

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM VIGILÂNCIA SANITÁRIA
INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

Fabio Santos Moraes

**IMPLANTAÇÃO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO PARA ANÁLISE DE AFLATOXINA
M1 EM LEITE, POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA E
DETECÇÃO POR FLUORESCÊNCIA, NO LABORATÓRIO MUNICIPAL DE
SAÚDE PÚBLICA DA CIDADE DO RIO DE JANEIRO.**

Rio de Janeiro

2019

Fabio Santos Moraes

IMPLANTAÇÃO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO PARA ANÁLISE DE AFLATOXINA M1
EM LEITE, POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA E DETECÇÃO
POR FLUORESCÊNCIA, NO LABORATÓRIO MUNICIPAL DE SAÚDE PÚBLICA
DA CIDADE DO RIO DE JANEIRO.

Monografia apresentada ao curso de Especialização em Controle da Qualidade de Produtos, Ambientes e Serviços Vinculados à Vigilância Sanitária do Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, da Fundação Oswaldo Cruz, como requisito para a obtenção do Certificado de conclusão do Curso de Especialização em Controle da Qualidade de Produtos, Ambientes e Serviços Vinculados à Vigilância Sanitária.

Orientadoras: Maria Heloisa Paulino de Moraes
Maria Helena Wohlers M. Cardoso

Rio de Janeiro

2019

Catálogo na Fonte
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
Biblioteca

Moraes, Fabio Santos

Implantação e validação de método para análise de aflatoxina M1 em leite, por cromatografia líquida de alta eficiência e detecção por fluorescência, no Laboratório Municipal de Saúde Pública da Cidade do Rio de Janeiro. / Fabio Santos Moraes. - Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2019.

88 f.

Monografia (Curso de Especialização em Controle da Qualidade de Produtos, Ambientes e Serviços Vinculados à Vigilância Sanitária) - Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2019.

Orientadora: Maria Heloisa Paulino de Moraes.

Co-orientadora: Maria Helena Wohlers Morelli Cardoso.

1. Estudos de Validação. 2. Aflatoxina M1. 3. Vigilância Sanitária. I. Título.

Implantation and validation of method for analysis of Aflatoxin M1 in milk, by high performance liquid chromatography and fluorescence detection in the Municipal Public Health Laboratory of the city of Rio de Janeiro.

Fabio Santos Moraes

IMPLANTAÇÃO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO PARA ANÁLISE DE AFLATOXINA M1
EM LEITE, POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA E DETECÇÃO
POR FLUORESCÊNCIA, NO LABORATÓRIO MUNICIPAL DE SAÚDE PÚBLICA
DA CIDADE DO RIO DE JANEIRO.

Monografia apresentada ao curso de Especialização em Controle da Qualidade de Produtos, Ambientes e Serviços Vinculados à Vigilância Sanitária do Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, da Fundação Oswaldo Cruz, como requisito para a obtenção do Certificado de conclusão do Curso de Especialização em Controle da Qualidade de Produtos, Ambientes e Serviços Vinculados à Vigilância Sanitária.

Aprovado em: ___ / ___ / _____

BANCA EXAMINADORA

Silvana do Couto Jacob (Doutora)

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde – INCQS

Lucia Helena Pinto Bastos (Doutora)

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde – INCQS

Mararlene Ulberg Pereira (Mestre)

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde – INCQS

ORIENTADORAS

Maria Heloisa Paulino de Moraes (Mestre) - Orientadora

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde – INCQS

Maria Helena Wohlers Morelli Cardoso (Doutora) - Co-orientadora

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde – INCQS

Dedico esse trabalho aos profissionais do Laboratório de Micotoxinas do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz que contribuíram de forma imprescindível para sua realização.

AGRADECIMENTOS

A Deus, sempre presente em minha vida, direcionando meus passos e me dando a sabedoria necessária para mais esse desafio.

Aos meus pais, cujo amor, que alcança a dimensão do infinito, não consigo expressar com palavras.

À minha Bela e amada esposa, por estar ao meu lado em todos os momentos.

Aos meus amigos do LASP, especialmente Laudicea e Gisele, que me deram as mãos nessa caminhada.

Às minhas orientadoras pela dedicação e colaboração imensuráveis.

Aos professores, coordenadores, demais profissionais e alunos do curso de Especialização.

Ao meu amigo Mick pelos valiosos ensinamentos e por ter me atrapalhado um pouco também.

RESUMO

A aflatoxina M1 é uma micotoxina que pode estar presente no leite de mamíferos, incluindo seres humanos, após a ingestão de alimentos ou ração contaminados com aflatoxina B1. Há evidências de que a aflatoxina M1 está relacionada com a carcinogenicidade em seres humanos, o que representa um elevado risco para a segurança alimentar, considerando ainda que grande parte do leite e derivados produzidos é destinada à alimentação infantil. O presente estudo teve como objetivo validar, intralaboratorialmente, método para análise de aflatoxina M1 em leite fluido, com extração por coluna de imunoafinidade e identificação e quantificação por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por fluorescência. Foram avaliados os parâmetros de seletividade, linearidade, limites de detecção e quantificação, recuperação e precisão. Nas condições operacionais do método, a seletividade foi comprovada pela ausência de interferentes no tempo de retenção da aflatoxina M1, além da correlação entre os tempos de retenção do padrão de aflatoxina M1 em fase móvel e na matriz, $5,29 \pm 0,02$ minutos, idênticos entre as repetições e maiores do que o dobro do tempo relativo ao volume vazio da coluna, não se verificando outro pico próximo da aflatoxina M1. A linearidade foi verificada pelos coeficientes de determinação e correlação maiores que 0,99, além da homocedasticidade nos resultados e normalidade dos resíduos da regressão. Os limites de detecção e quantificação encontrados foram de 0,002 e 0,006 $\mu\text{g/L}$, respectivamente. Os resultados demonstraram ainda a exatidão do método, tendo sido encontrados valores entre 80,67 e 97,56% de recuperação, para cinco níveis de fortificação de 0,0036 a 0,6430 $\mu\text{g/L}$. No que diz respeito à precisão, os desvios padrões de repetibilidade e precisão intermediária ficaram abaixo de 20%. O método analítico avaliado no presente estudo evidenciou ser capaz de detectar e quantificar a aflatoxina M1 em amostras de leite fluido desnatado, em atendimento ao limite máximo tolerado de 0,5 $\mu\text{g/L}$, estabelecido pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária.

Palavras-chave: Aflatoxina M1. Validação. Vigilância Sanitária.

ABSTRACT

Aflatoxin M1 is a mycotoxin that may be present in mammalian milk, including humans, after ingestion of food or feed contaminated with aflatoxin B1. There is evidence that aflatoxin M1 is related to the carcinogenicity in humans, which represents a high risk for food safety, considering also that a large part of the milk and its products are intended for infant feeding. The aim of the present study was to validate, in the laboratory, a method for the analysis of aflatoxin M1 in fluid milk, with extraction by immunoaffinity column and identification and quantification by high performance liquid chromatography with fluorescence detection. The proposed methodology, a descriptive study with a quantitative approach, consisted in the application of the parameters of selectivity, linearity, limits of detection and quantification, recovery assay and precision. In the operating conditions of the method, the selectivity was demonstrated by the absence of interferers in the retention time of aflatoxin M1, in addition to the correlation between the aflatoxin retention times in the mobile phase and in the matrix, 5.29 ± 0.02 minutes, identical between the replicates and greater than twice the retention time of the void volume of the column, with no other peak near aflatoxin M1 occurring. The linearity was verified by the coefficients of determination and correlation higher than 0.99, besides the homoscedasticity in the results and normality of the residuals of the regression. The detection and quantification limits were 0.002 and 0.006 $\mu\text{g/L}$, respectively. The results also demonstrated the accuracy of the method, with values between 80.67 and 97.56% recovery for five fortification levels of 0.0036 to 0.6430 $\mu\text{g/L}$. With regard to accuracy, the repeatability and intermediate accuracy standard deviations were below 20%. The analytical method evaluated in the present study was able to detect and quantify aflatoxin M1 in samples of UHT skimmed milk, in compliance with the maximum tolerated limit of 0.5 $\mu\text{g/L}$ established by the National Sanitary Surveillance Agency.

Key words: Aflatoxin M1. Validation. Health Surveillance.

LISTAS DE FIGURAS

Figura 1 - Conversão de AFB1 em AFM1	16
Figura 2 - Estrutura química das aflatoxinas B1, B2, G1, G2 e M1	23
Figura 3 - Fluxograma do método da AOAC para o preparo da amostra de leite	58
Figura 4 - Fluxograma do método adaptado para o preparo da amostra de leite	58
Figura 5 - Cromatograma referente à injeção de 50 µL do branco dos reagentes, nas condições operacionais do método	66
Figura 6 - Cromatograma referente à injeção de 50 µL do padrão de AFM1 (0,0787 ng/mL), em fase móvel	67
Figura 7 - Cromatograma referente à injeção de 50 µL do padrão de AFM1, em fase móvel, no nível de concentração correspondente ao LMT (0,2871 ng em 50 µL ou 5,742 ng/mL)	67
Figura 8 - Cromatograma referente à injeção de 50 µL da amostra branco, fortificada com o padrão de AFM1 no nível de concentração correspondente ao LMT (0,2944 ng em 50 µL ou 0,4710 µg/L)	68
Figura 9 - Cromatogramas demonstrando a correspondência nos tempos de retenção da amostra branco, contaminada naturalmente, e as amostras fortificadas com o padrão de AFM1 nos níveis do ensaio de recuperação	68
Figura 10 - Curva de calibração AFM1 (curva A)	69
Figura 11 - Curva de calibração AFM1 (curva B)	69

LISTAS DE QUADROS

Quadro 1 - Critério de aceitação para o ensaio de recuperação para AFM1	50
Quadro 2 - Critério de aceitação para a repetibilidade	52
Quadro 3 - Condições operacionais do método	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Concentrações utilizadas nas curvas de calibração de AFM1	64
Tabela 2 - Resultados das curvas de calibração A e B	70
Tabela 3 - Resultados do ensaio de recuperação da AFM1	71

LISTA DE ABREVIATURAS

AF	Aflatoxinas
AFB1	Aflatoxina B1
AFB2	Aflatoxina B2
AFG1	Aflatoxina G1
AFG2	Aflatoxina G2
AFM1	Aflatoxina M1
AFM2	Aflatoxina M2
ANOVA	Análise da variância
CCD	Cromatografia em camada delgada
CIA	Coluna de Imunoafinidade
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLAE-DFL	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector por Fluorescência
CPA	Ácido Ciclopiazônico
CV	Coefficiente de Variação
CYP	Enzimas do Citocromo P450
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DP	Desvio Padrão
DPR	Desvio Padrão Relativo
DPR _r	Desvio Padrão Relativo de Repetibilidade
EFS	Extração em Fase Sólida
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
FC	Fator de Correção
GST	Enzima Glutathiona S-transferase
LD	Limite de Detecção
LMT	Limite Máximo Tolerado
LQ	Limite de Quantificação
PNCRC	Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes
UHT	Ultra High Temperatures

LISTA DE SIGLAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOAC	AOAC International
CEN	Comite Europeu de Normalização
CNPPA	Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos
CODEX	Codex Alimentarius Commission
EFSA	Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos
FAO	Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura
FDA	Food and Drug Administration
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
IARC	Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IEC	Comissão Eletrotécnica Internacional
INCQS	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
ISO	Organização Internacional para Padronização
IUPAC	União Internacional de Química Pura e Aplicada
JECFA	Comitê de Peritos em Aditivos Alimentares da FAO/OMS
LASP	Laboratório Municipal de Saúde Pública
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MERCOSUL	Mercado Comum do Sul
OMS	Organização Mundial de Saúde
PCRJ	Prefeitura da Cidade do Rio de Janeiro
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
SUBVISA	Subsecretaria de Fiscalização, Vigilância Sanitária e Controle de Zoonoses

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 Aspectos nutricionais e econômicos do leite	17
1.2 Micotoxinas	19
1.3 Aflatoxinas	23
1.3.1 Características físico-químicas e toxicidade	23
1.3.2 Condições propícias à biossíntese das aflatoxinas	25
1.3.3 Ocorrência das aflatoxinas no Brasil e no mundo	28
1.4 Aflatoxina M1	30
1.4.1 Toxicidade	30
1.4.2 Ocorrência da aflatoxina M1 no Brasil e no mundo	31
1.4.3 Regulamentação e monitoramento	35
1.4.4 Métodos utilizados para a determinação de aflatoxina M1 no leite	39
1.5 Procedimento para validação de método analítico	43
1.5.1 Confiabilidade no desenvolvimento e aplicabilidade de métodos	43
1.5.2 Parâmetros para validação	44
1.5.2.1 <i>Seletividade</i>	46
1.5.2.2 <i>Linearidade</i>	46
1.5.2.3 <i>Faixa de trabalho</i>	48
1.5.2.4 <i>Limites de detecção e quantificação</i>	48
1.5.2.5 <i>Ensaio de recuperação</i>	50
1.5.2.6 <i>Precisão</i>	51
1.5.2.7 <i>Alguns critérios quanto à qualidade analítica</i>	53
1.6 Justificativa	55
2 OBJETIVOS	56
2.1 Objetivo geral	56
2.2 Objetivos específicos	56
3 METODOLOGIA	57
3.1 Descrição do método utilizado para a determinação de AFM1 em leite..	57
3.2 Determinação da concentração e preparo de soluções do padrão de AFM1	61
3.2.1 Fator de correção do espectrofotômetro	61
3.2.2 Concentração da solução padrão de AFM1	62

3.2.3 Preparo das soluções do padrão de AFM1	62
3.3 Parâmetros de validação de método analítico	63
3.3.1 Seletividade	63
3.3.2 Linearidade	63
3.3.3 Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ)	64
3.3.4 Ensaio de recuperação	64
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	66
5 CONCLUSÃO	74
6 PERSPECTIVAS FUTURAS	75
REFERÊNCIAS	76
ANEXO A – MODELO DE PLANILHA UTILIZADA PARA A AVALIAÇÃO DA LINEARIDADE DO MÉTODO	87
ANEXO B – MODELO DE PLANILHA UTILIZADA PARA A AVALIAÇÃO DA RECUPERAÇÃO E PRECISÃO DO MÉTODO	88

1 INTRODUÇÃO

A preocupação em ofertar o alimento saudável e com garantia de qualidade biológica, sanitária, nutricional e tecnológica à população está inserida em uma série de etapas, desde a produção (incluindo a agricultura tradicional e familiar), processamento, industrialização, comercialização, abastecimento até a distribuição, cuja responsabilidade é partilhada com diferentes setores de governo e da sociedade. Essa complexidade da cadeia produtiva de alimentos coloca a sociedade brasileira diante de novos riscos à saúde, como a inadequação do perfil nutricional dos alimentos e a presença de contaminantes (BRASIL, 2013).

Constitutiva das práticas em saúde, a Vigilância Sanitária possui seu escopo de ação voltado para a prevenção e controle de riscos, proteção e promoção da saúde, sendo o âmbito das relações sociais de produção e consumo seu principal ponto de atuação como espaço de intervenção em prol dos interesses da saúde (COSTA, 2009).

A agropecuária brasileira, que está há alguns anos entre os maiores produtores mundiais, alcançou recentemente seu recorde de produção de grãos, produzindo alimentos para o consumo interno e para mais de 150 países em todos os continentes (EMBRAPA, 2018a), sendo o terceiro maior exportador de produtos agrícolas em 2017, atrás apenas da União Europeia e dos Estados Unidos (MARANHÃO; FILHO, 2017). No mercado interno, boa parcela da produção de grãos é direcionada a alimentação animal, como o milho, do qual a maior parte se destina às indústrias de ração, enquanto que o consumo humano absorve apenas uma pequena fração do total produzido (CASTRO; ANJOS, 2009).

A ração destinada à alimentação animal tornou-se uma alternativa como complemento ao pasto ou volumoso (capim, silagem, feno etc.) dado ao gado leiteiro, o que nem sempre é indicativo de boa nutrição ou de produtividade (NEIVA, 2018). Neste cenário, o que se verificou nas últimas décadas foi uma evolução de forma contínua da produção de leite, resultando no crescimento consistente, levando o país a ser um dos principais produtores do setor no mundo (EMBRAPA, 2018b).

Contudo, o crescimento da oferta não reflete necessariamente o aumento no consumo, que sofre influência de questões socioeconômicas, como hábito alimentar e renda familiar.

Diante do exposto, a regulamentação, assim como a fiscalização sanitária passam a ter um papel cada vez mais importante na garantia da segurança alimentar, tendo em vista os diversos contaminantes químicos e biológicos, que podem resultar de não conformidades em qualquer momento da cadeia de produção do leite e chegar até à mesa do consumidor.

Dentre os contaminantes químicos que podem estar presentes nas rações e conseqüentemente no leite, destacam-se as micotoxinas. Sua presença nos alimentos representa, atualmente, um dos principais entraves técnicos à comercialização dos produtos agrícolas, uma vez que são substâncias altamente tóxicas e carcinogênicas, representando risco potencial para a saúde humana e animal (CASTRO; ANJOS, 2009).

As micotoxinas são um grupo relativamente grande e diverso de toxinas de ocorrência natural, sintetizadas por algumas espécies de fungos, muitas das quais caracterizadas como agentes químicos de doenças tóxicas em humanos e animais. Podem contaminar produtos agrícolas antes, durante ou após a colheita (PITT et al., 2012; STEIN; BULBOACĂ, 2017). A genética de plantas, exposição a esporos de fungos, condições climáticas durante o plantio, cultivo e colheita, danos causados por insetos, manejo de culturas e uso de fungicidas, são alguns dos fatores que influenciam o crescimento de fungos nas culturas e a conseqüente produção de micotoxinas. Nesse conjunto, o controle da umidade e temperatura tem uma grande influência no crescimento de fungos e na produção de micotoxinas no campo e armazenamento (RODRIGUES; NAEHRER, 2012).

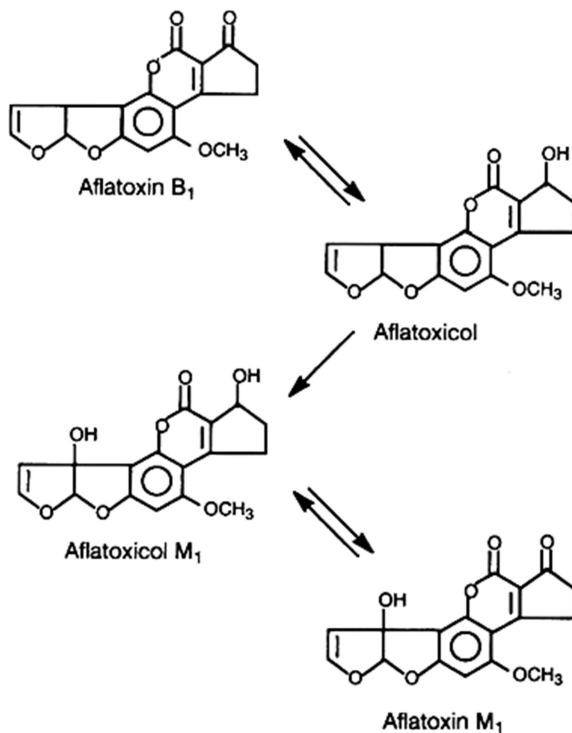
O consumo de alimentos contaminados por micotoxinas tem sido relacionado ao câncer, mutagenicidade, indução de distúrbios hormonais, gastrointestinais ou renais e imunossupressão, principalmente em dietas consideradas monótonas nos países com elevada exposição a esses alimentos (ANFOSSI; GIOVANNOLI; BAGGIANI, 2016; PITT et al., 2012).

Dentre as micotoxinas, as aflatoxinas (AF) são as mais importantes em relação à sua abundância, toxicidade e impacto humano. São produzidas, sobretudo, por espécies de *Aspergillus* em regiões tropicais e subtropicais do mundo, podendo ocorrer no campo e após a colheita em condições inadequadas de produção e armazenamento (STEIN; BULBOACĂ, 2017; WU, 2015; YAO; HRUSKA; DI MAVUNGU, 2015).

Há evidências suficientes que relacionam as aflatoxinas ao câncer no fígado em seres humanos e à carcinogenicidade em animais experimentais. Mais recentemente, foram relatados efeitos do impacto negativo das aflatoxinas no crescimento infantil, bem como na modulação imunológica (COPPOCK; DZIWENKA, 2014; IARC, 2012, 2015; PITT; TANIWAKI; COLE, 2013; WU, 2015).

Depois de ingerida, a aflatoxina B₁ (AFB₁) pode ser metabolizada em aflatoxina M₁ (AFM₁). Essa conversão ocorre no fígado de mamíferos e envolve um mecanismo de hidroxilação (Figura 1), aumentando a solubilidade em água e permitindo a rápida excreção da AFM₁ no leite. Em decorrência disso, os seres humanos são expostos à AFM₁ através do consumo de leite e produtos lácteos, incluindo o leite materno (CASTRO; ANJOS; TEIXEIRA, 2013; FAO, 2016; IARC, 2012; STEIN; BULBOACĂ, 2017; WHO/FAO, 2017; YAO; HRUSKA; DI MAVUNGU, 2015).

Figura 1 - Conversão de AFB₁ em AFM₁



Fonte: (Adaptado de IARC, 2002).

A presença de AFM₁ no leite destinado ao consumo humano torna-se altamente preocupante para a segurança alimentar, considerando ainda que grande parte deste produto é voltada para a alimentação infantil (FARIAS et al., 2005).

Segundo Wu (2015), a elevada sensibilidade das crianças aos efeitos neurotóxicos, endócrinos e imunológicos e a sua maior exposição por peso corporal em comparação com os adultos, as tornam particularmente vulneráveis e sensíveis aos efeitos tóxicos das micotoxinas.

Diante do risco que as micotoxinas representam para a saúde humana e devido à impossibilidade de se proibir a presença desses contaminantes, uma vez que as micotoxinas ocorrem naturalmente nos alimentos, a regulamentação de limites torna-se imprescindível (ANFOSSI; GIOVANNOLI; BAGGIANI, 2016).

Ao mesmo tempo, os requisitos para amostragem e métodos analíticos adequados para avaliar a conformidade com os regulamentos e monitorar a ocorrência de tais contaminantes em alimentos e rações tem sido tratado como uma prioridade mundial, contando com a atuação de organizações, como a AOAC International (AOAC) e o Comitê Europeu de Normalização (CEN). Com isso e diante do avanço científico em muitos campos, como a análise bioquímica e o progresso técnico-instrumental, aumentaram as possibilidades de se determinar micotoxinas, com menor tempo de análise, determinação múltipla de micotoxinas, melhor capacidade de detecção e quantificação, sem comprometer a confiabilidade do valor gerado (ANFOSSI; GIOVANNOLI; BAGGIANI, 2016; DE SAEGER; AUDENAERT; CROUBELS, 2016; VAN EGMOND; SCHOTHORST; JONKER, 2007).

1.1 Aspectos nutricionais e econômicos do leite

O leite e seus derivados merecem destaque por constituírem um grupo de alimentos de grande valor nutricional, uma vez que são importantes fontes de proteínas de alto valor biológico, além de conterem vitaminas e minerais. O consumo habitual desses alimentos é recomendado, principalmente, para que se atinja a adequação diária da ingestão de cálcio, um nutriente que, dentre outras funções, é fundamental para a formação e a manutenção da estrutura óssea do organismo (MUNIZ; MADRUGA; ARAÚJO, 2013; SBAN, 2015). Por ser considerada a melhor fonte de cálcio na alimentação, seu consumo é importante principalmente nas fases pré-escolares e escolares (BASTOS et al., 2016).

