

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

TÉCNICAS UTILIZADAS PARA DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE AFLATOXINA M₁ NO LEITE¹

ADRIANA FRIZZARIN², KEILA MARIA RONCATO DUARTE³

¹Recebido para publicação em 04/07/12. Aceito para publicação em 14/12/12.

²Programa de Pós-Gaduação em Produção Animal Sustentável. Instituto de Zootecnia (IZ), Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios (APTA), Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo (SAA), Rua Heitor Pentead, 56, CEP 13460-000, Nova Odessa, SP, Brasil. E-mail: adrianafrizzarin@hotmail.com

³Centro de Pesquisa e Desenvolvimento em Genética e Reprodução Animal, IZ, APTA, SAA, Rua Heitor Pentead, 56, CEP 13460-000, Nova Odessa, SP, Brasil.

RESUMO: Aflatoxina é a denominação dada a um grupo de substâncias tóxicas, produzidas principalmente por dois fungos *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*, que se desenvolvem sobre muitos produtos agrícolas e alimentos quando as condições de umidade do produto, umidade relativa do ar e temperatura ambiente são favoráveis. As aflatoxinas podem apresentar diferentes formas, sendo que no leite, apresentam-se como M₁ e M₂, resultantes do metabolismo das aflatoxinas B₁ e B₂. A aflatoxina M₁ (AFM₁) é classificada como possível carcinógeno para o homem, por isso, a ocorrência desta no leite de vacas lactantes é uma questão de saúde pública, diversas técnicas são utilizadas para sua detecção e quantificação. Essas técnicas incluem as físico-químicas como a cromatografia em camada delgada e cromatografia líquida de alta eficiência e as técnicas biológicas que incluem os imunoenaios, como o radioimunoensaio e o ELISA. Deste modo, este trabalho objetivou apresentar as técnicas utilizadas para determinação de aflatoxina M₁ e M₂ no leite.

Palavras-chave: AFM₁, cromatografia, CLAE, ELISA, micotoxinas.

TECHNIQUES USED FOR DETECTION AND QUANTIFICATION OF AFLATOXIN M₁ IN MILK

ABSTRACT: Aflatoxin is a group of toxic substances produced by fungi, mainly *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. It can be developed in agriculture products such as grains or processed food, when environment conditions of humidity and air humidity are favorable. Aflatoxins can be presented as several forms. In Milk, are called M₁ and M₂, resulting from aflatoxins B₁ and B₂ metabolism. Aflatoxin M₁ (AFM₁) is classified as a possible carcinogen to humans, so the occurrence of aflatoxin M₁ in milk of lactating cows is a public health issue, and because of its importance several techniques are used for its detection and quantification. These techniques include the physical-chemical as thin layer chromatography and high performance liquid chromatography and the biological techniques including immunoassays such as RIA and ELISA. This review aimed to present the techniques used to quantify aflatoxins M₁ and M₂ in milk and dairy products.

Key words: mycotoxins, AFM₁, ELISA, chromatography, HPLC.

INTRODUÇÃO

A contaminação de alimentos destinados ao consumo humano e a fabricação de rações animais com fungos e, conseqüente produção de micotoxinas representam perdas econômicas bastante significativas, além dos riscos à saúde (PEREIRA *et al.*; 2005).

Todas as aflatoxinas tem efeito carcinogênico, sendo que a aflatoxina B₁ (AFB₁) é especialmente relacionada à hepatocarcinogênese. A aflatoxina B₁ pode ser biotransformada no fígado de animais, incluindo o homem, em vários outros metabólitos tóxicos, tais como aflatoxina M₁ que é excretada no leite (GONÇALEZ, *et al.*; 2005). Leite contaminado com AFM₁ representa um risco, especialmente para crianças e bebês, que são potencialmente mais sensíveis as toxinas e possuem uma dieta menos diversificada que os adultos (SANTILI, 2010).

Diante de um cenário em que a exigência por qualidade e segurança na produção, processamento e comercialização de alimentos é cada vez mais rigorosa, tanto no âmbito nacional como no internacional, faz-se necessário o uso de medidas de fiscalização e monitoramento da integridade sanitária e nutricional dos alimentos produzidos e comercializados no país (PEREIRA, *et al.*, 2005). Para garantir que a população e os animais não consumam níveis que representem riscos a saúde e que estão acima do permitido por lei, a detecção e quantificação da aflatoxina M₁ é bastante importante. Através desse trabalho de revisão, tem-se como objetivo apresentar as técnicas mais utilizadas na detecção e quantificação da aflatoxina M₁.

