



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos

**DETERMINAÇÃO DE AFLATOXINA M₁ EM LEITE BOVINO UHT POR
CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA**

MILENA VERONEZI SILVA

Maringá
2013

MILENA VERONEZI SILVA

**DETERMINAÇÃO DE AFLATOXINA M₁ EM LEITE BOVINO UHT POR
CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA**

Dissertação apresentada ao programa de Pós Graduação em Ciência de Alimentos da Universidade Estadual de Maringá, como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Ciência de alimentos.

Maringá

2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá, PR, Brasil)

S586d Silva, Milena Veronezi
Determinação de aflatoxina M₁ em leite bovino por cromatografia líquida de alta eficiência / Milena Veronezi Silva. -- Maringá, 2013.
33 f. : il. color., figs., tabs.

Orientador: Prof. Dr. Miguel Machinski Junior.
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, 2013.

1. Aflatoxina M₁. 2. Cromatografia líquida de alta eficiência. 3. Leite UHT - Micotoxinas. 4. Aflatoxina M₁ - Ingestão diária provável. I. Machinski Junior, Miguel, orient. II. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos. III. Título.

CDD 22.ed. 615.954

AMMA-00946

Orientador
Dr. Miguel Machinski Junior

BIOGRAFIA

Milena Veronezi Silva nasceu na cidade de Assis Chateaubriand-PR. Possui graduação em Tecnologia em Alimentos pela Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Tem experiência nas áreas de química, microbiologia e toxicologia de alimentos, atuando principalmente nos seguintes temas: desenvolvimento de indicador biológico de resposta rápida, aproveitamento de matérias-primas da agroindústria com hidrólise enzimática e fermentações para obtenção de ácido láctico à indústria alimentícia, validação de metodologia por cromatografia líquida de alta eficiência e aflatoxina M₁.

Dedico

Aos meus pais Adalberto e Maria de Lourdes, pelo apoio e por sempre acreditarem em mim. Ao meu namorado Rogério, pelo incentivo e encorajamento.

AGRADECIMENTOS

Quero agradecer a Deus pela vida e por mais uma vez ter me dado forças, fazendo-me chegar até aqui.

Aos meus pais Adalberto e Maria de Lourdes, pelo apoio em todos os momentos da minha vida, se hoje estou realizando mais este sonho devo isso a vocês.

Ao meu namorado Rogério, por sempre me encorajar, pelas noites de companhia no laboratório, pelos auxílios durante o mestrado, pela paciência e compreensão. Você sempre me fez acreditar que eu conseguiria mesmo quando todos disseram que não seria possível.

Ao Professor Dr. Miguel Machinski Junior, pela oportunidade, orientação e confiança.

À Érika Bando, pelos inúmeros esclarecimentos, disposição, auxílio e paciência.

Ao Professor Dr. Vanderly Janeiro pela atenção, colaboração no trabalho e pelos ensinamentos transmitidos.

Ao Professor Dr. Geraldo Tadeu dos Santos, pela disposição e boa vontade em me apresentar a Fazenda Experimental de Iguatemi – FEI da Uem. A todos também da FEI que me auxiliaram.

À amiga de mestrado Cássia pela pronta disponibilidade em ajudar, por dividir comigo esta expectativa, pelas horas e noites ao lado do HPLC e pelos momentos de descontração.

À amiga Natália, que mesmo conhecendo a menos tempo, estava sempre disposta a ajudar.

Às amigas de mestrado Márcia, Simone e Cassandra pelos momentos de descontração.

À todos os amigos e colegas que fiz durante o mestrado e que de alguma forma me auxiliaram: Francine, Samuel, Flávio, Lydiana, Paula, Evanilde, Carol, Fátima, Gessé, professora Simone e professora Paula.

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudo.

APRESENTAÇÃO

Esta dissertação de mestrado está apresentada na forma de dois artigos científicos.

1 – Milena Veronezi Silva. Érika Bando. Vanderly Janeiro. Miguel Machinski Junior. Validação intralaboratorial de um método por cromatografia líquida de alta eficiência para análise de aflatoxina M₁ em leite bovino. Journal of AOAC International.

2 - Milena Veronezi Silva. Vanderly Janeiro. Miguel Machinski Junior. Estimativa de ingestão e ocorrência de aflatoxina M₁ em leite bovino UHT. Food Chemistry.

GENERAL ABSTRACT

Mycotoxins are secondary metabolites produced by a variety of fungi, including aflatoxins produced of *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus* and *A. nomius* and are present in many important agricultural products, such as cereals. Aflatoxin B₁ is the most studied because it is the most frequent and is a potent hepatocarcinogenic.

In mammals, aflatoxin B₁ is biotransformed in aflatoxin M₁, hydroxylated product, eliminated in urine and secreted in milk. The introduction of aflatoxin M₁ in diet has occurred mainly by ingestion of bovine milk. Due to its effects, the International Agency for Research on Cancer - IARC in 2002 included aflatoxin M₁ in group 1, carcinogenic to humans.

Brazil produced 32.091 billion liters of milk in 2011, 67.9% of which were purchased by the dairy industry. The state of Paraná occupied the third place in the national production with 11.9%. According to the Brazilian Association of Long Life Milk, UHT milk consumption has increased in 2011 by 6.7% from 5.45 million liters to 5.81 million liters, exceeding the segment milk powder and pasteurized.

Exposure to mycotoxins occurs by ingestion of contaminated food, so there is a risk the health of human and animal population. The risk assessment is to analyze human exposure to toxicant quantified in food in one place. Therefore, there is need for reliable analytical methods for determining toxicantes in foods, ie for quantification of aflatoxin M₁ in milk requires the determination of trace levels of this toxin (ng or pg).

Given the importance of consumer and UHT bovine milk to feed the population, the objectives of this study were to optimize and validate an analytical method for the determination of aflatoxin M₁ in cow milk by high performance liquid chromatography with fluorescence detection system, estimate the population exposure to aflatoxin M₁ in milk marketed in Maringá, Paraná, Brazil and investigate the occurrence of toxin in different seasons.

The intralaboratory validation was performed according to Directive 2002/657/EC of 12 August 2002 of the European Community and the Manual of Analytical Quality Assurance of the Ministry of Agriculture, Livestock and Supply (MAPA) of Brazil. The method proved to be selective, showed an average recovery of 89.9% and a reproducibility of 5.6%, the values of detection and quantification limits were 0.0000156 µg/kg and 0.0000519 µg/kg and the values for the decision limit (CC α) and detection capability (CC β) were 0.56 µg/kg, 0.62 µg/kg, respectively. A validated analytical method is efficient for determination of aflatoxin M₁ in milk and bovine met the criteria established by the rules.

To evaluate the estimate population exposure to aflatoxin M₁, we collected 152 samples of bovine milk UHT of four brands in three different supermarkets from Maringá, Paraná, Brazil. Of the 152 samples, 133 (87.5%) was contaminated with an average value of aflatoxin M₁ 19.6 ng/L. The samples that showed higher levels of contamination belonged seasons winter and autumn showed a mean concentration of 121 and 72.8 ng / mL, respectively.

In our study, the autumn season, which was significantly higher than the averages of the other seasons (p <0.05) showed a mean contamination level of 30.4 ng/L, therefore had the highest level of probable daily intake (PDI), 0.07 ng/kg of body weight.

In this study, the PDI estimated for aflatoxin M₁ in the population were below the PDI proposed by Kuiper-Goodman (1991). However, the high occurrence of this mycotoxin in milk (87.5%) found in the samples demonstrates the necessity of

monitoring of food to reduce the risk of hepatocellular carcinoma in the Brazilian population.

Key words: Aflatoxin M₁, high performance liquid chromatography, UHT milk, mycotoxins.

RESUMO GERAL

As micotoxinas são metabólitos secundários produzidas por uma série de fungos, dentre elas as aflatoxinas são produzidas dos fungos *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus* e *A. nomius* e estão presentes em vários produtos agrícolas importantes, como os cereais. A aflatoxina B₁ é a mais estudada por ser a de maior ocorrência e ser um potente hepatocarcinógeno.