O perfil nutricional do leite de vaca é composto, em média, por 87% de água e 13% de componentes sólidos, divididos entre cerca de 4% a 5% de carboidratos, 3%

de proteínas, 3% a 4% de lipídios, 0,8% de minerais e 0,1% de vitaminas. Contêm ainda, imunoglobulinas, hormônios, fatores de crescimento, citocinas, nucleotídeos, peptídeos, poliaminas, enzimas e outros peptídeos bioativos que apresentam efeitos positivos à saúde (SBAN, 2015).

Na agroindústria de alimentos o leite é um dos produtos mais versáteis. O seu consumo ocorre em grande parte na sua forma original, mas também após ser transformado em derivados como queijo, iogurte, leite condensado, leite fermentado e doce de leite. Com isso, sua aplicação é constante e diversificada tanto na agroindústria, como na culinária industrial ou doméstica (EMBRAPA, 2018b).

Nas últimas décadas, a atividade leiteira brasileira evoluiu de forma contínua, colocando o país como um dos principais produtores no mundo. De 1974 a 2014, a produção nacional passou de 7,1 para mais de 35,1 bilhões de litros ao ano. Em 2016, o Brasil ficou em quarto lugar entre os maiores produtores de leite no mundo, atrás apenas da Índia, maior produtora mundial, Estados Unidos e Paquistão. Mesmo assim, o país ainda importa parte do leite consumido, principalmente da Argentina e Uruguai. Dentre os estados brasileiros, Minas Gerais continua despontando com o maior número de fazendas leiteiras, seguido pelo Paraná, São Paulo, Goiás e Rio Grande do Sul (EMBRAPA, 2018b).

Estima-se, com base no faturamento da indústria de laticínios no país, que o consumo per capita no Brasil em 2017 foi de 173 litros/habitante, volume que ainda se encontra abaixo de indicadores verificados em outros países desenvolvidos, mas 33% maior do que em 2008. Dentre os produtos lácteos, o maior consumo foi na categoria dos queijos (56%), seguido do leite em pó (45%) e leite fluido submetido ao tratamento térmico com altas temperaturas (UHT) (32%) (EMBRAPA, 2018b).

O balanço anual da Associação Brasileira do Leite Longa Vida aponta que o consumo de leite UHT atingiu, em 2017, 7,026 bilhões de litros, o que significa 2,8% superior ou 194 milhões de litros a mais que 2016, quando bateu em 6,832 bilhões de litros. Os números mostram ainda crescimento do consumo formal de leite em 2017 da ordem de 2,4%, com aumento do consumo aparente para 53,9 litros per capita ao ano, contra 52,7 litros de 2016 (EMBRAPA, 2018b).

Os resultados da última edição da Pesquisa de Orçamento Familiar (2008-2009) indicam que a ingestão de leite e derivados é maior conforme ocorre o aumento da renda familiar e do grau de escolaridade da população. Dentre os produtos lácteos, o leite integral é o mais consumido, sendo mais frequente entre as

mulheres (13%) do que entre os homens (11,8%). Outra pesquisa importante realizada no Brasil, a Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico encontrou similaridade, com maior frequência para o consumo do leite integral (52,9%), porém maior entre homens (55,7%) que mulheres (50,4%) (SBAN, 2015).

Estudo realizado por Bastos e colaboradores (2016), objetivando avaliar o consumo de leite e produtos relacionados, em crianças na faixa etária de quatro meses a três anos, de uma instituição pública com fins filantrópicos localizada no município do Rio de Janeiro, possibilitou identificar o consumo de leite na residência e o tipo de leite consumido (UHT, pasteurizado, pó). De acordo com os resultados, os autores verificaram que, na residência, 88% das crianças consomem leite com regularidade, sendo que 56% dessas crianças consomem o produto exclusivamente na forma de pó. Na instituição, apesar da oferta, foi descrito o baixo consumo por parte das crianças.

O consumo do leite pode ser influenciado pelo seu custo, uma vez que a renda é o que mais interfere no consumo de lácteos no Brasil, mas também pela sua qualidade. A qualidade do leite está ligada não só aos seus atributos nutricionais, mas acima de tudo, à sua segurança sanitária. Se não for obtido em condições apropriadas, ele pode se tornar um veículo para contaminantes químicos e microbiológicos. Entre os contaminantes químicos que comumente são detectados no leite e que representam risco ao consumidor estão agrotóxicos, resíduos de medicamentos veterinários e micotoxinas (ANJOS et al., 2016; EMBRAPA, 2018b).

1.2 Micotoxinas

O início das atividades agrícolas, a cerca de 11000 anos atrás, proporcionou a humanidade condições melhores de sobrevivência do que a exclusiva dependência da caça, introduzindo os grãos, como trigo, cevada e centeio em um sistema de produção. Entretanto, logo se identificou a necessidade de armazenar os grãos produzidos e as culturas foram sendo deslocadas para fora de suas áreas de adaptação, submetendo esses grãos a temperaturas e graus de umidade diferentes dos seus locais de origem (PITT; MILLER, 2017).

Ao longo da história é possível encontrar referências a intoxicações provocadas pela presença de micotoxinas nos alimentos. Uma das ocorrências mais

significativas diz respeito ao ergotismo, doença causada pela ingestão de centeio e derivados, contaminados com alcaloides do ergot, micotoxinas produzidas por fungos do gênero *Claviceps* e que tomou proporções epidêmicas em grande parte da Europa durante a Idade Média (PEREIRA; FERNANDES; CUNHA, 2012; PITT; MILLER, 2017).

Em outro momento, a morte de cerca de 100.000 pessoas na antiga União Soviética, durante a 2ª Guerra Mundial, estaria relacionada à Aleucia Tóxica Alimentar, que teria sido causada pela toxina T-2, devido à ingestão de pão produzido a partir culturas de trigo contaminadas com *Fusarium* (PEREIRA; FERNANDES; CUNHA, 2012).

A doença “X” da Turquia, assim chamada por se assemelhar a uma doença viral, foi responsável pela morte de 100.000 perus e um número menor de frangos e patos na Inglaterra em 1960. A causa para a doença permaneceu um mistério por cerca de um ano após o surto original, uma vez que os pesquisadores se viram diante do dilema no qual a refeição, até então considerada estéril, foi declarada altamente tóxica. No decorrer do mesmo ano, uma alta incidência de doenças do fígado também foi registrada em patos no Quênia e uma amostra da farinha de amendoim envolvida no surto foi considerada tóxica e altamente contaminada por *Aspergillus flavus*. A descoberta da aflatoxina poderia ter sido perdida, não fosse pelo fato de que praticamente todos os perus mortos estivessem sendo criados a 100 milhas do Porto de Londres. Assim, a fonte da ração contaminada pôde ser rastreada até vários navios cargueiros do Brasil, incluindo o S.S. Rossetti, que chegou a Londres em 7 de julho de 1960 (PITT; MILLER, 2017).

Nesse momento, quando se soube pela primeira vez que a aflatoxina era um potencial carcinógeno, surgiu a definição de micotoxinas como metabólitos secundários de fungos, cuja exposição pode causar doenças ou morte em seres humanos e animais. Isso deu um impulso significativo à pesquisa, que buscou definir o papel das micotoxinas nas doenças humanas e animais (BRYDEN, 2007; STEIN; BULBOACĂ, 2017).

Alguns anos mais tarde, em 1976, Leonard Stoloff, da divisão de tecnologia de alimentos, da Food and Drug Administration (FDA), descreveu esses incidentes de 1960 como um marco no entendimento sobre as micotoxinas e suas consequências. Segundo Stoloff, foram o início de uma série de eventos que caracterizaram a toxicidade de um grupo de compostos fluorescentes que poderiam

ser extraídos de alimentos contaminados por *A. flavus*, estimulando a realização de estudos que estabeleceram sua oncogenicidade e hepatocarcinogênicidade em animais. O resultado foi uma série de atividades que produziram compostos isolados e uma metodologia simples, sensível e analítica para pesquisa e controle, com a determinação da incidência e do nível de micotoxinas em alimentos, além da busca por substâncias químicas específicas produzidas por fungos e sua relação com as doenças (STOLOFF, 1976).

Com o passar do tempo, a exposição humana a micotoxinas, pela ingestão de alimentos contaminados, passou a ser considerada uma questão de saúde pública, tendo em vista a grande quantidade de produtos agrícolas, com níveis excessivos destes contaminantes, que entram na cadeia alimentar humana e animal (CALDAS; SILVA; OLIVEIRA, 2002; PEREIRA; FERNANDES; CUNHA, 2012).

Além disso, embora o crescimento fúngico e a produção de micotoxinas dependam de condições ambientais favoráveis, por vezes limitando sua ocorrência a determinada área geográfica, a exposição do ser humano e dos animais às micotoxinas foi se transformando em uma preocupação mundial devido ao comércio internacional de alimentos (ANFOSSI; GIOVANNOLI; BAGGIANI, 2016).

As micotoxinas afetam o comércio de alimentos em muitos países, interferindo ou até mesmo impedindo a exportação, comprometendo a produção animal e agrícola. Nos países em desenvolvimento, o problema é ainda mais sério. Como os produtos de boa qualidade são normalmente exportados, aqueles alimentos de qualidade inferior, os quais apresentam níveis de micotoxinas superiores aos permitidos nos países importadores, são vendidos e consumidos no mercado interno, com riscos evidentes para a saúde da população (FREIRE et al., 2007; MEDINA et al., 2017; PITT et al., 2012).

As estimativas de que aproximadamente 25% das commodities produzidas no mundo estão de alguma forma contaminadas com micotoxinas, especialmente os alimentos básicos, vem se mantendo ao longo dos anos (COPPOCK; DZIWENKA, 2014; FREIRE et al., 2007; PITT et al., 2012; STEIN; BULBOACĂ, 2017).

No entanto, quando as commodities são direcionadas à alimentação animal o panorama pode ser outro. Em um estudo realizado para avaliar a presença de micotoxinas nas commodities mais comumente usadas para produção de ração, de janeiro de 2009 a dezembro de 2011, 23.781 análises de micotoxinas foram realizadas em 7.049 amostras provenientes das Américas do Norte e do Sul, Europa

e Ásia. As amostras foram analisadas para identificação isolada e em conjunto das micotoxinas: aflatoxinas, zearalenona, desoxinivalenol, fumonisinas e ocratoxina A. Do total de análises realizadas, 81% foram positivas para pelo menos uma micotoxina. Outro dado importante, a presença de mais de uma micotoxina em aproximadamente metade das amostras chama a atenção para a contaminação por múltiplas micotoxinas e para os seus efeitos sinérgicos em animais (RODRIGUES; NAEHRER, 2012).

Existem mais de 100.000 espécies de fungos conhecidos, mas a maioria das espécies toxigênicas conhecidas se encontram nos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*, responsáveis pela produção da maior parte das micotoxinas conhecidas (CAST, 2003).

Assim, embora muitos metabólitos produzidos por fungos sejam conhecidos, existe um consenso a respeito dos que seriam mais significativos para a saúde humana e animal: aflatoxinas, fumonisinas, ocratoxina A, desoxinivalenol, zearalenona e alcalóides do ergot. Estas toxinas são produzidas por espécies dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Alternaria* e *Claviceps*. Todas as espécies de *Aspergillus* e *Penicillium* são parasitas, crescendo em cultivos sem sinais óbvios de patogenicidade, ou invadem as culturas após a colheita, produzindo toxinas durante a secagem e armazenamento. Em contraste, as espécies importantes de *Fusarium* e *Claviceps* infectam as culturas antes da colheita e provocam danos aparentes, como a giberela (ADEYEYE, 2016; PITT et al., 2012; STEIN; BULBOACĂ, 2017).

As espécies mais importantes de *Aspergillus* são *A. flavus* e *A. parasiticus*. Ocorrem em climas mais quentes e produzem aflatoxinas em milho, amendoim, nozes e, com menor frequência, outras commodities. Os principais produtores de Ocratoxina A, *A. ochraceus* e *A. carbonarius*, são comumente encontrados em uvas, vinho e café. *Penicillium verrucosum* também produz ocratoxina A, mas ocorre apenas em climas frios e temperados, onde infecta pequenos grãos. *Fusarium verticillioides* é onipresente em milho, com natureza endofítica, e produz fumonisinas, que são geralmente mais prevalentes quando as culturas estão sob estresse hídrico ou sofrem danos excessivos por insetos. *F. graminearum*, que é o maior produtor de desoxinivalenol e zearalenona, é patogênico em milho, trigo e cevada, e produz essas toxinas sempre que infecta esses grãos antes da colheita.

Por fim, *Claviceps purpurea*, que produz esclerócios entre as sementes em gramíneas, incluindo trigo, cevada e triticale (PITT et al., 2012).

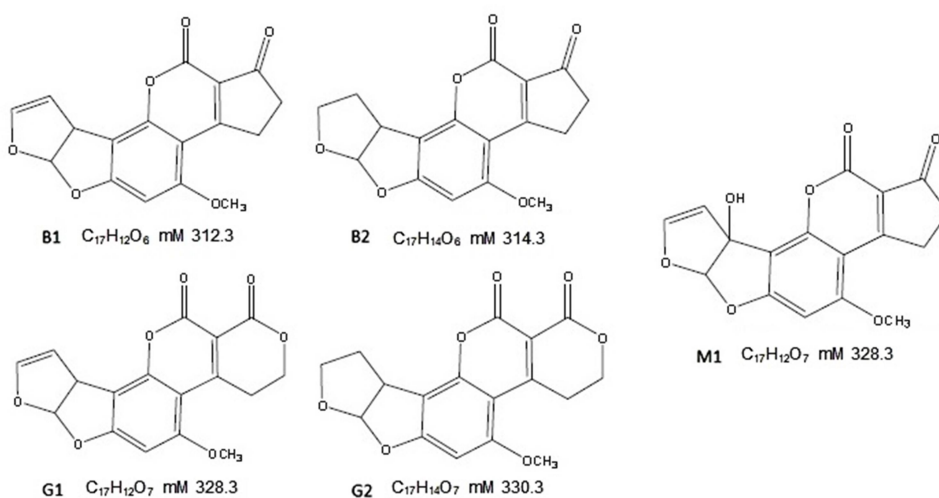
As estabilidades química e térmica das micotoxinas possibilitam sua permanência nos alimentos, mesmo após o processamento, representando risco ao consumo. Além disso, podem entrar na cadeia alimentar do ser humano de forma indireta, através de animais alimentados com ração contaminada com AFB1, por exemplo, metabolizada em AFM1, excretada no leite (ANFOSSI; GIOVANNOLI; BAGGIANI, 2016).

1.3 Aflatoxinas

1.3.1 Características físico-químicas e toxicidade

As aflatoxinas são furocumarinas complexas, divididas em dois grupos químicos, as que possuem anel ciclopentenona (AFB1, AFB2, AFM1) e as que possuem lactona insaturada (AFG1 e AFG2) (Figura 2). Elas formam cristais incolores a amarelos pálidos. Intensamente fluorescente em luz ultravioleta, emitindo fluorescência azul (AFB1 e AFB2) ou verde (AFG1) e verde-azul (AFG2), da qual derivaram as designações B e G, ou azul-violeta (AFM1) (COPPOCK; DZIWENKA, 2014; IMAMURA et al., 2000).

Figura 2 - Estrutura química das aflatoxinas B1, B2, G1, G2 e M1



Fonte: (EFSA, 2007).

São ligeiramente solúveis em água, insolúveis em solventes não polares e solúveis em solventes orgânicos moderadamente polares, como por exemplo, clorofórmio e metanol. São substâncias instáveis à luz ultravioleta na presença de oxigênio, extremos de pH (< 3 e > 10) e agentes oxidantes. São degradadas pela reação com amônia ou hipoclorito de sódio. Por outro lado, as aflatoxinas são estáveis a temperaturas elevadas (IARC, 2002; MARCHESI et al., 2018).

Segundo o Comitê de Peritos em Aditivos Alimentares (JECFA) da Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura e Organização Mundial da Saúde (FAO/OMS), as aflatoxinas estão entre as mais potentes substâncias mutagênicas e carcinogênicas conhecidas. Além disso, a infecção pelo vírus da hepatite B pode potencializar a ação das aflatoxinas na indução do câncer de fígado, possivelmente devido a menor atividade da glutathione S-transferase (GST) no fígado humano na presença de infecção pelo vírus da hepatite B (HBV) (EFSA, 2007; FAO, 2016; WHO/FAO, 2017).

A Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC), da OMS, classifica as aflatoxinas no grupo 1, por haver evidências suficientes da sua carcinogenicidade em seres humanos. As aflatoxinas causam carcinoma hepatocelular. Segundo a Agência, há ainda evidência suficiente em animais experimentais para a carcinogenicidade de misturas naturais de aflatoxinas e de AFB1, AFG1 e AFM1. As evidências são limitadas para a carcinogenicidade em animais experimentais pela AFB2 e as evidências para AFG2 são inadequadas para sua carcinogenicidade em animais experimentais (PITT et al., 2012).

Dentre as aflatoxinas, a AFB1 ocorre nos níveis mais altos, é considerada a mais tóxica e ainda representa risco de contaminação para o ser humano através de seu metabólito AFM1, excretado no leite de animais e seres humanos (IARC, 2015).

Em humanos, ao cair na circulação sistêmica, as aflatoxinas são distribuídas para o organismo ligadas a componentes sanguíneos, tais como proteínas e eritrócitos plasmáticos. A ligação ao ácido desoxirribonucleico (DNA) e a carcinogenicidade da AFB1 estão relacionadas com a sua conversão no 8,9-epóxido pelas enzimas do citocromo P450 (CYP). As enzimas do CYP, CYP1A2 e CYP3A4, catabolizam a AFB1 através de duas reações separadas de oxidação por transferência de elétrons. Enquanto a CYP1A2 decompõe a AFB1 em exo-epóxido, endoepóxido e AFM1, a CYP3A4 decompõe AFB1 em exo-8,9-epóxido e AFQ1. As AFM1 e AFQ1 não são mais quebradas, sendo excretadas na urina e, no caso da

AFM1, no leite. A ligação do exo-epóxido ao DNA resulta na formação de adutos de DNA, o que leva ao desenvolvimento de mutações no gene TP53 e eventual progressão a tumores (IARC, 2012; ROCHA et al., 2008; WACOO et al., 2014; WHO/FAO, 2017).

Informações mais recentes, sobre polimorfismos humanos em enzimas como CYP e GST, descrevem a variabilidade da população nos processos de ativação e desintoxicação de aflatoxinas. Este conhecimento tem sido usado em conjunto com biomarcadores para avaliar a eficácia de intervenções farmacológicas e dietéticas com o objetivo de reduzir o risco de câncer (FAO, 2016; WHO/FAO, 2017).

Fatores que explicam as diferenças na resposta a esse dano incluem a proporção de aflatoxinas metabolizadas em 8,9-exo-epóxido em relação a outros metabólitos menos tóxicos e a prevalência de vias que levam à formação de conjugados com mutagenicidade e citotoxicidade reduzidas (IARC, 2012; STEIN; BULBOACĂ, 2017; WHO/FAO, 2017).

1.3.2 Condições propícias à biossíntese das aflatoxinas

A biossíntese das aflatoxinas pode ser uma resposta de defesa dos fungos ao estresse causado pelos danos da exposição à luz ultravioleta, subprodutos do metabolismo primário, necessários para incrementar a aptidão fúngica ou como forma de proteção contra a ação de predadores em estruturas reprodutivas como conídios e escleródios (BATTILANI et al., 2012).

O gênero *Aspergillus*, responsável pela biossíntese das aflatoxinas, pertence a uma grande e diversificada família de fungos, distribuídos em todo o mundo, mas que estão presentes principalmente em climas temperados subtropicais e quentes, entre as latitudes 26° a 35° norte ou sul do equador. Eles geralmente são considerados saprófitas. Assim, estes fungos são mais comuns em climas temperados subtropicais e quentes. O crescimento a altas temperaturas e baixa atividade de água, permite seu desenvolvimento em várias culturas (CAST, 2003).

Dentre as espécies de *Aspergillus* capazes de sintetizar aflatoxinas, *A. flavus* e *A. parasiticus* são responsáveis pela maior proporção de aflatoxinas encontradas em produtos alimentares em todo o mundo. *A. flavus* sintetiza apenas AFB1 e AFB2 e, às vezes, o ácido ciclopiazônico (CPA) e *A. parasiticus* sintetiza AFB1, AFB2, AFG1 e AFG2, mas não CPA. No entanto, estudos recentes demonstraram que

certas cepas de *A. flavus* também podem sintetizar AFG1 e AFG2. Algumas das culturas mais susceptíveis a contaminação por aflatoxinas se encontram em regiões tropicais e subtropicais do mundo, como milho, arroz, trigo, pistache, nozes, castanha do Brasil, amendoim e caroço de algodão, sendo que a maior parte da exposição humana vem do milho, amendoim e arroz. A contaminação pode ocorrer no campo e após a colheita em condições inadequadas de produção e armazenamento (ADEYEYE, 2016; EFSA, 2007; FAO, 2016; IARC, 2012; PITT; TANIWAKI; COLE, 2013; STEIN; BULBOACĂ, 2017; WU, 2015; YAO; HRUSKA; DI MAVUNGU, 2015).

Segundo Pitt e colaboradores (2013), algumas características próprias das culturas podem influenciar na contaminação pelo fungo. As plantas de amendoim, uma das commodities mais afetadas, têm raízes profundas e, portanto, mais resistência à seca do que muitas outras culturas. Mesmo assim, o estresse provocado pela seca reduz as defesas naturais da planta contra a infecção. Na medida em que a planta murcha e perde a atividade metabólica, em um solo com menor atividade de bactérias, amebas e fungos competidores, são criadas condições para o crescimento de *A. flavus* e *A. parasiticus*. Além disso, a prática usual na colheita, de puxar os arbustos do solo e invertê-los na fileira para permitir a secagem ao sol, leva de 6 a 10 dias e não é rápido o suficiente para evitar a biossíntese de aflatoxina. Ainda, muitas áreas de cultivo e armazenamento de amendoim estão em regiões com alta umidade e contam com instalações de armazenamento inadequadas. Como *A. flavus* e *A. parasiticus* são xerófilos, a biossíntese de aflatoxina continuará a ocorrer se os pisos de armazenamento estiverem úmidos ou se a umidade relativa estiver elevada.

O milho é cultivado em quase todas as zonas temperadas e tropicais quentes o que representa maior risco de estresse hídrico. Além disso, a formação de grãos em espigas no ar torna o milho propenso ao ataque por uma variedade maior de insetos. Com isso, os danos provocados por insetos são mais severos do que no amendoim. As castanhas do Brasil, por sua vez, crescem em árvores altas na bacia amazônica e são cultivadas, em sua maioria, de forma extrativista. As castanhas, que são formadas dentro de vagens, quando maduras, caem no solo da floresta, de onde são colhidas em intervalos mais ou menos regulares. Desta forma, não há evidência de que a infecção por *A. flavus* ocorra na castanha, enquanto ainda está

na árvore, mas sim antes da colheita, no momento em que permanece no solo da floresta (PITT; TANIWAKI; COLE, 2013).

Quando se trata de alimentação animal, além do milho e da soja, também entram na composição o capim, feno, aveia, grãos entre outros. Em um estudo realizado por Variane e colaboradores (2018), em fazendas localizadas no Paraná, foram encontradas cepas de *A. parasiticus* na silagem armazenada e *A. flavus* e *A. nomius* na ração armazenada. Embora tenha sido constatada baixa atividade de água nas amostras, o que não favorece a biossíntese de aflatoxinas, a presença do fungo indica que estes poderiam crescer e sintetizar aflatoxina se a umidade aumentasse. Assim, segundo os autores, a presença das espécies detectadas de *Aspergillus* na silagem e na ração representa um risco potencial à saúde do ser humano e de animais (VARIANE et al., 2018).

