

ESTUDO COMPARATIVO DE MÉTODOS PARA DETERMINAÇÃO DE AFLATOXINA M₁

Célia Maria de SYLOS*
Delia Rodriguez AMAYA**

RIALA6/801

SYLOS, C. M. de e col. - Estudo comparativo de métodos para determinação de aflatoxina M₁ - *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 56(1):87-97, 1996.

RESUMO: Várias tentativas foram realizadas para escolher o solvente extratante mais eficiente e a melhor técnica para remover os interferentes de amostras de leite para a determinação de aflatoxina M₁ em camada delgada. Na extração foram utilizados acetona, metanol e clorofórmio individualmente, misturados entre si ou com água. Precipitação com sais de metais pesados, partição entre solventes imiscíveis e colunas cromatográficas foram avaliados para promover a limpeza do extrato. A utilização de metais pesados não foi eficiente para eliminar os interferentes. O uso conjunto de clorofórmio e uma coluna cromatográfica demonstrou ser a maneira mais eficiente de extrair a aflatoxina M₁ e remover substâncias interferentes. Colunas cromatográficas de sílica e sílica-C₁₈ apresentaram melhores resultados que a coluna de celulose. A cromatografia líquida de alta eficiência com extração em fase sólida, limpeza em coluna de sílica gel e derivação da aflatoxina M₁ por ácido trifluoroacético e detecção por fluorescência apresentou sensibilidade e especificidade bem maiores que o método por cromatografia em camada delgada com quantificação visual baseada na intensidade de fluorescência.

DESCRIPTORIOS: Aflatoxina M₁, leite. Cromatografia em camada delgada, Cromatografia líquida de alta eficiência, Análise.

INTRODUÇÃO

As investigações sobre a ocorrência de micotoxinas em alimentos e rações é de suma importância para que esforços possam ser concentrados na prevenção, no controle ou na destoxificação dos produtos susceptíveis a determinadas micotoxinas. Neste sentido e com vistas a garantir a confiabilidade dos resultados relativos à incidência de micotoxinas em alimentos, estudos visando escolher e aprimorar a metodologia para sua detecção e quantificação são, sem dúvida, necessários e urgentes.

Dentre as micotoxinas existentes, as aflatoxinas são as que podem causar maiores danos aos seres humanos e animais, pela sua alta toxidez e ampla ocorrên-

cia, possuindo, inclusive, propriedades carcinogênicas, mutagênicas e teratogênicas. As aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂ são as mais estudadas, já existindo metodologia definida para uma série de produtos agrícolas. Numerosos levantamentos sobre sua ocorrência em alimentos e rações também já foram realizados^{11,19}.

Quando o gado leiteiro é alimentado com ração contaminada com aflatoxina B₁, parte desta pode ser convertida em um derivado 4-monoidroxilado, a aflatoxina M₁ (AFM₁), a qual é excretada no leite^{8,15}.

Allcroft & Carnaghan¹, Purchase¹⁶ e Bullerman¹ verificaram que a toxidez da AFM₁ em patinhos e ratos aproximava-se da de aflatoxina B₁. O seu efeito carcinogênico ainda é controvertido. Sinnhuber et alii²⁴ observaram o crescimento de tumores similares

* Departamento de Alimentos e Nutrição - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP - CP 502 - 14801-902 - Araraquara - SP.

** Departamento de Ciência de Alimentos - Faculdade de Engenharia de Alimentos - UNICAMP - CP 6121 - 13081-870 - Campinas - SP.

àqueles produzidos pela aflatoxina B₁ em trutas alimentadas com aflatoxina M₁. Por outro lado, Barnes³ não observou a formação de tumores no fígado de ratos que foram alimentados com AFM₁. Em experimentos com ratos machos, a AFM₁ mostrou menor potencial carcinogênico que AFB₁.⁹

Estudos realizados para determinar a relação entre a ingestão de aflatoxinas e a excreção de AFM₁ no leite demonstraram uma conversão média de 1,5%^{8,12, 13,14,15}.

O conhecimento da incidência e dos níveis de aflatoxina M₁ em leite e seus derivados, produtos consumidos pela população infantil, é imprescindível, uma vez que estudos de toxicidade com animais têm mostrado que a sensibilidade às aflatoxinas é maior em jovens. No Brasil, existe ainda uma lacuna de informações sobre esta toxina, tanto em relação à metodologia quanto à sua incidência.

O presente trabalho tem por objetivo avaliar as metodologias, por cromatografia em camada delgada (CCD) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), para aflatoxina M₁ em leite.

MATERIAL E MÉTODOS

Preparo de Amostras Artificialmente Contaminadas

Para a avaliação dos métodos de determinação de AFM₁, foram utilizadas amostras de leite pasteurizado, artificialmente contaminado com 200 a 400 ng/L de AFM₁ e amostras de leite em pó, acrescidas com 300 a 500 ng/L de AFM₁. Estas amostras foram preparadas conforme descrito a seguir:

- a) leite em pó: as quantidades necessárias de padrão, dissolvidas na mistura benzenoacetonitrila (9:1), foram gotejadas sobre 5g da amostra de forma a evitar que a solução atingisse as paredes e deixando-se que o solvente se evaporasse de um dia para o outro.
- b) leite pasteurizado: nesse caso, a quantidade necessária de padrão, dissolvido em acetonitrila, foi adicionada a 50 ml de amostra, seguida de homogeneização por agitação.