Micotoxinas

As toxinas produzidas por fungos filamentosos são nomeadas micotoxinas. Este termo deriva da palavra grega *Mikes*, que significa fungo e da palavra latina *Toxicum*, que significa veneno, ou seja, micotoxina é a toxina produzida por fungos (SCUSSEL, 1998) São metabólitos secundários, aparentemente sem qualquer função no metabolismo basal dos fungos. Micotoxinas ocorrem em diferentes partes do mundo e representam um risco potencial para a saúde dos homens e animais quando presentes nos alimentos e rações. Podem entrar nas cadeias alimentares humana e animal por meio de contaminação direta ou indireta. A contaminação indireta de alimentos e rações ocorre quando um ingrediente qualquer foi previamente contaminado por um fungo toxigênico, e mesmo que o fungo tenha sido elimina-

do durante o processamento, as micotoxinas ainda permanecerão no produto final. Exemplo milho contaminado por fungo com produção de micotoxina ainda em campo, depois do processamento o fungo foi eliminado mas a micotoxina permanece e esse milho se torna ingrediente de uma ração ofertada ao gado, ocorre uma contaminação indireta. A contaminação direta, por outro lado, ocorre quando o produto contaminado por um fungo toxigênico, com posterior formação de micotoxinas é ingerido diretamente por humanos e animais. (FREIRE *et al.*, 2007).

A ingestão de micotoxinas por seres humanos ocorre principalmente pelo consumo de vegetais, leite, queijo, carnes e outros produtos animais contaminados (FREIRE *et al.*, 2007).

Doenças em humanos e animais resultantes do consumo de micotoxinas são chamadas de micotoxicoses. Os sinais e sintomas dessas doenças vão desde lesões de pele, sintomas de hepatotoxicidade, nefrotoxicidade, neurotoxicidade, hematotoxicidade ou genitotoxicidade, podendo levar à morte e ainda podem apresentar efeitos mutagênicos, teratogênicos, carcinogênicos ou imunossupressores (TEIXEIRA, 2008).

Entre as micotoxinas de grande interesse para a Saúde Pública e de importância agroeconômica estão as aflatoxinas, ocratoxinas, tricotecenos, zearalenona, fumonisinas e os alcalóides do ergot. Uma única espécie de fungo é capaz de produzir uma ou várias micotoxinas, e uma mesma micotoxina pode ser produzida por diferentes espécies de fungos (TESSARI *et al.*, 2012).

Dentre as micotoxinas conhecidas, as aflatoxinas são consideradas as mais perigosas devido a sua frequente ocorrência em alimentos e rações, e pelo seu efeito carcinogênico, mutagênico e teratogênico, representando, um risco significativo à saúde humana e animal (SANTILI, 2010).

Aflatoxinas

Em 1960 ocorreu um grave acidente econômico na Inglaterra com a morte de mais de 400.000 perus de 4 a 6 semanas de idade, o qual foi provocado por uma doença desconhecida, que por não apresentar causa aparente, foi denominada de *Turkey X Disease*, cujo desaparecimento dos sintomas ocorria com a mudança de rações. Iniciaram-se então estudos para descobrir a causa do distúrbio e verificou-se um ponto em

comum entre a morte dos perus e outras aves de criação na Inglaterra, a ingestão de rações que continham farelo de amendoim de procedência brasileira. Observaram que as rações apresentavam grandes números de hifas, o fungo foi isolado e identificado como *Aspergillus flavus* sendo o fator tóxico denominado aflatoxina (SCUSSEL, 1998).

A exposição humana e de animais às aflatoxinas ocorre predominantemente pela ingestão de alimentos e rações contaminados, especialmente cereais e grãos, como milho, trigo, amendoim, entre outros (OLIVEIRA *et al.*, 2010). Podem ser produzidas por três espécies de *Aspergillus*: *A. flavus*, *A. parasiticus* eventualmente, *A. nomius* (TEIXEIRA, 2008).

Dezoito diferentes tipos de aflatoxinas foram identificados, mas somente as aflatoxinas B₁ (AFB₁), B₂ (AFB₂), G₁ (AFG₁) e G₂ (AFG₂) foram detectadas como contaminantes naturais de rações e ingredientes, sendo a AFB₁ a toxina de maior toxicidade. A contínua ingestão de AFB₁ por animais em lactação leva à excreção de aflatoxina M₁ (AFM₁) no leite (OLIVEIRA *et al.*, 2010).