A presença de mais de um fungo na mesma colheita também pode interferir na biossíntese de micotoxinas, ocasionando muitas vezes a presença de múltiplas toxinas no alimento. No estudo conduzido por Domenico e colaboradores (2015), a incidência de *Penicillium sp.* e de *Fusarium sp.* em grãos de milho colhidos na safra de inverno, bem como a de *Aspergillus sp.* em grãos colhidos na safra de verão, apresentaram correlação e efeito diretos sobre a ocorrência de aflatoxinas. Esse comportamento pode ser atribuído às diferentes condições meteorológicas, que foram mais propícias à biossíntese de aflatoxinas no armazenamento da safra de verão. Além disso, a competição entre as espécies de fungos também pode ter interferido nos resultados, uma vez que espécies de *Fusarium* são capazes de colonizar rapidamente grãos danificados e reduzir os nutrientes disponíveis a outros fungos, como *A. flavus*.

As condições de crescimento do gênero *Aspergillus* requerem um teor de umidade em equilíbrio de 80 a 85% ou mais e temperaturas de 13 a 42°C com crescimento ótimo entre 25 e 37°C (COPPOCK; DZIWENKA, 2014). Já a biossíntese de aflatoxinas ocorre entre 28°C e 35°C, sendo quase completamente inibida acima de 36°C. Os fatores nutricionais mais extensivamente estudados, que influenciam a produção de aflatoxinas, são as fontes de carbono e nitrogênio. Açúcares simples, como glicose, frutose e maltose, favorecem a formação de aflatoxinas, enquanto os açúcares complexos, como a lactose, inibem essa atividade. A disponibilidade reduzida de fontes de nitrogênio, estresse oxidativo, temperaturas menores que 35°C e pH ácido (em torno de 4,5) são favoráveis, enquanto fontes de nitrogênio

oxidado, presença de antioxidantes, temperaturas maiores que 36°C e pH básico (em torno de 8) são desfavoráveis à biossíntese de aflatoxina. O triptofano reduz, enquanto a tirosina aumenta a produção de AFB1 e AFB2 por *A. flavus*. O triptofano também aumenta a produção de AFB1 e AFG1, enquanto a tirosina diminui a produção de AFG1 e aumenta a produção de AFB1 e AFB2 por *A. parasiticus* (STEIN; BULBOACĂ, 2017).

1.3.3 Ocorrência das aflatoxinas no Brasil e no mundo

Estudos que buscam determinar a exposição a partir da presença da aflatoxina nos alimentos é um desafio por várias razões, incluindo a variedade de alimentos que podem conter essa micotoxina e as dificuldades em estimar os padrões de consumo humano (STEIN; BULBOACĂ, 2017).

Em uma meta-análise representativa de 17 estudos que mediram biomarcadores da exposição à aflatoxina, Liu e colaboradores (2012) estimaram a carga global de câncer induzido por aflatoxina calculando o risco atribuível à população. Segundo o estudo, cerca de 23% de todos os casos globais de câncer de fígado poderiam ser atribuídos à exposição à aflatoxina, incluindo indivíduos HBV positivos e HBV negativos, correspondendo a cerca de 172000 casos de câncer de fígado relacionados à aflatoxina por ano (LIU et al., 2012; WU, 2015).

Na mais recente monografia elaborada pela FAO/OMS, a exposição da população brasileira às aflatoxinas foi estimada com base em informações individuais de consumo alimentar de uma pesquisa realizada pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), no período de 2008 a 2009 e em dados analíticos do Laboratório Central de Saúde Pública do Distrito Federal, referentes ao período de 2002 a 2011. A exposição dietética média foi estimada em 6,6 a 6,8 ng/kg de peso corporal por dia, enquanto a alta em 16,3 a 27,6 ng/kg de peso corporal por dia (JECFA, 2018).

Na União Europeia, em atendimento ao Regulamento (CE) nº 178 de 2002, as autoridades nacionais, o meio acadêmico, as empresas do setor de alimentos e outras partes interessadas são convidados a apresentar à Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (EFSA) dados relativos à ocorrência de contaminantes químicos nos alimentos e rações, incluindo as aflatoxinas. Todos os anos, os resultados, amostrados e analisados no ano anterior, são apresentados à EFSA. Em

2013, de um total de 48181 análises para avaliar aflatoxinas em alimentos e rações, 16636 (34,53%) foram resultados positivos. No período de 2015, de um total de 64099 análises, 17572 (27,41%) foram positivos para aflatoxinas (EFSA, 2016; EFSA; VERNAZZA, 2017).

No Brasil, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), é responsável pelo o Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes (PNCRC) em Produtos de Origem Vegetal e Animal. Segundo dados referentes ao ano safra de 2014/2015, as amostras de milho analisadas encontravam-se em conformidade com a legislação para aflatoxinas. O mesmo não ocorrendo com o amendoim, onde foram encontradas concentrações de até 395 µg/kg para o somatório das aflatoxinas em 6,4% das amostras analisadas, valor bem acima do limite máximo tolerado (LMT) de 20 µg/kg, estabelecido pela Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), n° 07 de 2011 (BRASIL, 2011; 2016).

O milho tem sido uma das commodities mais investigadas quanto à presença de micotoxinas, como as aflatoxinas e toxinas do *Fusarium*. Rocha e colaboradores (2009) avaliaram a ocorrência de fungos e a incidência de fumonisinas e aflatoxinas em grãos de milho em quatro regiões brasileiras. De um total de 200 amostras analisadas, no período de 2004 e 2005, 21 (10,5%) estavam contaminadas com AFB1 e em 16 (76,2%) o total de aflatoxinas estava acima do LMT de 20 µg/kg.

A ocorrência de fungos e aflatoxinas em grãos de milho foi investigada por Bento e colaboradores (2012), em um total de 84 amostras, provenientes de unidades armazenadoras de diferentes municípios das regiões Norte, Sul, Leste e Oeste do estado de Mato Grosso, referente às safras 2009 e 2010. Os resultados mostraram que 21,4% das amostras apresentavam contaminação por aflatoxinas, mas em nenhuma delas o LMT de 20 µg/kg foi atingido, com os níveis de contaminação de AFB1 variando de 1 a 12,2 µg/kg.

Motta e colaboradores (2015) realizaram um estudo sobre a ocorrência de fungos e AFB1 na dieta de bovinos leiteiros em São Paulo. Foram avaliadas 288 amostras de dieta composta por volumoso (silagem de milho, sorgo e cevada úmida) e concentrado (grãos de milho, farelo de soja e caroço de algodão e mistura mineral), de 135 vacas em fazendas produtoras de leite no estado de São Paulo. Dentre os principais gêneros de fungos filamentosos isolados, foram encontrados *Aspergillus* (20,09%), distribuídos em *A. flavus* (79,70%) e *A. parasiticus* (12,94%).

Do total de amostras avaliadas, 89 (30,90%) apresentaram níveis detectáveis de AFB1 com teores variando de 1,68 a 194,51µg/kg.

Em outro estudo, objetivando verificar a ocorrência de aflatoxinas em rações e leite produzidos em propriedades leiteiras do Estado de São Paulo, Oliveira e colaboradores (2010) constataram a presença de AFB1 na ração de todas as propriedades pesquisadas. A frequência de amostras de ração positivas para AFB1 foi de 40% e as concentrações observadas variaram de 1,2 a 19,5 µg/kg. Já a frequência de AFM1 no leite foi de 36,7%, com concentrações de 0,010 a 0,645 µg/L. Os autores observaram ainda que o fornecimento intensivo de rações aos animais, sobretudo nos meses de entressafra (outono e inverno) pode ter contribuído para os níveis de AFM1 encontrados no leite.

O mesmo foi observado por Lindahl e colaboradores (2018), segundo os quais existem variações sazonais nos níveis de AFM1 que podem depender da disponibilidade de capim fresco e do tempo de armazenamento das rações da última colheita, com níveis mais altos de aflatoxinas nas rações durante a estação chuvosa em comparação com a estação seca.

1.4 Aflatoxina M1

1.4.1 Toxicidade

A AFM1 é um importante derivado da AFB1 e pode estar presente no leite de mamíferos, incluindo seres humanos, após a ingestão de alimentos ou ração contaminados com AFB1. Segundo a IARC, há evidências suficientes em animais experimentais para a carcinogenicidade da AFM1, com forte evidência de que age através de um mecanismo relevante de carcinogenicidade, em seres humanos expostos. Sua via metabólica no fígado é a mesma observada na AFB1, porém sua toxicidade seria 10 vezes menor (CASTRO et al., 2013; EFSA, 2007; FAO, 2016; IARC, 2012; SARTORI et al., 2014; STEIN; BULBOACĂ, 2017; YAO; HRUSKA; DI MAVUNGU, 2015).

A conversão da AFB1 em AFM1 envolve a hidroxilação do átomo de carbono terciário do anel das furocumarinas, aumentando a solubilidade em água, permitindo a rápida excreção na urina e no leite. Estudos em animais revelaram que até cerca de 6% da AFB1 ingerida é metabolizada e secretada no leite como AFM1, mas a

taxa de transformação varia entre os animais e sob a influência de fatores como dieta, taxa de digestão e saúde animal (IARC 2012; STEIN; BULBOACĂ, 2017).

A AFM1 é definitivamente citotóxica, assim como a AFB1, em hepatócitos humanos. A toxicidade em curto prazo da AFM1 é semelhante à da AFB1, agindo pelo mesmo mecanismo, ocasionando alterações celulares, tais como alterações nas células do parênquima hepático, dissociação dos ribossomos do retículo endoplasmático rugoso e proliferação do retículo endoplasmático liso, não sendo necessária a ativação do CYP para que a AFM1 exerça efeitos citotóxicos (JECFA, 2018; JECFA, 2001; MARCHESE et al., 2018).

Segundo Gao e colaboradores (2017), a AFM1 poderia ainda estar relacionada a danos em células intestinais, levando a crescente conscientização sobre os efeitos adversos de várias micotoxinas no intestino, incluindo o rompimento da integridade intestinal, através da redução na resistência elétrica transepitelial, mesmo com baixas concentrações de AFM1. Esse dano poderia ser agravado pela presença de outras micotoxinas, como a ocratoxina, comumente encontrada no leite.

Marchese e colaboradores (2018) citam estudos em animais, que relacionam a AFM1 ao câncer intestinal. Essa lesão se mostrou dose dependente e estaria associada à sua ligação às células do trato digestivo, devido à sua polaridade.

1.4.2 Ocorrência da aflatoxina M1 no Brasil e no mundo

A exposição humana à AFM1 ocorre principalmente através do consumo de leite contaminado com aflatoxina, incluindo o leite materno. Essa contaminação com AFM1 tem sido relatada em leite e produtos lácteos de vários países do mundo, dependendo de múltiplos fatores, como estação do ano, condições ambientais, localização geográfica e diversidade dos sistemas agrícolas (FARIAS et al., 2005; IARC, 2002; STEIN; BULBOACĂ, 2017).

Além disso, a forte estabilidade térmica da AFM1 impede sua degradação durante o processamento do leite e produtos lácteos, uma vez que a pasteurização e outros tratamentos térmicos isoladamente mostraram-se pouco eficazes na redução da contaminação (MARCHESE et al., 2018; SANTINI et al., 2013).

No caso do queijo, a AFM1 que migra do leite parece não ser degradada na primeira fase da produção, onde ocorre a transformação em coalhada prensada. Durante a segunda fase de fabricação do queijo, o amadurecimento, algumas

discrepâncias foram encontradas na estabilidade da AFM1, mas, em geral, não apresentou perdas durante o amadurecimento do queijo (JECFA, 2001).

Fernandes e colaboradores (2012) investigaram a distribuição e estabilidade da AFM1 em queijos Minas Frescal, fabricados a partir de leite cru coletado na Universidade de São Paulo, Campus Pirassununga, contaminado com 0,250 e 0,500 ng/mL de AFM1. Após o segundo dia de fabricação foram encontrados níveis de 0,432 a 0,819 ng/g nos queijos. Segundo os autores, nos níveis de contaminação investigados, o teor de AFM1 pode concentrar em até 2,5 vezes os níveis presentes no leite utilizado na fabricação dos queijos, mas abaixo do limite de tolerância para AFM1 em queijos, estabelecido pela Anvisa, de 2,5 µg/kg.

Sharifzadeh e colaboradores (2017) encontraram contaminação em 52% do total de 100 amostras de queijo coletadas diferentes supermercados na província de Isfahan, Irã. Na Turquia, Öztürk Yilmaz e Altinci (2018), constataram a ocorrência em 61,5% do leite e 40% do queijo comercializados na cidade de Sakarya, no período de 2014 a 2015.

Outra grande preocupação diz respeito às fórmulas infantis. Primeiramente porque a matéria prima, que é o leite de vaca, pode estar contaminada e o seu processamento tem demonstrado ser insuficiente para eliminar a micotoxina, segundo, porque este produto está cada vez mais presente na alimentação de lactentes e crianças de primeira infância (ISHIKAWA et al., 2016).

Estudos realizados em vários países têm corroborado essa preocupação. Na Jordânia, os valores encontrados para AFM1 em amostras de fórmula infantil variaram de 0,0165 a 0,2887 µg/kg, sendo que em 85% do total de 20 amostras a concentração de AFM1 foi superior ao teor máximo aceito pela União Europeia e Estados Unidos (0,025 µg/kg) (OMAR, 2016). Akhtar e colaboradores (2017) avaliaram treze marcas de fórmula infantil, disponíveis nos mercados paquistaneses, encontrando contaminação em 53,84% com concentrações variando de 0,006 a 0,108 µg/kg.

Ishikawa e colaboradores (2016) constataram a presença de AFM1 em 7 (43,8%), do total de 16 amostras de fórmula infantil comercializadas na cidade de Londrina, Paraná, com concentrações até 0,046 µg/L. Os autores alertam que a legislação brasileira ainda não estabeleceu níveis máximos de AFM1 para produtos infantis.

Na China, Li e colaboradores (2018) analisaram 1207 amostras de leite cru, utilizadas por fabricantes de fórmula infantil na China. Os resultados mostraram que 56 das 1207 amostras de leite cru (4,64%) foram positivas para AFM1, sem ultrapassar o limite máximo de 0,065 µg/L, permitido na China para fórmula infantil, mas 13 amostras apresentaram concentração acima de 0,025 µg/L, teor máximo na União Europeia. O monitoramento do leite como matéria prima de fórmulas infantis surgiu quando, em setembro de 2008, altas concentrações de melamina foram detectadas nesse produto, o que levou a doenças graves em bebês na China. Desde então, o governo chinês tem prestado mais atenção ao controle da segurança sanitária do leite cru destinado à produção das fórmulas infantis.

A contaminação da AFM1 em leite UHT e pasteurizado, coletados em 25 cidades chinesas, no ano de 2010, foi investigada por Zheng e colaboradores (2013). A AFM1 estava presente em 54,9% das 153 amostras de leite UHT com concentrações de 0,006 a 0,160 µg/L e em 96,2% das 26 amostras de leite pasteurizado, com níveis de concentração de 0,023 a 0,154 µg/L. A ocorrência de AFM1 em todas as amostras positivas foi muito abaixo do limite de 0,5 µg/L, estabelecido na China, mas em 20,3% das amostras de leite UHT e 65,4% das amostras de leite pasteurizado os valores encontrados excedem o limite legal da União Europeia de 0,05 µg/L.

No Irã, todas as 48 amostras de leite de vaca, coletadas na cidade de Kashan, durante o período de outubro a dezembro de 2012, estavam contaminadas com AFM1, com concentrações maiores que o limite da União Europeia, em 20,83% das amostras (MOVASSAGHGHAZANI; GHORBIANI, 2017). Em outro estudo, realizado por Mashak e colaboradores (2016) investigou a presença de AFM1 em 30 amostras de leite aromatizado UHT de várias marcas, coletadas aleatoriamente em supermercados em Karaj, província de Alborz, em outubro de 2013. Considerando que o leite aromatizado é consumido por diversas faixas etárias, mas especialmente por crianças, os resultados, primeiros a serem obtidos em leite aromatizado no Irã, preocupam porque, apesar de terem sido encontradas concentrações até 0,5 µg/L, todas as amostras estavam contaminadas com AFM1.

Em outros países, a presença de AFM1 em diferentes espécies de mamíferos passa a representar risco, na medida em que o leite do animal constitui hábito alimentar do indivíduo. Na Jordânia, estudo objetivando investigar a presença de AFM1 em amostras de leite cru de vaca, ovelha, cabra e camelo, constatou que

todas as 175 amostras coletadas, durante o período de 2014 a 2015, estavam contaminadas com AFM1 variando de 0,0097 a 0,2886 µg/kg (OMAR, 2016).

Na Itália, Santini e colaboradores (2013) realizaram um levantamento objetivando verificar a presença de AFM1 em 73 amostras de leite de diferentes raças de animais e 24 amostras de produtos lácteos, coletados na Sicília, de janeiro a junho de 2012. A AFM1 foi detectada em 48% e 42% das amostras de leite e produtos lácteos, respectivamente.

Entre os estados brasileiros, Santa Catarina é um dos maiores produtores de leite bovino, o que reforça as preocupações com a saúde pública e as consequentes perdas econômicas em decorrência da presença da AFM1 nos alimentos. Assim, Gonçalves e colaboradores (2017) realizaram estudo com o objetivo de determinar AFM1 em 52 amostras de leite bovino fresco, produzido em pequenas propriedades na cidade de Concórdia, Santa Catarina, no período de novembro de 2014 a janeiro de 2015. Conforme os resultados, a presença de AFM1 foi detectada nas 52 amostras analisadas, sendo que 21 (40,4%) estavam acima do LMT permitido pela regulamentação brasileira (0,5 µg/L) e 31 (59,6%) apresentaram níveis superiores ao limite legal na União Europeia (0,05 µg/L).

Igualmente importante no cenário brasileiro, o Paraná ocupa posição de destaque na produção nacional e no consumo de leite. Diante disso, Silva e colaboradores (2015) avaliaram a ocorrência sazonal de AFM1 em 152 amostras de leite integral de vaca, comercializadas na cidade de Maringá. Do total de amostras analisadas, 133 (87,5%) estavam contaminadas com uma média de 0,019 µg/L de AFM1 e 4 amostras (2,6%) exibiam níveis acima do limite estabelecido pela União Europeia 0,05 µg/L. Os autores verificaram ainda que os maiores níveis de contaminação correspondiam às épocas de inverno e outono.

Em outra grande região produtora, o estado de São Paulo, Santili e colaboradores (2015) realizaram um estudo, objetivando avaliar a ocorrência e distribuição de AFM1 em leite cru de vaca produzido por 45 fazendas leiteiras, localizadas em três regiões produtoras de leite do estado. Do total de 635 amostras, a AFM1 foi detectada em 72,9%, 56,3% e 27,5% das amostras provenientes das regiões de Bauru, Araçatuba e Vale do Paraíba, respectivamente. A contaminação média por AFM1 considerando todas as amostras foi de 0,021 µg/L. Apenas três amostras (0,5%) apresentaram níveis de contaminação acima do LMT no Brasil, de

0,50 µg/L, e 64 amostras (10,1%) apresentaram contaminação acima do limite legal pela União Europeia, de 0,05 µg/L.

Oliveira e colaboradores (2006) avaliaram a ocorrência simultânea de AFM1 e CPA em 48 amostras de leites pasteurizados tipo A, B e C, além de leite UHT, comercializados em São Paulo, de julho a dezembro de 2004. De acordo com os resultados, 37 (77,1%) amostras foram positivas para AFM1, com níveis de 0,011-0,251 µg/L, abaixo do LMT para AFM1. O CPA foi detectado em 2 amostras (4,2%) de leite tipo A, em níveis de 6,4 e 9,7 µg/L. Mais recentemente, no estudo que Iha e colaboradores (2013) realizaram em Ribeirão Preto, São Paulo, a AFM1 foi detectada em 83% das amostras de leite com níveis variando de 0,008 a 0,437 µg/L para leite fluido e 0,020 a 0,760 µg/kg para leite em pó.

Em Minas Gerais, Oliveira e colaboradores (2013) determinaram a ocorrência de AFM1 em 75 amostras de leite UHT, coletadas no estado. Os resultados mostraram que do total de amostras coletadas, 23 (30,7%) apresentaram AFM1 e todas em níveis superiores ao LMT para leite fluido no país.

1.4.3 Regulamentação e monitoramento

O foco nas micotoxinas tem sido uma prioridade da FAO e da OMS, devido a seus impactos toxicológicos significativos na saúde humana e animal. Conseqüentemente, em várias partes do mundo foram adotados limites rigorosos em uma ampla gama de alimentos, sendo os limites praticados pela União Europeia os mais restritos. No entanto, isso não é suficiente para a garantia da segurança alimentar. Em muitos países, onde a legislação é frequentemente aplicada apenas aos produtos destinados à exportação, o consumo interno de alimentos contaminados com micotoxinas se torna um risco significativo, especialmente em populações rurais e subgrupos como crianças e pessoas imunocomprometidas (MEDINA et al., 2017).

O risco de exposição à AFM1 em leite e produtos lácteos é uma preocupação mundial, uma vez que estes produtos são largamente consumidos, especialmente por crianças, que são consideradas um grupo de consumidores mais suscetíveis aos efeitos adversos das micotoxinas do que os adultos (SANTINI et al., 2013). A avaliação de risco na segurança alimentar deve ser direcionada a todos os grupos

populacionais, com uma atenção especial para aqueles identificados como potencialmente mais vulneráveis (FRAZZOLI et al., 2016).

As avaliações de risco de micotoxinas em alimentos feitas pelo JECFA são usadas por governos e pela Comissão do Codex Alimentarius (CODEX), para estabelecer níveis máximos em alimentos ou fornecer direcionamentos sobre gestão de risco visando controlar ou prevenir a contaminação. O Código elaborado pelo CODEX, por sua vez, é uma compilação de padrões internacionais harmonizados, diretrizes e códigos de prática, desenvolvidos com a participação conjunta de especialistas independentes e a participação de 188 membros representando mais de 99% da população mundial. Coletivamente, visam proteger a saúde do consumidor e promover práticas justas no comércio de alimentos (FAO; WTO, 2017).

Até o final da década de 1990, as regulamentações sobre micotoxinas eram, principalmente, de competência de cada país. Gradualmente, vários blocos econômicos (por exemplo, União Europeia, Mercosul, Austrália e Nova Zelândia) seguiram a tendência de harmonização de regulamentos sobre as micotoxinas, anulando ou complementando as regulamentações nacionais existentes. Com o tempo, os regulamentos foram se baseando cada vez mais em pareceres científicos de órgãos competentes, como JECFA e a EFSA (FREIRE et al., 2007; STEIN; BULBOACĂ, 2017; VAN EGMOND; SCHOTHORST; JONKER, 2007).

Embora nem todos os países possuam recursos, capacidades ou dados científicos suficientes para realizar avaliações de risco, existem os dados e conhecimentos consistentes com as abordagens internacionalmente aceitas. As avaliações de risco realizadas a nível internacional pelo JECFA e por outros organismos especializados, assim como as normas do CODEX, são particularmente úteis. Cabe aos países, que não possuem infraestrutura suficiente, adotar uma abordagem pragmática e desenvolver um quadro de cientistas capazes de interpretar esses dados e avaliações para o desenvolvimento de programas nacionais, visando monitorar a presença de contaminantes em alimentos (WHO/FAO, 2003).

A presença de contaminantes é sempre indesejável nos alimentos, mas em muitos casos inevitável. Assim, para as aflatoxinas, a União Europeia aplicou o princípio “tão baixo quanto razoavelmente possível” em 1998, adotando níveis máximos rigorosos em concentrações tão baixas quanto razoavelmente possível. Os teores máximos harmonizados de aflatoxinas existem na União Europeia desde

Janeiro de 1999 e constam no Regulamento da Comissão Europeia (CE) n° 1881 de Dezembro de 2006, alterado pelos Regulamentos (UE) n° 165/2010 e 1058/2012. No caso do leite e produtos lácteos, foi estabelecido o limite legal de 0,05 µg/kg e fórmulas infantis de 0,025 µg/kg, para AFM1 (COMUNIDADE EUROPÉIA, 2006; EFSA, 2007).

