

**VALIDAÇÃO E ANÁLISE DA AFLATOXINA B1 POR ENSAIO  
IMUNOENZIMÁTICO COMPETITIVO INDIRETO EM AMOSTRAS DE URINA  
DE CRIANÇAS EM LONDRINA, PARANÁ, BRASIL**

 <https://doi.org/10.56238/sevened2024.037-054>

**Angélica Tiemi Ishikawa**

doutora em Patologia Experimental/UEL, Departamento de Ciências Patológicas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, Brasil.

**Estéfany Santos Redondo**

mestre em Ciência de Alimentos/UEL, Departamento de Ciência de Alimentos/UEL, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, Brasil.

**Cassia Reika Takabayashi Yamashita**

doutora em Ciência de Alimentos/UEL, Departamento de Ciência de Alimentos/UEL, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, Brasil.

**Elisabete Yurie Sataque Ono**

doutora em Ciência de Alimentos/UEL. Departamento de Bioquímica e Biotecnologia, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, Brasil

**Flávio Hiroshi Itano**

mestre em Ciência de Alimentos/UEL, Departamento de Ciências Patológicas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, Brasil.

**Bianca Dorana de Oliveira Souza**

mestre em Patologia Experimental, Departamento de Ciências Patológicas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, Brasil;

**Mario Augusto Ono**

doutor em Microbiologia e Imunologia/UNIFESP, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, Brasil.

**Osamu Kawamura**

doutor em Farmacia, Laboratório de Higiene Alimentar, Faculdade de Agricultura, Universidade de Kagawa, Kagawa, Japão

**Elisa Yoko Hirooka**

doutora em Engenharia de Alimentos/FEA-UNICAMP, Departamento de Ciência de Alimentos/UEL,

**Eiko Nakagawa Itano**

doutor em Microbiologia e Imunologia/UNIFESP, Depto. de Ciências Patológicas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR.

E-mail: itano@uel.br

## RESUMO

As aflatoxinas (AFs), metabólitos secundários produzidos por fungos do gênero *Aspergillus spp.*, são reconhecidas mundialmente como um problema de saúde pública devido ao seu potente efeito carcinogênico, hepatotóxico e imunossupressivo. A contaminação por aflatoxinas em crianças é especialmente preocupante, dado os impactos negativos sobre a saúde, o desenvolvimento e a qualidade de vida. Este estudo teve como objetivo validar o ensaio imunoenzimático competitivo indireto (ic-ELISA) para análise de aflatoxina B1 (AFB1) em urina, bem como avaliar o nível dessa micotoxina em 150 amostras de urina de crianças residentes em Londrina, Paraná, Brasil. Os parâmetros de desempenho analítico avaliados na validação incluíram especificidade (interferência de matriz e comparação de curvas com e sem matriz), exatidão (teste de recuperação), precisão (repetibilidade e precisão intermediária), robustez, sensibilidade, linearidade, limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ). Na validação intralaboratorial, a interferência de matriz foi analisada com fatores de diluição de 2, 5 e 10 vezes, sendo a diluição de 5 vezes selecionada para prosseguir. As curvas padrão preparadas na presença e ausência de matriz não apresentaram diferenças significativas na porcentagem de ligação entre os seis pontos analisados ( $p > 0,05$ ). A taxa média de recuperação para amostras de urina contaminadas com AFB1 em concentrações de 1,0; 2,5 e 5,0 ng/mL foi de  $100,00 \pm 8,71\%$ ,  $90,00 \pm 2,00\%$  e  $93,66 \pm 1,52\%$ , respectivamente. Os coeficientes de variação dos parâmetros de precisão foram inferiores a 15%. A equação de regressão obtida a partir de sete curvas padrão foi  $y = -14,89 \ln(x) + 61,234$ , com um coeficiente de determinação ( $R^2$ ) superior a 0,99. O LD foi de 0,096 ng/mL e o LQ de 0,115 ng/mL. A AFB1 foi detectada em 39,3% das amostras analisadas, com concentrações variando de 0,13 a 9,40 ng/mL e uma média de  $1,63 \pm 1,57$  ng/mL. Com base nos resultados obtidos, o ic-ELISA validado mostrou-se adequado para a determinação de AFB1 em urina infantil. Os dados preliminares sugerem que o nível de contaminação por aflatoxinas em crianças na região de Londrina, Paraná, Brasil, é baixo.