A toxicidade das seis aflatoxinas mais potentes decresce na seguinte ordem: B₁ > M₁ > G₁ > B₂ > M₂ > G₂. Quando observadas sob luz ultravioleta (UV), essas micotoxinas fluorescem nas seguintes colorações: B₁ e B₂ – azul, G₁ – verde, G₂ – verde-azulada, M₁ – azul-violeta, e M₂ – violeta (FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2009).

Efeitos tóxicos na saúde podem ocorrer de forma aguda ou crônica, predominantemente influenciada pela dose e duração da exposição. Além de causar aflatoxicose em humanos, os bovinos, suínos e aves são os animais que são primariamente afetados. AFB₁ pode causar danos hepáticos graves incluindo necrose hemorrágica, infiltração gordurosa e proliferação de ductos biliares. Embora uma variação de até 10 vezes na susceptibilidade dos efeitos agudos da AFB₁ entre as espécies seja documentada, nenhuma espécie pode ser considerada como totalmente resistente (VOLKEL *et al.*, 2011).

Aflatoxinas M₁

A aflatoxina M₁ ou toxina do leite é um metabólito hidroxilado da aflatoxina B₁ secretada no leite de mamíferos que consomem alimentos contaminados (WHO, 2001). A aflatoxina B₁ é absorvida via trato

gastrointestinal e transportada para o fígado onde se processa a sua metabolização, uma fração da aflatoxina é ativada e fixada nos tecidos hepáticos enquanto outras formas conjugadas hidrossolúveis são excretadas no sistema circulatório sanguíneo distribuindo-se por via sistêmica e passando eventualmente para o leite, ovos, músculos e tecidos (GIMENO, 2005).

A excreção da toxina no leite dos animais depende de vários fatores, como o nível de contaminação da ração com aflatoxina B₁, quantidade do alimento ingerido pelo animal, nível de produção do animal, fase da lactação e estado de saúde dos animais. Alguns estudos indicam que entre 0,3 a 6,2% da AFB₁ ingerida na dieta, aparece no leite de vacas lactantes (WHO, 2001). MASOERO *et al.* (2007) acrescentam que outros fatores que afetam a transição para o leite incluem a variabilidade de animais e saúde da glândula mamária. VOLKEL *et al.* (2011) citam que altos níveis de variação podem ser observados de animal para animal, dia-a-dia, ordenha a ordenha e espécie para espécie e que a transição não é diretamente dependente das doses administradas embora a quantidade absoluta de M₁ excretada é influenciada pela ingestão de AFB₁, por kg de peso corporal.

Essa toxina é classificada como possível carcinógeno para o homem (classe 2B), sendo também observada uma alta atividade genotóxica em animais de experimentação (LOPES *et al.*, 2001 *apud* GONÇALEZ *et al.*; 2005).

A maioria dos países desenvolvidos regulariza os níveis máximos permissíveis para aflatoxina M₁ no leite e derivados. Esses limites são altamente variáveis, os países membros da Comunidade Europeia, por exemplo, estabelecem o limite de 0,05 µg L⁻¹ como tolerável, enquanto a agência reguladora americana, FDA (Food and Drug Administration) estabeleceu a concentração máxima permitida no leite em 0,5 µg L⁻¹. Essa norma tem sido adotada por alguns países da América Latina, entre eles os que formam parte do Mercosul, como Argentina, Paraguai e Uruguai. No Brasil, o Ministério da Saúde, resolução nº7 de 18 de fevereiro de 2011, estabeleceu os limites máximos de 0,5 µg L⁻¹ para leite fluido, 5 µg L⁻¹ para leite em pó e 2,5 µg L⁻¹ para queijos (BRASIL, 2012).

Extração e purificação da AFM₁

Atualmente, as aflatoxinas têm sido detectadas por

técnicas físico-químicas como a cromatografia em camada delgada e cromatografia líquida de alta eficiência e as técnicas biológicas incluem os imunoenaios, como o Radioimunoensaio e o ELISA (AMARAL e MACHINSKI, 2006).

Os métodos químicos analíticos são constituídos pelas etapas de preparação da amostra, extração, purificação, detecção e quantificação (BOTURA, 2005).

O processo amostral de produtos como o leite é facilitado pela característica de uniformidade da amostra, na qual a AFM₁ encontra-se distribuída em todo o seu volume de forma homogênea. A fase de extração das toxinas consiste em separá-las do substrato analisado, utilizando-se solventes orgânicos, sendo geralmente empregado metanol, clorofórmio, acetonitrila, acetona ou a combinação de um ou mais desses solventes com água.

