

## Validação de método analítico para determinação de multimicotoxinas em leite

## Validation of analytical method for determination of multi mycotoxins in milk

### RESUMO

**Juliana França Lima**  
[julianafrancelima@hotmail.com.br](mailto:julianafrancelima@hotmail.com.br)  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná  
Medianeira, Paraná, Brasil

**Deisy Alessandra Drunkler**  
[deisydrunkler@utfpr.edu.br](mailto:deisydrunkler@utfpr.edu.br)  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná  
Medianeira, Paraná, Brasil

**Daniélly Nascimento Morais**  
[dany\\_spm@hotmail.com](mailto:dany_spm@hotmail.com)  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná  
Medianeira, Paraná, Brasil

**Elizandra Noely Grinfelder Ardohain**  
[elizandra.grinfelder@gmail.com](mailto:elizandra.grinfelder@gmail.com)  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná  
Medianeira, Paraná, Brasil

**Flavio Dias Ferreira**  
[flavioferreira@utfpr.edu.br](mailto:flavioferreira@utfpr.edu.br)  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná  
Medianeira, Paraná, Brasil

O leite é importante fonte de nutrientes na alimentação humana, mas sua qualidade pode ser comprometida pela presença de compostos tóxicos. Embora o limite máximo de AFM<sub>1</sub> seja determinado para garantir a saúde dos consumidores, outras micotoxinas não são controladas e há informações limitadas sobre a ocorrência de micotoxinas nessa matriz. Por isso, um método de extração baseado no método QuEChERS foi validado para determinação de aflatoxinas B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>), G<sub>1</sub> (AFG<sub>1</sub>), G<sub>2</sub> (AFG<sub>2</sub>) e M<sub>1</sub>, ocratoxina (OTA) e zearalenona (ZEA) de forma simultânea em leite fluído por cromatografia líquida acoplado a um detector de fluorescência. As curvas analíticas apresentaram r<sup>2</sup> superior a 0,99, o LQ estabelecido pelo método foi: 0,16; 1,08; 0,01; 0,12; 0,33 e 8,93 µg/Kg para AFB<sub>1</sub>, AFG<sub>1</sub>, AFG<sub>2</sub>, AFM<sub>1</sub>, OTA e ZEA, respectivamente. As recuperações do método foram entre 73,33 e 114,32 %. O efeito matriz foi inferior a 20 %, com exceção para a AFB<sub>1</sub> em dois ensaios. O método foi eficiente para identificar e quantificar multimicotoxinas em leite fluído e pode ser aplicado como método de rotina para monitorar a qualidade do leite, objetivando oferecer produtos seguros para o consumo humano.

**PALAVRAS-CHAVE:** Toxicidade. Micotoxinas. Leite e derivados lácteos.

### ABSTRACT

Milk is an important source of nutrients in human food, but its quality may be compromised by the presence of toxic compounds. Although the maximum limit of AFM<sub>1</sub> is determined to ensure consumer health, other mycotoxins are not controlled and there is limited information on the occurrence of mycotoxins in this matrix. Therefore, an extraction method based on the QuEChERS method has been validated for the determination of aflatoxins B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>), G<sub>1</sub> (AFG<sub>1</sub>), G<sub>2</sub> (AFG<sub>2</sub>) and M<sub>1</sub>, ochratoxin (OTA) and zearalenone (ZEA) simultaneously in fluid milk by liquid chromatography coupled to a fluorescence detector. The analytical curves presented r<sup>2</sup> higher than 0.99, the LQ established by the method was: 0.16; 1.08; 0.01; 0.12; 0.33 and 8.93 µg / kg for AFB<sub>1</sub>; AFG<sub>1</sub>; AFG<sub>2</sub>; AFM<sub>1</sub>; OTA and ZEA, the method recoveries were between 73.33 and 114.32% and the matrix effect was superior and inferior 20% except for AFB<sub>1</sub> in two trials. The method was efficient to identify and quantify multimicotoxins in fluid milk and can be applied as a routine method to monitor milk quality, aiming to offer safe products for human consumption.

**KEYWORDS:** Toxicity. Micotoxins. Milk and dairy products.

**Recebido:** 19 ago. 2019.  
**Aprovado:** 01 out. 2019.  
**Direito autorial:** Este trabalho está licenciado sob os termos da Licença Creative Commons-Atribuição 4.0 Internacional.



