, médias (obtidas de 3 repetições) indicadas pela mesma letra (a ou b) não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5 % de probabilidade. Para uma mesma concentração, médias indicadas pela mesma letra (x ou y) não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5 % de probabilidade. R = recuperação média; CV = coeficiente de variação. R e CV global obtidos dos 12 ensaios realizados para cada forma de purificação.

No estudo de comparação da área e altura como parâmetros de integração, não foram observadas diferenças significativas ($t_{9GL} = 1,520$; $p > 0,05$) entre os valores de recuperação calculados pelos dois processos (*Tabela 3*). Entretanto, a AOAC [1] recomenda a utilização do parâmetro área para integração dos picos obtidos na quantificação densitométrica e NESHEIM & TRUCKSESS [25] demonstraram que a altura dos picos não é proporcional à concentração de aflatoxina, e sim a área. Portanto, a área foi adotada como parâmetro de integração nos procedimentos do presente trabalho.

Segundo COKER [7] a etapa de detecção e quantificação, quando realizada densitometricamente, contribui efetivamente para a variabilidade do método, CV de 19%. Entretanto, neste estudo a variabilidade referente a esta etapa foi estimada em 9,5%, mostrando-se maior para maiores concentrações de aflatoxina detectadas (*Tabela 4*).

3.2 – Validação do método otimizado

Linearidade da resposta, sem interferência da matriz, foi observada na faixa de 0,1940ng a 1,940ng de aflatoxina M₁, para as curvas submetidas a análise densitométrica, com coeficientes de determinação superiores a 0,990. O limite de detecção do padrão de

aflatoxina M₁ foi 0,1940ng, massa correspondente ao menor volume de solução trabalho aplicado, detectável visual e densitometricamente.

TABELA 3. Interferência dos parâmetros de integração área e altura na porcentagem de recuperação de aflatoxina M₁

Experimento	Integração por altura	Integração por área
	R (%)	R (%)
1	98,8	101,4
2	108,6	96,2
3	112,9	92,6
4	92,4	96,7
5	95,5	90,8
6	107,3	110,7
7	90,3	85,4
8	92,4	95,6
9	111,5	99,8
10	101,0	101,3
Média das recuperações (%)	101,1	97,0
Coefficiente de variação (%)	8,4	7,1

$T_{\text{sol}} = 1,520$; $p > 0,05$ (teste pareado para comparação área x altura).
R = recuperação.
Massa de aflatoxina M1 aplicada correspondente a 0,4850ng.

TABELA 4. Coeficientes de variação obtidos para leituras densitométricas em triplicata de pontos de uma curva padrão de aflatoxina M₁

Volume de solução trabalho aplicado (µL)	Massa de aflatoxina correspondente (ng)	CV (%)	CV médios (%)
4	0,3880	1,1	2,7
		1,8	
		4,4	
		6,5	
		1,4	
5	0,4850	1,0	9,8
		13,8	
		5,6	
		13,5	
		6,2	
		13,7	
10	0,9700	5,9	15,9
		41,1	
		6,9	
		12,5	
		10,3	
		12,2	
CV médio global (%)		9,5	

CV = coeficiente de variação

As médias das recuperações e coeficientes de variação obtidos nos ensaios com amostras artificialmente contaminadas empregando o método otimizado estão ilustrados na *Tabela 5*. Os valores médios de porcentagem de recuperação do método não sofreram influência da variação de concentração, dentro da faixa estudada, tanto na detecção e quantificação visual quanto na densitométrica ($p > 0,05$, teste de Duncan), variando de 84,2% a 99,0% e de 85,2% a 105,2% nas análises visual e densitométrica, respectivamente. Os valores de CV variaram de 2,3% a 9,8% na análise visual e de 3,6% a 13,9% na análise densitométrica. Estes resultados indicaram precisão e exatidão do método na faixa de concentração estudada, conforme os valores adotados como referência.

Os valores de CV obtidos para o método como um todo, ou seja, realizando-se as etapas de extração, purificação, detecção e quantificação, incluem aqueles ob-

tidos quando realizados ensaios envolvendo somente as duas últimas etapas (*Tabelas 1 e 2*), permitindo deduzir que a etapa de extração pouco contribuiu para a variabilidade do método. Isto porque, provavelmente, na extração, as perdas foram minimizadas devido à incorporação adequada do clorofórmio, sem formação de emulsão e ao fato de serem colhidos 60mL do extrato e não o volume total.