Em mamíferos, a aflatoxina B₁ é biotransformada em aflatoxina M₁, produto hidroxilado, eliminada pela urina e secretada no leite. A introdução da aflatoxina M₁ na dieta tem ocorrido principalmente pela ingestão de leite bovino. Devido aos seus efeitos, a Agência Internacional para Pesquisa sobre o Câncer – IARC incluiu em 2002 a aflatoxina M₁ no grupo 1, ou seja, carcinogênica para humanos.

O Brasil produziu 32,091 bilhões de litros de leite em 2011, dos quais 67,9% foram adquiridos pela indústria de laticínios. O estado do Paraná ocupou a terceira colocação na produção nacional com 11,9%. Segundo a Associação Brasileira da Indústria de Leite Longa Vida, o consumo de leite UHT teve um aumento em 2011 de 6,7%, passando de 5,45 milhões de litros para 5,81 milhões de litros, superando o segmento do leite em pó e pasteurizado.

A exposição às micotoxinas ocorre pela ingestão de alimentos contaminados, portanto há um risco a saúde da população humana e animal. A avaliação de risco consiste em analisar a exposição humana ao toxicante quantificado nos alimentos em um local. Portanto, há necessidade de métodos analíticos confiáveis para a determinação de toxicantes em alimentos, ou seja, para quantificação da aflatoxina M₁ em leite requer a determinação de níveis traços desta toxina (ng ou pg).

Tendo em vista o consumo e a importância do leite bovino UHT para a alimentação da população brasileira. Os objetivos deste estudo foram otimizar e validar um método de análise para a determinação de aflatoxina M₁ em leite bovino por cromatografia líquida de alta eficiência, estimar a exposição da população à aflatoxina M₁ em leite UHT comercializado em Maringá, Paraná, Brasil e investigar a ocorrência da toxina em diferentes estações do ano.

A validação intralaboratorial foi realizada conforme a Diretiva 2002/657/EC de 12 de agosto de 2002 da Comunidade Européia e o Manual de Garantia de Qualidade Analítica do Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento (MAPA) do Brasil. O método se mostrou seletivo, apresentou uma média de recuperação de 89,9% e uma reprodutibilidade de 5,6%, os valores de limite de detecção e de quantificação foram de 0,0000156 µg/kg e de 0,0000519 µg/kg e os valores para o limite de decisão (CC_α) e a capacidade de detecção (CC_β) foram de 0,56 µg/kg de 0,62 µg/kg, respectivamente. A metodologia analítica validada é eficiente para determinação de aflatoxina M₁ em leite bovino e cumpriu os critérios estabelecidos pelas normas.

Para estimar a exposição da população à aflatoxina M₁, foram coletadas 152 amostras de leite bovino integral UHT de quatro marcas diferentes em três supermercados do município de Maringá, Paraná, Brasil. Das 152 amostras analisadas, 133 (87,5%) estavam contaminadas, apresentando um valor médio de aflatoxina M₁ de 19,6 ng/L. As amostras que apresentaram maior nível de contaminação pertenciam as estações do outono e inverno que apresentaram uma concentração média de 121 e 72,8 ng/L, respectivamente.

Em nosso estudo, a estação do outono, que foi significativamente maior que as médias das demais estações (p<0,05) apresentou uma média de contaminação

de 30,4 ng/L, conseqüentemente apresentou o maior nível de ingestão diária provável (IDP), 0,07 ng/kg p.c..

Neste estudo, a IDP estimada para aflatoxina M₁ na população estava abaixo da IDT proposta por Kuiper-Goodman (1991). Entretanto, a alta ocorrência desta micotoxina em leite UHT (87,5%) encontrada nas amostras analisadas demonstra a necessidade do monitoramento deste alimento para diminuir o risco de carcinoma hepatocelular na população brasileira.

Palavras chave: Aflatoxina M₁, cromatografia líquida de alta eficiência, leite UHT, micotoxinas.

ARTIGO 1

Journal of AOAC International

**Validação intralaboratorial de um método por cromatografia líquida de alta
eficiência para análise de aflatoxina M₁ em leite bovino**

Abstract

The aflatoxin M₁ is a hepatocarcinogenic product, derived from the biotransformation of aflatoxin B₁ and eliminated in urine and milk secretion. Therefore, it is necessary to effective control of aflatoxin M₁ in milk, and this requires an analytical procedure that guarantees the results. The aim of this study was to optimize and validate a method for the determination of aflatoxin M₁ in cow milk according to Directive 2002/657/EC of 12 August 2002 of the European Community and the Manual of Analytical Quality Assurance of the Ministry of Agriculture, Livestock and Supply (MAPA) of Brazil. To evaluate the accuracy, samples were spiked at concentrations of 0.5, 1.0 and 1.5 times the limit permissible in Brazil, namely 0.25, 0.5 and 0.75 µg/kg. The method proved to be selective, showed an average recovery of 89.9% and a reproducibility of 5.6%, the threshold values of detection and quantification were 0.0000156 µg/kg and 0.0000519 µg/kg and the values for the decision limit (CC α) and detection capability (CC β) were 0.56 µg/kg and 0.62 µg/kg, respectively. The analytical methodology was efficient for determination of aflatoxin M₁ in cow milk.

Keywords: Aflatoxin M₁, high performance liquid chromatography, UHT milk, validation.

Introdução

As aflatoxinas fazem parte de um grupo de aproximadamente 20 metabólitos fúngicos, são produzidas principalmente pelos fungos *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus* e *A. nomius* e podem estar presentes em vários produtos agrícolas importantes (1 - 2). A aflatoxina B₁ é a mais estudada por ser a de maior ocorrência e ser um potente hepatocarcinógeno (3 - 4). Quando ingerida por vacas em lactação esta toxina é biotransformada em um metabólito hidroxilado, a aflatoxina M₁, sendo secretada e então encontrada no leite. A exposição humana à aflatoxina M₁ ocorre principalmente através do consumo deste alimento (3 – 5 – 2). Devido aos seus efeitos, a Agência Internacional para Pesquisa sobre o Câncer incluiu a Aflatoxina M₁ no grupo 1, ou seja, carcinogênica para humanos (5).

Em geral, um método para determinação de micotoxinas deve ser seletivo, preciso, rápido e simples. Mas acima de tudo, deve ser sensível, devido aos baixos níveis de tolerância na alimentação animal e humana (6). O controle de aflatoxina M₁ em leite requer um procedimento analítico eficiente e que quantifique em níveis traços (7). Segundo Manetta et al. (2005), dentre as técnicas mais utilizadas para a determinação de aflatoxina M₁ em leite bovino está a extração em fase sólida ou cromatografia de imunoafinidade e a quantificação por cromatográfica líquida de alta eficiência em fase reversa com detecção por fluorescência. Este artigo teve como

objetivo, otimizar e validar intralaboratorialmente um método para a determinação de aflatoxina M₁ em leite bovino por cromatografia líquida de alta eficiência.

Método

A. Princípio – Colunas de imunoafinidade foram utilizadas para extrair a aflatoxina M₁ das amostras de leite bovino. Após a amostra ser centrifugada e desengordurada, o leite foi eluído pela coluna. A aflatoxina M₁ se liga a anticorpos específicos que estão imobilizados na coluna formando um complexo antígeno-anticorpo. Em seguida, a coluna foi lavada com água para retirada de interferentes. Por fim, a toxina foi eluída da coluna com acetonitrila e coletada para posterior análise por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por fluorescência.