A pureza do padrão de AFM₁ (Sigma, EUA), foi verificada através de CCD (Cromatografia em camada delgada) e espectrometria de absorção⁶.

Avaliação da Etapa de Extração

Foram avaliados vários métodos existentes na literatura, assim como tentativas de novos procedimentos. Na Tabela I estão relacionadas todas as tentativas que foram feitas com relação à escolha do solvente

extrator e sobre a melhor maneira de se remover os interferentes. Cada teste foi realizado em triplicata.

No caso do leite pasteurizado usou-se 50 ml de amostra e para leite em pó, 5g de amostra diluída em 50 ml de água destilada.

O procedimento para extração com metanol puro foi o proposto por Sabino et alii¹⁸. Na tentativa de eliminar-se o problema de emulsão, também foi utilizado metanol-KCl 4%²⁵, seguindo o mesmo procedimento para metanol puro. A extração com a mistura metanol-acetona (5:2) foi realizada de acordo com Dominguez et alii⁷.

O esquema 974.17 da AOAC²¹ (Figura 1) descreve a extração de 100 ml de amostra de leite pasteurizado (ou 10g de leite em pó dissolvido em 100ml de água) com acetona pura. Tentativas de se usar 50 ml de amostra, em vez dos 100 ml originais foram feitas, assim como a extração com a mistura acetona-água¹⁷ e acetona salina.

No caso do uso de clorofórmio puro como solvente extrator, os métodos utilizados foram o procedimento 980.1 da AOAC²¹ (Figura 2) e o proposto por Serralheiro & Quinta²³.

Avaliação da Etapa de Limpeza

Com relação ao uso de agentes clarificantes para remoção de substâncias indesejáveis, foram testados os seguintes sais: (1) sulfato de cobre 10%²⁵; (2) sulfato de amônia 30%²⁵; (3) sulfato de zinco 15%²⁶; (4) acetato de zinco 20% (5) acetato de chumbo 20% (AOAC, esquema 974.17)²¹; (6) cloreto férrico (2g/30ml de água + 170 ml de 0,2N NaOH)/1g de carbonato de cobre básico¹⁷; (7) acetato de zinco 15%/ cloreto de sódio 15% (1:1)¹⁰.

Para remoção dos lipídeos, foi efetuado desengorduramento com hexano ou éter de petróleo antes da etapa de partição com clorofórmio.

Foram avaliadas também as colunas cromatográficas de celulose (MERCK, Alemanha) (AOAC, proc. 974.17)²¹ (Figura 1) e de sílica gel (MERCK, Alemanha) (AOAC, proc. 980.21)²⁰ (Figura 2) para limpeza.

Considerando que alguns pesquisadores empregaram com sucesso o cartucho descartável de Sep-Pack C₁₈ para extração de AFM₁ e limpeza de amostras de leite a serem utilizadas em CLAE, foi realizada uma tentativa de proceder à limpeza da amostra em coluna empacotada de C₁₈. Nesse caso a AFM₁, após extração com clorofórmio, foi transferida para acetona e o extrato colocado numa coluna de vidro (8x300 mm) contendo sílica C₁₈ (0,5g) (50µm, SEPARATION TECHNOLOGY, EUA) como fase estacionária, e a AFM₁ eluída com acetona.