TABELA 5. Efeito da concentração de aflatoxina M₁ sobre as médias de recuperação e coeficientes de variação empregando análise visual e densitométrica

Concentração (µg/L)	Análise visual		Análise densitométrica	
	R (%)	CV (%)	R (%)	CV (%)
0,045	89,6 ^a	9,8	86,6 ^a	9,8
0,07	84,2 ^a	8,6	85,2 ^a	3,6
0,09	91,7 ^a	5,1	94,6 ^a	8,7
0,37	99,0 ^a	2,3	105,2 ^a	9,6
0,97	98,0 ^a	2,8	86,7 ^a	13,9
Global	92,5	8,3	91,7	12,2

Médias (obtidas de 5 repetições) indicadas pela mesma letra (a ou b) não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5 % de probabilidade.
R = recuperação média; CV = coeficiente de variação.
R e CV global obtidos dos 25 ensaios realizados para cada método.

Analisando as formas de detecção e quantificação por comparação pareada dos resultados individuais de recuperação obtidos, não foi observada diferença significativa, entre as análises visual e densitométrica ($t_{24GL} = 0,542$; $p > 0,05$).

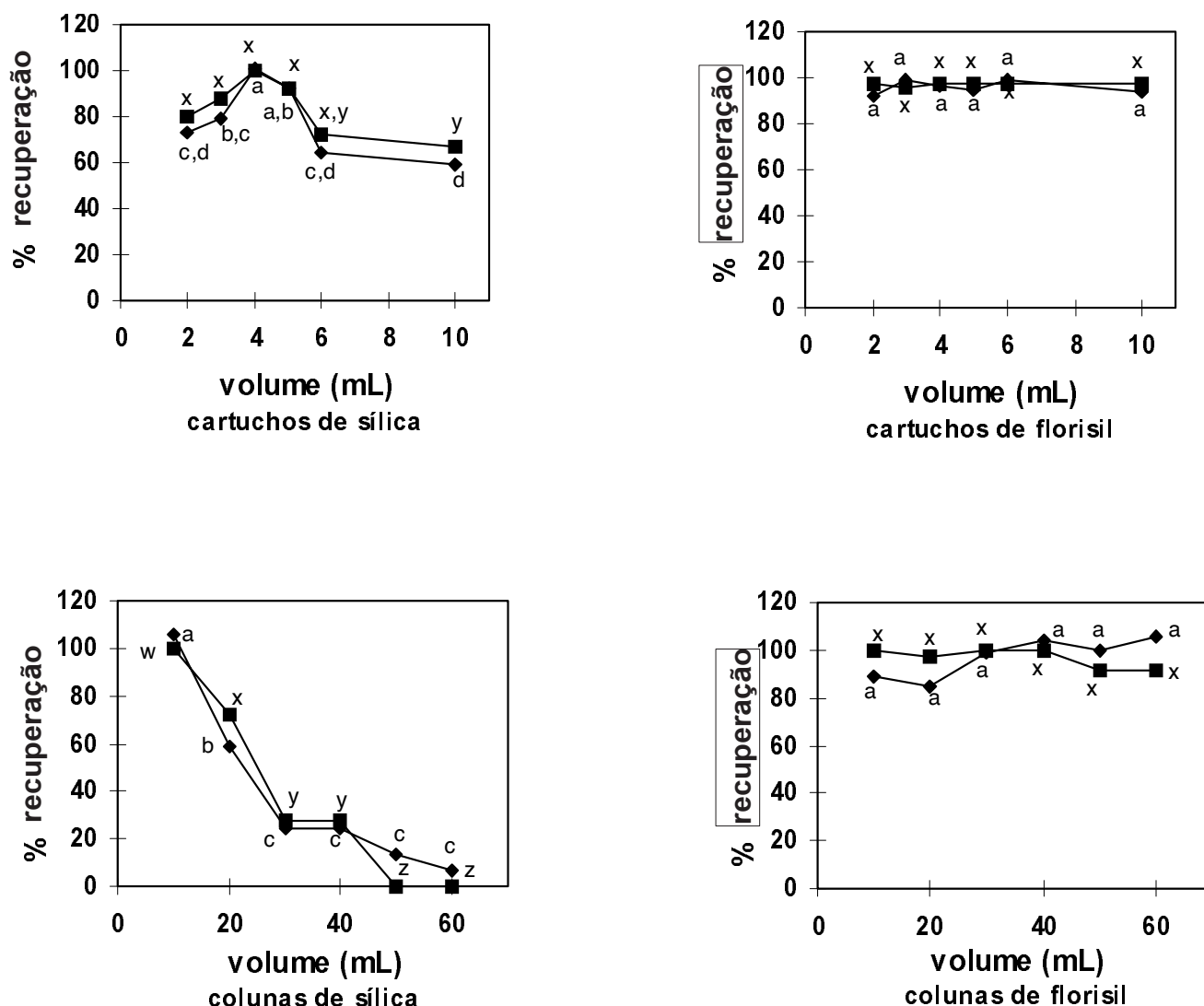
Para todas as replicatas de amostras no nível de concentração 0,036µg/L foi detectada aflatoxina M₁. Os valores médios de porcentagem de recuperação neste nível foram de 70,50% para a detecção e quantificação visual e 51,64% para a densitométrica, este último fora dos intervalos estabelecidos como aceitáveis para quantificação. As amostras contaminadas a 0,027µg/L não foram detectadas como positivas pelo método em questão.