B. Equipamentos

- a. Sistema cromatográfico – Cromatógrafo líquido Finnigan Surveyor Plus (Thermo Scientific®, San Jose, USA), com uma bomba quaternária e um injetor automático, acoplado a um detector por fluorescência Finnigan Surveyor Plus (Thermo Scientific®, San Jose, USA). O sistema operou sob as seguintes condições: fluxo de 1 mL/min de uma fase móvel isocrática, volume de injeção de 100 µL, e comprimentos de onda de excitação e emissão de 365 nm e 435 nm, respectivamente.
- b. Coluna cromatográfica – Pickering Laboratories, (Mountain View, USA), fase reversa, Micotox® C₁₈, 250x4,6mm, 5 µm.
- c. Sonicador – Unique (São Paulo, Brasil) USC 700.
- d. Sistema de preparação de amostras – Vac Elut (Kirkland, Canadá) Varian 20.
- e. Agitador de tubos – Vision Scientific (Samjeong Dong, Coréia) KMC 1300 V.
- f. Centrífuga - Hettich (Tuttlingen, Alemanha) Universal 320R.
- g. Espectrofotômetro – Shimadzu (Columbia, USA) UV160 1PC.
- h. Bomba à vácuo – Fanem (São Paulo, Brasil) Modelo 089.
- i. Filtros para seringa (Millex-LCR) – Millipore (Billerica, USA) PTFE modificado, 0,45 µm×13 mm.
- j. Membranas para filtração de solventes – Millipore (Billerica, USA) PTFE modificado.
- k. Micropipetas – Gilson (Middleton, USA) – Capacidades: 25, 50, 100, 250 e 1000 µL.

- I. Seringas – 5 mL, plástico, descartável, com ponta Luer-Slip.

C. Reagentes

- a. Coluna de imunoafinidade – Afla Test-M₁, VICAM (Watertown, MA, USA).
- b. Acetonitrila – grau cromatográfico, Mallinckrodt Backer (Xalostoc, Mexico).
- c. Água – ultra-pura purificada em um sistema Milli-Q em 18,2 MΩ/cm, Millipore (Billerica, USA).
- d. Fase móvel – água/acetronitrila (25:75, v/v).
- e. Cuidados com vidraria – Foram utilizados frascos âmbar para proteger as soluções da luz, e todos foram tratados com ácido sulfúrico segundo o método oficial da AOAC 2000.08 (2005), evitando assim perda da toxina.
- f. Padrão de aflatoxina M₁ – Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA.

(1) Solução estoque de aflatoxina M₁: O padrão de aflatoxina M₁ foi preparado segundo o método oficial da AOAC 2000.08 (2005). O padrão estoque liofilizado de 1 µg/mL foi ressuscendido em acetonitrila. A concentração de aflatoxina M₁ foi determinada medindo sua absorbância em um comprimento de onda máximo de 365nm, em um espectrofotômetro calibrado contra um branco de acetonitrila. A concentração (C, µg/mL) foi calculada segundo a equação 1:

$$C = \frac{100 \times A \times M}{\epsilon} \quad (1)$$

Onde: A é a absorbância medida no comprimento de onda máximo, que foi de 0.059, M é a massa molecular da aflatoxina M₁ (328 g/mol), e ε é o coeficiente de absorvidade da aflatoxina M₁ em acetonitrila (1985 m²/mol).

(2) Solução de trabalho: A partir da solução estoque, foi preparada em balão volumétrico uma solução de trabalho de 100 µg/kg.

(3) Solução para curva analítica: A partir da solução de trabalho da toxina a 100 µg/Kg, foram feitas diluições em acetonitrila obtendo soluções nas concentrações de 2,0, 1,0, 0,5, 0,25, 0,1, 0,05 e 0,025 µg/kg. Todas as soluções foram armazenadas à -20°C.

D- Extração

A extração foi realizada segundo o método de Tuinstra et al. (1993). A amostra de leite foi centrifugada a 1000 g durante 15 minutos para remoção da gordura, uma

alíquota de 50 mL de leite desengordurado foi eluída pela coluna a um fluxo de 2 a 3 mL por minuto seguindo-se uma lavagem com 10 mL de água ultra-pura. A toxina foi eluída com 4 mL de acetronitrila, esta permanecendo por pelo menos 60 segundos na coluna. Após homogeneização, o extrato foi filtrado e colocado em vial e conduzido para análise.

E-Procedimento de validação

Para determinação e quantificação da aflatoxina M₁, um método segundo Dragacci et al. (2001) foi otimizado e posteriormente validado seguindo a Diretiva 2002/657/EC de 12 de agosto de 2002 da Comunidade Europeia (EC, 2002) e o manual de garantia de qualidade analítica do BRASIL - MAPA (2011a).

(a) Amostra branco: para os experimentos de validação foi utilizada uma matriz branca (leite sem a presença da toxina). Para isto, as amostras foram obtidas da Fazenda Experimental de Iguatemi – FEI da Uem, foi necessário que isolassem vacas em fase de lactação, para que se alimentassem somente de gramíneas, isentando-se totalmente da ração e da silagem, para evitar a ingestão de aflatoxina B₁. No 9º dia as vacas foram ordenhadas e o leite foi alíquotado e armazenado a -20°C. Também foram realizadas análises para comprovar a não existência da toxina antes do início dos experimentos.

(b) Seletividade: foram analisadas 21 amostras em branco. Foi verificado no tempo de retenção esperado, se há a presença de algum interferente que possa conduzir a uma falsa identificação do analito ou a presença da toxina.

(c) Efeito matriz: foram analisadas seis réplicas de cada concentração, 0,5, 1,0 e 1,5 vezes o limite permitido (0,5 µg/kg), em solvente puro e no extrato da matriz branca. Para cada nível de fortificação foram comparadas as amostras matrizadas com aquelas não matrizadas.

(d) Recuperação: foram fortificadas seis réplicas nas seguintes concentrações, 0,5, 1,0 e 1,5 vezes o limite permitido. Após a análise das amostras pelo procedimento a validar, foi calculado o fator de recuperação (equação 2):

$$F_{rec} = \frac{C_f}{C_{ad}} \times 100 \quad (2)$$

Onde: C_f é o teor medido após fortificação da matriz branca e C_{ad} o teor do analito puro adicionado à matriz branca.

(e) Precisão: foram analisadas seis réplicas das amostras brancas fortificadas a 0,5, 1,0 e 1,5 vezes o limite permitido, segundo o procedimento a validar. Para determinação da repetibilidade, foi calculado para cada dia e cada nível de fortificação, a concentração média, o desvio-padrão e o coeficiente de variação (equação 2); para a reprodutibilidade intralaboratorial, estes cálculos foram feitos para cada nível de fortificação dos 3 dias de análise. Os valores foram confrontados com a equação de Horwitz (equação 3) e com os valores de HORRAT (equação 4).

$$CV = \frac{\sigma}{\mu} \times 100 \quad (2)$$

Onde: σ é o desvio padrão e μ é a concentração média determinada.

$$CV_{eqH} = 2^{(1-0,5\log C)} \quad (3)$$

Onde: C é a fração mássica expressa sob a forma de uma potência de 10 (por exemplo, $\mu\text{g}/\text{Kg}=10^{-6}$).

$$\text{HORRAT} = \frac{CV}{\text{DPRP}} \quad (4)$$

Onde: DPRP é o desvio padrão relativo predito ($2C^{-0,15}$) e C é a fração mássica expressa sob a forma de uma potência de 10 (por exemplo, $\mu\text{g}/\text{kg}=10^{-6}$).

(f) Limite de detecção e limite de quantificação: foram analisadas 21 amostras em branco. Foi determinado o ruído no tempo de retenção da aflatoxina M₁, que foi multiplicado por 10 para o limite de quantificação e por 3 para o limite de detecção.

(g) Limite de decisão (CC α) e capacidade de detecção (CC β): foram analisadas 21 amostras brancas fortificadas ao nível do limite máximo de resíduo. Após análise, foram utilizadas as equações 5 e 6 para o cálculo de cada parâmetro. Foi utilizada a equação 7 para analisar a conformidade da capacidade de detecção (CC β).

$$CC\alpha = \text{LMR} + 1,64 \times S_{\text{reproLMR}} \quad (5)$$

e

$$CC\beta = CC\alpha + 1,64 \times S_{\text{reproLMR}} \quad (6)$$

Onde: S_{reproLMR} é o desvio-padrão amostral das concentrações determinadas dessa série de 21 análises no nível de concentração do LMR, em condições de reprodutibilidade intralaboratorial.

$$CC\beta \leq (1 + 2 \times \frac{CV_{\text{Tab}}}{100}) \quad (7)$$

Onde: CV_{Tab} é o valor de coeficiente de variação tabelado para concentrações menores que 1 $\mu\text{g}/\text{Kg}$, ($CV_{\text{Tab}}=35\%$).

