

ÉRICA CRISTINA RAMÍREZ BAGGIO

**DETERMINAÇÃO DE AFLATOXINA M₁ EM LEITE PASTEURIZADO PELOS
MÉTODOS DE CCD E CLAE UTILIZANDO COLUNA DE IMUNOAFINIDADE**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Tecnologia de Alimentos, Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos, Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Renato João Sossela de Freitas

CURITIBA

2006

Baggio, Érica Cristina Ramírez
Determinação de aflatoxina M₁ em leite pasteurizado pelos métodos
de CCD e CLAE utilizando coluna de imunoafinidade / Érica Cristina
Ramírez Baggio. — Curitiba, 2006.
xv, 95 f.: il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Paraná. Setor de
Tecnologia. Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de
Alimentos.

Orientador: Renato João Sossela de Freitas

1. Aflatoxina. 2. Leite – Contaminação I. Freitas, Renato João
Sossela de. II. Título.

CDD 20 664.07

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, Dorival e Irene, pelo amor incondicional, aos meus irmãos, Junior e Luis Henrique e ao meu namorado Marcos Paulo que me apoiaram e incentivaram neste momento tão importante da minha vida profissional.

AGRADECIMENTOS

Quero agradecer a Deus que sempre esteve ao meu lado, me dando forças para trilhar o caminho escolhido por mim, fazendo-me acreditar cada vez mais que Ele está presente a cada passo que dou. Deus, o Senhor ajudou demonstrando seu amor incondicional por mim e provando a mim mesma, entre muitos obstáculos que a vida impõe, que conseguiria chegar até o fim.

Ao meu pai Dorival, à minha mãe Irene, aos meus irmãos Junior e Luis Henrique, minha família querida e que muito amo, pelo amor e apoio incondicional em todos os momentos e decisões. Pai e mãe, sou muito grata ao amor que vocês demonstram por mim, mas devo agradecer também pelo apoio financeiro e confiança que sempre me deram para que eu pudesse alcançar meus objetivos. Vocês sabem o quanto foi difícil ficar longe da minha família, e, mesmo, em meus momentos de fraqueza vocês se mantiveram firmes para me dar forças e não me deixaram desistir nunca podendo chegar até aqui. Muito obrigada mesmo!!

Ao meu amor Marquinho, que sempre acreditou em mim, e que, mesmo longe, me ajudou na concretização de mais este sonho. Pela paciência que teve e tem comigo, pelo carinho, atenção e amizade. Muito obrigada!!

Ao meu orientador Professor Doutor Renato João Sossela de Freitas, pela confiança e pela valorosa contribuição e incentivo nas orientações durante a realização deste trabalho.

Aos professores Dr^a. Maria Lúcia Masson, Paulo Fontoura, Dr. Renato João Sossela de Freitas e Dr^a. Sônia Maria Chaves Haracemiv, pelos ensinamentos.

Agradeço também ao Laboratório Central do Estado do Paraná – LACEN/PR, em especial ao Diretor Marcelo Pilloneto, pela possibilidade de realizar este trabalho no Laboratório de Físico-química, da Divisão de Produtos.

À Leonir Bittencourt Eizendeher, pela amizade, pelo incentivo, pelos conhecimentos e ensinamentos e por muitas vezes ‘minha mãezona’. Léo, do fundo do coração, agradeço não só pela imensa contribuição neste trabalho, mas também pelas longas conversas que tivemos, sendo que nestas me ensinou a enfrentar os

obstáculos que aparecem em nosso caminho, pelos conselhos e pela paciência de me ensinar com tanto amor. Sua amizade é de fundamental importância!!

Às amigadas sólidas que conquistei no LACEN/PR da Ana Maria, Angélica, Carmen, Higashyama, Júlia, Leonir, Maria Emília, Marvina, Lilinha e Wanda, pelo apoio e pela convivência tão harmoniosa e agradável.

Aos técnicos do LACEN/PR Júlio e Jandira, pela colaboração neste trabalho.

Ao secretário do Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos Paulo Roberto Krainski, pela amizade e competência no atendimento às minhas necessidades.