## INTRODUÇÃO

O leite é um dos mais completos alimentos disponíveis *in natura* para o homem, apresentando uma balanceada composição em nutrientes, sendo seu consumo recomendado em todas as etapas de desenvolvimento do ser humano, principalmente na infância e na velhice (FLORES-FLORES; GONZÁLEZ-PEÑAS, 2015; RODRÍGUEZ-CARRASCO et al., 2018). No entanto, pode carrear micotoxinas, que são metabólitos secundários de baixo peso molecular produzidos por fungos e que apresentam efeito tóxico para o homem e outros animais (JIA et al., 2014). Estes compostos apresentam sérios riscos à saúde humana, sendo responsáveis por várias patologias coletivamente chamadas micotoxicoses (ARROYO-MANZANARES; GARCÍA-CAMPAÑA; GÁMIZ-GRACIA, 2013). Dentre as micotoxinas, a principal é a aflatoxina M<sub>1</sub> (AFM<sub>1</sub>), que é um produto de metabolização da AFB<sub>1</sub> ingerida através da ração ou silagem contaminada (SARTORI et al., 2015). No entanto, hoje sabe-se que não somente a AFM<sub>1</sub> pode estar presente no leite, mas também a própria AFB<sub>1</sub> e demais aflatoxinas, e outras micotoxinas, como ocratoxina (OTA) e zearalenona (ZEA) (FLORES-FLORES; GONZÁLEZ-PEÑAS, 2015). Desta forma, o objetivo do trabalho foi validar um método para determinar de forma simultânea multi-micotoxinas (AFM<sub>1</sub>, AFB<sub>1</sub>, AFG<sub>1</sub>, AFG<sub>2</sub>, OTA e ZEA) em leite ultra alta temperatura (UAT) empregando cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por fluorescência (FLD), seguindo a normativa nacional da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2017).

## MATERIAL E MÉTODOS

As soluções estoque das micotoxinas AFM<sub>1</sub>, AFB<sub>1</sub>, AFG<sub>1</sub>, AFG<sub>2</sub>, ZEA e OTA (*Sigma Chemical Company*®, St. Louis, MO, EUA) foram preparadas individualmente e padronizadas, em espectrofotômetro UV-Vis em comprimento de onda específico de acordo com a metodologia descrita pelo Instituto Adolfo Lutz (IAL, 2008). As soluções de trabalho de cada micotoxina continham 1,0, 0,5 e 0,25 µg.mL<sup>-1</sup> para AFM<sub>1</sub>; 4,0; 2,0; 1,0 µg.mL<sup>-1</sup> para AFB<sub>1</sub>, AFG<sub>1</sub>, AFG<sub>2</sub> e OTA; e 10,50; 5,25; 2,63 µg.mL<sup>-1</sup> para ZEA e foram preparadas em metanol (MeOH). Foi empregado o cromatógrafo à líquido de alta eficiência (HPLC) (Thermo Fisher, UltiMate 3000, Sunnyvale, Estados Unidos) acoplado ao detector de fluorescência (FL) composto por *Software Chromeleon 7.2* para controle e aquisição de dados. As análises foram realizadas utilizando-se uma coluna cromatográfica C18 Acclaim PA2, 5µm Analítica (4.6 x 250 mm), mantida a 35 °C. A fase móvel empregada no modo gradiente foi constituída por acetonitrila: água (30:70, v/v) e acetonitrila: água: metanol (50:40:10) ambas acidificadas a 0,85 % com ácido acético, o fluxo foi de 1,5 mL min<sup>-1</sup> e o volume de injeção foi de 35 µL.

Para realização do método de extração foram transferidos 10 mL de leite UAT desnatado e fortificado a partir das soluções de trabalho para tubo tipo falcón. Foram adicionados à amostra 10 mL de acetonitrila e na sequência o tubo foi agitado manualmente por 2 minutos em vórtex. Posteriormente, adicionou-se 4 g de MgSO<sub>4</sub> e 1 g de NaCl ao tubo e agitou-se novamente. Os tubos foram levados à centrifuga (Cientec, CT 400, Minas Gerais, Brasil), em temperatura ambiente por 15 minutos a 4000 rpm. Oito mL do sobrenadante foram retirados e transferidos para outro tubo tipo falcón contendo 0,30 g de MgSO<sub>4</sub> e 0,20 g de celite. Os tubos foram agitados manualmente por 30 segundos e centrifugados por 7 minutos a

4000 rpm. Alíquotas de cinco mL do sobrenadante foram secas. O extrato seco foi ressuspenso em solvente orgânico, homogeneizado em vortex, foi transferido para um vial e posteriormente foi analisado no HPLC. Uma amostra branco (isenta de micotoxinas) foi preparada seguindo o mesmo método para comparação.