(h) Estabilidade: amostras em branco foram fortificadas ao nível do limite máximo de resíduo (0,5 µg/kg), armazenadas a -20°C durante seis meses. Seis réplicas foram analisadas com os tempos 1, 4 e 6 meses.

(i) Identificação do analito: a identificação foi realizada com base no tempo de retenção do soluto comparado com o padrão e por co-cromatografia. A quantificação foi feita por padronização externa, a partir das curvas analíticas, onde a área do pico cromatográfico foi proporcional a quantidade de padrão injetado.

Análise estatística

Para análise do efeito matriz foram realizados, uma análise de homogeneidade de variâncias e um Teste t para comparação de médias e para a análise da estabilidade, uma análise de variância para comparação das concentrações médias em relação aos tempos e um Teste de Tukey para comparação dos pares de médias, com um nível de significância de 0,05.

Os resultados foram analisados utilizando-se do programa R versão 2.15.1 (15).

Resultados e discussão

Inicialmente um método para identificação e quantificação foi otimizado a partir do descrito por Dragacci et al. (2001), com a finalidade de obter picos bem definidos e com boa separação, uma maior sensibilidade e seletividade. Na figura 1 é representado o cromatograma de um padrão de aflatoxina M₁ de concentração de 0,5 µg/Kg. O tempo de corrida foi de 6 minutos e o tempo de retenção da toxina foi de 2,7 minutos. As curvas analíticas utilizadas para quantificação foram tratadas pelo método de mínimos quadrados e os valores obtidos para os coeficientes de determinação (r^2) nos diferentes dias de validação foram: 0,9998, 0,9998 e 0,9999; todas as curvas se mostraram lineares.

Para avaliar a seletividade do método, foram analisados cromatogramas das 21 amostras brancas e pode-se observar que o método foi seletivo, pois, não houve nenhum interferente eluindo no mesmo tempo de retenção da aflatoxina M₁ que pudesse comprometer a identificação do analito. Nesta análise, introduziu-se uma variação entre as 21 amostras, utilizou-se o leite de 4 vacas, ordenhadas por pares em datas diferentes. Foi evidente a inexistência de interferentes em todas as

amostras, a figura 2 mostra isso através da comparação entre um cromatograma de uma amostra em branco e uma amostra fortificada com o analito.

O uso de colunas de imunoafinidade além de proporcionar uma eficiente limpeza em matrizes mais complexas, como o leite, e ser seletiva, reduz o número de etapas no preparo de amostras, o tempo de análise e o gasto com solventes.

Segundo o MAPA (2011a), quando se utilizam curvas analíticas preparadas em solução e não no extrato da matriz ou na matriz branca é necessário que se faça um teste de efeito matriz; este efeito pode gerar diminuição ou ampliação do sinal instrumental, e é causado por interferência das substâncias presentes na matriz. A princípio, quando há o uso de colunas de imunoafinidade o procedimento analítico é considerado sem efeito matriz, mas, é necessário avaliar as condições do método e a capacidade de ligação da coluna. Na tabela 1 estão apresentados os dados referentes ao teste de efeito matriz. De acordo com os valores de (p) do teste de homogeneidade de variâncias e Teste t da tabela 1, pode-se concluir que não houve o efeito matriz.

A Comunidade Européia (EC, 2002) e o MAPA (2011a) preconizam que as amostras sejam fortificadas nos níveis 0,5, 1,0 e 1,5 vezes o limite permitido. Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, BRASIL (2011b), o limite permitido de aflatoxina M₁ em leite fluido é de 0,5 µg/kg, portanto, as amostras foram fortificadas nas concentrações de 0,25, 0,5 e 0,75 µg/kg.

A exatidão foi verificada através de ensaios de recuperação. Segundo a Comunidade Europeia (EC, 2002), os valores para recuperação devem estar entre 50% e 120% e de acordo com o MAPA (2011a), entre 70% e 110%. O regulamento de 2006/401/EC de 23 de fevereiro de 2006 da Comunidade Europeia (European Commission, 2006), específico para toxinas, demonstra que a recuperação para aflatoxina M₁ deve se manter entre 70% e 110%. Os valores médios de recuperação que o método apresentou foram de 93,6%, 87,8% e 88,2% para o primeiro, segundo e terceiro dia, respectivamente. Pode-se observar que os valores se encontraram dentro da faixa esperada, podendo afirmar que este foi um método exato. Muscarella et al. (2007), em seu estudo de validação para aflatoxina M₁ em leite, também utilizou colunas de imunoafinidade e um cromatógrafo líquido acoplado a um detector por fluorescência e obteve valores entre 83,5 e 97,2%, com um valor de recuperação de 91%, muito próximo da média de recuperação obtida neste trabalho que foi de 89,9%.

A precisão do método encontra-se nas tabelas 2 e 3. A tabela 2, apresenta os valores de média, desvio padrão e coeficientes de variação das seis réplicas do mesmo dia para cada nível de fortificação referente a repetibilidade do método que foi determinada em termos de coeficientes de variação. A tabela 3, apresenta estes valores referentes aos 18 resultados obtidos para cada nível de fortificação que refere-se a reprodutibilidade do método e que também foi determinada em termos de coeficientes de variação.

De acordo com o manual do MAPA (2011a) e com a Comunidade Européia (2002), em condições de repetibilidade os valores de coeficientes de variação obtidos não devem ultrapassar 2/3 dos valores encontrados na equação de Horwitz e em condições de reprodutibilidade os coeficientes de variação obtidos não devem ultrapassar o valor encontrado na equação de Horwitz. Analisando a tabela 2 e 3 foi evidente que todos os valores se encontraram dentro dos critérios estabelecidos. O valor de HORRAT é um critério de aceitação para precisão apresentado pelo manual do MAPA, nas tabelas 2 e 3 esses valores foram exibidos e todos se mostraram satisfatórios, pois apresentaram valores inferiores a 1.

Segundo o MAPA (2011a) para determinar os limite de detecção e de quantificação deve-se utilizar o valor de desvio-padrão de ensaios com uma matriz branca, mas estes geraram valores muito baixos. Devido a este motivo, foi utilizado o método da relação sinal-ruído, como descrito no item “f” do procedimento de validação. Os valores encontrados foram de 0,0000156 µg/Kg para o limite de detecção e de 0,0000519 µg/kg e para o limite de quantificação.

O limite de decisão ($CC\alpha$) e a capacidade de detecção ($CC\beta$) são termos utilizados pela Comunidade Européia e são importantes para inspeção dos produtos. De acordo com o MAPA (2011a) esses valores são sempre maiores que o limite máximo de resíduo, mas devem estar o mais próximo possível dele. Para este método o valor de $CC\alpha$ encontrado foi de 0,56 µg/kg e de $CC\beta$ foi de 0,62 µg/kg. O manual do MAPA diz que o valor de $CC\beta$ não deve ultrapassar o valor encontrado na equação 7 que foi de 1,35, o valor encontrado se mostrou adequado.

O procedimento de estabilidade teve como objetivo, analisar a estabilidade das soluções padrão do analito na matriz leite e reproduzir as condições de armazenamento, manuseio e análise. A tabela 4 apresenta o resultado das médias das concentrações para cada mês analisado. Entre o primeiro e quarto mês não houve diferença significativa ($p < 0,05$), ocorrendo diferença apenas entre o sexto

mês, podendo afirmar desta forma que a toxina foi estável na matriz durante 4 meses. Uma vez que a validade de um leite UHT é de 4 meses, a toxina pode ficar estável durante toda vida de prateleira do produto.