Os procedimentos de extração e remoção de interferentes são mais exigentes, em função desse substrato ser um produto natural complexo, composto de açúcares, proteínas, lipídeos e minerais, que podem ser removidos juntos ou ligados à toxina, dificultando assim, a sua detecção (BOTURA, 2005).

Coluna de Imunoafinidade

Metodologia para determinação de aflatoxina M₁ em leite melhorou significativamente com a aplicação de tecnologia de coluna imunoafinidade para fornecer um conjunto extração e estágio de purificação para a análise.

A coluna de imunoafinidade contém anticorpos específicos ligado em um suporte sólido. Os anticorpos se ligam seletivamente com qualquer aflatoxina M₁ (antígeno) contidas no extrato, para dar um complexo antígeno-anticorpo. Outros componentes da matriz são removidos da coluna com a água (DRAGACCI *et al.*, 2001) e a especificidade do anticorpo para o analito faz diminuir os interferentes eluído, sendo o eluato, isolado praticamente puro (EIZENDEHER, 2005).

As colunas são bastante frágeis e possui o perigo de contaminação de uma extração/purificação para outra (no caso das colunas serem reutilizadas) e uma outra desvantagem é o custo elevado das colunas (EIZENDEHER, 2005).

Trabalho realizado por RAMOS *et al.*, (2008) comparou os dois métodos de extração, a purificação de aflatoxinas, para análise em cromatógrafo líquido de alta eficiência. Um dos métodos é físico-químico e baseia-se em reações químicas para todas as etapas. O outro utiliza coluna de imunoafinidade. Os métodos foram avaliados quanto à porcentagem de recuperação, custo do processo, tempo gasto para análise e número de amostras analisadas por dia. A recuperação obtida pelo método físico-químico foi mais baixa do que a do método de imunoafinidade. A análise comparativa de custos revelou que estes foram menores no método físico-químico. Porém, suas análises são demoradas, por envolverem várias etapas, e exigem maior cautela por parte do laboratorista. Apesar do custo mais elevado, aproximadamente seis vezes superior ao do método físico-químico, o método de imunoafinidade apresenta maior rapidez e facilidade de execução.

A utilização combinada de colunas de imunoafinidade para purificação das amostras e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência torna mais eficiente a determinação de baixas concentrações da micotoxina (DRAGASSI *et al.*, 2001).

Imunoenaios

No início da década de 80 surgiu uma nova perspectiva para a análise de aflatoxinas, com a introdução dos métodos imunológicos, ou imunoenaios, fundamentados nas reações específicas entre anticorpos e antígenos, com destaque para os de radioimunoensaio, cromatografia de imunoafinidade e de ensaio por enzimas imuno-adsorvidas (ELISA) (OLIVEIRA e GERMANO, 1996).

Radioimunoensaio (RIA)

É baseada na competição de ligação entre toxina não marcada proveniente da amostra e a toxina marcada sobre locais específicos do anticorpo (EIZENDEHER, 2005). O resultado é determinado comparando a proporção de ligação e a quantidade inicial total de aflatoxina multiplicada por 100%, com a concentração padrão de aflatoxina M₁ da curva padrão (WHO, 2001). A sensibilidade desta técnica permite dosar substâncias em concentrações da ordem de ng mL⁻¹, pg mL⁻¹ e até fg mL⁻¹. O radioimunoensaio tem uso limitado devido a complexidade do equipamento indispensável para sua aplicação além do in-

conveniente que envolve o trabalho com material radioativo (KAWASHIMA, 2004).

Ensaio Imunoenzimático em Suporte Sólido (ELISA)

EIZENDEHER (2005) descreve que o avanço mais importante nos imunoenaios foi o desenvolvimento dos imunoenaios enzimáticos (EIA). Os princípios e procedimentos da técnica EIA são basicamente semelhantes aos das técnicas radioimunoensaio, só que utilizam enzimas em vez de isótopos radioativos. Os imunoenaios apresentam várias vantagens em relação aos radioimunológicos, como: maior estabilidade dos reagentes; maior especificidade devido ao uso de antígenos marcados com enzima e ausência do perigo de radiações.

A técnica de ELISA foi aprovada como método oficial da AOAC (Association of Official Analytical Chemists) para a triagem. A *World Health Organization* (WHO) e a *Food and Agriculture Organization* (FAO) também recomendam o ELISA como método de rastreamento de Aflatoxina M₁ para leite e derivados.