O método foi validado seguindo os parâmetros de desempenho recomendados pelas Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Brasil, 2017), sendo eles: a) seletividade, que foi avaliada comparando-se o cromatograma gerado pela matriz isenta de micotoxinas e desta fortificada; b) linearidade, por curvas de calibração individuais com 7 ou 8 pontos construídas por diluição das substâncias químicas de interesse em ordem decrescente de concentração; c) limite de detecção e de quantificação, foram avaliados pelo sinal ruído da linha de base como sendo 3 vezes superior ao sinal do analito em LD e 10 vezes superior ao sinal do analito em LQ; d) efeito matriz, foi realizada a comparação entre as áreas obtidas das soluções analíticas em solvente orgânico e daquelas obtidas com soluções analíticas preparadas no extrato de cada matriz (triplicata); e) recuperação, aplicou-se a fortificação em 3 níveis de concentração com 3 repetições para cada nível. As amostras foram extraídas pelo método desenvolvido.

A regressão linear foi calculada para obtenção do coeficiente de determinação ( $r^2$ ) por análise de variância (ANOVA). Os ensaios de recuperação foram realizadas em triplicata e os resultados expressos como média  $\pm$  desvio-padrão relativo. Os resultados do efeito matriz foram analisados estatisticamente, as médias foram comparadas pelo teste de *t student*, considerando-se um nível de significância de 5%.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na comparação das matrizes, não houve detecção de contaminantes do tipo micotoxina na amostra de leite avaliada como branco, demonstrando que o método de extração de micotoxinas utilizado é seletivo.

Observou-se a alta correlação linear de todas as curvas realizadas. O coeficiente de determinação ( $r^2$ ) foi de 99 % para todas as micotoxinas (Tabela 1). Estes parâmetros atendem aos dispostos pela ANVISA para os estudos sobre linearidade e respostas analíticas individuais (BRASIL, 2017).

Tabela 1 - Linearidade das micotoxinas estudadas

MICOTOXINAS	Curva Analítica				DP
	a	b	$r^2$	r	
AFB <sub>1</sub>	394078,8	-106,60	0,9999	0,9999	187,05
AFG <sub>1</sub>	453891,70	3501,50	0,9992	0,9996	4475,70
AFG <sub>2</sub>	22397584,00	-1327,00	0,9999	0,9999	2034,2
AFM <sub>1</sub>	3014300,10	1657,00	0,9984	0,9992	8933,79
OTA	4172183,00	-3528,00	0,9971	0,9985	8738,10
ZEA	837798,10	4955,00	0,9998	0,9999	3443,30

Fonte: Próprio autor (2019). Legenda: Concentração das Diluições individuais das curvas em  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ : AFB<sub>1</sub> (57,60; 28,80; 14,4; 7,2; 3,6; 1,8; 0,9); AFG<sub>1</sub> (500; 250; 125; 62,3; 31; 15,60); AFG<sub>2</sub> (25; 12,5; 6,3; 3,1; 1,6; 0,8; 0,47); AFM<sub>1</sub> (50; 24,0; 12,0; 6,0; 3,0; 1,50; 0,75); OTA (100; 50,0; 25,0; 12,5; 6,4; 3,2; 1,6); e ZEA (100; 50,0; 25,0; 12,5; 6,4; 3,2; 1,6).

O limite de quantificação foi de 0,16  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  para  $\text{AFM}_1$  (Tabela 2) e a legislação brasileira tolera o máximo de 0,5  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  (BRASIL, 2011). Para as demais micotoxinas não há de limite máximo de tolerância determinado pela legislação vigente no Brasil em leite e seus derivados.