Conclusões

Diante dos resultados obtidos neste trabalho, pode-se concluir que a metodologia analítica avaliada foi eficiente para determinação de aflatoxina M₁ em leite bovino, cumprindo os critérios estabelecidos pelas normas seguidas. O método apresentou precisão, pois os resultados foram repetíveis e reprodutíveis. Também foi verificado que a metodologia foi seletiva e exata (89,9%).

Referências

- (1) Caloni, F. (2006) *Toxicon*. **47**, 409 – 415.
- (2) Prandini, A. et al. (2009) *Food and Chemical Toxicology*. **47**, 984-991.
- (3) Creppy, E. E. (2002) *Toxicology Letters*. **127**, 19 – 28.
- (4) Bennett, J. W. Klich, M. (2003) *Clinical Microbiology Reviews*. **16**, 497 – 516.
- (5) IARC. International Agency For Research on Cancer (2002) Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene, 82, 171-175.
- (6) Rahmani, A. Jinap, S. Soleimany, F. (2009). *Comprehensive reviews in food science and food safety*. **8**, 202-251.
- (7) Shundo, L. Sabino, M. (2006) *Journal of Microbiology*. **37**, 164-167.
- (8) Manetta, A. C. et al. (2005) *Journal of Chromatography A*. **1083**, 219-222.
- (9) *Official Methods of Analysis* (2005). AOAC INTERNATIONAL, Gaithersburg, MD, Method **2000.08**.
- (10) Tuinstra, L. G. M. T. et al. (1993) *Journal of AOAC International*. **76**, 1248-1254.
- (11) Dragacci, Sylviane. et al. (2001) *Journal of AOAC International*, **84**, 437-443.
- (12) EUROPEAN COMMISSION. Official Journal of the European Communities (2002). Decision 2002/657/EC of 12 August 2002, L221, 8-39
- (13) BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. (2011) Manual de garantia da qualidade analítica: resíduos e contaminantes em alimentos, www.agricultura.gov.br/animal/laboratorios/publicacoes. (a)
- (14) EUROPEAN COMMISSION. Official Journal of the European Communities (2006). Regulation 2006/401/EC of 23 February 2006, L70, 12-34.
- (15) R Core Team (2012). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0. www.R-project.org/.
- (16) BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. (2011) Resolução RDC nº 7, de 18 de fevereiro de 2011, bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2011/res0007_18_02_2011_rep.html. (b)
- (17) Muscarella, M. et al. (2007) *Analytica Chimica Acta*. **594**, 257-264.

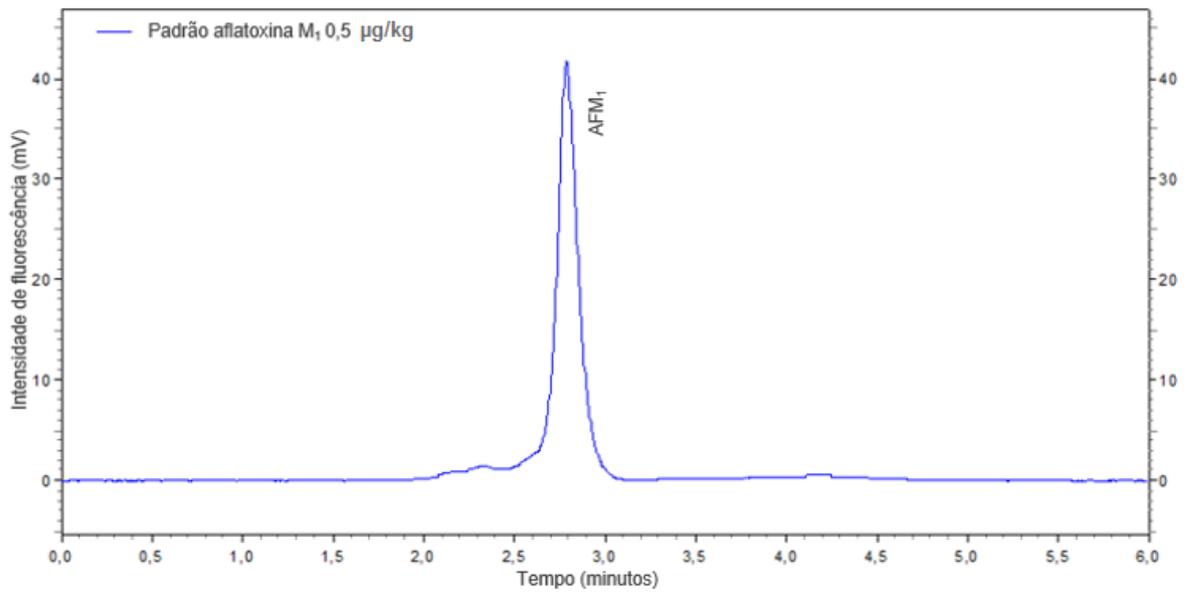


Figura 1.
Cromatograma do padrão de aflatoxina M₁ de concentração 0,5 µg/kg.

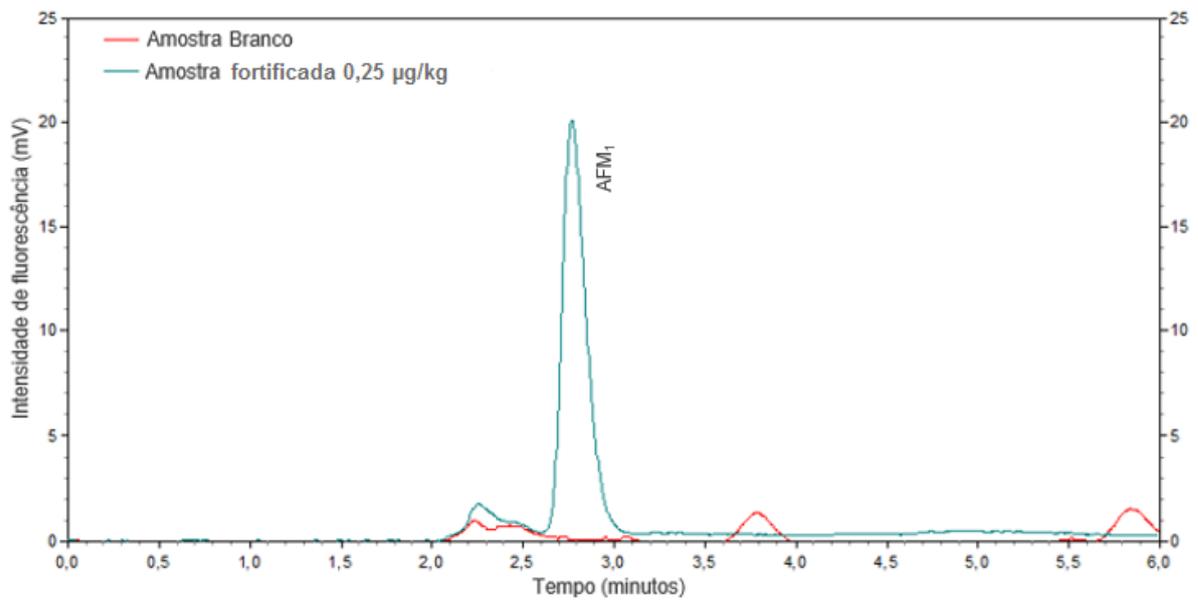


Figura 2.
Cromatograma de uma amostra em branco e de uma amostra fortificada na concentração de 0,25 µg/kg.

Tabela 1

Resultados obtidos para as réplicas do teste de efeito matriz.

Amostras	Média	Teste de homogeneidade de variâncias		Intervalo de confiança (95%) para diferença	Teste t (comparação de médias)	
		Fcal	Valor (p)		tcal	Valor (p)
Solvente 0,25	0,2618	0,8035	0,816	-0,0097; 0,0044	-0,8288	0,427
Extrato 0,25	0,2644					
Solvente 0,5	0,5196	0,8498	0,862	-0,0184; 0,0072	-0,97	0,355
Extrato 0,5	0,5252					
Solvente 0,75	0,8606	0,7017	0,707	-0,0006; 0,0125	2,022	0,071
Extrato 0,75	0,8547					

Fcal=valor de F calculado para o teste de homogeneidade de variâncias.