O ELISA, do termo inglês (*Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay*), ou ensaio imunoenzimático em suporte sólido, é uma técnica baseada no princípio da interação específica entre anticorpo e antígeno (aflatoxina) (ZHENG *et al.*, 2006). Segundo AMARAL e MACHINSKI (2006), a metodologia apresenta dois passos, sendo o primeiro a reação entre o anticorpo e o antígeno e o segundo a revelação da reação pela hidrólise enzimática que ocorre entre o complexo antígeno-enzima e o seu substrato.

Sua utilização em análises de controle de qualidade de alimentos contribui para a otimização do processo de detecção de aflatoxinas graças a sua sensibilidade, especificidade, rapidez e facilidade de manuseio (AMARAL e MACHINSKI, 2006). ZHENG *et al.*, (2006) acrescenta que trata-se de um método eficiente, capaz de detectar concentrações de aflatoxina a partir de 2,5 ppb. Mas possui como desvantagem a alta incidência de resultados falso-positivos, variabilidade de resultados, de 30 a 300% e baixa reprodutibilidade (AMARAL e MACHINSKI, 2006).

AMARAL *et al.*, (2006) confirmam que o ELISA é adequado para testes rápidos de triagem, mas deve ter seus resultados confirmados por um método alternativo de detecção como precaução a resultados falso-positivos e falso-negativos.

Constitui-se numa técnica rápida, pouco onerosa e de fácil execução.

Cromatografia

A cromatografia é um método físico-químico de separação dos componentes de uma mistura, realizada através da distribuição destes componentes entre duas fases, que estão em contato íntimo. Uma das fases permanece estacionária enquanto a outra se move através dela (fase móvel) (TORRES, 2009).

A fase móvel pode ser constituída de um líquido (pentano, hexano, éter, misturas de álcoois e água, etc.) ou por um líquido gasoso (hidrogênio, nitrogênio, dióxido de carbono, hélio, etc.). A fase estacionária é geralmente suportada numa coluna de vidro ou metal, numa placa de vidro ou alumínio ou papel de filtro (EIZENDEHER, 2005).

Se a fase móvel for um líquido, denominar-se-á a técnica de cromatografia a líquido ou cromatografia em fase líquida e se a fase móvel for um gás ou um vapor, será cromatografia a gás ou cromatografia gasosa. A grande variedade de combinações entre fases móveis e estacionárias a torna uma técnica extremamente versátil e de grande aplicação (TORRES, 2009).

O termo cromatografia foi primeiramente empregado em 1906 e sua utilização é atribuída a um botânico russo ao descrever suas experiências na separação dos componentes de extratos de folhas. Nesse estudo, a passagem de éter de petróleo (fase móvel) através de uma coluna de vidro preenchida com carbonato de cálcio (fase estacionária), à qual se adicionou o extrato, levou à separação dos componentes em faixas coloridas. Este é provavelmente o motivo pelo qual a técnica é conhecida como cromatografia (chrom = cor e graphie = escrita), podendo levar à errônea ideia de que o processo seja dependente da cor (DEGANI *et al.*, 1998).

Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

Com base na fluorescência da AFM₁ foram desenvolvidos, em meados dos anos 60, os primeiros métodos para a determinação desta micotoxina em amostras de leite e derivados. A técnica de identificação e quantificação utilizada no início, a Cromatografia em Camada Delgada é ainda hoje largamente empregada (WEIGEL, 2007). É tradicional para determinação de micotoxinas por ser de fácil e rápida execução, não

requer o uso de equipamentos dispendiosos e é de baixo custo (AMARAL e MACHINSKI, 2006) também apresenta repetibilidade e reprodutividade adequadas ao nível de análise, geralmente em partes por bilhão (ppb) ou $\mu\text{g kg}^{-1}$ (TESSARI *et al.*, 2012).

Na CCD, as substâncias a serem identificadas são aplicadas com micros seringas em placas preparadas prontas para uso (cromatoplasmas de alumínio e de plástico recobertas com adsorventes) e depois da evaporação do solvente, as placas são colocadas em câmaras de separação previamente saturadas do solvente. O solvente, chamado também de eluente, migra num sentido monodimensional ascendente e ultrapassando os pontos onde foi aplicada a mistura, arrasta os seus componentes em velocidades diferentes, formando-se zonas ou manchas diferentes das substâncias, e depois que o eluente percorreu a distância suficiente, a placa é retirada da câmara separadora e é colocada para secar ao ar livre. As substâncias se comprovam, então, de forma apropriada: substâncias coloridas podem ser visualizadas imediatamente, outras apresentam fluorescência ou absorvem a luz ultravioleta, outras se tornam visíveis mediante reativos característicos (EIZENDEHER, 2005).