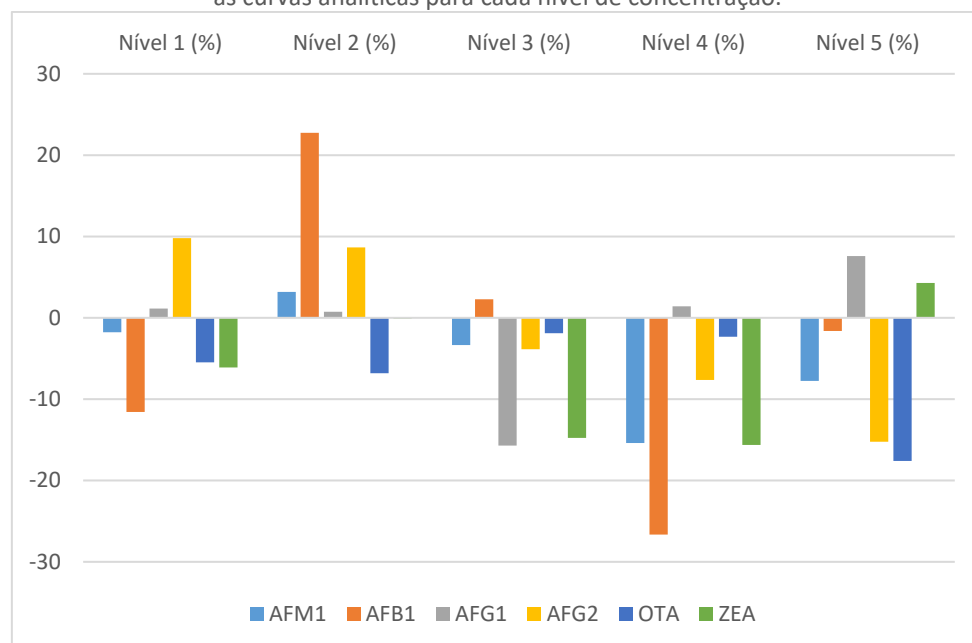
Tabela 2 – Limites de detecção e quantificação do método

Micotoxina	LQ $\mu\text{g.kg}^{-1}$	LD $\mu\text{g.kg}^{-1}$
$\text{AFB}_1$	0,16	0,049
$\text{AFG}_1$	1,08	0,33
$\text{AFG}_2$	0,01	0,003
$\text{AFM}_1$	0,12	0,03
OTA	0,33	0,09
ZEA	8,93	2,68

Fonte: Próprio autor (2019). Legenda: LQ =  $10*s/S$ ; LD =  $3*s/S$ .

De maneira geral, o efeito matriz foi baixo nas concentrações preparadas no extrato do leite, com exceção para as concentrações do nível 2 e 4 de  $\text{AFB}_1$  (Tabela 3). Considera-se que desvios entre -20% e + 20% não influenciam de maneira relevante sobre os resultados obtidos sobre os demais parâmetros.

Gráfico 1 - Percentual do efeito matriz observado na faixa de concentração estudada para as curvas analíticas para cada nível de concentração.



Fonte: Próprio autor (2019).

A precisão do método foi avaliada por medidas repetidas dos níveis de fortificação, no mesmo dia (repetibilidade,  $n = 3$ ) e foram expressos como desvio padrão relativo (% RSD). Os dados de precisão mostram que o método é repetível, o percentual de RSD variará em função da micotoxina observada devido as características químicas intrínsecas de cada uma (BRASIL, 2017).

Tabela 3 - Percentuais médios de recuperação e os valores de RSD% obtidos através do estudo de fortificação e recuperação em leite fluido desnatado, nas três concentrações de fortificação estudadas.

MICOTOXINAS	Níveis de fortificação					
	Nível 1		Nível 2		Nível 3	
	Rec. (%)	RSD (%)	Rec. (%)	RSD (%)	Rec. (%)	RSD (%)
AFM <sub>1</sub>	101,60	7,34	109,99	4,44	92,03	5,67
AFB <sub>1</sub>	73,51	13,90	91,14	11,83	73,33	6,34
AFG <sub>1</sub>	89,41	14,41	114,32	24,65	85,67	0,01
AFG <sub>2</sub>	105,26	4,33	102,95	3,18	106,31	5,21
ZEA	99,80	14,05	92,61	12,91	111,93	4,85
OTA	106,43	3,94	72,64	4,33	108,71	6,44

Fonte: Próprio Autor (2019). Legenda: Rec., recuperação; RSD, desvio padrão relativo. Concentração AFM<sub>1</sub>, AFB<sub>1</sub>, AFG<sub>1</sub>, AFG<sub>2</sub>, ZEA e OTA Nível 1 (0,40; 1,00; 2,00; 0,10; 0,40; 4 µG.KG<sup>-1</sup>); Nível 2 (0,80; 2,00; 4,00; 0,20; 0,80; 8,00 µG.KG<sup>-1</sup>); Nível 3 (1,16; 4,00; 6,00; 0,40; 1,60; 16,00 µG.KG<sup>-1</sup>)

## CONCLUSÃO

O método QuERChERS modificado validado e empregado neste estudo para determinação de multimicotoxinas mostrou ser uma alternativa viável na qual não há necessidade de derivatização, além de ser rápido, eficiente e sensível mesmo quando aplicado em uma matriz complexa, como é o caso do leite.