Alguns países da África, Ásia e América Latina também adotam o limite máximo de 0,05 µg/kg para o leite. No Marrocos, além desse limite para o leite, foi estabelecido 0,03 µg/kg para produtos destinados a crianças menores de 3 anos. A Áustria e Suíça adotam o menor limite para alimentos infantis, 0,01 µg/kg. Na Síria, o limite máximo aceitável de AFM1 no leite é de 0,20 µg/kg. Irã, China, Coreia, Estados Unidos, Brasil e outros países seguem o estabelecido pelo CODEX desde 2001, de 0,50 µg/L, para o leite (BRASIL, 2011; EFSA, 2004; OLIVEIRA et al., 2013).

No Brasil, a competência para legislar sobre "proteção e defesa da saúde" é da União, dos Estados, do Distrito Federal e dos Municípios, mas cabe à União apenas o estabelecimento de normas gerais sobre o assunto. Os Estados são competentes para suplementar a legislação posta pela União, e finalmente, cabe aos Municípios legislar sobre todos os assuntos de interesse local, com autonomia para estabelecer e aprovar seus atos administrativos, como no caso da Vigilância Sanitária Municipal (TANCREDI; MORAES; MARIN, 2004).

A vigilância sanitária constitui uma instância social de mediação entre a produção de bens e serviços e a saúde da população. Compete-lhe avaliar riscos e executar um conjunto de ações para prevenir, minimizar e eliminar riscos à saúde, bem como estabelecer regulamentos técnico-sanitários e fazer cumprir estes e as normas jurídicas, que fixam as regras para os comportamentos relacionados com os objetos sob vigilância sanitária (COSTA, 2009).

Nesse sentido, a estrutura de regulamentação sanitária no país ganha impulso com a criação da ANVISA, pela Lei n° 9.782, de 26 de janeiro 1999. Além da atribuição regulatória, a ANVISA passa a ser responsável pela coordenação do Sistema Nacional de Vigilância Sanitária, de forma integrada a outros órgãos públicos relacionados direta ou indiretamente ao setor saúde, como o MAPA. Essa integração tem se mostrado importante para a atuação dos órgãos responsáveis pela regulação do sistema de produção, bem como para fortalecer a atividade de inspeção sanitária pelos serviços de Vigilância Sanitária, estaduais e municipais (SPISSO; NÓBREGA; MARQUES, 2009).

No Município do Rio de Janeiro, conforme o Artigo 58 do Decreto Rio Nº 45585 de 27 de dezembro de 2018, que regulamenta o Código de Vigilância Sanitária, Vigilância de Zoonoses e de Inspeção Agropecuária, no âmbito do Município do Rio de Janeiro, instituído pela Lei Complementar nº 197, de 27, de dezembro de 2018, em seu Art. 55, “os alimentos, produtos alimentícios, bebidas, água, produtos comestíveis de origem animal e vegetal, quando se apresentarem manifestadamente impróprios para o consumo humano e animal deverão ser apreendidos e inutilizados pela autoridade sanitária no ato da inspeção, sem prejuízo das demais penalidades cabíveis”. Pelo Código, são considerados impróprios os produtos proibidos após condenação definitiva por análise laboratorial, encontrados em uso ou comercialização. De acordo com o Art. 57, compete à autoridade sanitária realizar a colheita de amostras de produtos e bens de consumo de interesse sanitário, para efeito de análise fiscal (PCRJ, 2018).

A legislação brasileira para micotoxinas, com base nos conhecimentos então disponíveis, foi inicialmente estabelecida através da Resolução nº 34 de 1977, elaborada pela Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos (CNPAA), que fixou limites de tolerância para as aflatoxinas em alimentos, sendo de 30 µg/kg para a soma das frações B1 e G1 em qualquer tipo de alimento (BRASIL, 1977; OLIVEIRA; GERMANO, 1997).

Alguns anos após, os produtos especificamente destinados à alimentação humana foram normatizados pela Resolução ANVISA RDC nº 274, de 2002, que aprovou o “Regulamento Técnico Sobre Limites Máximos de Aflatoxinas Admissíveis no Leite, no Amendoim e no Milho” e internalizou os limites do Mercado Comum do Sul (MERCOSUL). Para os demais alimentos, permaneceria vigente a Resolução CNPAA nº 34 de 1977 (BRASIL, 2002; SPISSO; NÓBREGA; MARQUES, 2009).

Em 2011, com a Resolução ANVISA RDC nº 07, de 18 de fevereiro de 2011, que aprova o Regulamento Técnico sobre LMT para micotoxinas em alimentos, o Brasil ampliou seu monitoramento, aproximando-se das recomendações mundiais, contribuindo para a segurança alimentar da população brasileira e a aceitação dos produtos brasileiros no comércio exterior. Os limites estabelecidos nessa norma, para AFM1, são 0,5 µg/L no leite fluido e 5,0 µ/kg no leite em pó. É importante destacar que não há LMT para AFM1 em fórmulas infantis, mas sim o LMT de 1,0 µg/kg do somatório de AFB1, AFB2, AFG1 e AFG2 (BRASIL, 2011b).

Como visto, o panorama mundial em torno do monitoramento da AFM1 no leite se apresenta delimitado a dois principais limites, o estabelecido pelo CODEX e o da União Europeia. Segundo o JECFA, mesmo dispondo de métodos mais modernos de análise, possibilitando determinar a AFM1 em concentrações bem abaixo de 0,05 µg/kg, os resultados da análise de estudos realizados em vários países mostraram que, no pior cenário, os riscos projetados para câncer de fígado são muito pequenos, tanto nos locais onde o limite é de 0,05 µg/kg, quanto 0,5 µg/kg. Assim, o Comitê concluiu que é improvável que a redução dos limites de AFM1 produza uma redução observável nas taxas de câncer de fígado. Entretanto, os portadores do vírus da hepatite B, principalmente em países menos desenvolvidos, podem se beneficiar de uma redução na concentração de aflatoxinas em sua dieta, e a redução também pode oferecer alguma proteção aos portadores do vírus da hepatite C (JECFA, 2001; WHO/FAO, 2018).

Uma variedade de fatores pode afetar a promulgação dos limites e regulamentações das micotoxinas. Dentre eles, destacam-se a disponibilidade de dados toxicológicos e de exposição às micotoxinas, a legislação em outros países com os quais existem contatos comerciais e a disponibilidade de métodos analíticos. Métodos analíticos confiáveis devem estar disponíveis para permitir a aplicação dos regulamentos (VAN EGMOND; SCHOTHORST; JONKER, 2007).

1.4.4 Métodos utilizados para a determinação de aflatoxina M1 no leite

A seleção de um método analítico depende de fatores como o analito de interesse e a matriz em que se encontra, uma vez que seu desempenho pode ser influenciado pela composição química do alimento (efeito matriz). Vários métodos têm sido propostos para triagem, inspeção e controle de micotoxinas em alimentos, muitos inclusive já foram validados em estudos promovidos por organizações como a AOAC, CEN, Sociedade Americana de Químicos de Óleo, Associação Americana de Químicos de Cereais e União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC) (TEIXEIRA, 2008).

A maioria desses métodos é baseada em cromatografia e métodos imunoenzimáticos. Podem ser classificados como métodos de triagem ou quantitativos. Os métodos de triagem geralmente são rápidos, de fácil execução e

economicamente viáveis. Já os quantitativos são capazes de produzir resultados com exatidão e precisão aceitáveis (OLIVEIRA, 2010).

A cromatografia em camada delgada (CCD) tornou-se a primeira técnica capaz de detectar e quantificar aflatoxinas em alimentos em níveis baixos. As aflatoxinas são identificadas e estimadas visualmente sob a luz ultravioleta ou quantificadas por densitometria, conforme a intensidade de fluorescência dos pontos de aflatoxina (EFSA, 2007).

Os avanços em biotecnologia e nos métodos de automação para detecção de micotoxinas possibilitaram o desenvolvimento de técnicas imunoenzimáticas, que estão disponíveis comercialmente desde meados da década de 1970. Essas técnicas constituem imunoensaaios os quais envolvem interações entre micotoxinas e anticorpos específicos contra homólogos de micotoxinas. Os dois tipos mais utilizados em análises de micotoxinas são enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) e radioimunoensaaios. Esses ensaios passaram a ser utilizados, principalmente como triagem para determinação de contaminantes. No entanto, têm de seguir um protocolo rigoroso, dependendo do tipo de amostra e dos solventes utilizados, caso contrário, os compostos da matriz, bem como o uso de solventes inadequados, podem influenciar a ligação das aflatoxinas ao anticorpo, levando a resultados falso-negativos ou falso-positivos. O ELISA é um método com elevada sensibilidade, rapidez e simplicidade, já que, muitas vezes, não são necessárias as etapas de extração e purificação, além de possuir alta precisão e ótima recuperação (EFSA, 2007; HASHEMI, 2016; SOUZA; VARGAS; JUNQUEIRA, 1999).

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) começou a ser utilizada no final dos anos 60, mas foi com os avanços no método na década de 1980 que os laboratórios foram se afastando da determinação por CCD. Além disso, foram introduzidos cartuchos para extração em fase sólida (EFS) o que culminou no desenvolvimento de métodos combinando a EFS com a CLAE. Originalmente desenvolvido para CLAE de fase normal, o método foi posteriormente modificado para fase reversa e avaliado em um estudo colaborativo, tornando-se o método oficial da AOAC 986.16 (JECFA, 2001; LI et al., 2011). Mais recentemente, o uso de colunas de imunoafinidade (CIA) se tornou um dos mais bem sucedidos métodos analíticos usados para isolamento de aflatoxinas em alimentos (EFSA, 2007).

Segundo Dragacci e colaboradores, a metodologia para a determinação da AFM1 no leite melhorou acentuadamente com a aplicação da CIA, combinando a

etapa de extração e limpeza. No entanto, os métodos anteriormente utilizados, que envolviam extração líquido-líquido ou EFS, seguida de coluna de sílica gel ou outro método para limpeza, foram elaborados com base em estudos colaborativos e ainda existem como métodos oficiais da AOAC para a AFM1 em leite líquido e em pó (DRAGACCI; GROSSO; GILBERT, 2001).

A CCD e a CLAE constituem, há alguns anos, as técnicas oficiais e convencionais para separação, detecção e quantificação de AFM1 em extratos de leite. São compostas pelas etapas de extração, purificação, separação, detecção, quantificação e confirmação (OLIVEIRA, 2010; TEIXEIRA, 2008). Dentre as micotoxinas de maior ocorrência nos alimentos, as aflatoxinas podem estar presentes e exercer seus efeitos tóxicos mesmo em quantidades extremamente pequenas. Por isso mesmo, a sua identificação e sua quantificação geralmente requerem amostragem específica e métodos de extração e detecção sensíveis e eficientes (WHO/FAO, 2017).

A amostragem pode ser considerada uma etapa crítica no processo de análise. Agências internacionais e nacionais, incluindo a União Europeia e o CODEX, estabelecem planos de amostragem para uma variedade de commodities. Cada plano de amostragem especifica o tamanho do lote (no caso de lotes muito grandes, um sublote representativo é especificado), o tamanho da amostra agregada e o número mínimo de amostras incrementais (TURNER et al., 2015).

No laboratório, a amostragem desempenha um papel fundamental na determinação exata do teor de AFM1, independente de como a micotoxina está distribuída nos lotes (COMISSÃO EUROPEIA, 2006). Se a alíquota obtida da amostra de ensaio não for representativa do material original, não será possível relacionar o resultado analítico ao material original, não importando a qualidade do método e nem o cuidado para realização da análise (ANVISA, 2004).

Segundo o Regulamento (CE) 401/2006, da União Europeia, o método de amostragem para leite e produtos lácteos, fórmulas para lactentes e fórmulas de transição, incluindo leite para bebês e leite de transição deve prever uma amostra de, no mínimo, 1 kg ou 1 litro, a menos que não seja possível, como no caso de uma única embalagem com menor volume, por exemplo (COMISSÃO EUROPEIA, 2006).

A extração é realizada na alíquota obtida da amostra de ensaio, da qual várias substâncias presentes na matriz são extraídas junto com o analito, sendo necessária uma etapa posterior de limpeza para remoção dos possíveis

interferentes. Os principais procedimentos para limpeza são a partição líquido-líquido, a precipitação com adição de sais metálicos, o uso de cartuchos de EFS e as CIA (TEIXEIRA, 2008).

Os cartuchos EFS como etapa de extração e purificação ou a CIA para limpeza e isolamento das micotoxinas, associadas à CLAE seguida de detector por fluorescência (CLAE-DFL) ou espectrômetro de massa estão entre as ferramentas mais utilizadas para a determinação quantitativa de micotoxinas (JECFA, 2001; OLIVEIRA, 2010; RAHMANI; JINAP; SOLEIMANY, 2010; WHO/FAO, 2017).

A CIA é muito utilizada para determinação de poucos ou apenas um analito, particularmente em amostras complexas que podem conter potenciais interferentes. Estas colunas são compostas por anticorpos monoclonais específicos para o analito (antígeno) como, por exemplo, a AFM1. No entanto, quando se utiliza CIA, alguns fatores devem ser observados para não interferir na recuperação do analito de interesse, como a especificidade do anticorpo e a capacidade da coluna ou quantidade de sítios de anticorpos, que deve ser considerada para não ocorrer sobrecarga nos sítios e menor recuperação (LI et al., 2011; OLIVEIRA, 2010).

Além desses fatores, a acessibilidade do antígeno ao anticorpo também pode interferir na recuperação do analito, e está relacionada ao fluxo da amostra através da CIA. Altos fluxos não são recomendados, por dificultar a ligação do analito ao sítio de ligação, comprometendo sua recuperação (OLIVEIRA, 2010).

Mais recentemente, alguns pesquisadores têm realizado ensaios para determinação multirresíduos utilizando o método para pré-tratamento da amostra chamado QuEChERS, abreviatura de “Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged e Safe” (ANJOS et al., 2016; SARTORI et al., 2014; SIRHAN et al., 2014). O método envolve a extração dos analitos com solvente (acetonitrila), seguida da adição de sais (cloreto de sódio e sulfato de magnésio), que promovem a remoção de proteínas e outras substâncias interferentes para a fase aquosa. Em seguida, há uma etapa de purificação com a utilização de cartuchos de EFS dispersiva e a injeção no cromatógrafo (ANJOS et al., 2016).

A cromatografia, por sua vez, é um método físico-químico de separação, fundamentado na migração diferencial dos componentes de uma mistura, que ocorre devido a diferentes interações entre duas fases imiscíveis, a fase móvel e a fase estacionária. Com a redução do diâmetro da partícula de empacotamento das colunas cromatográficas (fase estacionária), foi possível se obter uma melhor

performance em termos de resolução, quantificação e detecção em um menor tempo de análise. Além disso, técnicas como a espectrometria de massa acoplada à CLAE ou à cromatografia líquida de ultra-alta performance, melhoraram a sensibilidade e seletividade para as micotoxinas, possibilitando ainda determinar múltiplos analitos na mesma matriz (HAN et al., 2010; SARTORI et al., 2015; TEIXEIRA, 2008).

Estudo colaborativo, conduzido por Dragacci e colaboradores (2001), contando com 12 colaboradores em 12 países europeus, avaliou a eficácia de um método para determinação de AFM1 em leite nos limites regulatórios propostos, utilizando CIA para isolamento da aflatoxina e CLAE-DFL para sua identificação e quantificação. Os resultados obtidos pelos autores possibilitaram a indicação do método para análise de AFM1 em leite líquido, em concentrações maiores que 0,02 µg/L. O estudo se tornou bastante relevante, uma vez que o método AOAC existente até então não tinha sido testado em concentrações menores que 0,08 µg/L e desde 1999 o limite de AFM1 passou a ser de 0,05 µg/L (DRAGACCI; GROSSO; GILBERT, 2001).

1.5 Procedimento para validação de método analítico

1.5.1 Confiabilidade no desenvolvimento e aplicabilidade de métodos

O desenvolvimento e a aplicabilidade de métodos devem priorizar a confiabilidade e a simplicidade, pois afetarão a qualidade e quantidade de dados gerados, além da praticidade das medidas finais tomadas. A necessidade de se mostrar a qualidade de medições químicas, através de sua comparabilidade, rastreabilidade e confiabilidade, está sendo cada vez mais reconhecida e exigida. Dados analíticos não confiáveis podem conduzir a decisões desastrosas e a prejuízos financeiros irreparáveis (RIBANI et al., 2004; VAN EGMOND; SCHOTHORST; JONKER, 2007).

A confiabilidade dos dados pode ser obtida pelo uso de métodos validados, como os da AOAC e os padronizados pelo CEN. Os requisitos para esses métodos foram ditados pelas necessidades impostas pelas regulamentações ou para a combinação de micotoxinas e matrizes as quais ainda não havia regulamentação, mas a comunidade científica viu a necessidade para fins de vigilância. Os métodos da AOAC são referidos como métodos oficiais na legislação sobre micotoxinas em

muitos países. Os métodos do CEN, embora não sejam obrigatórios, podem ser usados na União Europeia para fins oficiais de controle de alimentos, pois suas características de desempenho atendem aos critérios estabelecidos para amostragem e análise (VAN EGMOND; SCHOTHORST; JONKER, 2007).

O processo de padronização das atividades dos laboratórios de ensaio e calibração teve início com a publicação, pela Organização Internacional para Padronização (ISO) e Comissão Eletrotécnica Internacional (IEC), da ISO/IEC Guia 25 em 1978, revisado em 1992. Na Europa a norma utilizada para reconhecer a competência dos ensaios e calibrações realizados pelos laboratórios era EN 45001:1989, elaborada sob forte influência da norma ISO 9000 (IAL, 2008).

Tanto a ISO/IEC Guia 25 como a EN 45001 continham aspectos cujos níveis de detalhamento eram insuficientes como, por exemplo, o conteúdo mínimo a ser declarado na política da qualidade do laboratório, a rastreabilidade das medições, as operações relacionadas às amostragens e o uso de meios eletrônicos (IAL, 2008).

Para suprir essas lacunas, a ISO iniciou em 1995 os trabalhos de revisão da ISO Guia 25, resultando na publicação da norma ISO/IEC 17025 – Requisitos gerais para a competência de laboratórios de ensaio e calibração, oficialmente datada de 15 de dezembro de 1999 e publicada internacionalmente no início do ano 2000. No Brasil, foi publicada pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) como NBR/ISO/IEC 17025, em janeiro de 2001, atualizada em 2017 (IAL, 2008; ABNT, 2017).

Segundo a ISO/IEC 17025, normas internacionais, nacionais, regionais ou outras especificações reconhecidas que contenham informações suficientes e concisas sobre como realizar atividades laboratoriais não precisam ser complementadas ou reescritas como procedimentos internos, caso estas normas tenham sido escritas de forma que possam ser usadas pelo pessoal operacional em um laboratório. No entanto, um laboratório deve validar métodos que ainda não são padronizados, métodos desenvolvidos e métodos utilizados fora do escopo pretendido ou modificados de outra forma (ABNT, 2017).

1.5.2 Parâmetros para validação

A validação é um estudo experimental e documentado que objetiva demonstrar que o procedimento analítico é adequado à finalidade proposta, de

forma a assegurar a confiabilidade dos resultados obtidos. É essencial que a validação seja realizada sobre o procedimento analítico exatamente da forma que ele será executado na rotina do laboratório, observando a faixa de concentração do analito e matrizes aos quais ele é aplicado (BRASIL, 2011a; THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2002).

No Brasil, os dois órgãos que orientam a validação de métodos analíticos são a ANVISA e o Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO) (RIBEIRO et al., 2008).

Segundo o INMETRO (2018), com o objetivo de confirmar que os métodos são apropriados para o uso pretendido, o laboratório deve validar métodos que não estejam normalizados, que foram criados ou desenvolvidos pelo próprio laboratório, métodos normalizados, mas que foram usados fora dos escopos concebidos, ampliações e modificações de métodos normalizados.

Devem ser realizadas algumas verificações, para garantir que as características de desempenho de um método sejam entendidas e para demonstrar que o método seja cientificamente coerente, nas condições em que será aplicado (ANVISA, 2004).

Durante a validação do método, para que as características de desempenho sejam atendidas dentro da faixa de concentração estabelecida, são utilizadas amostras enriquecidas ou materiais de referência certificados. Isso deve incluir o nível mais baixo para o qual os resultados serão relatados e os níveis máximos legislativos. Além disso, deve ser observada a ausência de resultados falso-positivos para amostras em branco (COMISSÃO EUROPEIA, 2016).

A AOAC (2016) preconiza para métodos quantitativos, aplicados a contaminantes ou elementos traço, considerando a validação por um único laboratório, a avaliação dos parâmetros relativos à faixa de trabalho, linearidade, precisão, recuperação e limite de quantificação (AOAC, 2016).

Para a ANVISA e o INMETRO, os parâmetros de validação devem estar claramente declarados no procedimento documentado e incluir, quando aplicável: seletividade, linearidade, faixa de trabalho e faixa linear, limite de detecção, limite de quantificação, tendência ou recuperação, precisão (repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade) e robustez (ANVISA, 2004; INMETRO, 2018).

1.5.2.1 Seletividade

A Seletividade é o grau em que o método pode quantificar o analito na presença de outros analitos, matrizes ou de outro material potencialmente interferente. Um método que produz respostas para vários analitos, mas que pode distinguir a resposta de um analito da de outros, é chamado seletivo. Se a seletividade não for assegurada, a linearidade e a precisão estarão seriamente comprometidas. Experimentos para avaliação da seletividade descritos na literatura sobre validação de métodos analíticos envolvem ensaios com padrões ou materiais de referência, amostras com e sem o analito, além da avaliação da capacidade de identificação do analito de interesse na presença de interferentes (INMETRO, 2018).

Segundo o INMETRO (2018), é necessário verificar a existência do efeito matriz, onde componentes da amostra podem interferir no desempenho da medição e conseqüentemente na seletividade do método (INMETRO, 2018).

Entretanto, no método proposto para o presente estudo a amostra é extraída e limpa passando através de uma CIA contendo anticorpos específicos que se ligam seletivamente com qualquer aflatoxina M1 (antígeno) contida no extrato, para formar um complexo anticorpo-antígeno. Os demais componentes da matriz são então lavados da coluna com água.

1.5.2.2 Linearidade

A Linearidade de um procedimento analítico é definida pelo INMETRO (2018) como a habilidade em se obter resultados diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra. É obtida pela curva de calibração, realizada por padronização interna ou externa e formulada como expressão matemática, denominada equação da reta (equação 1), utilizada para o cálculo da concentração do analito a ser determinado na amostra real (INMETRO, 2018).

$$y = a + bx \tag{1}$$

Onde:

y: resposta medida (sinal instrumental como absorvância, altura ou área do pico, etc.);

x: concentração;

a: coeficiente linear (interseção com o eixo y, quando x = 0);

b: coeficiente angular (inclinação da curva analítica = sensibilidade).

Segundo Thompson e colaboradores (2002), para realizar a curva de calibração deve haver seis ou mais níveis de concentração do padrão, uniformemente espaçados na faixa de concentração de interesse, cujo intervalo deve abranger 0-150% ou 50-150% da concentração provável de ser encontrada. Os padrões de calibração devem ser analisados pelo menos em duplicata e, de preferência, em triplicata ou mais, em ordem aleatória.

A ANVISA, por sua vez, preconiza que a relação linear deve ser avaliada em toda a faixa estabelecida para o método, devendo-se utilizar, no mínimo, cinco concentrações diferentes do padrão de referência para as soluções preparadas em, no mínimo, triplicata (BRASIL, 2017).