Há uma estimativa visual da comparação entre a intensidade de fluorescência da mancha de AFM₁, extraída da amostra e do padrão em uma mesma cromatoplasma, por ser um método semi-quantitativo possui um nível razoável de especificidade e sensibilidade (WEIGEL, 2007).

SHUNDO *et al.*, (2004) utilizaram um método com coluna de imunoafinidade (CI) para purificação e cromatografia em camada delgada (CCD), este trabalho mostrou que a CCD é uma importante ferramenta que pode ser utilizada pelos laboratórios em análises rotineiras e de ocorrência de AFM₁. Eles verificaram que o método CI/CCD mostrou-se específico, sensível e preciso, mesmo em baixas concentrações o método teve boas recuperações e fácil operacionalidade, não necessitando de equipamentos de alto custo e atendendo às legislações de diferentes países.

Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Dentre os vários métodos cromatográficos, a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é o mais novo e mais importante membro de uma família inteira de técnicas de separação e seu emprego em vários laboratórios é considerado atualmente indispensável (TORRES, 2009).

O método de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência é considerado o mais sensível e preciso na detecção e quantificação de concentrações em ppt (partes por trilhão) de micotoxinas (RAI e VARMA, 2010). Com essa técnica houve um incremento no grau de precisão das análises, porém também houve um aumento significativo nos custos (WEIGEL, 2007).

O grande avanço na cromatografia em coluna foi o desenvolvimento e a utilização de suportes com partículas diminutas responsáveis pela alta eficiência, as quais tornam necessário o uso de bombas de alta pressão para a eluição da fase móvel, devido a sua baixa permeabilidade. Esse método não necessita da volatilidade, mas sim da solubilidade das amostras na fase móvel e uma possível interação com a fase estacionária (DEGANI *et al.*, 1998).

As válvulas de injeção usadas possuem uma alça de amostragem para a introdução da amostra com uma seringa e duas posições, uma para o preenchimento da alça e outra para sua liberação para a coluna. (DEGANI *et al.*, 1998).

As colunas utilizadas em CLAE são geralmente de aço inoxidável, o comprimento é variável, essas colunas também são reaproveitáveis, sendo empacotadas com suportes de alta resolução, não sendo necessária sua regeneração após cada separação (DEGANI *et al.*, 1998).

O detector mais utilizado para separações por CLAE é o detector de ultravioleta, sendo também empregados detectores de fluorescência, de índice de refração, e eletroquímicos, entre outros (DEGANI *et al.*, 1998). O sistema de detecção por fluorescência é, cerca de 30-40 vezes mais sensível que o sistema de detecção por UV para aflatoxinas (AMARAL e MACHINSKI, 2006).

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) vem substituindo nos últimos anos todas as técnicas, em especial a CCD. A CLAE, apesar de ser mais sensível e rápida, tem um aspecto negativo que é o custo do equipamento (EIZENDEHER, 2005).

SHUNDO e SABINO, (2006) realizaram estudo utilizando a técnica de coluna de imunoafinidade com posterior detecção pela cromatografia líquida de alta eficiência e obtiveram excelentes resultados na recuperação e sensibilidade, sendo que esse método apresenta fácil operacionalidade. Segundo GILBERT (1993)

apud EIZENDEHER (2005), os resultados são claros e não há interferência de picos nos cromatogramas.

Espectrometria de massas (EM)

O acoplamento de um cromatógrafo com o espectrômetro de massas combina as vantagens da cromatografia (alta seletividade e eficiência de separação) com as vantagens da espectrometria de massas (obtenção de informação estrutural, massa molar e aumento adicional da seletividade) (CHIARADIA *et al.*, 2008).

A espectrometria de massas e cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas já foram estudadas e sugeridas, mas ainda não são muito empregadas nos países em desenvolvimento, provavelmente pelo alto custo dos equipamentos e a necessidade de pessoal altamente capacitado (WEIGEL, 2007).

MARQUES (2006) utilizaram técnicas avançadas de espectrometria de massas, (MALDI-TOF e ESI-MS) na análise de micotoxinas em alimentos. A técnica MALDI-TOF mostrou excelente desempenho nas análises de aflatoxinas e ocratoxina e vantagem sobre o método ELISA. Esta vantagem é representada principalmente pela maior especificidade com o uso de medidas de massas e, portanto, maior confiabilidade.