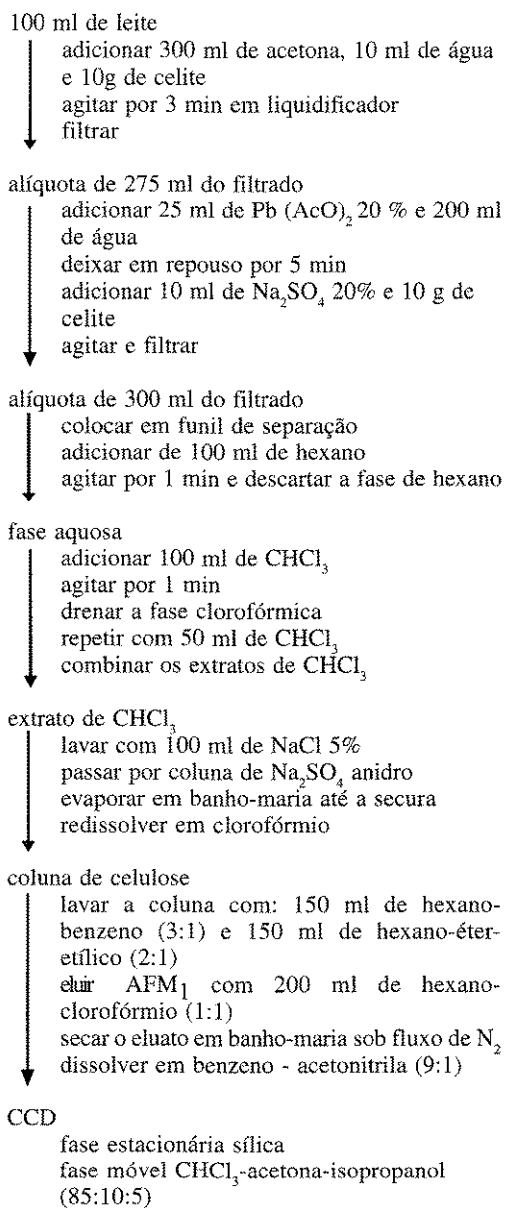


FIGURA 1

Esquema para determinação de AFM₁ pelo procedimento 974.17 da AOAC²¹.

Foi realizada também uma tentativa de se reaproveitar a coluna de C₁₈, material importado e caro. Nesse sentido após a eluição da toxina, a coluna foi lavada com clorofórmio e a seguir com hexano para remover as substâncias interferentes na mesma, retidas, sendo o C₁₈ reconicionado com acetona, antes de se aplicar uma nova amostra.

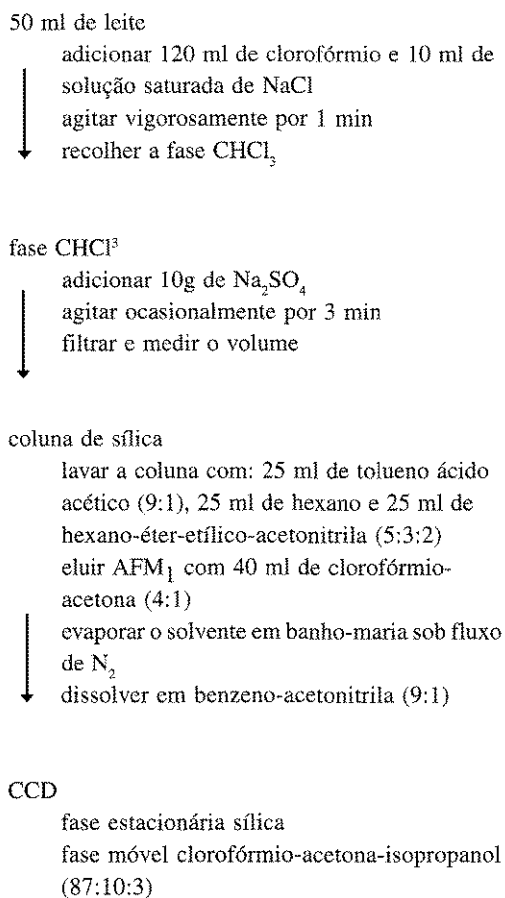


FIGURA 2

Esquema para determinação de AFM₁, de acordo com o procedimento 980.21 da AOAC²¹.

Separação e Quantificação

Cromatografia em camada delgada

A cromatografia em camada delgada (CCD) de cromatofolhas de sílica gel G60 (MERK, Alemanha) foi inicialmente realizada, testando-se as seguintes

fases móveis: (1) clorofórmio-acetona-isopropanol (87:10:3)²¹, (2) clorofórmio-acetona (9:1)¹⁷; (3) clorofórmio-acetona-metanol (90:10:2)²¹, (4) éter etílico-metanol-água (95:4:1)²¹; (5) tolueno-acetato de etil-ácido fórmico (6:3:1)²³.

O extrato seco da amostra foi dissolvido em 100µl de benzeno-acetonitrila (9:1), sendo uma alíquota aplicada na camada juntamente com volumes conhecidos de padrão de AFM₁ (0,5µg/ml). Após o desenvolvimento cromatográfico, a quantificação foi feita por comparação visual da intensidade de fluorescência da mancha da amostra com as dos padrões, sob iluminação ultravioleta longa (365nm).

Também foi realizado CCD bi-dimensional, usando-se inicialmente o solvente éter etílico-metanol-água (95:4:1) e posteriormente clorofórmio-acetona-isopropanol (87:10:3).

A confirmação da AFM₁ foi feita por reação com ácido trifluoroacético (TFA) diretamente na camada, de acordo com a AOAC²¹.

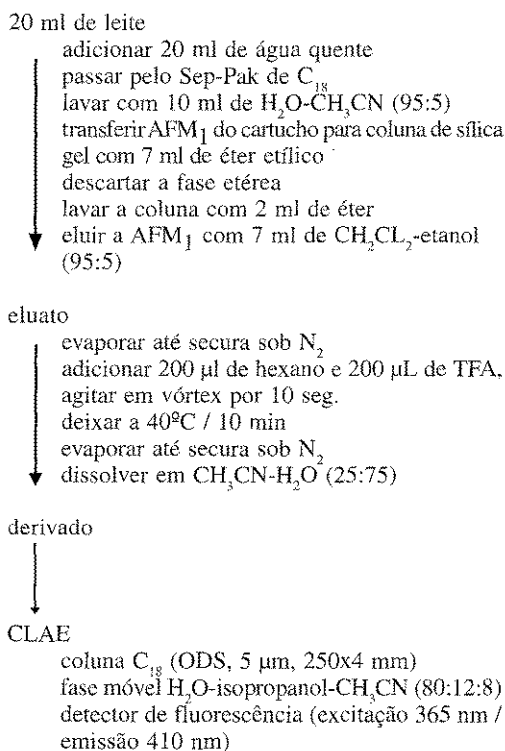


FIGURA 3

Esquema para extração de AFM₁ com Sep-pak de C₁₈, proc. 986.16 da AOAC²¹.