**Palavras-chave:** Anticorpos monoclonais. Fungos. Micotoxina. Imunodiagnóstico. Segurança alimentar.

## 1 INTRODUÇÃO

As aflatoxinas (AFs) representam um sério problema para a saúde pública e a economia global, como demonstrado pela sua frequente detecção em alimentos e commodities agrícolas (LIU et al., 2013). Este grupo inclui cerca de 20 metabólitos fúngicos, produzidos principalmente pelas espécies *Aspergillus flavus* e *A. parasiticus* (VARGA et al., 2011), sendo que apenas quatro desses compostos (B1, B2, G1 e G2) são considerados contaminantes alimentares significativos (BELOGLAZOVA; EREMIN, 2015). A contaminação fúngica dos alimentos ocorre principalmente durante a pré-colheita, transporte e armazenamento. Nesse contexto, as aflatoxinas têm sido detectadas em diversas commodities agrícolas, com maior incidência em milho, amendoim, sementes de algodão e frutas secas (IARC, 2002).

Entre os diferentes análogos de aflatoxinas (AFs), a aflatoxina B1 (AFB1) é a mais tóxica, sendo que a extensão da toxicidade depende de como o fígado é afetado. A Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC) classifica a AFB1 no Grupo 1, ou seja, como carcinogênica para o ser humano (IARC, 2002). As AFs são altamente lipossolúveis, o que facilita sua absorção tanto pelo trato gastrointestinal quanto pelo sistema respiratório. Uma vez na corrente sanguínea, elas se distribuem por diversos tecidos e órgãos (IARC, 2002). Para exercer sua atividade carcinogênica, a aflatoxina necessita de ativação metabólica para gerar um intermediário eletrofílico, que pode reagir e modificar o DNA, resultando em lesões pró-mutagênicas que ativam proto-oncogenes e inativam genes supressores de tumor (KENSLER et al., 2003; BBOSA et al., 2013).

Além de ser um potente hepatocarcinogênico, mutagênico e teratogênico, a aflatoxina B1 (AFB1) também possui propriedades imunossupressoras (SHARMA et al., 2011). Os efeitos imunotóxicos da AFB1 estão associados à interferência na imunidade mediada por células, resultando na redução do número de linfócitos circulantes, na inibição da blastogênese de linfócitos em várias espécies animais, na alteração da atividade das células Natural Killer, na modulação da expressão de citocinas e na possível alteração da função dos macrófagos. Além disso, a AFB1 prejudica a capacidade das células da medula óssea de formar colônias mielóides e eritróides (BIANCO et al., 2012; GREINER et al., 2013).

A aflatoxicose, intoxicação causada pela ingestão de aflatoxinas (AFs), pode afetar seres humanos e outros animais, manifestando-se de forma aguda ou crônica. Casos de aflatoxicose aguda em humanos já foram registrados em populações de países em desenvolvimento, especialmente na África e na Ásia (MWANDA, OTIENO, OMONGE, 2005; SAMUEL et al., 2009; FAO, 2014). Diversos fatores podem influenciar a toxicidade, como condições ambientais, idade, estado de saúde e nutricional, além da dose e duração da exposição à micotoxina (FDA, 2016).

As crianças, devido ao sistema imunológico e metabólico ainda em desenvolvimento, são particularmente suscetíveis aos efeitos tóxicos das aflatoxinas (AFs). Entre os principais impactos estão

os efeitos hepatotóxicos, que podem provocar lesões hepáticas graves e aumentar o risco de câncer de fígado. A exposição prolongada às AFs pode levar à imunossupressão, deixando as crianças mais propensas a infecções. Além disso, a exposição crônica pode interferir no crescimento físico e prejudicar o desenvolvimento cognitivo, comprometendo o aprendizado e o desempenho escolar (ALVITO, SILVA, 2022; DAI et al., 2024).

Com base nesse contexto, o presente estudo teve como objetivo padronizar e validar, em laboratório, o método de ELISA competitivo indireto para a detecção de AFB<sub>1</sub> em amostras de urina infantil. O estudo também buscou avaliar os níveis de contaminação por aflatoxinas em crianças residentes em Londrina, Paraná, Brasil. A escolha da urina como matriz de análise visa facilitar a adesão dos participantes, garantindo maior aceitação por parte dos pais e crianças.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 PADRÃO DE AFLATOXINA B<sub>1</sub>

O padrão de AFB<sub>1</sub> obtido de *Aspergillus flavus* (A663, Sigma, USA) foi quantificado em espectrofotômetro (Biochrom, modelo Libra S22, UK), de acordo com Instituto Adolfo Lutz (IAL, 2008). A absorvidade molar de AFB<sub>1</sub> considerado para o cálculo da concentração de AFB<sub>1</sub> em metanol foi 21.800 em 360 nm.