Às queridas amigas do mestrado, Dayane Karina Lorenzetti, Giovana Longo, Katielle Rosalva Vonic Córdoba, Nelisa Sita Pires Picolotto Martim, Thaís Martins Marcheze Tavares Bastos Gama e Vanessa Haddad Kalluf, pela amizade, carinho, incentivo e força.

À amiga Andréa Emilia Marques Stingen, pela ajuda e incentivo para que eu pudesse fazer o mestrado.

À querida amiga Giovana Longo, pela pronta disponibilidade de ajudar em parte deste trabalho, pelo carinho e amizade. Gi, muito obrigada mesmo!!

À minha querida amiga e agora mamãe Thaís Martins Marcheze Tavares Bastos Gama, pelas longas conversas que tivemos, em especial numa viagem para um congresso em Goiânia, pelos conselhos, carinho e uma grande amizade. Como é bom conhecer pessoas tão especiais como você Thaís, obrigada pela amizade!!

A todos meus familiares que incentivaram, apoiaram e me acolheram, em especial à minha querida prima Cristiane Hatsuko Baggio e à minha tia Maria de Lourdes Baggio.

Às professoras Doutora Márcia Regina Beux e Doutora Patrícia Teixeira P. S. Penteado que participaram da banca do exame de qualificação e de defesa, pelo auxílio e contribuições para a melhoria deste trabalho.

À CAPES, pelo suporte financeiro possibilitando dedicação ao mestrado.

A todas as pessoas que, direta ou indiretamente, colaboraram para a concretização deste trabalho, seja através de conselhos, conversas e àquelas que torcem por mim!!

Mantenha sempre viva a esperança
Acredite, não deixe nunca de acreditar, que a maré sempre volta
Dê-se conta de que em você existe um potencial maior do que suspeita
Para usar uma frase antiquada mas poderosa
"Ouse ser o que você deseja e pode ser"
Jamais aceite um não como resposta
Se de início você não está obtendo êxito, tente, tente de novo
Não se deixe abater pelas circunstâncias
Insista sempre - tente sempre - aí está o segredo
Dê o melhor de si e deixe o resto nas mãos de Deus
Esqueça-se do FPL: Falta, Perda e Limitação
Risque-o do seu vocabulário
Mantenha a imagem da vida que deseja e faça com que
essa imagem se torne um fato
Esforce-se sempre; tente sempre
E não se esqueça da oração. Ela é uma Fonte de Força
E lembre-se.... lembre-se sempre....
QUERER É PODER!!

(Norman Vincent Peale)

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	x
LISTA DE TABELAS.....	xi
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS.....	xii
RESUMO.....	xiv
ABSTRACT.....	xv
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 – OBJETIVOS.....	2
1.1.1 – Objetivo Geral.....	2
1.1.2 – Objetivos Específicos.....	3
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	4
2.1 – MICOTOXINAS.....	4
2.1.1 – Fungos Produtores de Micotoxinas.....	6
2.1.2 – Principais Micotoxinas.....	10
2.1.2.1 – Aflatoxinas.....	10
2.1.2.2 – Ocratoxinas.....	15
2.1.2.3 – Fumonisinas.....	17
2.1.2.4 – Zearalenona.....	19
2.1.2.5 – Tricotecenos.....	20
2.2 – AFLATOXINAS E CARCINOGENICIDADE.....	21
2.3 – AFLATOXINAS B ₁ E M ₁	23
2.4 – BIOTRANSFORMAÇÃO DA AFLATOXINA B ₁	27
2.5 – AFLATOXINA M ₁	33
2.5.1 – Importância do Leite.....	33
2.5.2 – Aflatoxina M ₁ em Leite e Derivados.....	36
2.5.3 – Métodos de Análise de CCD e CLAE para Aflatoxina M ₁ em Leite Associados à Coluna de Imunoafinidade.....	39