Cromatografia líquida de alta eficiência

A AFM₁ foi extraída da amostra de leite em cartucho Sep-Pak de C₁₈ (WATERS), transferida com éter para uma coluna de sílica, eluída com diclorometano-etanol (95:5) e finalmente derivada com ácido trifluoroacético, de acordo com o método da AOAC²¹ (proc. 986.16) (Figura 3).

A cromatografia líquida de alta eficiência foi realizada utilizando-se os equipamentos e condições descritos a seguir: Cromatógrafo líquido marca VARIAN, modelo 8500, com sistema de bombeamento de solvente adaptado com alça de amostra de 10µl; detector por fluorescência VARIAN, modelo 2070, excitação a 365nm e com emissão a 410nm; e integrador VARIAN modelo 4290; coluna LiChrospher 100 RP-18, 5µm (100x4,6mm, Merck), precedida de coluna de guarda; fase móvel; água-isopropanol-acetonitrila (80:12:8) e vazão de 0,5 ml/min.

A quantificação foi feita por padronização externa. Foi construída uma curva padrão com soluções contendo 4, 8, 16 e 32 ng de AFM₁ por ml de acetonitrila, que reagiram também com TFA e injetadas nas mesmas condições das amostras. A curva padrão apresentou linearidade e passou pela origem, englobando as concentrações de AFM₁ encontradas nas amostras.

Os solventes empregados, marca LiCHROSOLV, foram previamente filtrados em sistema Millipore de filtração a vácuo, empregando-se membrana de 0,45 µm e a seguir degaseificado por ultrassom. A água utilizada foi purificada por sistema de ultrafiltração Milli Q Plus (WATERS) e também degaseificada. As amostras e os padrões foram também filtrados em membrana (Millipore) de 0,45µm.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os limites estipulados para aflatoxina M₁ em alimentos são da ordem de ng/l ou ng/kg (ppt), níveis extremamente baixos que exigem dos métodos o máximo de sensibilidade e especificidade. Embora a amostragem não seja problema devido à distribuição uniforme dessa toxina nos alimentos, as etapas de extração e de remoção dos interferentes requerem muito cuidado. Tais problemas não são tão críticos nas metodologias de aflatoxinas B e G cujos limites permitidos estão na faixa de µg/kg (ppb), sendo nesses casos a amostragem o principal desafio.

Extração e Limpeza

As características dos extratos finais de aflatoxina M₁, obtidos nas várias tentativas com vistas a escolha do solvente extrator e da maneira de remover os interferentes, estão apresentados na Tabela 1.

Os procedimentos que utilizam metanol para extração proporcionaram certa dificuldade na filtração, prolongando-a e às vezes demandando centrifugação. Além disso, os vários clarificantes testados não se mostraram totalmente eficientes, resultando em extratos ainda sujos que, quando aplicados em camada delgada, apresentavam manchas com caudas e interferentes, merecendo destaques uma substância amarela fluorescente e outra verde azulada com Rf's muito próximos, e que em muitos casos sobrepunham-se à toxina.

A tentativa de fazer a extração utilizando a mistura metanol-acetona (5:2), de acordo com o procedimento

de Dominguez et alii⁷, não foi bem sucedida, pois mesmo após a centrifugação, as fases voltavam a misturar-se com facilidade na hora de recolher a fase desejada.

Os procedimentos que utilizam acetona como solvente extrator e sais como agentes clarificantes não mostraram-se eficientes na remoção dos interferentes. O extrato final permaneceu sujo, a substância que apresentava fluorescência azul esverdeada e comportamento cromatográfico muito semelhante à AFM₁ não foi eliminada e as manchas apresentaram cauda (Tabela 1). O uso conjunto de acetato de chumbo, hexano e colunas cromatográficas de celulose e de

TABELA 1
Características dos extratos finais de amostras de leite e de leite em pó obtidos das etapas de extração e limpeza para AFM₁ para CCD.