A linearidade de um método deve ser avaliada por meio de testes estatísticos, e não somente por meio do gráfico dos resultados em função da concentração do analito. Antes de concluir a regressão linear, deve ser verificada a ausência de valores aberrantes (em inglês, outliers), pelo teste de Grubbs ou com base nos resíduos padronizados Jack-Knife, para cada nível de concentração. Outro teste estatístico para avaliar a linearidade, o teste F, também conhecido como F-Snedecor, permite a análise da variância (ANOVA) da regressão. Por fim, é importante verificar a homocedasticidade, igualdade ou homogeneidade das variâncias dos resíduos dos dados, pelos testes de Cochran, de Levene ou de Brown-Forsythe (INMETRO, 2018).

Se o sistema for homocedástico, o cálculo da equação da regressão linear simples se baseia no método dos mínimos quadrados ordinários não ponderados. Caso seja heterocedástico, o cálculo utiliza o método dos mínimos quadrados ordinários ponderados. Vale ressaltar que procedimentos analíticos inadequados ou realizados com pouco rigor podem influenciar esse comportamento. O recomendado é investigar essa situação e aplicar ações corretivas pertinentes, porque o método pode apresentar comportamento homocedástico novamente (INMETRO, 2018).

Portanto, ao avaliar a linearidade, consideram-se os dados relativos à representação gráfica das respostas em função da concentração do analito; gráfico de dispersão dos resíduos, acompanhado de sua avaliação estatística; equação da reta de regressão, estimada pelo método dos mínimos quadrados; avaliação da associação linear entre as variáveis por meio dos coeficientes de correlação (r) e de determinação (r^2); avaliação da significância do coeficiente angular (BRASIL, 2017).

1.5.2.3 *Faixa de trabalho*

A Faixa de trabalho é o intervalo entre a menor concentração e a maior concentração de analito na amostra para o qual se demonstrou que o procedimento analítico tem um nível aceitável de precisão, exatidão e linearidade. Faixa linear de trabalho é por inferência a faixa de concentração do analito em que os resultados do método são proporcionais à concentração do analito (INMETRO, 2018). No estudo destinado à validação de metodologia ganha relevância o intervalo validado, ou seja, parte do intervalo de concentração de um método analítico que foi submetido à validação e, portanto, o intervalo de concentração do analito dentro do qual o método pode ser considerado como validado. Embora a calibração possa cobrir uma ampla faixa de concentração, o restante da validação (e geralmente uma parte muito mais importante em termos de incerteza) poderá cobrir um intervalo mais restrito (THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2002).

1.5.2.4 *Limites de detecção e quantificação*

O limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ) são parâmetros chave, que caracterizam o desempenho de métodos que utilizam baixas concentrações. Cabe ressaltar que as estimativas de LD e LQ podem ser influenciadas pelas matrizes cobertas pelo método analítico. Por isso, eles precisam ser determinados para cada matriz. (WENZL et al., 2016).

O LD de um procedimento analítico individual é a menor quantidade de analito na amostra que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada sob as condições estabelecidas para o ensaio. O LQ é a menor quantidade do analito na amostra que pode ser quantitativamente determinada com precisão e exatidão aceitáveis (BRASIL, 2017; INMETRO, 2018).

Os dados gerados durante a validação do desempenho do método, na faixa de concentração relevante para fins de controle, podem não ser adequados para a estimativa desses limites, pois a diferença nas concentrações entre eles e a faixa de trabalho do método poderia levar a estimativas pouco realistas. Portanto, os experimentos para estimar LD e LQ devem ser conduzidos em níveis de concentração próximos ao esperado, com base em conhecimento especializado e experiências obtidas em experimentos anteriores (WENZL et al., 2016).

Dentre os modos de se calcular o LD e o LQ estão a relação sinal/ruído e as estimativas a partir da curva analítica, pelo desvio padrão do branco e por meio de curva de desvios padrão (INMETRO, 2018; WENZL et al., 2016).

A relação sinal/ruído é frequentemente aplicada em métodos analíticos que exibem ruído de linha de base. O ruído da linha de base próximo ao tempo de retenção do analito é medido e a concentração do analito que produziria um sinal igual a um valor definido da relação sinal/ruído é estimada. A potência de ruído pode ser medida manualmente no cromatograma ou com um processo automatizado pelo software do instrumento. Uma relação sinal-ruído de 3 é geralmente aceita para estimar LD e de 6 a 10 para estimar LQ (WENZL et al., 2016).

Segundo a ANVISA, para a determinação baseada em parâmetros da curva analítica, o LD e o LQ podem ser calculados em função do desvio padrão (DP) obtido de três formas: a partir do intercepto com o eixo Y de, no mínimo, 3 curvas de calibração construídas, contendo concentrações do analito próximas ao suposto limite de detecção; do desvio padrão residual da linha de regressão; da estimativa de ruído proveniente da análise de um apropriado número de amostras do branco, através das equações 2 e 3 (BRASIL, 2017):

$$LD = (3,3 \times DP) / IC \quad (2)$$

$$LQ = (10 \times DP) / IC \quad (3)$$

Onde:

DP – desvio padrão

IC – inclinação da curva

O Regulamento (UE) 333/2007 define o LD como 3 vezes o DP da média das determinações em branco e LQ como seis ou dez vezes o DP da média das determinações em branco, ou de forma simplificada o LQ corresponde a 3,3 vezes o LD (COMISSÃO EUROPEIA, 2007; WENZL et al., 2016).

No campo dos elementos químicos devem-se priorizar as estimativas com base em amostras em branco, mas em alguns casos, como das micotoxinas, essas amostras podem nem sempre estar disponíveis. Como alternativa, amostras com baixa contaminação podem ser usadas. A homogeneidade das variâncias dos sinais dessas amostras em branco e com baixa concentração, é assumida. No entanto, as concentrações do analito em amostras com baixa contaminação devem ser iguais ou

na mesma faixa de concentração dos LD estimados, não excedendo 5 vezes o nível de seus respectivos LD estimados (WENZL et al., 2016).

Por outro lado, se houver evidência de que as análises não são afetadas nem por efeitos de matriz nem por interferências, os padrões de calibração puros em solvente podem ser usados para o cálculo do LD (WENZL et al., 2016).

1.5.2.5 Ensaio de recuperação

O ensaio de recuperação do analito, uma das formas de se avaliar a tendência do método, pode ser realizado pela análise de amostras fortificadas com quantidades conhecidas do mesmo. As amostras podem ser fortificadas com o analito em pelo menos três diferentes concentrações (baixa, média e alta) da faixa de uso do método. A recuperação é calculada segundo a equação 4 (INMETRO, 2018).

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{(C_1 - C_2)}{C_3} \times 100 \quad (4)$$

Onde:

C₁: concentração do analito na amostra fortificada.

C₂: concentração do analito na amostra não fortificada.

C₃: concentração do analito adicionado à amostra fortificada.

É importante que os laboratórios estabeleçam critérios de aceitação para recuperação (Quadro 1), seguindo as orientações normativas da legislação aplicável às áreas de atividades, como, por exemplo, meio ambiente. Normalmente, os critérios estão atrelados ao nível de concentração (INMETRO, 2018).

Quadro 1 - Critério de aceitação para o ensaio de recuperação para AFM1.

Critério	Concentração	Valor recomendado
Branco	Todas	Desprezível
AFM1	0,01 – 0,05 µg/kg	60 – 120 %
	> 0,05 µg/kg	70 – 110 %

Fonte: (COMISSÃO EUROPEIA, 2006).

1.5.2.6 Precisão

A precisão de um método é a proximidade da concordância entre os resultados dos testes independentes obtidos em condições estipuladas. Normalmente é determinada para circunstâncias específicas de medição e as três opções mais comuns de expressá-la são por meio da repetibilidade, precisão intermediária, ou reprodutibilidade intralaboratorial, e da reprodutibilidade (AOAC, 2016; INMETRO, 2018).

Repetibilidade é o valor obtido a partir de um conjunto de medições incluindo o mesmo procedimento, a mesma amostra, o mesmo operador, os mesmos aparelhos, o mesmo laboratório e um intervalo curto. A repetibilidade pode ser expressa pela característica da dispersão dos resultados e ser determinada por meio da análise de padrões, material de referência ou adição do analito ao branco da amostra, em várias concentrações na faixa de trabalho (COMISSÃO EUROPEIA, 2006; INMETRO, 2018).

A precisão pela dispersão dos resultados pode ser obtida calculando-se o desvio padrão relativo (DPR), também denominado coeficiente de variação (CV), da série de medições conforme a equação 5 (BRASIL, 2017):

$$\text{DPR} = (\text{DP}/\text{CMD}) \times 100 \quad (5)$$

Onde:

DP: desvio padrão

CMD: concentração média determinada.

A determinação da repetibilidade deve ser realizada com, no mínimo, nove determinações, contemplando o intervalo linear do método analítico, ou seja, três concentrações (baixa, média e alta), com três réplicas em cada nível (BRASIL, 2017). É importante que os laboratórios estabeleçam critérios de aceitação, para o DPR_r, (desvio padrão de repetibilidade) conforme quadro 2 (AOAC, 2016; INMETRO, 2018).

A precisão intermediária é avaliada considerando o mesmo procedimento de medição, mesmo local e medições repetidas no mesmo objeto ou em objetos similares, ao longo dum período extenso de tempo, mas podendo incluir outras condições submetidas às mudanças. É necessário definir exatamente quais

condições sofrerão variação (uma ou mais), como por exemplo: diferentes analistas, diferentes equipamentos e diferentes tempos de análise (INMETRO, 2018).

Quadro 2 - Critério de aceitação para a repetibilidade

Anatito %	Fração Mássica (C)	Unidade	DPR _r %
100	1	100%	1,3
10	10 -1	10%	1,9
1	10 -2	1%	2,7
0,1	10 -3	0,1%	3,7
0,01	10 -4	100 ppm (mg/kg)	5,3
0,001	10 -5	10 ppm (mg/kg)	7,3
0,0001	10 -6	1 ppm (mg/kg)	11
0,00001	10 -7	100 ppb (µg/kg)	15
0,000001	10 -8	10 ppb (µg/kg)	21
0,0000001	10 -9	1 ppb (µg/kg)	30

Fonte: (AOAC, 2016).

Embora a reprodutibilidade não seja um componente de validação de método, quando executado por um único laboratório, é considerada importante quando um laboratório busca a verificação do desempenho dos seus métodos em relação aos dados de validação obtidos por meio de comparação interlaboratorial (INMETRO, 2018). É o valor da diferença entre os resultados de dois testes determinados, obtidos em condições de reprodutibilidade e expressa pelo DPR_R (COMISSÃO EUROPEIA, 2006).

A Robustez de um método analítico é a capacidade do método em não ser afetado por pequenas variações nos parâmetros de execução e, por isso, fornece uma indicação da confiança do método durante uma aplicação rotineira. É um parâmetro opcional dentro dos estudos de validação e está geralmente mais associado a estudos de otimização (INMETRO, 2018).

Portanto, os parâmetros de validação são os indicadores quantitativos do escopo e do bom desempenho das técnicas. A validação, por sua vez, é uma forma de assegurar a aplicabilidade e o alcance de um método durante as operações de rotina de um laboratório, através do estabelecimento dos limites para os parâmetros analíticos. Entretanto, o bom desempenho de qualquer técnica analítica depende crucialmente de dois critérios: a qualidade das medidas instrumentais e a

confiabilidade estatística dos cálculos envolvidos no seu processamento (RIBEIRO et al., 2008).

1.5.2.7 *Alguns critérios quanto à qualidade analítica*

O método de escolha para a determinação de micotoxinas, segundo o documento de orientação sobre a identificação de micotoxinas em alimentos e rações, SANTE/12089/2016, do Departamento de Saúde e Segurança Alimentar da Comissão Europeia, deve ser desenvolvido preferencialmente por cromatografia combinada com espectrometria de massas. Alternativamente, a cromatografia líquida com detecção de fluorescência pode ser aplicada, mas somente quando for possível a utilização da CIA específica para a micotoxina alvo (COMISSÃO EUROPEIA, 2016).

A qualidade das medidas instrumentais passa invariavelmente por um programa de garantia de qualidade que inclui, quando possível, o uso de materiais de referência certificados. Os materiais ou padrões de referência certificados são produtos homogêneos e estáveis contendo quantidades certificadas do analito de interesse (JECFA, 2001).

Nas situações em que se fizer necessária a confirmação do analito de interesse, caso o método preconize a utilização de um padrão interno apropriado, este deve ser adicionado à amostra de ensaio no início do processo de extração. Quando não se puder usar nenhum padrão interno adequado, a identificação da substância deve ser confirmada através de co-cromatografia. Neste último caso, deve obter-se apenas um pico, cujo incremento na altura (ou área) deverá ser equivalente à quantidade adicionada. Além disso, a largura do pico, na região da metade da sua altura máxima, deverá estar compreendida entre 90 % e 110 % da largura inicial, e os tempos de retenção deverão ser idênticos, com um desvio de 5 % (COMISSÃO EUROPEIA, 2002).

O tempo mínimo de retenção, aceitável para o analito examinado, deve ser o dobro do tempo de retenção correspondente ao volume vazio da coluna. Além disso, o tempo de retenção do analito no extrato da amostra deve corresponder ao da média dos padrões de calibração medidos na mesma sequência, com uma tolerância de $\pm 0,2$ min ou $\pm 50\%$ da largura do pico a meia altura (o que for maior), para cromatografia gasosa e cromatografia líquida (COMISSÃO EUROPEIA, 2016).

No caso de análises repetidas de um material de referência certificado, o desvio entre o teor médio determinado experimentalmente e o valor certificado não deve ultrapassar o limite de $\pm 10\%$. Quando esses materiais de referência não estiverem disponíveis, se aceita que a veracidade das medições seja avaliada através da recuperação de quantidades conhecidas do elemento adicionadas às amostras com teor desconhecido. É importante destacar que, ao contrário do analito naturalmente presente na amostra, quando adicionado não se encontra igualmente ligado quimicamente à matriz, por conseguinte, os resultados obtidos com este método são menos confiáveis do que os resultantes da utilização dos materiais de referência (COMISSÃO EUROPEIA, 2002).

Alguns requisitos se aplicam a moléculas que exibem fluorescência nativa e a moléculas que exibem fluorescência após transformação ou derivação. Nesse tipo de detecção, a seleção dos comprimentos de onda de excitação e emissão em combinação com as condições cromatográficas deve ser feita de modo a minimizar a ocorrência de componentes interferentes nos extratos de amostras em branco. O pico máximo, mais próximo no cromatograma, deve ser separado do pico do analito de interesse pelo menos a uma largura máxima a 10% da altura máxima do pico do analito (COMISSÃO EUROPEIA, 2016).

Outro importante componente para assegurar a qualidade do método analítico é a realização de ensaios de proficiência, considerados ferramentas de controle de qualidade externo. Nestes ensaios, cujos procedimentos são harmonizados entre AOAC, ISO e IUPAC, os laboratórios participantes analisam o material distribuído pelo organizador, utilizando o procedimento analítico adotado em suas rotinas de trabalho. O principal objetivo do ensaio de proficiência é avaliar o desempenho de um método analítico desenvolvido por um laboratório (OLIVEIRA, 2010).

Por fim, a confiabilidade estatística dos cálculos envolvidos no seu processamento passa pelo uso de ferramentas, como softwares e planilhas, que permitam a estimativa dos parâmetros de validação, rapidamente e de forma segura, cabendo ao usuário alimentar com as informações referentes ao procedimento de validação, além dos dados referentes ao sinal analítico e às concentrações, obtidos nas análises (RIBEIRO et al., 2008).

1.6 Justificativa

Os dados encontrados, em pesquisas realizadas no Brasil e no mundo, revelam o risco para o desenvolvimento de câncer em indivíduos expostos a alimentos contaminados com AFM1 em níveis acima dos limites máximos permitidos. Estudos têm demonstrado também a evolução nas técnicas analíticas capazes de determinar a contaminação dos alimentos por AFM1. Diante do exposto e considerando a importância da fiscalização sanitária para a proteção da saúde da população e a necessidade de se adotar procedimentos analíticos em conformidade com os guias e normas nacionais e internacionais, torna-se imprescindível a validação de metodologia durante a implantação de uma rotina de análise de contaminantes, como a determinação de AFM1 em leite.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo do presente trabalho é validar intralaboratorialmente um método para análise de aflatoxina M1 em leite, por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por fluorescência, no Laboratório Municipal de Saúde Pública (LASP) da Subsecretaria de Vigilância, Fiscalização Sanitária e Controle de Zoonoses (SUBVISA) da Prefeitura da Cidade do Rio de Janeiro (PCRJ).

2.2 Objetivos específicos

- Estudar o método e verificar as modificações necessárias à sua validação e implantação;
- Definir os parâmetros necessários para a validação do método;
- Elaborar planilhas para avaliação do processo analítico;
- Realizar a validação do método.

3 METODOLOGIA

A metodologia proposta, um estudo descritivo com abordagem quantitativa, consiste na validação de método para determinação de aflatoxina M1 em leite fluido, referenciado, com adaptações, pelo método desenvolvido por Dragacci e colaboradores (2001), aprovado pelo Comitê de Métodos sobre Toxinas Naturais e Alergênicos Alimentares, adotado pelo Conselho de Métodos Oficiais da AOAC como método oficial 2000.08 (DRAGACCI; GROSSO; GILBERT, 2001).

Para a aplicação do método e execução das etapas da validação, foi feito o preparo e a determinação da concentração do padrão primário de AFM1, conforme o método oficial da AOAC 971.22 (NESHEIM; TRUCKSESS; PAGE, 1999).

Em seguida, o padrão de AFM1 foi utilizado na aplicação dos parâmetros de seletividade, linearidade, limite de detecção e quantificação, recuperação e precisão, considerando as orientações do INMETRO e da ANVISA. Recomendações constantes em Regulamentos e Diretivas da União Europeia também foram consideradas na execução da validação.

Os ensaios de recuperação foram realizados com amostra de leite fluido desnatado UHT, testada previamente nas mesmas condições do método e fortificada com a solução de padrão de AFM1.

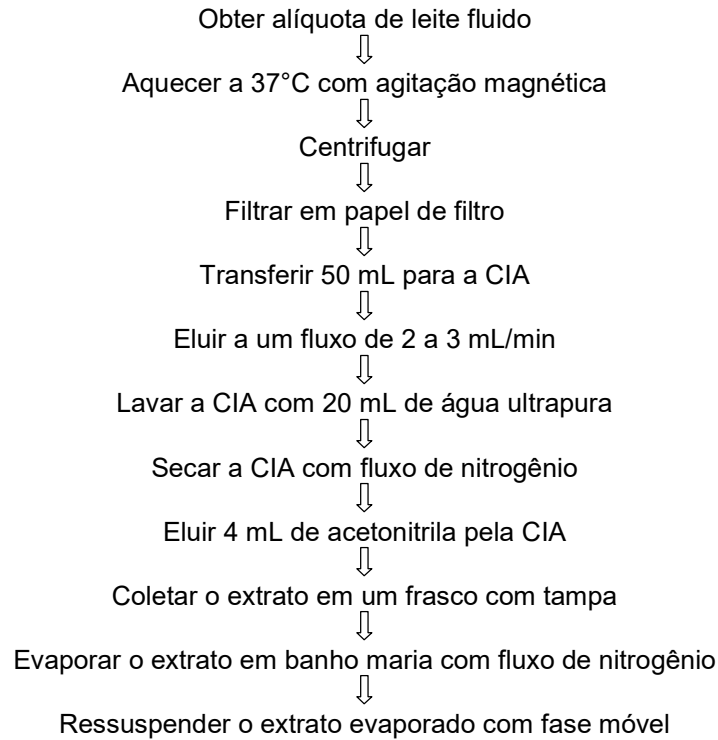
3.1 Descrição do método utilizado para a determinação de AFM1 em leite

O método utilizado nas análises, referenciado pelo método AOAC 2000.08, consiste na extração e limpeza de amostras de leite fluido por CIA e determinação por CLAE-DFL (Figura 3).

Além disso, ao aplicar o método, foram realizadas adaptações (Figura 4): na alíquota da amostra, com redução de 50 para 25 mL de leite fluido; no volume de injeção, ajustado para 50 μ L e no volume final, onde o extrato foi ressuspenso com 2 mL de fase móvel. Antes de proceder à injeção no cromatógrafo, o extrato final foi filtrado em filtro de seringa, com 0,22 μ m de poro.

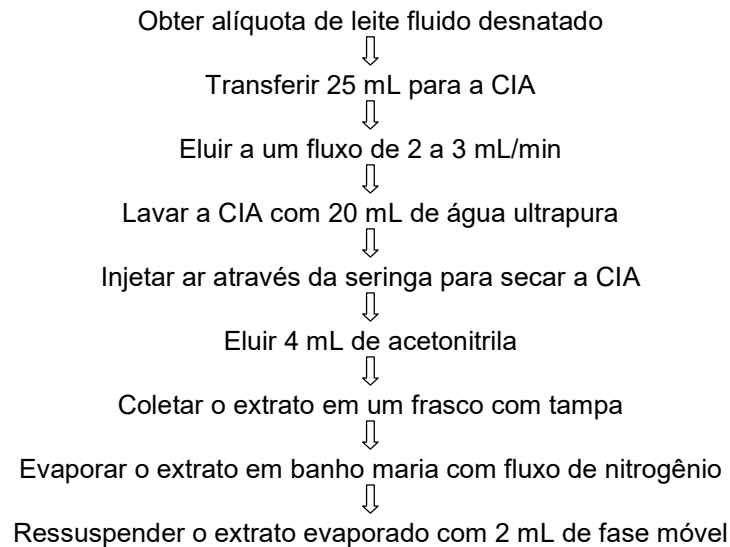
As análises foram realizadas em ambiente com temperatura climatizada, mantida em torno de 22°C e os solventes e padrões manipulados em capela com exaustão.

Figura 3 - Fluxograma do método da AOAC para o preparo da amostra de leite.



Fonte: (DRAGACCI, 2001).

Figura 4 - Fluxograma do método adaptado para o preparo da amostra de leite.



Fonte: (Do autor, 2019).

Para as análises foi utilizado um cromatógrafo líquido de alta eficiência, com sistema quaternário de solventes, módulo degaseificador, bomba binária, injetor

automático de amostras, forno para a coluna cromatográfica e detector por fluorescência, conectados a um módulo de controle. As condições operacionais do método estão descritas no quadro 3. O equipamento fica localizado em uma sala com temperatura climatizada, mantida em torno de 22°C.

Quadro 3 - Condições operacionais do método.

Condição	Descrição
Equipamento de cromatografia líquida	Shimadzu, modelo LC-20AT Proeminence, composto por módulo de comando modelo CBM 20A, degaseificador modelo DGU-20A, injetor automático de amostras modelo SIL-20A, forno de coluna modelo CTO-20A, detector por fluorescência modelo RF-20A. A aquisição e tratamento de dados foram realizados pelo software LC Labsolutions.
Coluna cromatográfica	Shimadzu, C18 (ODS) medindo 150 x 4,6 mm, tamanho de partícula 4,6 µm, com pré-coluna.
Fase móvel	Água ultrapura (65%), Acetonitrila (25%) e Metanol (10%), no modo isocrático.
Fluxo	1,0 mL/min
Volume de injeção	50 µL
Temperatura do forno da coluna	40°C
Detector por fluorescência	365 nm de Excitação e 435 nm de Emissão
Tempo de corrida	10 minutos

Fonte: (Do autor, 2019).