Desta forma, foram considerados 0,036µg/L e 0,045µg/L como os limites de detecção e quantificação do método, respectivamente, suficientes para monitoramentos da contaminação de amostras nos limites de tolerância determinados tanto pela União Européia [5] quanto pelo MERCOSUL [23].

Nos ensaios utilizando amostras artificialmente contaminadas também foi evidenciada suficiente especificidade do método. Na faixa quantificável, os interferentes presentes na amostra não foram detectados como aflatoxina M₁ e não foram observados desvios analíticos decorrentes de interferência entre os componentes da matriz e a micotoxina estudada.

4 - CONCLUSÕES

Apresentaram melhor desempenho na otimização do método a extração da aflatoxina M₁ com clorofórmio, empregando incorporação por agitação magnética e a purificação por extração em fase sólida, com cartuchos de Florisil.



Médias indicadas pela mesma letra, sendo a,b,c,d para análise densitométrica (◆) e w,x,y,z para visual (■), não diferem entre si pelo teste de Duncan, a 5 % de probabilidade.

FIGURA 1. Influência dos volumes de solventes utilizados na purificação com cartuchos de sílica, cartuchos de Florisil, colunas de sílica e colunas de Florisil sobre os valores médios de recuperação.

O método validado demonstrou eficiência para ser adotado em atividades de monitoramento de aflatoxina M₁ em leite apresentando:

- linearidade sem interferência da matriz na faixa de 0,1940ng a 1,940ng;
- especificidade para a detecção de aflatoxina M₁ na presença dos interferentes da matriz, na faixa de 0,045µg/L a 0,970µg/L;
- exatidão e precisão na faixa de 0,045µg/L a 0,970µg/L, com valores de porcentagem de recuperação variando de 84,2% a 99,0% na análise visual e de 85,2% a 105,2% na análise densitométrica e coeficientes de variação de 2,3% a 9,8% e de 3,6% a 13,9%, respectivamente; e
- limites de detecção (0,036µg/L) e de quantificação (0,045µg/L) contemplando os níveis de tolerância estabelecidos na legislação nacional e internacional para aflatoxina M₁ em leite.

5 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] AOAC INTERNATIONAL. Official methods of analysis of AOAC **International**. 16.ed. 4th ver. 1998. (Software Adobe and E-DOC/CJS).
- [2] BECKWITH, A.C., STOLOFF, L. Fluorodensitometric measurement of aflatoxin thin layer chromatograms. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.**, v. 51, p. 602-608, 1968.
- [3] BENTO, H., FERNANDES, A.M., BARBOSA, M. Pesquisa de aflatoxina M1 em leite corrente pasteurizado e em leite em pó. **Rev. Port. Ci. Vet.**, v. 84, p. 163-171, 1989.
- [4] CARRILO, A.E.C. **Micotoxinas: calidad analítica y materiales de referencia**. In: CRUZ, L.C.H. Micotoxinas: perspectiva latinoamericana. [s.l.]: Sociedade Latinoamericana de Micotoxicologia, 1996. p. 48-52.
- [5] CE - Comunidades Europeias. Regulamento CE no 1525/98. **Jornal Oficial das Comunidades Europeias**. [s.n.l.], 1998. (Diretiva das Comunidades Europeias).
- [6] CEN – EUROPEAN COMMITTEE FOR STANDARTISATION. CEN Repot: **Food Analysis – Biotoxins: Criteria of**