EXTRAÇÃO	LIMPEZA	APARÊNCIA DO EXTRATO FINAL	APARÊNCIA NA CD ^a	
			CAUDA	INTERFERENTES FLUORESCENTES ^b
metanol puro / ou metanol: NaCl 5% (9:1) (200 ml)	partição com hexano	sujo	sim	presente
	CuSO ₄ .5H ₂ O 10%	sujo	sim	presente
	FeCl ₃ / CuCO ₃	sujo	sim	presente
	(NH ₄) ₂ SO ₄ 30%	sujo / oleoso	sim	presente
	Pb(AcO) 20%	sujo	sim	presente
	ZnSO ₄ 15%	sujo / oleoso	sim	presente
acetona pura / ou acetona: água (85:15) ou acetona: NaCl 5% (9:1) (200ml)	ZnAcO 15% / NaCl 15%	sujo	sim	presente
	CuSO ₄ .5H ₂ O 10%	sujo / oleoso	sim	presente
	FeCl ₃ / CuCO ₃	sujo	sim	presente
	Pb(AcO) 20%	sujo	sim	presente
	Pb(AcO) 20% hexano / coluna de celulose	limpo	não	presente / ausente
	Pb(AcO) 20% hexano / coluna de sílica gel	limpo	não	presente / ausente
acetona pura (300ml)	Zn(AcO) 15%	sujo / oleoso	sim	presente
	ZnSO ₄ 15%	sujo / oleoso	sim	presente
	Pb(AcO) 20% / hexano / coluna de celulose	limpo	não	presente / ausente
	coluna de sílica gel	limpo	não	ausente
	coluna de C ₁₈	limpo	não	ausente
	partição com metanol / partição com CCl ₄	limpo	não	ausente / presente
clorofórmio(120ml)	partição com metanol / partição com éter de petróleo	sujo	sim	presente
	partição com metanol / partição com hexano	sujo	sim	presente
	partição com metanol / partição com éter butílico	sujo	sim	presente

^aCD - Camada Delgada

^b. Sob iluminação ultravioleta a 365 nm

sílica produziram extratos limpos, que não apresentaram, na maioria das vezes, caudas e interferentes fluorescentes na camada delgada.

A extração com clorofórmio com limpeza em coluna de sílica gel resultaram um extrato final não oleoso, livre de substâncias interferentes, apresentando manchas simétricas na camada delgada.

O método desenvolvido por Serralheiro & Quinta²³, que consiste na extração com clorofórmio, transferência para metanol, e limpeza por partição com tetracloreto de carbono revelou-se eficiente. As tentativas de substituir-se o tetracloreto de carbono, solvente não recomendado pelo "Montreal Protocol on Substances that Deplete the Ozone Layer"²² por éter butílico, éter de petróleo ou hexano não se revelaram satisfatórias.

Na coluna empacotada com C₁₈ (50µm) (fase reversa), a AFM₁ eluiu antes dos interferentes, ao contrário do que ocorre na coluna de sílica gel (fase normal). A limpeza foi eficiente, apresentando a mancha de AFM₁ na camada delgada, simétrica e separada dos interferentes.

O adsorvente C₁₈ foi reutilizado oito vezes com amostras de leite pasteurizado (Tabela 2), mas a coluna foi acumulando resíduos, tornando desse modo o fluxo cada vez mais lento e conseqüentemente dificultando o seu aproveitamento. Tal problema pode ser contornado diminuindo-se as dimensões da coluna, tornando-as mais próximas das do cartucho Sep-pak, porém, sua eficiência deverá ainda ser submetida à avaliação.

Para a coluna de sílica gel o eluente que apresentou melhor recuperação foi o que utilizou 60 ml de clorofórmio-acetona (3:2) (em lugar de 40ml de clorofórmio-acetona (4:1)). No caso da celulose, foi necessário substituir o clorofórmio-hexano (1:1) por clorofórmio-hexano-acetona (5:4:1).

A limpeza por cromatografia em coluna (geralmente sílica gel), apesar de ser utilizado em numerosos métodos para micotoxinas, é uma técnica trabalhosa e demorada, que requer grandes volumes de solventes para eluir separadamente os interferentes e as toxinas. Além disso, como a separação efetiva dos interferentes das toxinas depende diretamente da capacidade de adsorção da fase estacionária e do poder de eluição dos solventes utilizados, a reconhecida variação das propriedades dos adsorventes e da pureza dos solventes de diferentes marcas, ou até de diferentes lotes da mesma marca, torna necessária a realização de testes preliminares para cada remessa recebida, sob pena de obter-se resultados totalmente errôneos. No presente trabalho, por exemplo, para se garantir a eluição total de AFM₁ o volume de solvente clorofórmio-acetona (1:4) teve que ser aumentado de 40 para 60ml.

Utilizando-se os três tipos de adsorventes, foram testados a recuperação nas colunas, adicionando-se quantidades conhecidas de padrão às mesmas. A coluna de C₁₈ revelou-se melhor enquanto a de celulose foi a que mostrou menor recuperação (Tabela 3).

Na Tabela 4 estão expressos os valores de recuperação da AFM₁ adicionada ao leite pasteurizado e ao leite em pó, comparando-se três métodos que

TABELA 2

Recuperação de AFM₁ da coluna de C₁₈ reutilizada para amostras de leite pasteurizado.