3. MATERIAL E MÉTODOS	43
3.1 – MATERIAL	43
3.1.1 – Amostras	43
3.1.2 – Coluna de Extração	43
3.1.3 – Reagentes	43
3.1.4 – Equipamentos e Materiais Diversos	44
3.2 – MÉTODOS	44
3.2.1 – Solução Padrão de Aflatoxina M ₁	44
3.2.2 – Curva de Calibração	46
3.2.3 – Limite de Detecção e Limite de Quantificação do Método	47
3.2.4 – Fortificação das Amostras de Leite para Teste de Recuperação	47
3.2.4.1 – Método de CCD	47
3.2.4.2 – Método de CLAE	48
3.2.5 – Determinação de Aflatoxina M ₁	48
3.2.5.1 – Cromatografia em Camada Delgada (CCD)	48
3.2.5.1.1 – Preparação e tratamento da amostra	48
3.2.5.1.2 – Separação, quantificação e confirmação	49
3.2.5.1.3 – Cálculo	50
3.2.5.1.4 – Diagrama	50
3.2.5.2 – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	52
3.2.5.2.1 – Preparação e tratamento da amostra	52
3.2.5.2.2 – Separação, quantificação e confirmação	52
3.2.5.2.3 – Cálculo	53
3.2.5.2.4 – Diagrama	53
3.2.6 – Análise Estatística	55
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	56
4.1 – AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO DOS MÉTODOS	56
4.1.1 – Determinação da Concentração do Padrão de Aflatoxina M ₁	56
4.1.2 – Método de Cromatografia em Camada Delgada	56
4.1.2.1 – Resultados dos Ensaios de Recuperação da AFM ₁ em Amostras de Leite	56
4.1.3 – Método de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência	57

4.1.3.1 – Resultados dos Ensaios de Recuperação da AFM ₁ em Amostras de Leite.....	58
4.1.3.2 – Curva de Calibração.....	59
4.2 – RESULTADOS DAS ANÁLISES DE LEITE PASTEURIZADO PELO MÉTODO DE CCD E CLAE.....	61
5. CONCLUSÕES.....	67
REFERÊNCIAS.....	68
APÊNDICES.....	86
APÊNDICE 1 – CROMATOGRAMA DO PADRÃO DE AFM₁ DE CONCENTRAÇÃO 0,1 µg/L.....	87
APÊNDICE 2 – CROMATOGRAMA DO PADRÃO DE AFM₁ DE CONCENTRAÇÃO 0,2 µg/L.....	89
APÊNDICE 3 – CROMATOGRAMA DA AMOSTRA DE LEITE COM CONCENTRAÇÃO DE 0,06 µg/L.....	91
APÊNDICE 4 – CROMATOGRAMA DA AMOSTRA DE LEITE COM CONCENTRAÇÃO DE 0,1 µg/L.....	93
APÊNDICE 5 – CROMATOGRAMA DA AMOSTRA DE LEITE COM CONCENTRAÇÃO DE 0,17 µg/L.....	95

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – ESTRUTURAS QUÍMICAS DAS PRINCIPAIS AFLATOXINAS.....	12
FIGURA 2 – MECANISMO DE ATIVAÇÃO DA AFLATOXINA B ₁	29
FIGURA 3 – BIOTRANSFORMAÇÃO DA AFLATOXINA B ₁	31
FIGURA 4 – COLUNA DE IMUNOAFINIDADE.....	41
FIGURA 5 – SISTEMA DE FILTRAÇÃO A VÁCUO DA AFLATOXINA M ₁	49
FIGURA 6 – DESENVOLVIMENTO DA PLACA CROMATOGRÁFICA.....	50
FIGURA 7 – DIAGRAMA DO MÉTODO DE CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA.....	51
FIGURA 8 – CROMATOGRÁFO LÍQUIDO DE ALTA EFICIÊNCIA.....	53
FIGURA 9 – DIAGRAMA DO MÉTODO DE CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA.....	54
FIGURA 10 – CURVA DE CALIBRAÇÃO DO PADÃO DE AFLATOXINA M ₁	59
FIGURA 11 – CROMATOGRAMA DO PADRÃO DE AFLATOXINA M ₁ DE CONCENTRAÇÃO 0,06 µg/L.....	60
FIGURA 12 – CROMATOGRAMA DO PADRÃO DE AFLATOXINA M ₁ DE CONCENTRAÇÃO 0,2 µg/L.....	60
FIGURA 13 – CROMATOGRAMA DA AMOSTRA DE LEITE COM CONCENTRAÇÃO DE 0,1 µg/L DE AFLATOXINA M ₁	63