### 2.2 AMOSTRAS DE URINA

Um total de 150 crianças, <1 ano (38) e 1- 8 anos ( 113) participaram deste estudo com a permissão de seus responsáveis. Os voluntários foram informados sobre o protocolo do estudo, e um termo de consentimento livre e esclarecido foi assinado. As amostras de urina foram obtidas no Laboratório Municipal do Pronto Atendimento Infantil, Londrina, utilizando o coletor infantil estéril descartável, seguido de armazenamento em freezer -20°C até o momento da análise. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos (CEP-UEL, CAAE 06371612.5.0000.5231).

### 2.3 CULTIVO E PURIFICAÇÃO DE HIBRIDOMA AF.4

O hibridoma linhagem AF.4, secretor de anticorpo monoclonal (AcM), é derivado de mieloma linhagem Sp2/0-Ag14 e célula esplênica de camundongo BALB/c (KAWAMURA et al., 1988). O hibridoma apresenta reatividade cruzada com AFB<sub>1</sub> de 100%, AFB<sub>2</sub> de 2,3%, AFG<sub>1</sub> de 3,4%, AFG<sub>2</sub> de 2,4%, e AFM<sub>1</sub> de 4,5%. O cultivo foi realizado inicialmente em meio RPMI 1640 (Gibco Co., EUA) acrescido de 50% de Soro Fetal Bovino (SFB, Gibco Co., EUA), com redução gradual de SFB até concentração de 10% ao longo do cultivo celular. Seguido de adaptação gradual crescente em Hybridoma Serum Free Medium (H-SFM, Gibco, USA) a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> (Forma Scientific, EUA).

O sobrenadante produzido foi filtrado, e o AcM foi purificado pela precipitação com sulfato de amônio (243g/L). Após purificação, o anticorpo foi dialisado contra 1L de PBS a 4°C por 16h (4x), e armazenado a -80°C. A Figura 1 apresenta as etapas realizadas para o cultivo celular e purificação do AcM.

## 2.4 ELISA COMPETITIVO INDIRETO

### 2.4.1 Determinação de AFB<sub>1</sub> em urina por ELISA competitivo indireto

Determinação de AFB<sub>1</sub> foi realizada segundo Kawamura *et al.* (1988). Microplaca foi revestida com 50 L de OTA-BSA (250 ng/mL, Sigma) em tampão PBS 0,015M pH7,3 e incubada por 18 h à 4°C. Após três lavagens com PBST 0,05 % (PBS+ 0,05% de Tween 20), os poços foram bloqueados com 150 L de solução de Albumina bovina (BSA, Sigma, EUA) 0,1% em PBS e a microplaca incubada por 1 h à 25 °C. Após três lavagens com PBST 0,05 %, foi adicionado 50 L de AFB<sub>1</sub> de padrão ou urina e 50 L de AcM anti-AFB<sub>1</sub> (1:5000, 239 ng/mL) em PBST. Após incubação por 25°C por 1h a microplaca foi lavada três vezes com PBST 0,05 % e adicionada 50 L de conjugado IgG-HRP (Sigma) diluído em PBST 0,05 % (1:5000), incubado por 1 h à 25°C. Após seis lavagens com PBST 0,05 %, foi adicionado 100 L de substrato cromógeno tetrametilbenzidina, seguido de incubação a 15 min à 25°C. A reação foi bloqueada com 50 L de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1mol L<sup>-1</sup> e realizada a leitura da absorvância em 450 nm (Biochrom, modelo Libra S22, UK, Figura 2). A média da absorvância foi calculada da medida em triplicata de cada concentração e o resultado expresso como porcentagem de ligação pela Equação (1):

$$\% \text{ de ligação} = (A^+/A^-) \times 100 \text{ (1)}$$

Sendo A<sup>+</sup> a absorvância na presença de amostra ou AFB<sub>1</sub> (padrão) e A<sup>-</sup> a absorvância na ausência de AFB<sub>1</sub>. A concentração de AFB<sub>1</sub> nas amostras foi determinada utilizando-se curva padrão de AFB<sub>1</sub> (1,0 a 10 ng/mL), pela plotagem da porcentagem de ligação contra o log da concentração de AFB<sub>1</sub>.

### 2.4.2 Validação intra-laboratorial de ic-ELISA para quantificação de AFB<sub>1</sub>

Os parâmetros de validação intra-laboratorial de AFB<sub>1</sub> em urina por ic-ELISA foi baseada em linearidade, sensibilidade, especificidade, exatidão, precisão, robustez, limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) (Tabela 1). Para validação da metodologia foi utilizado um *pool* de amostras de urina previamente centrifugada a 10.000 rpm por 30s (Chibitan II, Tokio, Japão) (ANVISA, 2003; EC, 2006; INMETRO, 2007).