REUTILIZAÇÃO	TEOR DE AFM ₁ ADICIONADO (ng/l)	TEOR DE AFM ₁ RECUPERADO (ng/l)	RECUPERAÇÃO (%)
1	500	415	83,0
2	400	350	87,7
3	200	179	89,8
4	200	153	76,6
5	250	226	90,4
6	250	219	87,6
7	200	155	77,6
8	300	245	81,7

TABELA 3

Recuperação de AFM₁ adicionada na coluna.

QUANTIDADE ADICIONADA (ng/l)	RECUPERAÇÃO MÉDIA (%)			
	nº de repetições	Coluna de sílica gel ^a	Coluna de celulose ^b	Coluna de C ₁₈ ^c
200	3	81,2	79,3	82,8
300	3	83,1	78,5	85,2
400	3	84,2	79,5	85,5

^a - Eluída por acetona clorofórmio (3:2)

^b - Eluída por hexano - clorofórmio (1:1)

^c - Eluída por acetona pura

TABELA 4

Recuperação de AFM₁ em amostra de leite pasteurizado e em leite em pó no método completo

QUANTIDADE ADICIONADA (ng/l)	RECUPERAÇÃO MÉDIA (%)			
	COLUNA DE SÍLICA GEL ^a	(Nº DE REPETIÇÕES ENTRE PARENTESSES)		
		COLUNA DE CELULOSE ^b	COLUNA DE C ₁₈ ^c	CCl ₄ ^d
leite pasteurizado				
200	77,4 (3)	74,4 (3)	82,9 (3)	77,6 (2)
250	78,2 (3)	61,1 (3)	79,6 (2)	67,7 (2)
300	80,4 (3)	72,0 (3)	84,7 (2)	-
leite em pó				
300	78,7 (3)	73,5 (3)	83,4 (2)	-
500	81,1 (3)	77,0 (3)	84,5 (2)	-

^a - Proc. 980.21 da AOAC²¹

^b - Proc. 974.17 da AOAC²¹

^c - Proc. 980.21 da AOAC²¹

^d - Método de Serralheiro & Quinta²³

utilizam coluna cromatográfica para limpeza e o método que emprega tetracloreto de carbono²².

O método que utiliza coluna de C₁₈ foi o que apresentou a melhor recuperação da toxina, seguido de perto pelo que utiliza coluna de sílica gel. As porcentagens de recuperação situam-se dentro da faixa considerada aceitável para aflatoxina M₁²⁰, especialmente considerando-se que os níveis testados estão baixos, e próximos do limite de detecção do método.

Tendo em vista os resultados obtidos, não recomendamos o uso da coluna de celulose que, além de utilizar grandes quantidades de adsorvente e de eluentes, revelou-se menos eficiente do que a coluna de sílica gel. A coluna C₁₈ é uma boa alternativa, mas trata-se de material caro e de difícil aquisição. Após o término deste estudo, tomamos conhecimento que o comitê da AOAC para toxinas naturais recomendou a retirada do método 974.17²², o que coincide com a nossa conclusão.

Quantificação por Cromatografia em Camada Delgada

Dentre as misturas de solventes utilizadas para CCD, as que promoveram as melhores separações entre AFM₁ e as outras substâncias foram clorofórmio-acetona-isopropanol (87:10:3) e éter etílico-metanol-água (95:4:1). O desempenho do éter etílico, no entanto, variou de uma marca para outra.

Devido ao fato de a sensibilidade requerida ser muito alta (ng/L), não foi possível utilizar-se placas cromatográficas preparadas em laboratório. O limite de detecção obtido utilizando-se placas preparadas foi de 2,5 ng de AFM₁, chegando no caso das placas compradas, a 0,5ng.

Na tentativa de se melhorar a separação entre AFM₁ e os interferentes, utilizou-se a técnica do multidesenvolvimento, empregando-se primeiramente a fase móvel clorofórmio-acetona-isopropanol (87:10:3) e a seguir éter etílico-metanol-água (95:4:1). Observa-se que no caso das amostras de leite obteve-se boa separação, mas não melhor que a obtida com o desenvolvimento unidimensional utilizando-se apenas um dos solventes.

Para amostras de queijo, a utilização da CCD unidimensional e o multidesenvolvimento, não revelou-se eficiente na separação da AFM₁ dos interferentes, sendo necessário empregar a CCD bi-dimensional. Nesse caso usou-se primeiramente éter etílico-metanol-água (95:4:1), seguido por clorofórmio-acetona-isopropanol (87:10:3). Esse é um procedimento

muito dispendioso, pois só permite a quantificação de uma amostra cada vez.

Quantificação por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

Os cromatogramas obtidos por CLAE (Figura 4) demonstraram a alta seletividade desse método, devido, principalmente, à derivação com TFA, a eficiente remoção dos interferentes e ao uso do detector por fluorescência. Este método foi o que apresentou maiores taxas de recuperação, como mostra a Tabela 5, mostrando que a extração em fase sólida foi eficiente (cartucho Sep-pak) e não houve perdas na limpeza em coluna de sílica gel e na derivação com TFA. Esta técnica revelou também maior sensibilidade, apresentando um limite de determinação bastante menor (25ng/L) que o obtido com CCD (150ng/L) para leite.