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – LIMITES MÁXIMOS ADMISSÍVEIS DE CONCENTRAÇÃO DE AFLATOXINAS EM LEITE, AMENDOIM E MILHO.....	14
TABELA 2 – LEGISLAÇÃO INTERNACIONAL PARA AFLATOXINA M ₁ EM LEITE E DERIVADOS DE LEITE PARA CONSUMO HUMANO.....	24
TABELA 3 – CONSUMO MÍNIMO DE LEITE PARA O HOMEM.....	35
TABELA 4 – VALORES MÉDIOS, RECUPERAÇÃO E COEFICIENTE DE VARIAÇÃO OBTIDOS PELO MÉTODO DE CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA.....	57
TABELA 5 – VALORES MÉDIOS, RECUPERAÇÃO E COEFICIENTE DE VARIAÇÃO OBTIDOS PELO MÉTODO DE CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA.....	58
TABELA 6 – RESULTADOS DOS NÍVEIS DE AFLATOXINA M ₁ ENCONTRADOS NO LEITE PASTEURIZADO PELOS MÉTODOS DE CCD E CLAE UTILIZANDO COLUNA DE IMUNOAFINIDADE.....	61

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AFs	Aflatoxinas
AFM ₁	Aflatoxina M ₁
AFB ₁	Aflatoxina B ₁
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
UR	Umidade Relativa
%	Porcentagem
°C	Graus Celsius
AFB ₂	Aflatoxina B ₂
AFG ₁	Aflatoxina G ₁
AFG ₂	Aflatoxina G ₂
UV	Ultravioleta
μg	Micrograma
kg	Quilograma
L	Litro
OTA	Ocratoxina A
pH	Potencial Hidrogeniônico
ng	Nanograma
bw	Body Weight
FB1	Fumonisina B1
FB2	Fumonisina B2
FB3	Fumonisina B3
SNC	Sistema Nervoso Central
g	Grama
mg	Miligrama
mL	Mililitro
TCT	Tricoceteno
DON	Deoxinivanelol

NIV	Nivalenol
CHC	Carcinoma Hepatocelular
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
HBV	Vírus da Hepatite B
DT	Dose Média
pmol	Picomol
DL ₅₀	Dose Letal ₅₀
ppb	Parte por Bilhão
RNA	Ácido Ribonucléico
AFQ1	Aflatoxina Q1
AFB _{2a}	Aflatoxina B _{2a}
AFP1	Aflatoxina P1
AFL	Aflatoxicol
min	Minuto
seg.	Segundo
Ac	Anticorpo
Ag	Antígeno
mm	Milímetro
mM	Milimol
UV	Ultravioleta
K ₂ Cr ₂ O ₇	Dicromato de Potássio
H ₂ SO ₄	Ácido Sulfúrico
M	Molar
rpm	Rotação por Minuto
nm	Nanômetro
sol.	Solução
N ₂	Nitrogênio
r ²	Coeficiente de Correlação
UHT	Ultra High Temperature