Tcal=valor de t calculado para o teste t.

Valor (p)= valor de significância para testar as hipóteses.

Tabela 2

Resultados obtidos para análise da repetibilidade do método.

	Nível de fortificação (µg/kg)	Média* (µg/kg)	Desvio Padrão	CV		2/3 de CV _{eqH} (%)	Valores de HORRAT _r
				Obtido (%)	CV _{eqH} (%)		
Dia 1	0,25	0,25	0,004	1,44	19,84	13,23	0,07
	0,5	0,45	0,004	0,80	18,13	12,09	0,04
	0,75	0,69	0,017	2,44	17,03	11,35	0,15
Dia 2	0,25	0,24	0,005	2,24	20,39	13,59	0,11
	0,5	0,43	0,023	5,38	18,38	12,25	0,30
	0,75	0,61	0,022	3,63	17,27	11,51	0,21
Dia 3	0,25	0,23	0,024	10,21	20,25	13,50	0,52
	0,5	0,42	0,020	4,80	18,38	12,25	0,27
	0,75	0,65	0,015	2,38	17,15	11,43	0,14

CV=Coefficiente de variação

CV_{eqH}= Coeficiente de variação obtida a partir da equação de Horwitz.

*Média de seis repetições.

Tabela 3

Resultados obtidos para análise da reprodutibilidade intralaboratorial do método.

Nível de fortificação (µg/kg)	Média (µg/kg)	Desvio Padrão	CV obtido (%)	CV _{eqH} (%)	Valores de HORRAT _R	Reprod. do método (%)
0,25	0,24	0,02	6,60	20,25	0,34	5,6
0,5	0,43	0,02	4,70	18,26	0,26	
0,75	0,65	0,04	5,59	17,15	0,33	

CV=Coefficiente de variação

CV_{eqH}= Coeficiente de variação obtida a partir da equação de Horwitz.

Tabela 4

Resultados referentes a estabilidade das soluções padrão do analito na matriz leite.

Mês	Média (µg/kg)
1	0,4694 ^b
4	0,4538 ^b
6	0,5008 ^a

^{a,b}Valores seguidos por letras diferentes são significativamente diferentes ($p < 0,05$).

ARTIGO 2

Food Chemistry

**Estimativa de ingestão e ocorrência de aflatoxina M₁ em leite bovino UHT no
Estado do Paraná, Brasil**

ABSTRACT

Aflatoxin M₁ is a product of the hydroxylated metabolite of aflatoxin B₁ biotransformation when ingested by lactating animals, and its introduction in the diet has been primarily by ingesting milk. Due to its effects, the International Agency for Cancer Research in 2002 included the Aflatoxin M₁ in Group 1, carcinogenic to humans. This study aimed to estimate population exposure to aflatoxin M₁ and to investigate the occurrence of toxin in different seasons in UHT milk marketed in Maringá, Paraná, Brazil. We collected 152 samples of bovine milk UHT of four brands in three different supermarkets of Maringá, Paraná, Brazil. Of the samples collected and analyzed 133 (87.5%) were contaminated. The autumn season, which was significantly higher than the averages of the other seasons ($p < 0.05$) showed a mean contamination level of 30.4 ng/L, therefore had the highest level of probable daily intake (PDI), 0.07 ng/kg of body weight. There were differences between the concentrations of toxin samples collected in different seasons occurring a climatic influence.

Keywords: Aflatoxin M₁, intake, high performance liquid chromatography, occurrence, UHT milk.

1. Introdução

As micotoxinas são toxinas fúngicas produzidas por uma série de fungos, dentre elas as aflatoxinas representam a maior classe com aproximadamente 20 metabólitos (CAST, 2003). A aflatoxina B₁ é a mais estudada por ser a de maior ocorrência e ser um potente hepatocarcinógeno (Creppy, 2002; Bennett, Klich, 2003). Em mamíferos, a aflatoxina B₁ é biotransformada em aflatoxina M₁, produto hidroxilado, eliminada pela urina e secretada no leite. A introdução da aflatoxina M₁ na dieta humana tem ocorrido principalmente pela ingestão de leite bovino. Esta é uma preocupação mundial, pois, este é um importante alimento para adultos e especialmente crianças, que são os grandes consumidores e estão mais susceptíveis aos efeitos adversos das micotoxinas. Devido aos seus efeitos, a Agência Internacional para Pesquisa sobre o Câncer – IARC a aflatoxina M₁ no grupo 1, ou seja, carcinogênica para humanos (IARC, 2002).

O Brasil produziu 32,09 bilhões de litros de leite em 2011, dos quais 67,9% foram adquiridos pela indústria de laticínios. O estado do Paraná ocupou a terceira colocação na produção nacional com 11,9% (IBGE, 2011). Segundo a Associação Brasileira da Indústria de Leite Longa Vida, o consumo de leite UHT teve um aumento de 6,7% em 2011, passando de 5,45 milhões de litros para 5,81 milhões de litros, superando o segmento do leite em pó e pasteurizado (ABLV, 2011).

A forma usual de exposição às micotoxinas é a ingestão de alimentos contaminados e estas têm sido associadas com patologias, denominadas de

micotoxicoses em animais e humanos. Assim, para conhecer o risco a saúde dos seres humanos pela exposição as micotoxinas, tem-se realizado avaliações de risco (Kuiper-Goodman, 1995; CAST, 2003). Tendo em vista o consumo e a importância do leite UHT para a alimentação da população brasileira, os objetivos deste estudo foram estimar a exposição da população à aflatoxina M₁ e investigar a ocorrência desta micotoxina em diferentes estações do ano em leite UHT comercializado em Maringá, Brasil.

2. Material e métodos

2.1. Padrão de aflatoxina M₁

A solução estoque de aflatoxina M₁ foi preparada segundo o método oficial da AOAC 2000.08 (AOAC, 2005). O padrão estoque da Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA) liofilizado de 1 mg foi ressuspendido em acetonitrila grau cromatográfico (Mallinckrodt Backer, Xalostoc, Mexico). A concentração de aflatoxina M₁ foi determinada medindo sua absorvância em 365 nm no espectrofotômetro Shimadzu UV160 1PC (Columbia, USA). A partir da solução estoque foi preparada a solução de trabalho de 100 µg/L e desta construída a curva de calibração nas seguintes concentrações: 0,025, 0,05, 0,1, 0,25, 0,5, 1 e 2 µg/L. Todas as soluções foram armazenadas à -20°C.

2.2. Amostragem

Foram coletadas 152 amostras de leite bovino integral UHT de quatro marcas diferentes, de lotes distintos, em três supermercados do município de Maringá, Paraná, Brasil, durante o período de julho de 2011 a maio de 2012. As amostras foram homogeneizadas, e uma alíquota de 200 mL foi armazenada em tubos tipo falcon a -20°C até o momento da análise.

2.3. Extração

A extração foi realizada segundo o método de Tuinstra et al. (1993). A amostra de leite foi processada na centrífuga Universal 320R (Beverly, USA) a 1000 g por 15 minutos para separação da gordura. Cinquenta mL de leite desengordurado foi eluído pela coluna Aflatest-M₁ (VICAM®, Watertown, MA, USA) sob fluxo de 2 a 3 mL/min seguindo a lavagem com 10 mL de água ultra-pura Milli-Q (Millipore,

Billerica, USA). A toxina foi eluída com 4 mL de acetronitrila e o extrato filtrado em Millex-LCR 0.45 μm ×13 mm PTFE modificado (Millipore, Billerica, USA) e conduzido para análise.

2.4. Determinação cromatográfica da aflatoxina M₁

A determinação e quantificação da aflatoxina M₁ foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência com sistema de detecção de fluorescência. Para isso um método foi otimizado segundo Dragacci et al. (2001) e em seguida validado segundo a Diretiva 2002/657/EC de 12 de agosto de 2002 da Comunidade Européia (EC, 2002) e o manual de garantia de qualidade analítica do Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento (Brasil, 2011b).