Os resultados obtidos nos levam a concluir que o método por CLAE é o mais adequado para determinação de AFM₁ e recomendar que a monitoração dessa toxina seja realizada preferencialmente por CLAE, apesar do alto custo, cabendo ressaltar, a título de comparação, que no caso das aflatoxinas B e G a CCD tem se mostrado perfeitamente adequada.

CONCLUSÕES

Dentre os solventes testados, o clorofórmio provou ser mais eficiente para a extração de AFM₁ em leite.

TABELA 5

Porcentagens de recuperação de AFM₁ em leite pasteurizado pelo método por CLAE.

QUANTIDADE ADICIONADA (ng/l)	RECUPERAÇÃO MÉDIA (%)	DESVIO PADRÃO
100	90,5	4,6
150	91,2	4,5

Para a remoção efetiva dos interferentes é necessário o uso de coluna cromatográfica. Ao contrário das aflatoxinas B e G, para as quais a limpeza rápida com metais pesados tem sido bem sucedida, no caso da AFM₁ nenhum dos sais testados mostrou-se capaz de eliminar os interferentes presentes.

A CLAE apresentou taxas de recuperação, sensibilidade e especificidade maiores que a CCD.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao CNPq pelo auxílio financeiro para realização deste trabalho.

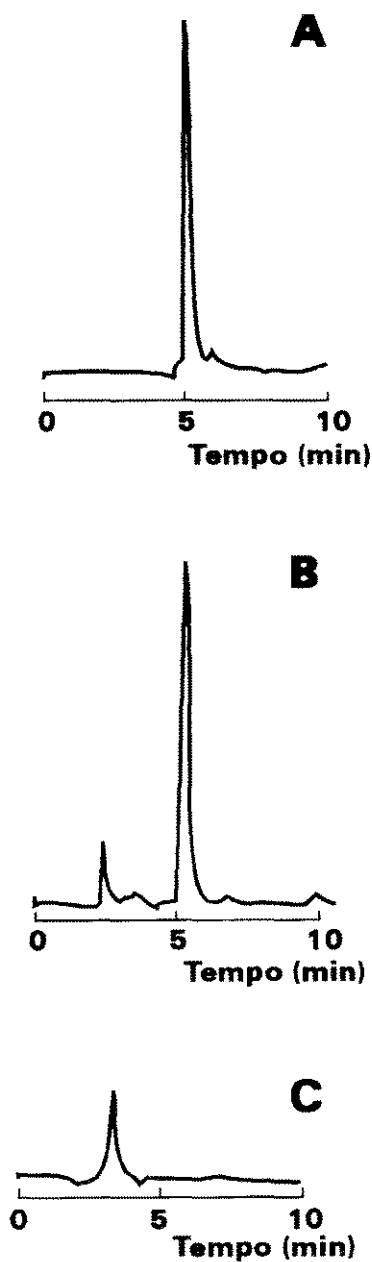


FIGURA 4

Cromatogramas característicos de um padrão de AFM₁, derivado com TFA (A); de uma amostra de leite pasteurizado contaminada, derivada com TFA (B) e de uma amostra não contaminada, derivada com TFA (C). Condições cromatográficas: coluna LiChrospher 100 RP-18, 5 µm, (100 x 4,6 mm); fase móvel água-isopropanol-acetonitrila (80:12:8); vazão 0,5 ml / min; detector por fluorescência, excitação a 365 nm e emissão a 410 nm.

SYLOS, C. M. de e col. - Comparative study of methods to aflatoxin M₁ determination - *Rev. Inst. Adolfo Lutz* 56(1):87-97, 1996.

SUMMARY: Various trials were carried out to choose the extracting solvent and the best technique for removing interfering substances from samples of milk for the TLC determination of aflatoxin M₁. For extraction acetone, methanol and chloroform were utilized either singly, in combination with each other or with water. Precipitation with heavy metal salts, partition between immiscible solvents and conventional column chromatography were evaluated for clean-up. Heavy metals by themselves were not effective in eliminating interfering substances. The combined use of chloroform and a chromatographic column proved to be the most efficient procedure for extraction and clean-up. Columns packed with silica or silica-C₁₈ gave better results than that of cellulose. HPLC with solid phase extraction, clean-up in silica gel column and trifluoroacetic acid derivatization and fluorescence detection presented much higher sensitivity and specificity than TLC with visual quantification based on fluorescence intensity.