RESUMO

As micotoxinas são metabólitos secundários produzidos por fungos e representam um risco potencial para a saúde do homem e dos animais, quando presentes nos alimentos e rações. Dentre as micotoxinas pesquisadas, a aflatoxina é uma das principais e mais estudadas. O leite e seus derivados são os principais nutrientes para o homem, especialmente as crianças que são mais sensíveis aos efeitos das micotoxinas. Entretanto, estes produtos podem estar contaminados com aflatoxina M_1 (AFM₁), um perigo para a saúde humana devido seus efeitos tóxicos no organismo como carcinogenicidade e mutagenicidade. Tendo em vista a importância da AFM₁, este trabalho tem por objetivo verificar os níveis de AFM₁, limite de detecção e de quantificação em leite pasteurizado tipo C comercializado no Estado do Paraná pelos métodos de cromatografia em camada delgada (CCD) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) utilizando coluna de imunoafinidade como técnica de purificação. Foram analisadas 40 amostras de leite pasteurizado, tipo C, coletadas em 21 Distritos Sanitários do Estado do Paraná no período de dezembro/05 a março de 2006. Para o método de CCD, o limite de detecção observado foi de 0,01 µg/L e o limite de quantificação foi de 0,02 µg/L. As recuperações variaram entre 83,3%-93,3% e os coeficientes de variação foram inferiores a 6%, demonstrando uma alta eficiência do método para níveis mais baixos. AFM₁ foi encontrada em 42,5% das amostras analisadas. Para o método de CLAE, o limite de detecção observado foi de 0,0085 µg/L e o limite de quantificação foi de 0,01 µg/L. As recuperações variaram entre 82%-100% e os coeficientes de variação foram inferiores a 14,6%. AFM₁ foi encontrada em 57,5% das amostras analisadas. O teste t de Student revelou que os resultados das análises de AFM₁ no leite por CLAE não diferiram estatisticamente dos resultados obtidos por CCD ao nível de 5% de significância. Todas as amostras estão dentro do limite máximo permitido no Brasil, pela Resolução RDC nº 274, de 15 de outubro de 2002, que é de 0,5 µg/L, e somente 20% (CLAE) e 25% (CCD) estariam com níveis de AFM₁ acima de 0,05 µg/L, que é a tolerância exigida por alguns países da Europa. Os resultados encontrados para AFM₁ em leite pasteurizado tipo C comercializado no Estado do Paraná revelaram baixo nível de contaminação. Entretanto, há a necessidade de um monitoramento por um período mais longo, incluindo todas as estações do ano, para confirmar essa tendência.

PALAVRAS-CHAVE: aflatoxina M_1 , leite, CCD, CLAE, coluna de imunoafinidade, micotoxinas.

ABSTRACT

The mycotoxins are secondary metabolites produced by fungi and represent a potential risk to the man and animals' health when present in foods and foodstuff. Amongst the mycotoxins studied the aflatoxins is one of the most studied. Milk and its derivatives are the main nutrients to the man, especially children, who are the most sensible to the mycotoxins effects. However, these products can be contaminated with aflatoxin M₁ (AFM₁), a danger for human health for its toxic effects into the organism, like carcinogenicities and mutability. Watching the AFM₁ importance, this work wants to verify the AFM₁'s levels, limit of detection and quantify it in pasteurized milk, C sort commercialized in Paraná State through thin-layer chromatography (TLC) and High Pressure Liquid Chromatography (HPLC) using immunoaffinity column as purification technique. 40 samples of pasteurized milk C sort were analyzed, taken in 21 sanitary Districts of Paraná State in period from december/2005 to march/2006. To the TLC method, the limit of detection observed was 0.01 µg/l and quantification limit was 0.02 µg/l. The recuperation varied between 83.3% – 93.3% and variation coefficient was lower than 6%, showing a high efficiency of method to smaller levels. AFM₁ was find in 42.5% of analyzed samples. To the HPLC's method, the detection limits watched was 0.0085 µg/l and quantify method was 0.01 µg/l. The recuperation varied between 82% – 100% and coefficients of variation was lower than 14.6%. AFM₁ was find in 57.5% of samples analyzed. The t test of Student showed that the results taken by TLC, at level of 5% of significance. All the samples are inside maximum limit permitted in Brazil, by RDC Resolution nº 274, 2002, October, 15, that's 0.5 µg/l, and just 20% (HPLC) and 25% (TLC) had been above 0.05 µg/l of AFM₁, tolerance required by some European Countries. The results found to AFM₁, in pasteurized milk, C sort commercialized in Paraná State shown low level of contamination. However, there is a necessity of observing for a longer period, including all the seasons of year, to confirm its tendency.

KEY WORDS: aflatoxin M₁, milk, TLC, HPLC, immunoaffinity column, mycotoxins.