O sistema cromatográfico utilizado foi o Finnigan Surveyor Plus (Thermo Scientific®, San Jose, USA), contendo bomba quaternária, injetor automático e detector por fluorescência sob fluxo de 1,0 mL/min de água-acetronitrila (25:75, v/v). Foi utilizada a coluna de fase reversa Micotox® C₁₈ (250×4,6mm, 5 μm , Pickering Laboratories, Mountain View, USA). O volume de injeção foi de 100 μL e os comprimentos de onda de excitação e emissão foram de 365 nm e 435 nm, respectivamente.

O tempo de retenção da aflatoxina M₁ foi de 2,7 minutos. A identificação do composto foi feita com base no tempo de retenção do soluto comparado com o padrão e co-cromatografia. A quantificação foi realizada por padronização externa, a partir das curvas analíticas, onde a área do pico cromatográfico foi proporcional a quantidade de padrão injetado.

2.5. Determinação da ingestão diária provável de aflatoxina M₁

A ingestão diária provável (IDP) foi calculada para cada estação do ano e considerando um adulto de 60 Kg. Multiplicou-se a concentração média de aflatoxina M₁ (ng/L) pelo consumo de leite no estado do Paraná (0,132 L/pessoa/dia), de acordo com os dados da pesquisa de orçamentos familiares (IBGE, 2010).

2.6. Análise estatística

Os resultados foram analisados utilizando-se do programa R versão 2.15.1 (R Core Team, 2012). Foi realizada a análise de variância para comparação das

concentrações médias entre as estações e o Teste de Tukey para comparação dos pares de médias, ao nível de significância de 0,05.

3. Resultados e discussão

O método de extração para aflatoxina M₁ se mostrou seletivo, preciso e apresentou uma média de recuperação de 89,9%, demonstrando também exatidão. Os coeficientes de determinação (r^2) para as curvas analíticas utilizadas para quantificação variaram de 0,9998 a 0,9999. O limite de detecção e de quantificação foram de 0,0156 e 0,0519 ng/L, respectivamente. A figura 1 demonstra os cromatogramas de uma amostra fortificada em 500 ng/L e de uma amostra naturalmente contaminada na concentração de 72,8 ng/L.

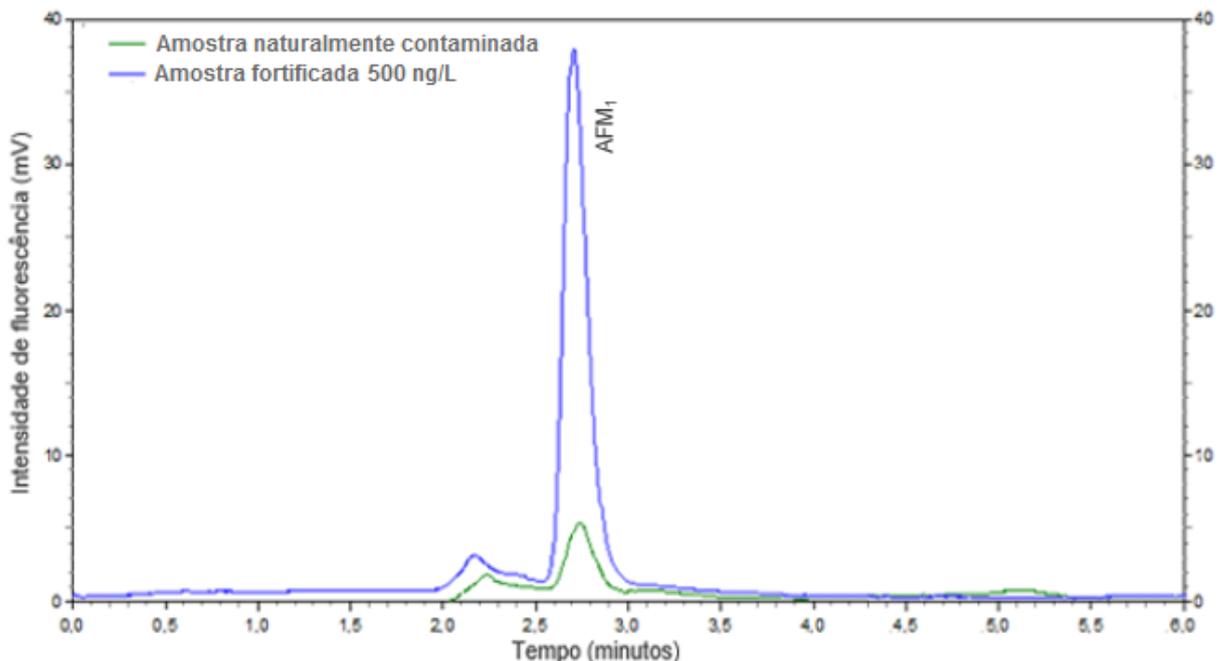


Fig.1. Cromatograma de uma amostra naturalmente contaminada na concentração de 72,8 ng/L e de uma amostra fortificada na concentração de 500 ng/L.

Das 152 amostras analisadas, 133 (87,5%) foram positivas, apresentando um valor médio de aflatoxina M₁ de 19,6 ng/L. Nenhuma amostra excedeu os limites máximos tolerados pela legislação brasileira que é de 500 ng/L (Brasil, 2011a). Quatro amostras (2,6%) apresentaram quantidades de aflatoxina M₁ acima de 50 ng/L, limite estabelecido pela Comunidade Européia (EC, 2006).

Em outros estudos realizados no Brasil, autores também encontraram amostras de leite UHT contaminadas com a aflatoxina M₁. De acordo com Oliveira et al. (2013), das 75 amostras de leite UHT coletadas em Minas Gerais, 30,7% (n=23) foram positivas. Jager et al. (2013) demonstraram que 40% (n=26) das amostras

coletadas em Pirassununga-SP estavam contaminadas com a aflatoxina M₁. Shundo et al. (2009) analisaram 40 amostras de leite UHT coletadas na cidade de São Paulo, todas estavam contaminadas. Em 2006, Shundo e Sabino analisaram 42 amostras de leite UHT coletadas em São Paulo e Marília-SP e 80,9% (34 amostras) foram positivas. Em nenhum dos estudos a concentração da micotoxina excedeu os limites estabelecidos pela legislação brasileira.

Alguns autores também encontraram contaminação em amostras analisadas em outros países. Zheng et al. (2013) encontrou 54,9% das amostras positivas das 153 analisadas na China, dessas 20,3% excederam o limite permitido pela Comunidade Européia (50 ng/L). Fallah (2010) analisou 109 amostras de leite UHT no Irã, 68 (62,3%) estavam contaminadas, 19 (17,4%) apresentaram contaminação acima de 50 ng/L. Na Índia, Siddappa, Nanjegowda e Viswanath (2012) encontraram 30 amostras contaminadas das 45 analisadas, 19 destas ultrapassaram os valores permitidos pela Comunidade Europeia e 11 apresentaram concentrações acima de 500 ng/L.

Os níveis de aflatoxina M₁ nas amostras analisadas variou de 1,8 a 121 ng/L para as amostras positivas (Tabela 1). As amostras que apresentaram maior nível de contaminação pertenciam as estações do inverno e outono.

Tabela 1

Concentrações mínima, máxima e média de aflatoxina M₁ encontradas nas amostras de leite UHT comercializadas na cidade Maringá, Brasil, bem como a ingestão diária provável nas diferentes estações do ano.

Estação do ano	Concentração de aflatoxina M ₁ (ng/L)			Ingestão diária estimada (ng/kg p.c./dia)
	Mínima	Máxima	Média	
Outono	8,6	72,8	30,4 ^a	0,07
Inverno	1,8	121,0	19,4 ^b	0,04
Verão	6,7	45,9	16,8 ^{bc}	0,04
Primavera	2,7	54,7	10,9 ^c	0,02

^{a,b,c}Valores seguidos por letras diferentes são significativamente diferentes (p<0,05).