CONCLUSÃO

Dentre as técnicas utilizadas para a detecção da aflatoxina M₁ no leite o ELISA é um ótimo método qualitativo, que pode também ser utilizado para quantificar a aflatoxina. Contudo, pela possibilidade de resultados falso positivos, é necessário confirmação por técnicas cromatográficas. As colunas de imunoafinidade são altamente seletivas para as aflatoxinas e oferecem melhor purificação do eluato para posterior quantificação pelos métodos de cromatografia.

A Cromatografia Camada Delgada é a mais comum e popular, não exigindo grande experiência do analista, mas vem sendo substituída pela Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) que é mais recomendada por ser mais sensível e precisa na detecção e quantificação das aflatoxinas, principalmente quando utilizada a técnica de coluna de imunoafinidade antes da quantificação.

A técnica de espectrometria de massas atua como

uma forte ferramenta na área de ciências de alimentos, pois os resultados possuem alta precisão e confiabilidade, mas ainda não é muito empregada pelo altíssimo custo dos equipamentos e necessidade de pessoal altamente capacitado.

Independente do método empregado, a rastreabilidade do leite quanto à contaminação seja por aflatoxina M₁ ou por quaisquer outros contaminantes deve ser realizada de forma a garantir a inocuidade deste alimento, tanto para animais quanto para crianças e adultos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMARAL, K.A.S.; NASCIMENTO, G.B.; SEKIYAMA, B.L.; JANEIRO, V.; MACHINSKI, M. Aflatoxinas em produtos à base de milho comercializados no Brasil e riscos para a saúde humana. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.26, n.2, p. 336-342, 2006.

AMARAL, K.A.S.; MACHINSKI, M. J. Métodos analíticos para a determinação de aflatoxinas em milho e seus derivados: uma revisão. **Revista Analytica**, Maringá, n.24, p. 60-62, 2006.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. AGÊNCIA DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução RDC Nº 7, de 18 de fevereiro de 2011. Aprovar o regulamento técnico sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br>. Acesso em: 22 mar. 2012.

BOTURA, M.B. **Otimização de métodos analíticos para determinação de aflatoxinas em rações e leite de cabra, e sua ocorrência no estado da Bahia**. Dissertação (mestrado em medicina veterinária tropical) Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia, 2005.

CHIARADIA, M.C.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F. O estado da arte da cromatografia associada à espectrometria de massas acoplada à espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos em alimentos. **Química Nova**, v. 31, n. 3, p.623-636, 2008.

DEGANI, A.L.; CASS, Q.B.; VIEIRA, P.C. **Cromatografia**: um breve ensaio. *Química nova na escola*, n. 7, p. 21-25, maio, 1998.

DRAGACCI, S. et al. Immunoaffinity Column Cleanup with Liquid Chromatography for Determination of AflatoxinM1 in Liquid Milk: Collaborative Study. **Journal of AOAC International** v. 84, n. 2, p.437-443, 2001