Foram utilizados ainda outros equipamentos, assim como reagentes, vidrarias e acessórios, conforme descrito a seguir:

Outros equipamentos utilizados:

- Agitador de tubos tipo vortex;
- Balança analítica, marca Mettler Toledo, modelo AB204-S;
- Capela de exaustão;
- Espectrofotômetro, marca Micronal, modelo AJX 3000PC;
- Freezer;
- Refrigerador;
- Sistema para filtração a vácuo;

- Placa de aquecimento para banho-maria, com haste e sensor de temperatura;

Reagentes e solventes:

- Acetonitrila grau CLAE, marca Merck;
- Ácido sulfúrico P.A., marca ProQuimios;
- Água destilada;
- Água ultra pura ou com maior grau de pureza;
- Coluna de imunoafinidade com anticorpos monoclonais para AFM1: Afla M1, marca Vicam;
- Detergente neutro concentrado;
- Dicromato de potássio, marca Merck;
- Etanol 70%;
- Nitrogênio com pureza $\geq 99,99\%$;
- Hipoclorito de sódio;
- Metanol grau CLAE, marca Merck;
- Padrão com pureza $\geq 98\%$, marca Sigma Aldrich, contendo $5\mu\text{g}$ de aflatoxina M1 na forma de cristais.

Vidrarias e acessórios:

- Balões volumétricos;
- Bastões de vidro;
- Béqueres;
- Cubetas de quartzo;
- Erlenmeyers;
- Filtro de seringa com $0,22\ \mu\text{m}$ de poro;
- Frascos de vidro com tampa;
- Kitassatos;
- Membrana filtrante com $0,45\ \mu\text{m}$ de poro e 47 mm de diâmetro;
- Microseringas de vidro;
- Pipetador automático com ponteiros;
- Pipetas Pasteur;
- Pipetas volumétricas;
- Provetas com tampa;

- Seringas de vidro e de plástico;
- Suporte com garra;
- Tubos tipo Falcon com 50 mL;
- Vials.

A descontaminação de vidrarias e materiais utilizados nas análises foi realizada com etanol 70% e, posteriormente, com hipoclorito de sódio 5%. O descarte de solventes e demais materiais seguiu os procedimentos adotados no laboratório de contaminantes químicos e biológicos do LASP e no laboratório de micotoxinas do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS), da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ).

3.2 Determinação da concentração e preparo de soluções do padrão de AFM1

A determinação da concentração do padrão de AFM1 foi realizada a partir do padrão primário, contendo 5,0 µg de AFM1 na forma de cristais, em cujo frasco foram injetados 5 mL de acetonitrila, com auxílio de seringa. Para a leitura da concentração foi utilizado espectrofotômetro, com 1cm de caminho ótico, cubetas de quartzo, para o qual foi calculado o fator de correção.

3.2.1 Fator de correção do espectrofotômetro

O fator de correção do espectrofotômetro foi calculado a partir de uma solução de ácido sulfúrico 0,009M. A partir dessa solução foram realizadas as diluições com dicromato de potássio ($K_2Cr_2O_7$) a 0,25 mM, 0,125 mM e 0,0625 mM e determinadas suas absorvâncias no comprimento de onda 350nm, em triplicata e sem retirar as cubetas entre as leituras. A solução de ácido sulfúrico 0,009M foi utilizada como branco.

Em seguida foi calculada a absortividade molar específica (ϵ_n) para cada uma das soluções pela equação 6 e o fator de correção (FC) através da equação 7, para o qual se considerou a média dos valores encontrados para a absortividade molar específica na equação 6.

$$\varepsilon_n = \frac{\bar{A}_i \times 1000}{C_i} \quad (6)$$

Onde:

\bar{A}_i : média das absorvâncias

C_i : concentração da solução de $K_2Cr_2O_7$ em mM

1000: volume das cubetas

$$FC = \frac{3160}{\varepsilon'} \quad (7)$$

Onde:

ε' : média dos valores encontrados para o coeficiente de absorvidade molar específica

3160: valor tabelado para a absorvidade molar do $K_2Cr_2O_7$

3.2.2 Concentração da solução padrão de AFM1

Após preencher a cubeta com a solução padrão de AFM1, foi feita a leitura da absorvância, em triplicata, no comprimento de onda 350nm, tendo como branco a acetonitrila, e aplicada a equação 8.

$$C (\mu\text{g/mL}) = \frac{\bar{A} \times MM \times 1000 \times FC}{\varepsilon} \quad (8)$$

Onde:

\bar{A} : absorvância média da aflatoxina.

MM: massa molecular da aflatoxina, correspondente a 328.

1000: fator de conversão da aflatoxina em $\mu\text{g/mL}$.

FC: fator de correção do equipamento.

ε : coeficiente de absorvidade molar específico em acetonitrila, correspondente a 19000.

3.2.3 Preparo das soluções do padrão de AFM1

Foram preparadas soluções intermediárias, a partir da solução estoque de AFM1, para a construção da curva de calibração e para a fortificação das amostras aplicadas no ensaio de recuperação. A solução intermediária foi preparada com a diluição de 1 mL da solução estoque de AFM1 em 100 mL de acetonitrila e mantida no freezer até sua utilização.

A partir dessa solução, foram obtidas as alíquotas necessárias para o preparo das soluções destinadas à construção das curvas de calibração e à fortificação das amostras. Essas alíquotas foram evaporadas em banho maria, com fluxo de nitrogênio. Logo após, foram ressuspensas com a fase móvel para as curvas e

com uma solução de água-acetonitrila (90:10 v/v) para a fortificação das amostras. O preparo dessas soluções foi realizado no dia em que foram utilizadas.

3.3 Parâmetros de validação de método analítico

A avaliação dos parâmetros de validação foi realizada com a utilização de planilhas elaboradas no software Excel ®. A linearidade foi avaliada pela planilha (Anexo A) desenvolvida por Bazilio e colaboradores (2012) e os cálculos de recuperação e precisão por uma planilha criada para o presente estudo (Anexo B).

3.3.1 Seletividade

A seletividade do método foi verificada pela análise do branco do método, ou branco dos reagentes, uma vez que, após a análise prévia de dez amostras de diferentes marcas de leite, nas mesmas condições do método, não foram identificadas amostras isentas de AFM1. Assim, foram analisadas três alíquotas independentes de água ultrapura, nas mesmas condições do método. A partir dos cromatogramas obtidos foi verificado o ruído da linha de base e se havia algum pico no tempo de retenção da AFM1, correlacionado com o cromatograma da amostra considerada branco no presente estudo.

3.3.2 Linearidade

A linearidade foi verificada pela utilização de curvas de calibração, elaboradas com solução padrão de AFM1 em duas faixas de concentração. A curva A em cinco níveis, com concentrações menores, para o cálculo dos limites de detecção e quantificação teóricos e quantificação da amostra que seria utilizada como branco no ensaio de recuperação. A curva B em sete níveis, com concentrações que incluíssem os níveis aplicados no ensaio de recuperação (Tabela 1).

Os pontos das curvas foram distribuídos de forma equidistante, respeitando a faixa de 0 a 150% do LMT. Cada solução foi injetada três vezes.

Os valores extremos (outliers) foram verificados pelo teste de Jack-Knife, a homocedasticidade nos resultados pelo teste de Levene, modificado por Brown & Forsythe, e a significância pela análise de variância (ANOVA).

Tabela 1 - Concentrações utilizadas nas curvas de calibração de AFM1

Pontos da curva	Curva A		Curva B	
	ng/mL	ng em 50 μ L	ng/mL	ng em 50 μ L
1	0,0161	0,0008	0,0402	0,0020
2	0,0804	0,0040	0,1608	0,0080
3	0,3215	0,0161	1,6075	0,0803
4	0,5626	0,0281	3,6169	0,1808
5	0,8038	0,0402	5,6263	0,2813
6	----	----	7,6356	0,3817
7	----	----	9,6450	0,4822

Fonte: (Do autor, 2019).

3.3.3 Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ)

Os LD e LQ foram obtidos a partir da curva de calibração com padrão de AFM1. Em seguida, a concentração correspondente ao LQ foi adicionada à amostra em branco para confirmação.

Considerando que não foram encontradas amostras isentas de AFM1, dentre as testadas previamente, utilizou-se como branco amostras cujas concentrações se mostraram iguais ou na mesma faixa de concentração do LD estimado, não excedendo 5 vezes o nível do LD estimado.

A confirmação foi feita pela relação sinal/ruído da amostra fortificada, onde LD correspondeu a 3 vezes e LQ a 10 vezes a relação sinal/ruído.

3.3.4 Ensaio de recuperação

O ensaio de recuperação foi realizado considerando as análises aplicadas no mesmo dia e em dias alternados, sendo todos os níveis analisados em triplicata e injetados três vezes no equipamento. Cabe destacar que as etapas de extração foram realizadas no laboratório de micotoxinas do INCQS e as demais etapas, assim como a injeção no cromatógrafo, realizadas no laboratório de contaminantes químicos e biológicos do LASP. O método foi aplicado pelo mesmo analista, utilizando os mesmos solventes em todos os níveis analisados.

No ensaio de recuperação foram utilizadas 21 alíquotas da amostra branco, às quais foram adicionadas alíquotas do padrão de AFM1, em triplicata, correspondentes a cerca de 75, 100 e 125% do LMT estabelecido pela Resolução Anvisa RDC nº 07 de 2011, para leite fluido, bem como no LQ estimado e no valor correspondente a 10 vezes a concentração da amostra branco, calculada nas mesmas condições estabelecidas para o método.

Os resultados das injeções, como áreas e cromatogramas, foram obtidos pelo software Labsolutions, conectado ao equipamento de CLAE-DFL. As áreas foram utilizadas para o cálculo de AFM1 (ng) em 50 µL, aplicando-se a equação da reta, da curva de calibração, e os resultados inseridos na equação 9.

$$C (\mu\text{g/L}) = M \times (V_f / V_i) \times (1 / V_a) \quad (9)$$

Onde:

C: concentração final em ng/mL ou µg/L

M: ng de AFM1 em 50 µL

V_f: volume final do extrato (2 mL)

V_i: volume de injeção (50 µL)

V_a: volume da amostra (25 mL)

A precisão foi calculada com base nos resultados do ensaio de recuperação, já que o preparo das amostras e as análises atenderam aos critérios para repetibilidade.

A repetibilidade foi verificada a partir do DPR_r das análises correspondentes a cada nível de fortificação, realizadas no mesmo dia e a precisão intermediária pela análise do DPR das amostras fortificadas no LMT (0,5 µg/L) e no LQ, com variação nos dias de análise.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

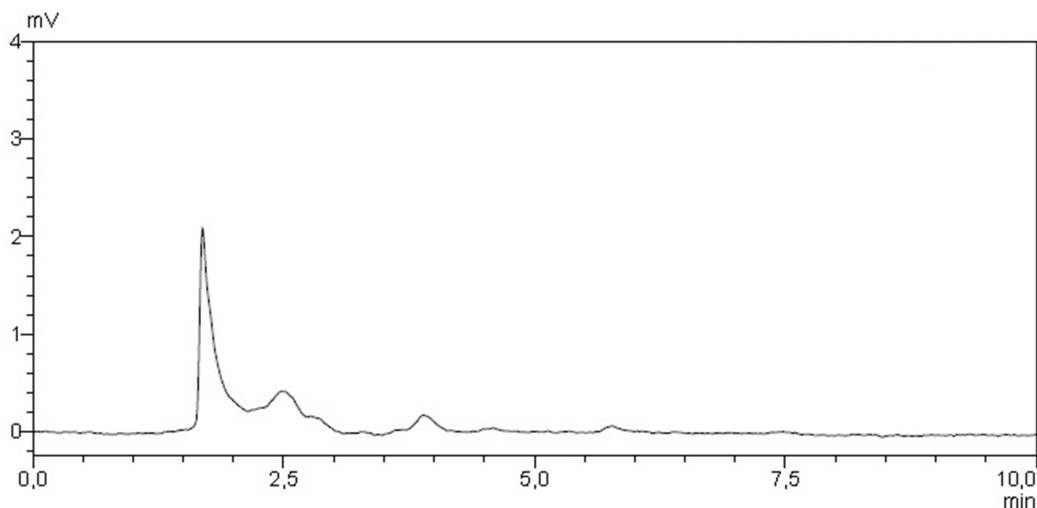
A validação foi realizada dentro das condições apresentadas pelo laboratório de contaminantes químicos e biológicos do LASP, com algumas atividades sendo desenvolvidas no laboratório de micotoxinas do INCQS.

Cabe ressaltar que o laboratório não dispunha de centrífuga no período em que a validação foi desenvolvida. Sendo assim, compreendendo que a centrifugação seria recomendada para separar as fases, possibilitando obter uma alíquota isenta de gordura, optou-se por realizar a validação somente na matriz leite desnatado. Com isso, outras etapas também foram consideradas desnecessárias, como o aquecimento da amostra e a filtração.

O fator de correção do espectrofotômetro foi de 0,97, estando de acordo com o método oficial da AOAC 971.22, que recomenda valores entre 1,05 e 0,95. A concentração do padrão de AFM1, obtida no espectrofotômetro, resultou em 1,6075 µg/mL. A partir dessa solução foi preparada a solução intermediária a 16,075 ng/mL.

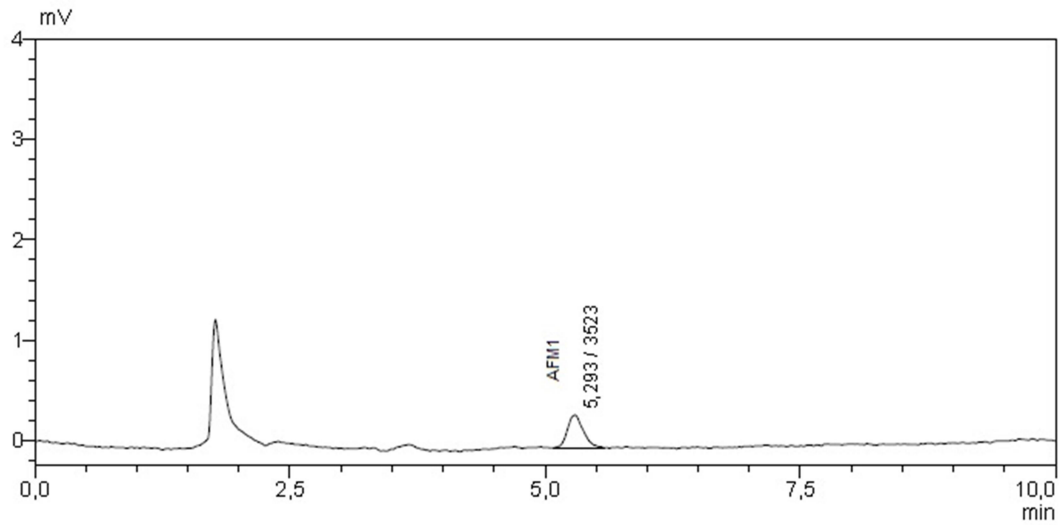
Nas condições operacionais do método, considerando as orientações da ANVISA e INMETRO a seletividade foi comprovada pela ausência de interferentes no tempo de retenção da AFM1, quando comparados os cromatogramas do branco do método, ou branco dos reagentes (figura 5) e do padrão de AFM1 em fase móvel (figura 6). Além da correlação entre os tempos de retenção do padrão de AFM1 em fase móvel (figura 7) e na matriz (Figura 8), no LMT.

Figura 5 - Cromatograma referente à injeção de 50 µL do branco dos reagentes, nas condições operacionais do método.



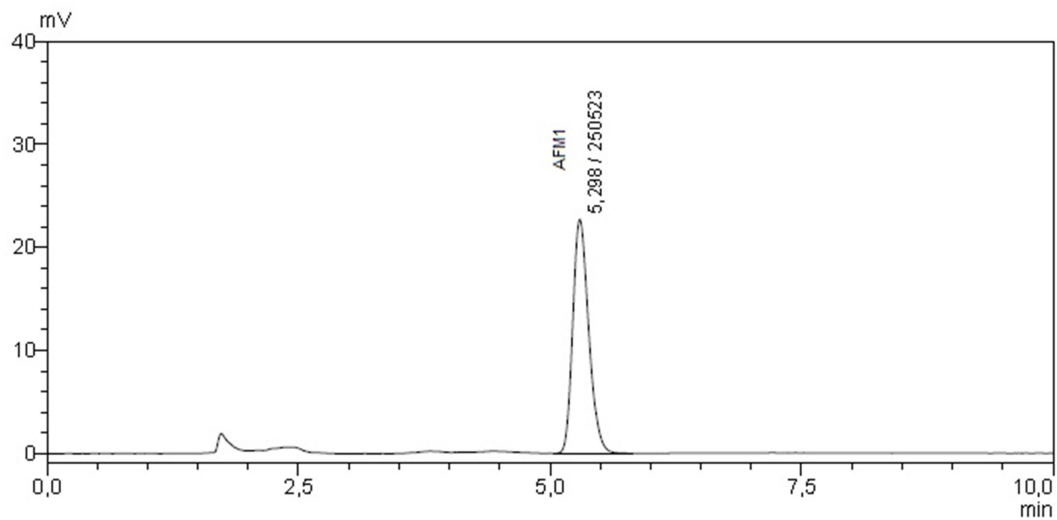
Fonte: (Do autor, 2019).

Figura 6 - Cromatograma referente à injeção de 50 μ L do padrão de AFM1 (0,0787 ng/mL), em fase móvel.



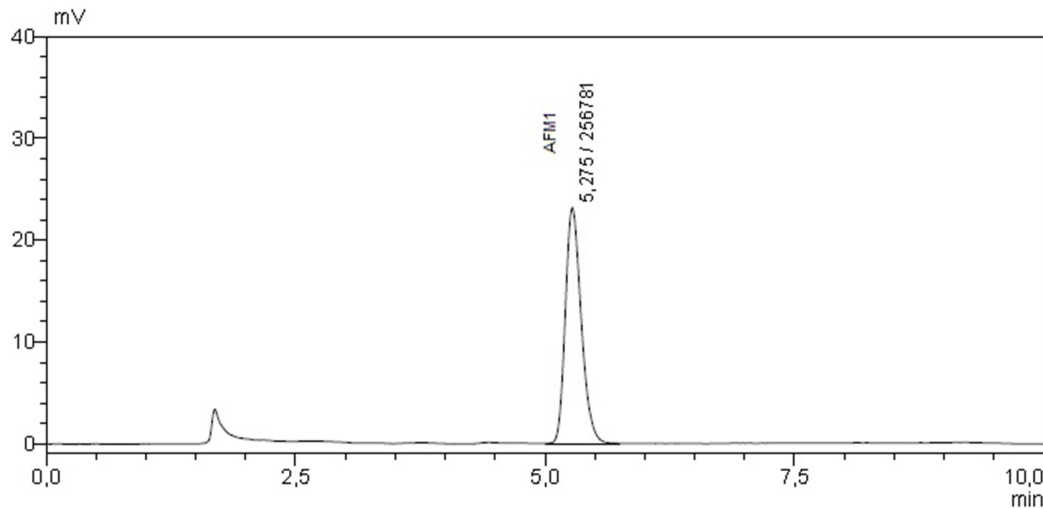
Fonte: (Do autor, 2019).

Figura 7 - Cromatograma referente à injeção de 50 μ L do padrão de AFM1, em fase móvel, no nível de concentração correspondente ao LMT (0,2871 ng em 50 μ L ou 5,742 ng/mL).



Fonte: (Do autor, 2019).

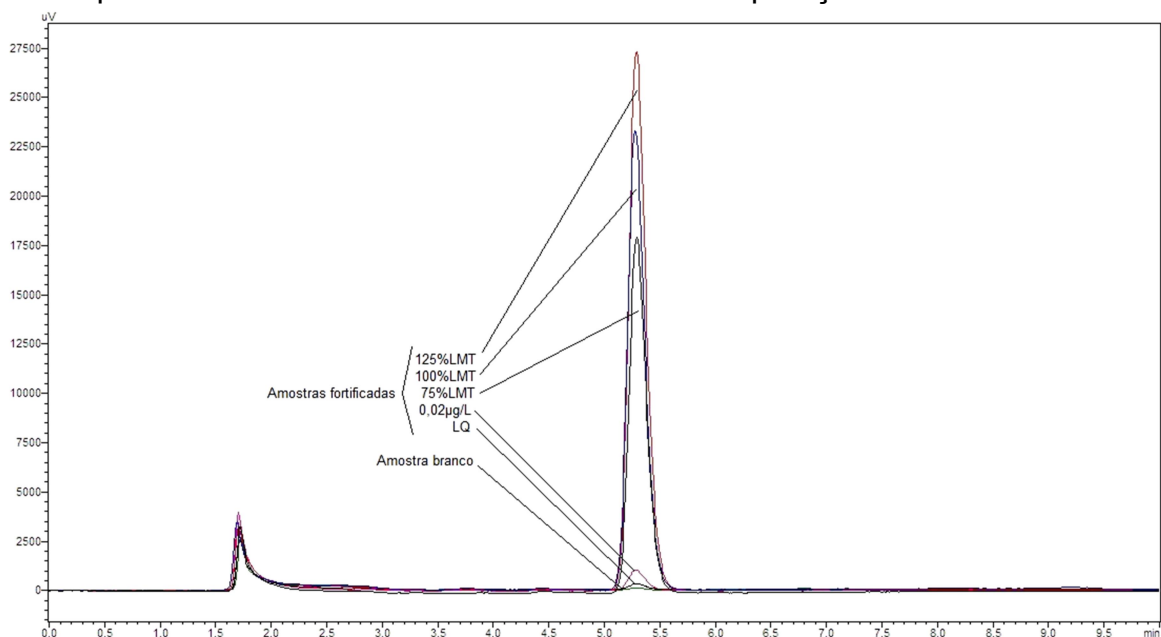
Figura 8 - Cromatograma referente à injeção de 50 μL da amostra branco, fortificada com o padrão de AFM1 no nível de concentração correspondente ao LMT (0,2944 ng em 50 μL ou 0,4710 $\mu\text{g/L}$).



Fonte: (Do autor, 2019).

Os cromatogramas das amostras branco e fortificadas, analisadas no presente estudo, apresentaram tempos de retenção $5,29 \pm 0,02$ minutos (Figura 9), idênticos entre as repetições e maiores do que o dobro do tempo de retenção do volume vazio da coluna, não se verificando outro pico próximo da AFM1.

Figura 9 - Cromatogramas demonstrando a correspondência nos tempos de retenção da amostra branco, contaminada naturalmente, e as amostras fortificadas com o padrão de AFM1 nos níveis do ensaio de recuperação.



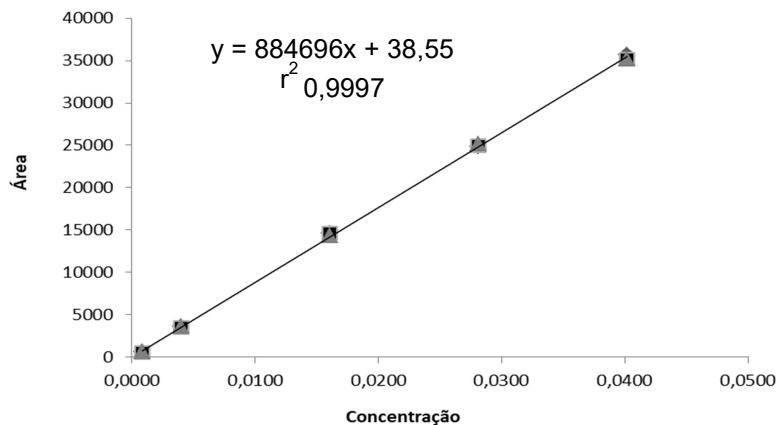
Fonte: (Do autor, 2019).

Os resultados das curvas de calibração (Figuras 10 e 11) estão descritos na tabela 2. Após retirar o único valor extremo observado pelo teste de Jack-Knife, verificou-se a homocedasticidade nos resultados, com homogeneidade da variância, pelo teste de Levene, modificado por Brown & Forsythe, e que a regressão é significativa ($p < 0,001$) pela análise da variância (ANOVA), apesar do desvio de linearidade ($p < 0,05$).