- analytical methods for mycotoxins**, Brussels. CR 13505:199E. 8 p.
- [7] COKER, R.D. **High performance liquid chromatography and other chemical quantification methods used in the analysis of mycotoxins in foods**. In: GILBERT, J. (Ed.) Analysis of food contaminants. London: Elsevier, 1984. p. 207-263.
- [8] CULLEN, J.M., RUEBNER, B.H., HSIEH, L.S., HYDE, D.M., HSIEH, D.P. Carcinogenicity of dietary aflatoxin M1 in male fischer rats compared to aflatoxin B1. **Cancer Res.**, v. 47, p. 1913-1917, 1987.
- [9] DOMINGUEZ, L., BLANCO, J.L., GOMEZ-LUCIA, E., RODRIGUEZ, E.F., SUAREZ, G. Determination of aflatoxin M1 in milk and milk products contaminated at low levels. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.**, v. 70, p. 470-472, 1987.
- [10] DOU-DIÁRIO OFICIAL DA UNIÃO. Brasília, 25 mar. 1996. Suplemento no 58. Seção 1, p.43.
- [11] DRAGACCI, S.; GROSSO, F.; GILBERT, J. Immunoaffinity column cleanup with liquid chromatography for determination of aflatoxin M1 in liquid milk: collaborative study. **J. AOAC Int.**, v. 84, n. 2, p. 437-443, 2001.
- [12] DRAGACCI, S.; GROSSO, F.; PFAUWATHEL-MARCHOND, N.; FREMY, J.M.; VENANT, A.; LOMBARD, B. Proficiency testing for the evaluation of the ability of European Union-National Reference Laboratories to determine aflatoxin M1 in milk at levels corresponding to the new European Union legislation. **Food Addit. Contam.**, v. 8, n. 5, p. 405-415, 2001.
- [13] DUNCAN, D.B. Multiple range and multiple F tests. **Biometrics**, v.11, p.1-42, 1955.
- [14] EURACHEM. **The fitness for purpose of analytical methods**. A laboratory guide to method validation and related topics. Teddington, 1998. 61 p.
- [15] FAO/WHO. Evaluation of certain mycotoxins in food: fifty-sixth report of the Joint FAO/WHO. Expert Committee on Food Additives. **WHO-Technical-Report-Series**, n. 906, v. 3, 2001. 62 p.
- [16] GILBERT, J. Recent advances in analytical methods for mycotoxins. **Food Addit. Contam.**, v. 10, p. 37-48, 1993.
- [17] HSIEH, D.P.H., WONG, Z.A., WONG, J.J., MICHAS, C., RUEBNER, B.H. **Comparative metabolism of aflatoxin**. In: RODRICKS, J.V., HESSELTINE, C.W., MEHLMAN, M.A. (Ed.) Mycotoxins in human and animal health. Park Forest South: Pathotox Publishers, 1977. p.37-50.
- [18] IOANNOU-KAKOURI, E.; CHRISTODOULIDOU, M.; CHRISTOU, E.; CONSTANTINIDOU, E. Immunoaffinity column/HPLC determination of aflatoxin M1 in milk. **Food Agric. Immun.**, v. 7, p. 131-137, 1995.
- [19] KAMIMURA, H. **Problems of mycotoxin in food sanitation**. 2 ed. Tokyo: JICA, 1996. 52 p. (Texto técnico).
- [20] KAMIMURA, H. Simple rapid cleanup method for analysis of aflatoxins and comparison with various methods. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.**, v. 68, p. 458-461, 1985.
- [21] LESZCZYNSKA, J.; MASLOWSKA, J.; OWCZAREK, A.; KUCHARSKA, U. Determination of aflatoxins in food products by the ELISA method. **J. Food Sci.**, v. 19, n. 1, p. 8-12, 2001.
- [22] MARKAKI, P.; MELISSARI, E. Occurrence of aflatoxin M1 in comercial pasteurized milk determined with ELISA and HPLC. **Food Addit. Contam.**, v. 14, p. 451-456, 1997.