- EIZENDEHER, L.B. **Comparação de métodos cromatográficos por camada delgada e líquida com kits imunológicos para detecção de aflatoxinas em amendoim in natura e doce de amendoim**. Dissertação (mestrado Tecnologia de Alimentos) Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.
- FREIRE, F.C.O.; GUEDES, M.I.F.; MENDES, F.N.P. **Micotoxinas: Importância na Alimentação e na Saúde Humana e Animal**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2007. 48 p. (Embrapa Agroindústria Tropical. Documentos, 110).
- FOOD INGREDIENTS BRASIL **As Micotoxinas**. Disponível em: www.revista-fi.com. Acesso em: (falta colocar a data do acesso) e, n.7, p. 32-40, 2009.
- GIMENO, A. Aflatoxina M₁ no Leite; **Riscos para a Saúde Pública, Prevenção e Controle**. Disponível em: <http://pt.engormix.com/MA-pecuaria-leite/saude/artigos/aflatoxina-leite-riscos-saude_3.htm>. Acesso em: 18 mar 12.
- GONÇALEZ, E. et al. Intoxicação de vacas leiteiras por farelo de algodão naturalmente contaminado com aflatoxinas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.34, n.1, p. 171-174, 2004.
- GONÇALEZ, E. et al. Ocorrência de aflatoxina M₁ em leite comercializado em alguns municípios do estado de São Paulo. **Arquivos do Instituto Biológico**. São Paulo, v.72, n.4, p.435-438, 2005.
- KAWASHIMA, L. M. **Micotoxinas em alimentos e bebidas nacionais produzidos e comercializados em diferentes regiões do Brasil**. Tese (doutorado Engenharia de Alimentos) Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.
- MARQUES, L. A. **Aplicação de Técnicas Avançadas de Espectrometria de Massas em Ciências de Alimentos e Perfumaria**. Dissertação (mestrado Química Analítica) Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.
- MASOERO, F. et al. Carryover of aflatoxins from feed to milk in dairy cows with low or high somatic cell counts. **Animal**, v.1, n.9, p. 1344-1350, 2007.
- OLIVEIRA, C.A.F. et al. Determinação de aflatoxina B1 em rações e aflatoxina M1 no leite de propriedades do Estado de São Paulo. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.30(Supl.1), p.221-225, 2010.
- OLIVEIRA, C. A. F. de; GERMANO, P. M. L. Avaliação do desempenho do método do ensaio por enzimas imuno-adsorvidas (ELISA) em leite em pó reconstituído contaminado experimentalmente com aflatoxina M1. **Revista de Saúde Pública**, v. 30, n. 6, 542-548, 1996.
- PEREIRA, M.M.G. et al. Aflatoxinas em alimentos destinados a bovinos e em amostras de leite da região de Lavras, Minas Gerais-Brazil. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.29, n.1, p. 106-112, 2005.
- PRADO, G.; OLIVEIRA, M.S.; LIMA, A.S.; MOREIRA, A.P.A. Occurrence of aflatoxin m1 in parmesan cheese consumed in minas gerais, Brazil. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 32, n. 6, p. 1906-1911, nov./dez., 2008.
- RAI, M.; VARMA, A. **Mycotoxins in food, feed and bioweapons**. Germany: Editora Springer, 2010.
- RAMOS, C.R.B.A.; BRASIL, E.M.; GERALDINE, R.M. Avaliação de métodos de extração, limpeza e purificação de aflatoxinas para análise em cromatografia líquida de alta eficiência. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 38, n. 2, p. 103-108, 2008.
- SANTILI, A.B.N. **Ocorrência de aflatoxina M1 em leite cru de três mesorregiões produtoras do estado de São Paulo e sua correlação com parâmetros de qualidade do leite**. 2010 p.111 Dissertação (mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.
- SCUSSEL, V.M. **Micotoxinas em alimentos**. 18 ed. Florianópolis: Editora Insular, 1998.
- SOUZA, S. V. C.; VARGAS E. A.; Roberto G. 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. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.19, n.3 p. 401- 405, 1999.
- SHUNDO, L. et al. Otimização da determinação da aflatoxina M₁ em leite, utilizando coluna de imunoafinidade e cromatografia em camada delgada. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 63 n.1 p.43-48, 2004.
- SHUNDO, L.; SABINO, M. Aflatoxin m1 in milk by immunoaffinity column cleanup with tlc/hplc determination. **Brazilian Journal of Microbiology**. v.37, n.2, p. 164-167, 2006.
- ROSMANINHO, J.F. et al. Aflatoxina M1 e Ácido Ciclopiazônico em Leites de Consumo Comercializados no Município de São Paulo, SP, Brasil. **Brazilian Journal of Food technology**, III JIPCA, janeiro, p.55-59, 2006.
- TEIXEIRA, A.S. **Adequação e apresentação de parâmetros**

de validação intralaboratorial de um ensaio para a quantificação de Aflatoxinas em Castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa* Bonpl.) através de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. 2008 p.57 Dissertação (mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica – RJ, 2008.

TESSARI, E.N.C.; CARDOSO, A.L.S.P. Efeitos da aflatoxina sobre as aves: revisão de literatura. **Revista científica eletrônica de medicina veterinária**, ano IX, n.18, 2012.

TORRES, A.C.B. Cromatografia líquida de alta eficiência: Revisão de literatura. 2009 p.31 Seminário (doutorado Ciência Animal) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia – 2009.

VOLKEL, I.; SCHROER-MERKER, E.; CZERNY, C. The Carry-Over of Mycotoxins in Products of Animal Origin with Special Regard to Its Implications for the European Food Safety Legislation. **Food and Nutrition Sciences**, v.2, p.852-867, 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, WHO FOOD ADDITIVES SERIES: 47. Safety evaluation of certain mycotoxins in food. FAO, Geneva. **Food and Nutrition paper**, 74, 2001. p. 700.

ZHENG, M. Z.; RICHARD, J. L.; BINDER, J.; A review of rapid methods for the analysis of mycotoxins. **Mycopathologia**, v.161, p.261–273, 2006.