Como os parâmetros de regressão estimados se comportaram de forma homocedástica, os cálculos das equações da regressão linear simples se basearam no método dos mínimos quadrados ordinários não ponderados.

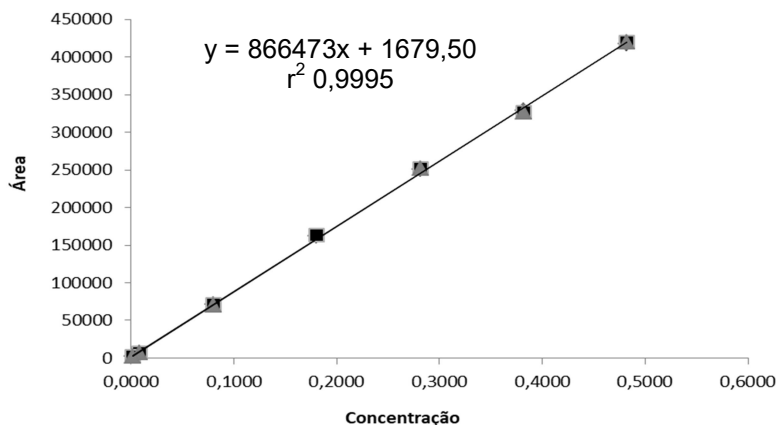
Verificou-se nas duas curvas a normalidade dos resíduos da regressão ($\alpha = 0,05$), pelo teste Ryan-Joiner, apesar de ter sido encontrada a dependência dos resíduos pelo teste de Durbin-Watson.

Figura 10 - Curva de calibração AFM1 (curva A)



Fonte: (Do autor, 2019).

Figura 11 - Curva de calibração AFM1 (curva B)



Fonte: (Do autor, 2019).

Tabela 2 - Resultados das curvas de calibração A e B.

Parâmetros	Curva A	Curva B	Referência
Coefficiente angular	884696	866473	---
Coefficiente Linear	38,55	1679,50	---
Coefficiente de correlação (r)	0,9998	0,9997	>0,99 ^a
Coefficiente de determinação (r ²)	0,9997	0,9995	>0,99
Valores extremos	Não	01 (4,76%)	Máx 22% ^b
Homocedasticidade	-0,079 (t _L)	-1,429 (t _L)	t _L < t _{tab} ^c
	2,160 (t _{tab})	2,101 (t _{tab})	
Normalidade dos resíduos	0,9831 (R _{eq})	0,9539 (R _{eq})	R _{eq} > R _{crit} ^c (α 0,05)
	0,9383 (R _{crit})	0,9503 (R _{crit})	
Regressão significativa	3,15 x 10 ⁻²⁴	4,82 x 10 ⁻³¹	p < 0,001 ^c
Desvio de linearidade	2,03 x 10 ⁻²	2,89 x 10 ⁻¹¹	p > 0,05 ^c

Fonte: (Do autor, 2019).

Notas: (a) ANVISA, 2017; (b) Horwitz, 1995; (c) INCQS, 2009, 2018.

Considerando os dados obtidos pela curva de calibração, confirmados pela relação sinal/ruído, foram encontrados valores de 0,002 e 0,006 µg/L para o LD e LQ, respectivamente.

Os resultados do ensaio de recuperação (Tabela 3) demonstraram a exatidão, pela concordância entre os resultados obtidos após a aplicação do método de extração e análise, com as concentrações adicionadas, tendo sido encontrados valores entre 80,67 e 97,56% de recuperação.

Segundo as orientações adotadas na União Europeia, caso a legislação do país não exija métodos específicos para a determinação dos níveis de micotoxinas, os laboratórios podem selecionar qualquer método, desde que a sua recuperação seja de 60 a 120% para níveis de 0,01 a 0,05 µg/kg e 70 a 110% para concentrações maiores que 0,05 µg/kg de AFM1 (COMISSÃO EUROPEIA, 2006).

No que diz respeito à precisão do método, o DPR_r foi menor do que 5% em todos os níveis estudados no ensaio de recuperação e o DPR_R abaixo de 20%, ou seja, dois terços da precisão esperada de até 30%, em função da concentração, como recomendado pelo INMETRO (2018). Além disso, os resultados ficaram abaixo de 22% para DPR_R e 11% para DPR_r, recomendados por Thompson (2000).

Tabela 3 - Resultados do ensaio de recuperação da AFM1.

Concentração adicionada	Concentração recuperada	Recuperação	DP	DPR _r	DPR _R
(µg/L)	(µg/L)	(%)	(µg)	(%)	(%)
0,0036 ^a	0,0035 ^h	96,6 ^h	0,0002 ^h	4,21 ^f /3,92 ^g	3,79
	0,0034 ^f /0,0035 ^g	95,64 ^f /97,56 ^g	0,0002 ^f /0,0002 ^g		
0,0206 ^b	0,0191	92,77	0,0008	3,08	--
0,3858 ^c	0,352	91,24	0,0087	2,46	--
0,5144 ^d	0,4379 ^h	85,12 ^h	0,0574 ^h	18,27 ^f /0,46 ^g	13,04
	0,4149 ^f /0,4608 ^g	80,67 ^f /89,58 ^g	0,0762 ^f /0,0020 ^g		
0,6430 ^e	0,5515	85,77	0,0177	3,2	--

Fonte: (Do autor, 2019).

Notas: (a) LQ estimado na curva de calibração; (b) dez vezes a concentração da amostra branco; (c) 77,16% LMT; (d) 102,88% LMT; (e) 128,60% LMT; (f) Resultados do 1º dia de análise; (g) Resultados do 2º dia de análise; (h) Resultados dos 1º e 2º dias consolidados.

A exceção se verificou no primeiro dia de análise das alíquotas que foram adicionadas no LMT, quando ocorreu um erro no procedimento de extração em uma das triplicatas, o que resultou em perda do analito e baixa recuperação. Esse resultado influenciou a repetibilidade (DPR_r 18,27%), mas não chegou a comprometer a exatidão e a precisão intermediária (DPR_R 13,04%) nesse nível de concentração, uma vez que ocorreu em apenas uma das seis replicatas. Ao se excluir o resultado dessa replicata, verifica-se um DPR_r de 1,18% e DPR_R de 0,94%. Da mesma forma, a concentração média recuperada é alterada de 0,4379 µg/L (85,12%) para 0,4647 µg/L (89,96%).

No estudo colaborativo conduzido por Dragacci e colaboradores (2001), o protocolo do método permitiu aos laboratórios participantes algumas adaptações, conforme sua infraestrutura. Alguns participantes optaram por colunas cromatográficas curtas, com 100mm, para reduzir a quantidade de solventes utilizados, mas foram empregadas também colunas maiores, com 150 e 250mm. A partir do comprimento das colunas foram selecionadas as fases móveis, sendo utilizadas na maioria dos casos as compostas por água e acetonitrila (75:25) e água, acetonitrila e metanol (65:25:10). O fluxo da fase móvel variou de acordo com o comprimento das colunas e os volumes de injeção variaram de 10 a 500 µL. Vale destacar que a recomendação para os laboratórios seria a injeção de um volume adequado, de acordo com a capacidade do sistema de injeção, equivalente a pelo

menos 12,5 mL da alíquota inicial de leite. Os autores destacam que não foram observados efeitos analíticos particulares em relação a discrepância nos equipamentos dos laboratórios. Nas amostras fortificadas verificou-se RSD_r de 18% e uma RSD_R de 31%, com uma recuperação média de 74%. Após a remoção de resultados individuais de laboratórios, onde a recuperação individual estava abaixo de 70%, a recuperação passou para 87% e gerou valores significativamente melhores de RSD_r e RSD_R , 14% nos dois casos.

Outros pesquisadores, que avaliaram o desempenho desse método em suas análises, apresentaram resultados semelhantes aos do presente estudo. Na pesquisa realizada por Castro e colaboradores (2013), o procedimento consistiu em passar 50 mL do leite na CIA. A AFM1 retida na coluna foi eluída com 2 mL de metanol e o eluato, após ter sido evaporado, foi ressuscitado com 1 mL da fase móvel, composta por acetonitrila, metanol e água ultrapura (30:15:55). Na cromatografia, utilizou-se coluna cromatográfica com 250 x 4,6 mm e 5 μ m de poro, a um fluxo de 1 mL por minuto e temperatura do forno de colunas de 35°C. O volume de injeção utilizado foi de 40 μ L, equivalente a 2 g de leite. Nessas condições ou autores encontraram valores médios de 80 a 92% para a recuperação e de 4 a 11% para o DPR_r , nos níveis de fortificação de 0,012 a 0,050 μ g/L. Os valores de LD e de LQ da foram 0,001 e 0,003 μ g/kg.

Zinedine e colaboradores (2007) obtiveram uma recuperação média de 84,6%, com um DPR_r de 5,6%, em amostras de leite fortificadas a 0,1 ng/mL de AFM1. Nos demais níveis, de 0,05 ng/mL e 1,5 ng/mL, os valores de recuperação foram 88,3 e 92,3%, com DPR_r 5,8 e 6,8%, respectivamente. O LD encontrado foi de 0,0010 μ g/L e o LQ 0,0039 μ g/L. O tempo de retenção para AFM1 foi de 11,6 minutos. Os autores encontraram esses resultados utilizando uma alíquota de 20 mL de leite, passada através da CIA, cuja AFM1 retida foi posteriormente eluída com 4 mL de acetonitrila. O eluato foi evaporado e reconstituído em 100 μ L de fase móvel, composta por acetonitrila e água (25:75). Foi utilizada uma coluna cromatográfica com 150 x 4,6 mm e 5 μ m de poro, a um fluxo de 0,8 mL por minuto e a alíquota do extrato da amostra, injetada no sistema, foi de 20 μ L, equivalente a 4 g de leite.

Hussain e colaboradores (2010) utilizaram uma alíquota de 50 mL de leite, purificada através da CIA. A AFM1 retida foi eluída com 4 mL de acetonitrila e o eluato evaporado e diluído com a fase móvel, composta por acetonitrila e água (25:75). Foi utilizada coluna cromatográfica com 150 x 4,6 mm e 5 μ m de poro, a um

fluxo de 0,8 mL por minuto. Nessas condições, os autores verificaram uma recuperação de 88%, 87% e 92%, para os níveis de fortificação 10, 20 e 50 µg/L, respectivamente. O LD encontrado foi de 0,04 µg/L e o tempo de retenção para a AFM1 foi de 6,1 minutos.

No método executado por Santili e colaboradores (2015), uma alíquota de 20 mL do leite foi passada através da CIA. A AFM1 foi eluída por três vezes com 1 mL de metanol cada. O eluato foi evaporado e ressuspenso em 1 mL de solução água e acetonitrila (3:1). Uma alíquota de 100 µL (equivalente a 2 g de leite) foi injetada no cromatógrafo, cuja fase móvel consistiu em água, acetonitrila e metanol (65:23:12), em uma coluna com 250 × 4 mm e 5 µm de poro, a um fluxo de 1 mL por minuto. O forno da coluna foi mantido a 35°C. Nessas condições, os autores encontraram uma recuperação média de 90, 83 e 75%, com DPR_r de 8,3, 6,3 e 8,7, para os níveis de 0,04, 0,1 e 0,2 µg/L, respectivamente. O LD encontrado foi de 0,003 µg/L e o LQ 0,010 µg/L.

Conforme demonstrado, os resultados obtidos no presente estudo se assemelham aos demais. Comparativamente, verificou-se um tempo de retenção menor, com uma economia significativa de solventes e de tempo de uso do detector de fluorescência. Além disso, a utilização de uma alíquota menor da amostra (25 mL) pode contribuir para a eficiência da CIA, com uma melhor purificação do analito. A diluição do extrato final em 2 mL, contendo o equivalente a 0,6 mL da alíquota inicial de leite, leva a uma menor proporção de interferentes no volume injetado no equipamento de cromatografia, o que possibilita ainda preservar a eficiência da coluna cromatográfica.

5 CONCLUSÃO

O método avaliado no presente estudo demonstrou ser válido para a análise de resíduos de AFM1 em leite fluido, de acordo com as orientações do Inmetro e Comissão Europeia, considerando um limite de detecção de 0,002 µg/L e um limite de quantificação de 0,006µg/L, para a faixa de trabalho de 0,0012 a 0,7715 µg/L de AFM1. Com isso, evidencia ser apropriado para o controle de qualidade de leite fluido, em atendimento à Resolução ANVISA RDC nº07 de 2011, podendo ser incluído na rotina do Laboratório de Saúde Pública da Prefeitura da Cidade do Rio de Janeiro, para monitoramento da AFM1 em leite, considerando o limite máximo tolerado de 0,5 µg/L, estabelecido na Resolução.

6 PERSPECTIVAS FUTURAS

- Desenvolvimento e implementação dos Procedimentos Operacionais Padronizados para a aplicação do método no LASP, com base na metodologia descrita no presente estudo.
- Elaboração de rotina de controle de qualidade dos resultados analíticos, baseada em Carta Controle, ou similar.

REFERÊNCIAS

- ADEYEYE, S. A. O. Fungal mycotoxins in foods: A review. **Cogent Food & Agriculture**, v. 2, n. 1, p. 1-11, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/23311932.2016.1213127>. Acesso em: 11 dez. 2018.
- ANVISA (Brasil). **Guia para Qualidade em Química Analítica: Uma Assistência a Acreditação**. Tradução Gerência-Geral de Laboratórios em Saúde Pública. Brasília: ANVISA, 2004.
- AKHTAR, S. *et al.* Determination of Aflatoxin M1 and Heavy Metals in Infant Formula Milk Brands Available in Pakistani Markets. **Korean Journal for Food Science of Animal Resources**, v. 37, n. 1, p. 79–86, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.5851/kosfa.2017.37.1.79>. Acesso em: 02 fev. 2019.
- ANFOSSI, L.; GIOVANNOLI, C.; BAGGIANI, C. Mycotoxin detection. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 37, p. 120–126, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.copbio.2015.11.005>. Acesso em: 11 dez. 2018.
- ANJOS, M. R. *et al.* Multiresidue method for simultaneous analysis of aflatoxin M1, avermectins, organophosphate pesticides and milbemycin in milk by ultra-performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. **Food Additives & Contaminants: Part A**, v. 33, n. 6, p. 995–1002, 2016.
- AOAC. Appendix F: guidelines for standard method performance requirements. *In*: AOAC. **Official Methods of Analysis**. 20. ed. Maryland, USA: AOAC, 2016. Disponível em: http://www.eoma.aoac.org/app_f.pdf. Acesso em: 15 fev. 2019.
- ABNT. **NBR ISO/IEC 17025**: requisitos gerais para a competência de laboratórios de ensaio e calibração. Rio de Janeiro: ABNT, 2017. 32 p.
- BASTOS, L. P. H. *et al.* Estimativa do consumo de leite e produtos afins por crianças em instituição filantrópica da cidade do Rio de Janeiro. **Higiene Alimentar**, v. 30, n. 262–263, p. 64-69, 2016. Disponível em: <https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/19030>. Acesso em: 12 fev. 2019.
- BATTILANI, P. *et al.* Modelling, predicting and mapping the emergence of aflatoxins in cereals in the EU due to climate change. **EFSA Supporting Publications**, v. 9, n. 1, 2012. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.2903/sp.efsa.2012.EN-223>. Acesso em: 11 dez. 2018.
- BENTO, L. F. *et al.* Ocorrência de fungos e aflatoxinas em grãos de milho. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 71, n. 1, p. 44–49, 2012.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC N° 274, de 15 outubro de 2002. Aprova o Regulamento Técnico Sobre Limites Máximos de Aflatoxinas Admissíveis no Leite, no Amendoim, no Milho. **Diário Oficial da União**, seção 1, Brasília, DF. 16 out. 2002.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 07, de 18 de fevereiro de 2011. Dispõe sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos. **Diário Oficial da União**, seção 1, Brasília, DF, 22 fev. 2011b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 166, de 24 de julho de 2017. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, seção 1, Brasília, DF, 25 jul. 2017.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Manual de garantia da qualidade analítica**. Brasília: MAPA. Secretaria de Defesa Agropecuária, 2011a.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. PORTARIA nº 52, de 16 de JUNHO de 2016. **Diário Oficial da União**, Seção 1, Brasília, DF: 17 jun. 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. Divisão de Organização Sanitária. Comissão Nacional de Normas e Padrões Para Alimentos. Resolução CNNPA nº 34, de 19 de janeiro de 1977. Fixa para os alimentos, tolerância de 30ppb (trinta partes por bilhão) para as Aflatoxinas, calculada pela soma dos conteúdos das aflatoxinas B1 e G1. **Diário Oficial da União**, Seção 1, Brasília, DF, 19 jan. 1977.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Política Nacional de Alimentação e Nutrição**. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2013.

BRYDEN, W. L. Mycotoxins in the food chain: human health implications. **Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition**, v. 16, Suppl 1, p. 95–101, 2007.

CALDAS, E. D.; SILVA, S. C.; OLIVEIRA, J. N. Aflatoxinas e ocratoxina A em alimentos e riscos para a saúde humana. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 36, n. 3, p. 319–323, jun. 2002.

CAST. **Mycotoxins**: risks in plant, animal, and human systems. Ames, Iowa: CAST, 2003.

CASTRO, I. M. DE *et al.* Contaminante em leite: análise de aflatoxina M1 por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por fluorescência - CLAE/DFL. **Comunicado Técnico Embrapa Agroindústria de Alimentos**, n. 199, dez. 2013. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/978236/1/CT199Contaminanteleitelzabela.pdf>. Acesso em: 23 jan. 2019.

CASTRO, I. M. DE; ANJOS, M. R. DOS. Determinação de Aflatoxinas em Milho por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detecção por Fluorescência. **Comunicado Técnico Embrapa Agroindústria de Alimentos**, n. 158, 2009. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/663928/1/2009CTE0158.pdf>. Acesso em: 8 set. 2018.

CASTRO, I. M.; ANJOS, M. R.; TEIXEIRA, A. S. Análise de Aflatoxinas B1, G1, B2 e G2 em Castanha-do-Brasil, Milho e Amendoim Utilizando Derivatização Pós-Coluna

no Sistema Cromatográfico CLAE/ Kobra-Cell®/DFL. **Comunicado Técnico Embrapa Agroindústria de Alimentos**, n. 198. Disponível em:

<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/977550/1/2013CTE0198.pdf>. Acesso em: 20 dez. 2016.

COMISSÃO EUROPEIA. Regulamento CE n° 333, 28 de março de 2007. Estabelece métodos de amostragem e de análise para o controlo oficial dos teores de chumbo, cádmio, mercúrio, estanho na forma inorgânica, 3-MCPD e benzo(a)pireno nos géneros alimentícios. **Jornal Oficial das Comunidades Europeias**, 29 mar. 2007. Disponível em: <http://data.europa.eu/eli/reg/2007/333/oj/por>. Acesso em: 16 fev. 2019.

COMISSÃO EUROPEIA. Regulamento CE n° 401, 23 de fevereiro de 2006. Estabelece os métodos de amostragem e de análise para o controlo oficial dos teores de micotoxinas nos géneros alimentícios. **Jornal Oficial das Comunidades Europeias**, 28 nov. 2006. Disponível em: <http://data.europa.eu/eli/reg/2006/401/oj/por>. Acesso em: 9 fev. 2019.

COMISSÃO EUROPEIA. Regulamento CE n° 657, 08 de agosto de 2002. Dá execução ao disposto na Directiva 96/23/CE do Conselho relativamente ao desempenho de métodos analíticos e à interpretação de resultados, **Jornal Oficial das Comunidades Europeias**. 17 ago. 2002. Disponível em: <http://data.europa.eu/eli/dec/2002/657/oj/por>. Acesso em: 17 fev. 2019.

COMISSÃO EUROPEIA. Regulamento CE n° 1881, 20 de dezembro de 2006. Fixa os teores máximos de certos contaminantes presentes nos géneros alimentícios. **Jornal Oficial da União Europeia**. 20 dez. 2006. Disponível em: <https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2006:364:0005:0024:PT:PDF>. Acesso em: 09 fev. 2019.

COMISSÃO EUROPEIA. Departamento de Saúde e Segurança Alimentar. **SANTE/12089/2016. Guidance document on identification of mycotoxins in food and feed**. Comissão Europeia, 2016. Disponível em: https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/safety/docs/cs_contaminants_sampling_guid-doc-ident-mycotoxins.pdf. Acesso em: 15 fev. 2019.

COPPOCK, R. W.; DZIWENKA, M. M. Mycotoxins. *In*: GUPTA, Ramesh (ed.). **Biomarkers in Toxicology**. Oxford: Academic Press; Elsevier, 2014. p. 549–562.

COSTA, E. A. **Vigilância sanitária**: temas para debate. Salvador: EDUFBA, 2009.

DE SAEGER, S.; AUDENAERT, K.; CROUBELS, S. Report from the 5th International Symposium on Mycotoxins and Toxigenic Moulds: Challenges and Perspectives (MYTOX) Held in Ghent, Belgium, May 2016. **Toxins**, v. 8, n. 5, p. 146, 12 mai 2016.

DOMENICO, A. S. D. *et al.* Análise de trilha da contaminação por aflatoxinas em grãos de milho armazenados. **Pesq. Agropec. Bras.**, Brasília, v. 50, n. 6, p. 441-449, jun. 2015.

DRAGACCI, S.; GROSSO, F.; GILBERT, J. Immunoaffinity Column Cleanup with Liquid Chromatography for Determination of Aflatoxin M1 in Liquid Milk: Collaborative Study. **Journal of AOAC International**, v. 84. N. 2, 2001.

EFSA. Opinion of the Scientific Panel on contaminants in the food chain [CONTAM] related to Aflatoxin B1 as undesirable substance in animal feed. **The EFSA Journal**, v. 39, p. 1–27, 2004. Disponível em: <https://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/39>. Acesso em: 20 jan. 2019.

EFSA. Opinion of the scientific panel on contaminants in the food chain [CONTAM] related to the potential increase of consumer health risk by a possible increase of the existing maximum levels for aflatoxins in almonds, hazelnuts and pistachios and derived products. **EFSA Journal**, v. 5, n. 3, 1 mar. 2007. Disponível em: <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.2903/j.efsa.2007.446>. Acesso em: 20 jan. 2019.

EFSA. Summary of the 2014 Data Collection on Contaminant Occurrence. **EFSA Supporting Publications**, v. 13, n. 1, 01 jan. 2016. Disponível em: <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.2903/sp.efsa.2017.EN-1217>. Acesso em: 14 jan. 2019.

EFSA; VERNAZZA, F. Summary of the 2016 Data Collection on Contaminant Occurrence Data. **EFSA Supporting Publications**, v. 14, n. 5, 1 maio 2017. Disponível em: <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.2903/sp.efsa.2017.EN-1217>. Acesso em: 14 jan. 2019.

EMBRAPA. **Visão 2030**: o futuro da agricultura brasileira. Brasília, DF: Embrapa, 2018.

EMBRAPA. **ANUÁRIO leite 2018**: indicadores, tendências e oportunidades para quem vive no setor leiteiro. Juiz de Fora, MG: Embrapa Gado de Leite, 2018b. Disponível em: <https://www.embrapa.br/gado-de-leite/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1094149/anuario-leite-2018-indicadores-tendencias-e-oportunidades-para-quem-vive-no-setor-leiteiro>. Acesso em: 15 jan. 2019.

FAO. Evaluations of contaminants . *In*: JOINT FAO/WHO EXPERT COMMITTEE ON FOOD ADDITIVES, 83., 2016, Rome. **Summary and conclusions**. Rome: FAO; WHO, 2016. Disponível em: <https://www.who.int/foodsafety/publications/JECFA83-Summary.pdf?ua=1>. Acesso em: 14 jun. 2017.

FARIAS, A. X. DE *et al.* **Aflatoxina M1 em leite**: um risco para a saúde pública. Rio de Janeiro: Embrapa Agroindústria de Alimentos, 2005.