- [23] MERCOSUL - Mercado Comum do Cone Sul. **Regulamento técnico sobre limites máximos de aflatoxinas**. Resolução no 56/94. [s.n.l.], 1994. (Publicação avulsa MERCOSUL).
- [24] MILLIPORE CORPORATION. **Waters sep-pak cartridge: care and use manual**. Milford, 1992. 19 p; A-10. (Waters Chromatography Publications).
- [25] NESHEIM, S., TRUCKSESS, M.W. **Thin-layer chromatography/high-performance thin-layer chromatography as tool for mycotoxin determination**. In: COLE, R. J. (Ed.) Modern methods in the analysis and structural elucidation of mycotoxins. Orlando:Academic Press, 1986. p. 240-264.
- [26] PEREIRA, M.L., TOLEDO, M.C.F. Micotoxinas: impacto na saúde humana e animal e sua detecção pelo método de ELISA. **Cad. Téc. Esc. Vet. UFMG**, n. 13, p. 5-27, 1995.
- [27] PIETRI, A.; BERTUZZI, T.; PIVA, G. Aflatoxin M1 occurrence in samples of Grana Padano cheese. **Food Addit. Contam.**, v. 14, p. 341-344, 1997.
- [28] PIMENTEL-GOMES, F. Curso de estatística experimental. 14. ed. Piracicaba: Nobel, 2000. 477p.
- [29] PONG, R.S., WOGAN, G.N. Toxicity and biochemical and fine structural effects of synthetic aflatoxins M₁ and B₁ in rat liver. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 47, p. 585-592, 1971.
- [30] SABINO, M., PURCHIO, A., ZORZETTO, M.A.P. Variations in the levels of aflatoxin in cows milk consumed in the city of São Paulo, Brazil. **Food Addit. Contam.**, v. 6, p. 321-326, 1989.
- [31] SIMONELLA, A.; SCORTICHINI, G.; MANETTA, A.C.; CAMPANA, G.; CONTE, A.; ANNUNZIATA, L.; MIGLIORATI, G.; DI GIUSEPPE, L. Aflatoxina M₁ nel latte vaccino: ottimizzazione di un protocollo analitico di determinazione quali-quantitativa basato su tecniche cromatografiche, di immunoaffinità e immunoenzimatiche. **Veterinaria Italiana**, v. 34, n. 27, p. 25-39, 1998.
- [32] SNEDECOR, G.W., COCHRAN, W.G. **Statistical Methods**. 8.ed. Iowa: State University Press, 1989. 503 p.
- [33] SOUZA, S.V.C., VARGAS, E.A., JUNQUEIRA, R.G. Eficiência de um kit de ELISA na detecção e quantificação de aflatoxina M1 em leite e investigação da ocorrência no estado de Minas Gerais. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v.19, n. 3, p.401-405, 1999.
- [34] STUBBLEFIELD, R.D., VAN EGMOND, H.P. **Chromatographic methods of analysis for aflatoxin M₁**. In: VAN EGMOND, H.P. Ed. Mycotoxins in dairy products. London: Elsevier Applied Science, 1989. p. 57-95.
- [35] SYLOS, C.M., RODRIGUEZ AMAYA, D.B. Estudo comparativo de métodos para determinação de aflatoxina M₁. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, v. 56, p. 87-97, 1996.
- [36] UENO, Y. **Mycotoxins, in mutagens**. In: HAYATSU, H. (Ed.) Food: detection and prevention. Boca Raton: CRC, 1990. p. 113-124.
- [37] VAN EGMOND, H.P. Aflatoxins in milk. In: EATON, D.L.; GROOPMAN, J.D. (Ed.) **The toxicology of aflatoxins: human health, veterinary, and agricultural significance**. San Diego: Academic Press, 1994. cap. 17. p. 365-381.
- [38] VAN EGMOND, H.P., DEKKER, W.H. Worldwide regulations for mycotoxins in 1994. **Natural Toxins**, v. 3, p. 332-336, 1995.