## AGRADECIMENTOS

Ao CNPq pela Bolsa de Iniciação Científica à primeira autora e à CAPES, pela bolsa DS-Capes para a terceira autora.

## REFERÊNCIAS

ARROYO-MANZANARES, N.; GARCÍA-CAMPAÑA, A. M.; GÁMIZ-GRACIA, L. Multiclass mycotoxin analysis in *Silybum marianum* by ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry using a procedure based on QuEChERS and dispersive liquid-liquid microextraction. *Journal of Chromatography A*. v. 1282, p. 11–19, 2013. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23415469>. Acesso em: 10 ago. 2019.

BRASIL. Ministério da Saúde - Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA - Estabelece os limites máximos para aflatoxinas (AFB<sub>1</sub>+AFB<sub>2</sub>+AFG<sub>1</sub>+AFG<sub>2</sub> e AFM<sub>1</sub>), ocratoxina A (OTA), desoxinivalenol (DON), fumonisinas (FB<sub>1</sub> + FB<sub>2</sub>), patulina (PAT) e zearalenona (ZON) admissíveis em alimentos prontos para oferta ao consumidor e em matérias-primas. RDC Nº 7, de 18 de fevereiro de 2011. Disponível em: [http://bvsm.sau.gov.br/bvs/sau/legis/anvisa/2011/res0007\\_18\\_02\\_2011\\_re\\_p.html](http://bvsm.sau.gov.br/bvs/sau/legis/anvisa/2011/res0007_18_02_2011_re_p.html). Acesso em: 10 ago. 2019.

BRASIL. Ministério da Saúde - Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA -Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos.: RDC N° 166, de 24 de junho de 2017. BRASÍLIA. Disponível em: [http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2721567/RDC\\_166\\_2017\\_COMP.pdf/d5fb92b3-6c6b-4130-8670-4e3263763401](http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2721567/RDC_166_2017_COMP.pdf/d5fb92b3-6c6b-4130-8670-4e3263763401). Acesso em: 14 ago. 2019.

FLORES-FLORES, M. E.; GONZÁLEZ-PEÑAS, E. **Development and validation of a high performance liquid chromatographic** – mass spectrometry method for the simultaneous quantification of 10 trichothecenes in ultra-high temperature processed cow milk. v. 1419, p. 37–44, 2015. Disponível em: <https://europepmc.org/abstract/med/2643185>. Acesso em: 14 ago. 2019.

IAL - INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Métodos físicos-químicos para análises de alimentos. In: ZENEBON, O.; PASCUET, N. S.; TIGLEA, P. (Eds.). **Métodos físicos-químicos para análises de alimentos**. 4º ed. São Paulo. p. 1020. Acesso em: 14 ago. 2019.

JIA, W.; CHU, X.; LING, Y.; HUANG, J.; CHANG, J. Multi-mycotoxin analysis in dairy products by liquid chromatography coupled to quadrupole orbitrap mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, Beijing, v. 1345, p. 107–114, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.04.021>. Acesso em: 14 ago. 2019.

RODRÍGUEZ-CARRASCO, Y.; IZZO, L.; GASPARI, A.; GRAZIANI, G.; MAÑES, J.; RITIENI, A. Simultaneous Determination of AFB1 and AFM1 in Milk Samples by Ultra High Performance Liquid Chromatography Coupled to Quadrupole Orbitrap. **Beverages**, Basel, v. 43, n. 4, p. 1–9, 2018. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2306-5710/4/2/43>. Acesso em: 14 ago. 2019.

SARTORI, A. V.; SWENSSON DE MATTOS, J.; DE MORAES, M. H. P.; DA NÓBREGA, A. W. 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 Analytical Methods**, Nova York, v. 8, n. 9, p. 2321–2330, 2015. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12161-015-0128-4>. Acesso em: 14 ago. 2019.