FERNANDES, A. M. *et al.* Distribution and stability of aflatoxin M1 during processing and storage of Minas Frescal cheese. **Food Control**, v. 24, n. 1, p. 104–108, 1 mar. 2012.

FAO; WTO. **Trade and food standards**. Rome: Food and Agriculture Organization; Geneva: World Trade Organization, 2017.

FRAZZOLI, C. *et al.* The Hotspot for (Global) One Health in Primary Food Production: Aflatoxin M1 in Dairy Products. **Frontiers in Public Health**, v. 4, p. 294, 2016. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpubh.2016.00294/full>. Acesso em: 02 fev. 2019.

FREIRE, F. C. O. *et al.* **Micotoxinas**: importância na alimentação e na saúde humana e animal. Fortaleza, CE: Embrapa Agroindústria Tropical, 2007.

GAO, Y. *et al.* Modulation of Intestinal Epithelial Permeability in Differentiated Caco-2 Cells Exposed to Aflatoxin M1 and Ochratoxin A Individually or Collectively. **Toxins**, v. 10, n. 1, p. 27, 2017.

GONÇALVES, L. *et al.* Incidence of aflatoxin M1 in fresh milk from small farms. **Food Science and Technology**, Campinas, SP, v. 37, n. SPE, p. 11–15, dez. 2017.

HAN, Z. *et al.* An ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for simultaneous determination of aflatoxins B1, B2, G1, G2, M1 and M2 in traditional Chinese medicines. **Analytica Chimica Acta**, v. 664, n. 2, p. 165–171, 7 abr. 2010.

HASHEMI, M. A survey of aflatoxin M1 in cow milk in Southern Iran. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 24, n. 4, p. 888–893, 2016.

HUSSAIN, I. *et al.* AFM1 contamination in milk from five dairy species in Pakistan. **Food Control**, v. 21, p. 122–124, 1 fev. 2010.

IAL. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. São Paulo: Instituto Adolf Lutz, 2008.

IHA, M. H. *et al.* Aflatoxin M1 in milk and distribution and stability of aflatoxin M1 during production and storage of yoghurt and cheese. **Food Control**, v. 29, n. 1, p. 1-6, jan. 2013.

IMAMURA, K. B. *et al.* Incidência de aflatoxinas no amendoim (*Arachis hypogaea* L) cru em casca da região da Alta Paulista-SP, durante o período de 2011 a 2012. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**. São Paulo, SP: jan. 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.18241/0073-98552014731603>. Acesso em: 11 dez. 2018.

INMETRO. Coordenação Geral de Acreditação. **Orientação sobre validação de métodos analíticos**: documento de caráter orientativo: DOQ-CGCRE-008. 7. rev. Rio de Janeiro: INMETRO, jul. 2018. Disponível em: http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/pesquisa_link.asp?seq_tipo_documento=5&cod_uo_numeracao=00774&num_documento=008. Acesso em: 20 jan. 2019.

IARC. **A review of human carcinogens**: Part F: Chemical agents and related occupations. Lyon: IARC, 2012. (IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, v. 100F).

IARC. **Mycotoxin control in low- and middle-income countries**. Lyon: IARC, 2015. (IARC Working Group Reports, n. 9).

IARC. **Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene**. Lyon: IARC, 2002. (IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, n. 82).

ISHIKAWA, A. T. *et al.* Exposure Assessment of Infants to Aflatoxin M₁ through Consumption of Breast Milk and Infant Powdered Milk in Brazil. **Toxins**, v. 8, n. 9, 31 2016.

JOINT FAO/WHO EXPERT COMMITTEE ON FOOD ADDITIVES. **Safety evaluation of certain mycotoxins in food**. Geneva: World Health Organization : IPCS, 2001.

JOINT FAO/WHO EXPERT COMMITTEE ON FOOD ADDITIVES. **Safety evaluation of certain contaminants in food**. WHO food additives series: World Health Organization : IPCS, 2018.

LI, P. *et al.* Aflatoxin Measurement and Analysis. *In*: TORRES-PACHECO, I. (ed.). **Aflatoxins: detection, measurement and control**. London: IntechOpen, 2011. Disponível em: <https://www.intechopen.com/books/aflatoxins-detection-measurement-and-control/aflatoxin-measurement-and-analysis>. Acesso em: 11 dez. 2018.

LI, S. *et al.* Occurrence of Aflatoxin M₁ in Raw Milk from Manufacturers of Infant Milk Powder in China. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 15, n. 5, p. 879, 2018.

LINDAHL, J. F.; KAGERA, I. N.; GRACE, D. Aflatoxin M₁ levels in different marketed milk products in Nairobi, Kenya. **Mycotoxin Research**, v. 34, n. 4, p. 289–295, nov. 2018.

LIU, Y. *et al.* Population Attributable Risk of Aflatoxin-Related Liver Cancer: Systematic Review and Meta-Analysis. **European journal of cancer**, Oxford, England, v. 48, n. 14, p. 2125–2136, set. 2012.

MARANHÃO, R. L. A.; FILHO, J. E. R. V. **Inserção Internacional do Agronegócio Brasileiro**. Brasília: Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada, 2017. Disponível em: http://repositorio.ipea.gov.br/bitstream/11058/8024/1/td_2318.pdf. Acesso em: 15 jan. 2019.

MARCHESE, S. *et al.* Aflatoxin B₁ and M₁: Biological Properties and Their Involvement in Cancer Development. **Toxins**, v. 10, n. 6, maio 2018.

MASHAK, Z. *et al.* Assessment of AflatoxinM₁ Contamination in UHT Flavored Milk Samples in Karaj, Iran. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research : IJPR**, v. 15, n. 3, p. 407–411, 2016.

MEDINA, A. *et al.* Climate change, food security and mycotoxins: Do we know enough? **Fungal Biology Reviews**, v. 31, n. 3, p. 143–154, jun. 2017.

- MOTTA, T. P. *et al.* Study on the occurrence of fungi and aflatoxina B1 in the diet of dairy cattle in São Paulo, Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 35, n. 1, p. 23–28, jan. 2015.
- MOVASSAGHGHAZANI, M. H.; GHORBANI, M. Incidence of Aflatoxin M1 in Human and Cow Milk in Kashan, Iran. **Journal of food quality and hazards control**, v. 4, n. 4, p. 99–102, 15 dez. 2017.
- MUNIZ, L. C.; MADRUGA, S. W.; ARAÚJO, C. L. Consumo de leite e derivados entre adultos e idosos no Sul do Brasil: um estudo de base populacional. **Ciência & Saúde Coletiva**. Rio de Janeiro, v. 18, p. 3515–3522, dez. 2013.
- NEIVA, R. **Alimentação do rebanho é o maior problema da pecuária de leite no Brasil**. Minas Gerais: Embrapa, 11 dez. 2018. Disponível em: www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/39871103/alimentacao-do-rebanho-e-o-maior-problema-da-pecuaria-de-leite-no-brasil. Acesso em: 15 jan. 2019.
- NESHEIM, S.; TRUCKSESS, M. W.; PAGE, S. W. Molar absorptivities of aflatoxins B1, B2, G1, and G2 in acetonitrile, methanol, and toluene-acetonitrile (9 + 1) (modification of AOAC Official Method 971.22): collaborative study. **Journal of AOAC International**, v. 82, n. 2, p. 251–258, abr. 1999.
- OLIVEIRA, C. A.; ROSMANINHO, J.; ROSIM, R. Aflatoxin M1 and cyclopiazonic acid in fluid milk traded in São Paulo, Brazil. **Food Additives and Contaminants**, v. 23, n. 2, p. 196–201, fev. 2006.
- 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, p. 221–225, maio 2010.
- OLIVEIRA, C. A. F.; GERMANO, P. M. L. Aflatoxinas: conceitos sobre mecanismos de toxicidade e seu envolvimento na etiologia do câncer hepático celular. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 31, n. 4, p. 417–424, ago. 1997.
- OLIVEIRA, C. P. DE *et al.* Aflatoxin M1 occurrence in ultra high temperature (UHT) treated fluid milk from Minas Gerais/Brazil. **Food Control**, v. 30, n. 1, p. 90–92, 1 mar. 2013.
- OLIVEIRA, M. S. **Validação de metodologia analítica para análise de aflatoxina M1 e sua ocorrência em leite bovino comercializado no sul do Brasil**. 2010, 107f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2010.
- OMAR, S. S. Aflatoxin M1 Levels in Raw Milk, Pasteurised Milk and Infant Formula. **Italian Journal of Food Safety**, v. 5, n. 3, p. 5788, 3 jun. 2016.
- ÖZTÜRK YILMAZ, S.; ALTINCI, A. Incidence of aflatoxin M1 contamination in milk, white cheese, kashar and butter from Sakarya, Turkey. **Food Science and Technology**, n. AHEAD, 2018.

PEREIRA, V. L.; FERNANDES, J. O.; CUNHA, S. C. Micotoxinas em Portugal: Ocorrência e Toxicidade. **Acta Farmacêutica Portuguesa**, v. 1 n°2, 2012.

PITT, J. *et al.* **Improving Public Health through Mycotoxin Control**. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer, 2012.

PITT, J. I.; MILLER, J. D. A Concise History of Mycotoxin Research. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 65, n. 33, p. 7021–7033, 23 ago. 2017.

PITT, J. I.; TANIWAKI, M. H.; COLE, M. B. Mycotoxin production in major crops as influenced by growing, harvesting, storage and processing, with emphasis on the achievement of Food Safety Objectives. **Food Control**, v. 32, n. 1, p. 205–215, jul. 2013.

PREFEITURA DA CIDADE DO RIO DE JANEIRO. Decreto Rio n° 45585, 27 de dezembro de 2018. Regulamento Administrativo do Código de Vigilância Sanitária, Vigilância de Zoonoses e de Inspeção Agropecuária, no âmbito do Município do Rio de Janeiro, instituído pela Lei Complementar n° 197, de 27, de dezembro de 2018, no tocante ao Licenciamento Sanitário e aos Procedimentos Fiscalizatórios. **Diário Oficial [do] Rio**. Rio de Janeiro, 28 dez. 2018.

RAHMANI, A.; JINAP, S.; SOLEIMANY, F. Validation of the procedure for the simultaneous determination of aflatoxins ochratoxin A and zearalenone in cereals using HPLC-FLD. **Food Additives & Contaminants: Part A**, v. 27, n. 12, p. 1683–1693, dez. 2010.

RIBANI, M. *et al.* Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771–780, out. 2004.

RIBEIRO, F. A. DE L. *et al.* Planilha de validação: uma nova ferramenta para estimar figuras de mérito na validação de métodos analíticos univariados. **Química Nova**, v. 31, n. 1, p. 164–171, 2008.

ROCHA, M. D. DA *et al.* Incidência de aflatoxinas em amostras de amendoim e paçoca comercializadas na cidade de Alfenas-MG, Brasil. **Revista Brasileira de Toxicologia**, v. 21, n. 1, 2008.

ROCHA, L. O. *et al.* Mycoflora and Co-Occurrence of Fumonisin and Aflatoxins in Freshly Harvested Corn in Different Regions of Brazil. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 10, n. 11, p. 5090–5103, nov. 2009.

RODRIGUES, I.; NAEHRER, K. A Three-Year Survey on the Worldwide Occurrence of Mycotoxins in Feedstuffs and Feed. **Toxins**, v. 4, n. 9, p. 663–675, 12 set. 2012.

SANTILI, A. B. N. *et al.* Aflatoxin M₁ in raw milk from different regions of São Paulo state – Brazil. **Food Additives & Contaminants: Part B**, v. 8, n. 3, p. 207–214, 3 jul. 2015.

SANTINI, A. *et al.* Aflatoxin M₁ in raw, UHT milk and dairy products in Sicily (Italy). **Food Additives & Contaminants: Part B**, v. 6, n. 3, p. 181–186, 1 set. 2013.

SARTORI, A. V. *et al.* Determination of aflatoxins M1, M2, B1, B2, G1 and G2 in peanut by modified QuEChERS method and ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Vigilância Sanitária em Debate**. Rio de Janeiro, v. 3, n. 3, 27 nov. 2014.

SARTORI, A. V. *et al.* Determination of Aflatoxins M1, M2, B1, B2, G1, and G2 and Ochratoxin A in UHT and Powdered Milk by Modified QuEChERS Method and Ultra-High-Performance Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry. **Food Anal. Methods**, 19 fev. 2015.

SHARIFZADEH, A. *et al.* Aflatoxin M1 Contamination Levels in Cheeses Sold in Isfahan Province, Iran. **Osong Public Health and Research Perspectives**, v. 8, n. 4, p. 260–263, ago. 2017.

SILVA, M. V. *et al.* Occurrence and estimative of aflatoxin M1 intake in UHT cow milk in Paraná State, Brazil. **Food Control**, v. 53, p. 222–225, jul. 2015.

SIRHAN, A. Y. *et al.* QuEChERS-HPLC METHOD FOR AFLATOXIN DETECTION OF DOMESTIC AND IMPORTED FOOD IN JORDAN. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 37, n. 3, p. 321–342, 7 fev. 2014.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE ALIMENTAÇÃO E NUTRIÇÃO. **A Importância do Consumo de Leite no Atual Cenário Nutricional Brasileiro**, 2015. Disponível em: http://www.sban.org.br/por_dentro/documentos-tecnicos/205/a-importancia-do-consumo-de-leite-no-atual-cenario-nutricional-brasileiro. Acesso em: 12 fev. 2019.

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. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Campinas, v. 19, n. 3, p. 401–405, dez. 1999.

SPISSO, B. F.; NÓBREGA, A. W. DE; MARQUES, M. A. S. Resíduos e contaminantes químicos em alimentos de origem animal no Brasil: histórico, legislação e atuação da vigilância sanitária e demais sistemas regulatórios. **Ciência & Saúde Coletiva**. Rio de Janeiro, v. 14, p. 2091–2106, dez. 2009.

STEIN, R. A.; BULBOACĂ, A. E. Mycotoxins. *In*: DODD, C.; ALDSWORTH, T.; STEIN, R. **Foodborne Diseases**. [Oxford]: Elsevier; Academic Press, 2017. p. 407–446.

STOLOFF, L. Occurrence of Mycotoxins in Foods and Feeds. *In*: RODRICKS, J. V. (ed.). **Mycotoxins and other fungal related food problems**. Washington, D. C.: American Chemical Society, 1976. v. 149, p. 23–50.

TANCREDI, R. C. P.; MORAES, O. M. G. DE; MARIN, V. A. Vigilância Sanitária Municipal do Rio de Janeiro: considerações sobre a aplicabilidade normativa no controle de alimentos. **Revista de Direito Sanitário**, v. 5, n. 3, p. 85, 14 nov. 2004.

TEIXEIRA, A. DA 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. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 29 ago. 2008.

THOMPSON, M. Recent trends in inter-laboratory precision at ppb and sub-ppb concentrations in relation to fitness for purpose criteria in proficiency testing. **Analyst**, 125, 385–386, 2000.

THOMPSON, M.; ELLISON, S. L. R.; WOOD, R. Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis (IUPAC Technical Report). **Pure and Applied Chemistry**, v. 74, n. 5, p. 835–855, 2002.

TURNER, N. W. *et al.* Analytical methods for determination of mycotoxins: An update (2009–2014). **Analytica Chimica Acta**, v. 901, p. 12–33, dez. 2015.

VAN EGMOND, H. P.; SCHOTHORST, R. C.; JONKER, M. A. Regulations relating to mycotoxins in food: Perspectives in a global and European context. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 389, n. 1, p. 147–157, set. 2007.

VARIANE, A. C. F. *et al.* The occurrence of aflatoxigenic *Aspergillus* spp. in dairy cattle feed in Southern Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 49, n. 4, p. 919–928, dez. 2018.

WACOO, A. P. *et al.* Methods for Detection of Aflatoxins in Agricultural Food Crops. **Journal of Applied Chemistry**, v. 2014, p. 1–15, 2014.

WENZL, T. *et al.* (ed.). **Guidance document on the estimation of LOD and LOQ for measurements in the field of contaminants in feed and food.** Luxemburgo: Publications Office, 2016.

WHO; FAO. **Assuring Food Safety and Quality: Guidelines for Strengthening National Food Control Systems.** Geneva, Switzerland: World Health Organization, 2003.

WHO; FAO. **Evaluation of certain contaminants in food:** eighty-third report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Geneva, Switzerland: World Health Organization, 2017.

WHO; FAO. CODEX STANDARD 193-1995: general standard for contaminants and toxins in food and feed. **Codex Committee on Contaminants in Food.** 2018. Disponível em: <http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/thematic-areas/contaminants/en/>. Acesso em: 05 fev. 2019.

WU, F. Global impacts of aflatoxin in maize: trade and human health. **World Mycotoxin Journal**, v. 8, n. 2, p. 137–142, jan. 2015.

YAO, H.; HRUSKA, Z.; DI MAVUNGU, J. D. Developments in detection and determination of aflatoxins. **World Mycotoxin Journal**, v. 8, n. 2, p. 181–191, jan. 2015.

ZHENG, N. *et al.* Occurrence of aflatoxin M1 in UHT milk and pasteurized milk in China market. **Food Control**, v. 29, n. 1, p. 198–201, jan. 2013.

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

ANEXO A – MODELO DE PLANILHA UTILIZADA PARA A AVALIAÇÃO DA LINEARIDADE DO MÉTODO

Ministério da Saúde FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde		INCQS			
AVALIAÇÃO DE LINEARIDADE DE CURVA ANALÍTICA					
Dados da Curva Analítica					
Análise:	AFM1	Curva N°:	7		
Data de Confeção da Curva:	31/05/2019	N° de Níveis (n):	7		
Replicatas por Nível (k):	3	Responsável:	Fabio Moraes		
Equipamento:	HPLC-F				
Tabela de dados originais					
Nível (k)	i	Conc. ng / 50 µL	Resposta Área		
1	01	0,0020	1858		
	02	0,0020	1662		
	03	0,0020	1872		
2	04	0,0080	7268		
	05	0,0080	7109		
	06	0,0080	6922		
3	07	0,0803	71492		
	08	0,0803	71050		
	09	0,0803	70543		
4	10	0,1808	162446		
	11	0,1808	162850		
	12	0,1808	166516		
5	13	0,2813	250523		
	14	0,2813	252219		
	15	0,2813	251727		
6	16	0,3817	328388		
	17	0,3817	327140		
	18	0,3817	326741		
7	19	0,4822	417734		
	20	0,4822	419327		
	21	0,4822	419617		
Avaliação de Valores Extremos (Teste de Jack-Knife para avaliação de valores extremos)					
Os dados da tabela marcados em vermelho foram avaliados e retirados do conjunto de dados por se tratarem de valores extremos (outliers). Estes dados não serão considerados na avaliação das premissas.					
Curva Analítica Final 					
Gráfico de Resíduos 					
Normalidade dos Resíduos (Teste de Ryan-Joiner)					
Req	0,95				
Rcrit (α = 0,05)	0,95				
Autocorrelação dos Resíduos (Teste de Durbin-Watson)					
d (calculado)	0,65				
dL (Limite Inferior) α = 0,05	1,20				
dU (Limite Superior) α = 0,05	1,41				
Homogeneidade da Variância dos Resíduos (Teste de Brown-Forsythe)					
Variância Combinada	1,45E+07				
t _L calculado	-1,43E+00				
t _{tabela} (α = 0,05)	2,10E+00				
p	1,70E-01				
Resumo da Avaliação					
Homogeneidade de variância					
Há Homocedasticidade p > 0,05					
Regressão e Teste de Desvio de Linearidade					
A regressão é significativa p < 0,001					
Há desvio de linearidade p < 0,05					
Autocorrelação dos Resíduos (α = 0,05)					
Há autocorrelação d < dL					
Teste de Normalidade (α = 0,05)					
Segue a Normal Req > Rcrit					
Estadísticas da Regressão Linear (Modelo: Y = a + bX)					
Coefficiente Angular (b):	8,66E+05	Coefficiente Linear (a):	1,68E+03		
r	0,9997	R ²	0,9995		
N	20	Graus de Liberdade	18		
Limites de Detecção e Quantificação (LD e LQ)					
Limite de Detecção	9,43E-03	Limite de Quantificação	2,82E-02		
ANOVA da Regressão e Teste de Desvio de Linearidade (Falta de Ajuste)					
fonte	G.L.	SQ	MQ	F	p
regressão	1	4,73E+11	4,73E+11	3,49E+04	4,82E-31
resíduos	18	2,44E+08	1,36E+07		
Ajuste	4	2,38E+08	5,96E+07	1,47E+02	2,89E-11
erro puro	14	5,68E+06	4,05E+05		
total	19	4,73E+11			
Observações					
Responsável: _____ Data: ___/___/___ Verificado por: _____ Data: ___/___/___					
AVALIAÇÃO DE LINEARIDADE DE CURVA ANALÍTICA				Pág.:1/1	

ANEXO B – MODELO DE PLANILHA UTILIZADA PARA A AVALIAÇÃO DA RECUPERAÇÃO E PRECISÃO DO MÉTODO

Dados das Curvas (Planilha INCQS - ng/50µL)								
		30/mai		31/mai				
		ng/mL	ng/50µL	ng/mL	ng/50µL			
	1	0,0161	0,0008	0,0402	0,0020			
	2	0,0804	0,0040	0,1608	0,0080			
	3	0,3215	0,0160	1,6075	0,0803			
Níveis	4	0,5626	0,0281	3,6169	0,1808			
	5	0,8038	0,0401	5,6263	0,2813			
	6			7,6356	0,3817			
	7			9,6450	0,4822			
		885000		866473				
Coefficiente angular		38,5		1679,5				
Coefficiente linear		0,00064		0,00943				
LD		0,00193		0,0282				
LQ								
Dados das amostras								
Datas	Areas	ng/50µL	[AOAC µg/L]	ng/50µL	[AOAC µg/L]			
18/jun	Amostra 0,5ppb 4	251044	0,28362	0,45380	0,28779	0,46047		
		251382	0,28400	0,45441	0,28818	0,46109		
		252244	0,28498	0,45596	0,28918	0,46268		
	Amostra 0,5ppb 5	251438	0,28407	0,45451	0,28825	0,46120		
		251846	0,28453	0,45525	0,28872	0,46195		
		252447	0,28521	0,45633	0,28941	0,46306		
	Amostra 0,5ppb 6	254392	0,28741	0,45985	0,29166	0,46665		
		252832	0,28564	0,45703	0,28986	0,46377		
		253403	0,28629	0,45806	0,29052	0,46482		
Dados estatísticos								
	x	Areas	[µg/L]	x _i - x̄		(x _i - x̄) ²		
				Areas	[µg/L]	Areas	[µg/L]	
Amostra 4	1	251044	0,4604	-1292	-0,0024	1670412,642	5,76E-06	
	2	251382	0,4610	-954	-0,0018	910964,1975	3,24E-06	
	3	252244	0,4626	-92	-0,0002	8545,975309	4,00E-08	
Amostra 5	4	251438	0,4612	-898	-0,0016	807202,4198	2,56E-06	
	5	251846	0,4619	-490	-0,0009	240535,7531	8,10E-07	
	6	252447	0,4630	111	0,0002	12222,53086	4,00E-08	
Amostra 6	7	254392	0,4666	2056	0,0038	4225308,642	1,44E-05	
	8	252832	0,4637	496	0,0009	245575,3086	8,10E-07	
	9	253403	0,4648	1067	0,0020	1137540,753	4,00E-06	
	Média (x̄)	252336	0,4628			Σ(x _i - x̄) ²	9258308,222	3,17E-05
						[Σ(x _i - x̄) ²]/(N-1)	1157288,528	3,96E-06
						DP	1075,77	1,99E-03
						DPR (%)	0,43	0,43
Recuperação								
				Am Bco	0,0020			
				Padrão ad	0,5144			
				Am 0,5ppb	0,4628			
				Rec %	89,58			