Segundo o Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA, 2001) e Creppy (2002), a ingestão diária de aflatoxina a partir do consumo de leite foi estimada em 3,5 ng/Kg peso corpóreo/dia para a América Latina. No entanto em nosso estudo, a estação do outono, que foi significativamente maior que as médias das demais estações (p<0,05), apresentou uma média de contaminação de 30,4 ng/L, conseqüentemente apresentou o maior nível de ingestão diária provável (IDP), 0,07 ng/kg p.c.. Kuiper-Goodman (1991) determinou uma ingestão diária tolerável (IDT) para aflatoxina M₁ de 0,5 ng/kg p.c., considerando a dose de nenhum efeito

desejável (NOEL) de 2500 ng/kg p.c./dia e fator de segurança de 5000. Portanto, o resultado encontrado foi sete vezes menor. Resultado semelhante ao de Jager et al. (2013) que encontrou uma IDP de 0,1 ng/kg p.c. na cidade de Pirassununga-Brasil, mas inferior ao de Shundo et al. (2009), 0,188 ng/kg p.c., na cidade de São Paulo-Brasil.

Baseado em nossos estudos, a estação do outono apresentou a maior contaminação, devido a baixa temperatura e foi uma estação muito seca. Estes resultados são corroborados por Asi et al. (2012) e Ghiasian et al. (2007), observaram que a frequência de contaminação por aflatoxina M₁ nas amostras coletadas no inverno foi mais elevada em relação as coletadas no verão. Também Picinin et al. (2013), demonstraram em seu trabalho que as amostras coletadas no período seco apresentou maior contaminação em relação ao período de chuvas. Isso se deve pelo fato de que os animais ficam mais confinados nestas épocas e a alimentação fornecida pode estar contaminada com a aflatoxina B₁.

4. Conclusões

Neste estudo, a IDP estimada para aflatoxina M₁ na população estava abaixo da IDT proposta por Kuiper-Goodman (1991). Entretanto, a alta ocorrência desta micotoxina em leite UHT (87,5%) encontrada nas amostras analisadas demonstra a necessidade do monitoramento deste alimento para diminuir o risco de carcinoma hepatocelular na população brasileira.

Referências

- ABLV, Associação Brasileira da Indústria de Leite Longa Vida. (2011). Mercado do leite longa vida. Disponível em: <http://www.ablv.org.br/fixedcontent.aspx?area=set-inf>. Acessado: 22.12.12.
- AOAC, Association of Official Analytical Chemists. (2005). Official method: Aflatoxin M₁ in liquid milk, nº 2000.08.
- Asi, M. R., Iqbal, S. Z., Ariño, A., Hussain, A. (2012). Effect of seasonal variations and lactation times on aflatoxin M₁ contamination in milk of different species from Punjab, Pakistan. Food Control, 25, 34-38.
- Bennett, J. W., Klich, M. (2003). Mycotoxins. Clinical Microbiology Reviews. 16, n. 3, 497 – 516.
- BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. (2011). Resolução RDC nº 7, de 18 de fevereiro de 2011. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2011/res0007_18_02_2011_rep.html. Acessado:27.12.12. (a)

- BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. (2011) Manual de garantia da qualidade analítica: resíduos e contaminantes em alimentos. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/animal/laboratorios/publicacoes>. Acessado:24.12.12. (b)
- Creppy, E. E. (2002). Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe. *Toxicology Letters*, 127, 19-28.
- CAST, Council for Agricultural Science and Technology. (2003) *Mycotoxins: Risks in Plant, Animal, and Human Systems* (nº 139). USA: Iowa, (Capítulo 2, 3).
- Dragacci, S., Grosso, F., Gilbert, J. (2001) Immunoaffinity column cleanup with liquid chromatography for determination of aflatoxina M₁ in liquid milk: collaborative study. *Journal of AOAC International*, 84, 437-443.
- EC. (2002a). Decision 2002/657/EC of 12 August 2002. *Official Journal of the European Communities*, L221, 8-39.
- EC. (2006). Regulation n º 1881 of 19 december 2006. *Official Journal of the European Communities*, L364, 5-24.
- Fallah, A. A. (2010). Assessment of aflatoxin M₁ contamination in pasteurized and UHT milk marketed in central part of Iran. *Food and Chemical Toxicology*, 48, 988-991.
- Ghiasian, S.A., Maghsood, A. H., Neyestani, T. R., Mirhendi, S. H. (2007). Occurrence of aflatoxina M₁ in raw milk during the summer and winter seasons in Hamedan, Irã. *Journal of Food Safety*, 27, 188-198.
- Kuiper-Goodman, T. (1991). Mycotoxins: risk assessment and legislation. *Toxicology Letters*, 82/83, 853-859.
- IARC, International Agency For Research on Cancer. (2002). Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene. *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*, 82, 171-175.
- IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. (2011). Produção da pecuária municipal. Disponível em: http://ftp.ibge.gov.br/Producao_Pecuaria/Producao_da_Pecuaria_Municipal/2011/ppm2011.pdf. Acessado: 22.12.12.
- IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. (2010). Pesquisa de Orçamentos Familiares 2008-2009. Aquisição Alimentar Domiciliar *Per Capita* Brasil e Grandes Regiões. Disponível em: http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/condicaodevida/pof/2008_2009_aquisicao/default.shtm. Acessado: 27.12.12.
- Jager, A. V., Tedesco, M. P., Souto, P. C. M. C., Oliveira, C.A.F. (2013). Assessment of aflatoxin intake in São Paulo, Brazil. *Food Control*, 33, 87-92.
- JECFA, Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. (2001) Safety evaluation of certain mycotoxins in food, nº 47. Disponível em: <http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v47je01.htm>. Acessado: 18.02.12.

- Oliveira, C. P., Soares, N. F. F., Oliveira, T. V., Júnior, J. C. B., Silva, W. A. (2013). Aflatoxin M₁ occurrence in ultra high temperature (UHT) treated fluid milk from Minas Gerais/Brazil. *Food Control*, 30, 90-92.
- Picinin, L. C. A., Cerqueira, M. M. O. P., Vargas, E. A., Lana, A. M. Q., Toaldo, I. M., Bordignon-Luiz, M. T. (2013). Influence of climate conditions on aflatoxin M₁ contamination in raw milk from Minas Gerais State, Brazil. *Food Control*, 31, 419-424.
- Prandini, A., Tansini, G., Sigolo, S., Filippi, L., Laporta, M., Piva, G. (2009). On the occurrence of aflatoxin M₁ in milk and dairy products. *Food and Chemical Toxicology*, 47, 984-991.
- R Core Team. (2012). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing (ISBN 3-900051-07-0). Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>
- Shundo, L., Navas, S. A., Lamardo, L. C. A., Ruvieri, V., Sabino, M. (2009). Estimate of aflatoxin M₁ exposure in milk and occurrence in Brazil. *Food Control*, 20, 655-657.
- Shundo, L., Sabino, M. (2006). Aflatoxin M₁ in milk by immunoaffinity column cleanup with TLC/HPLC determination. *Brasilian Journal of Microbiology*, 37, 164-167.
- Siddappa, V., Nanjegowda, D. K., Viswanath, P. (2012). Occurrence of aflatoxin M₁ in some samples of UHT, raw & pasteurized milk from Indian states of Karnataka and Tamilnadu. *Food and Chemical Toxicology*, 50, 4158-4162.
- Tuinstra, L. G. M. T., Roos, A. H., Trijp, J. M. P. V. (1993). Liquid chromatographic determination of aflatoxina M₁ in milk powder using immunoaffinity columns for cleanup: Interlaboratory study. *Journal of AOAC International*, 76, 1248-1254.
- Zheng, N., Sun, P., Wang, J. Q., Zhen, Y. P., Han, R. W., Xu, X. M. (2013). Occurrence of aflatoxin M₁ in UHT milk and pasteurized milk in China market. *Food Control*, 29, 198-201.