DESCRIPTORS: Aflatoxin M₁, milk, thin layer chromatography, high performance liquid chromatography, analysis.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALLCROFT, R & CARNAGHAN, R.B.A.- Groundnut toxicity: An examination for toxin in human food products from animals fed toxic groundnut meal. *Vet Rec.*, **75**(2):259-263,1963.
2. ASSOCIATION of OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTIS. - *The Reference* **17**(9):10, 1993.
3. BARNES, J.M. - Aflatoxin as a health hazard. *J. Appl. Bacteriol.*, **32**:285-298,1970.
4. BULLERMAN, L.B. - Significance of mycotoxins to food safet and human health. *J. Food Protec.* **42** (1): 65-86,1979.
5. CHAMBON, P.; DANO, S.D.; CHAMBON, R. & GEACHAN, A. - Rapid determination of aflatoxin M₁ milk and dairy products by high performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* **259**(2):372-374-1983.
6. COLE, R.J.; COX, R.H. - Handbook of fungal metabolites. *Academic Press Inc.*, New York, p. 29-31, 1981.
7. DOMINGUEZ, L.; BLANCO, J.; GOMEZ-LUCIA, E.; RODRIGUEZ, E.F. & SUAREZ, G.- Determination of aflatoxin M₁ in milk and milk products contaminated at low levels. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **70**(3):470-472,1987.
8. FROBISH, R.A.; BRADLEY, B.D.; WAGNER, D.D.; LONG-BRADLEY, P.E. & HAIRSTON, H. - Aflatoxin residues in milk of dairy cows after ingestion of naturally contaminated grain. *J. Food Prot.*, **49**(10):781-785,1986.
9. HSIEH, D.P.H. - The role of aflatoxin in human cancer. In: STEYN, P.S., VLEGGAR,R. (eds.), *Mycotoxins and Phycotoxins*, Elsevier, Amsterdam, p.447-456, 1986.
10. HOLADAY, C.E. - Rapid, screening method for aflatoxin M₁ in milk. *J.Assoc. Off. Anal. Chem.*, **64**:1064-1066, 1981.
11. KROGH, P. - Mycotoxins in Food. *Academic Press Inc.*, London, p. 37-45, 1987.
12. MARSI, M.S.; GARCIA, V.C. & PAGE, J.R.- Aflatoxin M₁ content of milk from cows fed known amounts of aflatoxin. *Vet. Rec.*, **84**:146-147, 1969.
13. NABNEY, J. & BURBAGE, M.B. - Metabolism of aflatoxin in the lactating ewe. *Food Cosmet. Toxicol.*, **5**:11-17,1967.
14. POLAN, C. E.; HAYES, J. R. & CAMPBELL, T.C. - Consumption and fate of aflatoxin B₁ by lactating cows. *J.Agric. Food Chem.*, **22**(3) 635-638, 1974.
15. PRICE,R.L., PAULSON, J.H.; LOUCH, O.G.; GINGG, C. & KURTZ, A.G. - Aflatoxin conversion by dairy cattle consuming naturally contaminated whole cottonseed. *J. Food Prot.*, **48**(1):11-15, 1985.
16. PURCHASE, I.F.H. - Acut toxicity of aflatoxins M₁ and M₂ in one-day-old ducklings. *Food Cosmet. Toxicol.*, **5**:339-342,1967.

17. ROMER, T.R. - Screening method for the determination of aflatoxins in mixed feeds and other agricultural commodities with subsequent confirmation and quantitative measurement of aflatoxins in positive samples. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **58**(3):500-506, 1975.
18. SABINO, M.; PURCHIO, A. & ZORZETTO, M.A. - Variation in the levels of aflatoxin in cows milk consumed in the city of the São Paulo, Brazil. *Food Additives Contaminants*, **6**(3):321-326, 1989.
19. SABINO, M.; RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. - Mycotoxin research in Brazil. *Ciência e Cultura (J. Brazilian Assoc. Advanc., Sci.)*, **46**(6) 359-371, 1993.
20. SCOTT, P.M. Methods of determination of aflatoxin M₁ in milk and milk products a review of performance characteristics. *Food Additives Contaminants*, **6**(3):283-305, 1989.
21. SCOTT, P.M. - Natural Poisons. In: ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS - *Official methods of analysis of Association of Official Analytical Chemists.*, 15th ed., Arlington, Virginia, A.O.A.C., v.2, cap. 49, p.1184-1213. 1990.
22. SCOTT, P.M. - Mycotoxins. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **76**(1):112-119, 1993.
23. SERRALHEIRO, M.L. & QUINTA, M.L. - Rapid thin layer chromatographic determination of aflatoxin M₁ in powdered milk. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **68**(5) : 952-954, 1985.
24. SINNHUBER, R.O.; LEE, D.J.; WALES, J.H.; LANDERS, M.K. & KEYL, A.C. - Aflatoxin M₁, a potent liver carcinogen for rainbow trout. *Fed. Proc.* **29**:568 (Abstr. 1800), 1970.
25. SOARES, L.M.V. & RODRIGUES-AMAYA, D.B. - Survey of aflatoxins, ochratoxin A, zearalenone and sterigmatocystin in some Brazilian foods by using a multi-toxin thin-layer chromatographic method. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **72**(1): 22-26, 1989.
26. TUINSTRAL, L.G.M.; BRONGEEST, J.M. - Determination of aflatoxin M₁ in milk at the parts per trillion level. *J. Chromatography*, **111**:448-451, 1975.