Tabela 1. Parâmetros de validação intra-laboratorial de AFB<sub>1</sub> em urina infantil por ic-ELISA

<b>Parâmetros de validação</b>	<b>Testes executados</b>
<b>Sensibilidade</b>	Inclinação da reta de regressão linear
<b>Linearidade</b>	Equação da regressão linear
<b>Especificidade</b>	<i>Interferência de matriz</i> Matriz sem contaminação (diluição 2, 5 e 10x) 3 replicatas em 4 dias diferentes
	Curva padrão sem matriz x curva padrão matrizada 3 replicatas em 3 dias diferentes
<b>Exatidão</b>	<i>Recuperação</i> 3 determinações em dias diferentes, 7 replicatas/dia 1,0; 2,5 e 5 ng/mL
<b>Precisão</b>	<i>Repetibilidade</i> 1 determinação, 7 replicatas 1,0; 2,5 e 5 ng/mL
	<i>Precisão intermediária</i> 3 determinações em dias diferentes, 7 replicatas/dia 1,0; 2,5 e 5 ng/mL
<b>Robustez</b> (Sensibilidade a pequenas variações)	Tempo de sensibilização Dois analistas diferentes Uso de micropipeta de marca diferente
<b>Limite de detecção (LD)</b>	Média - 3,143 x DP Média e DP: 7 replicatas do branco
<b>Limite de quantificação (LQ)</b>	Média - 5 x DP Média e DP: 7 replicatas do branco

#### 2.4.2.1 Sensibilidade

A sensibilidade foi obtida pela inclinação da reta de regressão de calibração, conforme a equação  $\text{Sensibilidade} = \text{variação da resposta} / \text{variação da concentração}$  (INMETRO, 2007).

#### 2.4.2.2 Linearidade

A linearidade foi obtida pela padronização externa de acordo com a equação da reta de sete curvas de calibração com seis pontos (0,1; 0,2; 0,5; 1,5; 5,0; 10,0 ng de AFB<sub>1</sub>/mL) (ANVISA, 2003; EC, 2006; INMETRO, 2007).

#### 2.4.2.3 Especificidade

A especificidade foi avaliada pela interferência da matriz sem contaminação nas diluições de 2, 5 e 10x. Além disso, foi feita comparação entre os pontos da curva padrão utilizando o padrão solubilizado na matriz e metanol:PBST (1:9; v/v). A comparação entre as duas curvas padrão foi feita pelo teste t, e a análise dos desvios entre a curva de referência e a curva matrizada - % de interferência (INMETRO, 2007).

#### 2.4.2.4 Exatidão

A exatidão foi avaliada pelo teste de recuperação em três níveis de contaminação (1,0; 2,5 e 5 ng/mL), analisadas em três replicatas em três dias diferentes (EC, 2006; INMETRO, 2007).

#### 2.4.2.5 Precisão

A precisão foi avaliada pela repetibilidade e precisão intermediária. A repetibilidade foi realizada pela precisão intra-corrída, considerando três níveis de contaminação (1,0; 2,5 e 5 ng/mL) analisada em sete replicatas no mesmo dia. Precisão intermediária foi realizada pela precisão inter-corrída, considerando três níveis de contaminação (1,0; 2,5 e 5 ng/mL), analisada em sete replicatas em três dias diferentes (ANVISA, 2003; EC, 2006; INMETRO, 2007).

#### 2.4.2.6 Robustez

A robustez foi avaliada pela execução da curva padrão por dois analistas diferentes, variação no tempo de sensibilização da placa (18 e 20h), e uso de pipetas de marcas diferentes (ANVISA, 2003; EC, 2006; INMETRO, 2007).

#### 2.4.2.7 Limite de detecção (LD) e quantificação (LQ)

O LD foi determinado pela fórmula  $LD = Média - (3 \times DP)$  e  $LQ = Média - (5 \times DP)$ . A média e DP foram obtidos de sete replicatas do branco da matriz (INMETRO, 2007).

### 2.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS

Todos os dados obtidos foram expressos como média e desvio padrão da média. Os dados foram analisados quanto a normalidade e homogeneidade, seguido de análise de variância. Para avaliação da robustez e comparação entre curva não matrizada e matrizada foi utilizado teste t. As diferenças foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$ .

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1 CULTIVO CELULAR

O volume total de sobrenadante produzido em meio H-SFM foi de 12 litros. O AcM anti-AFB<sub>1</sub> precipitado com sulfato de amônio, e o dialisado rendeu um volume de 346 mL (508 mg de Ac). O volume do dialisado foi aliqotado em 10 mL e congelado a -20°C. A aliqota utilizado para o ic-ELISA foi na concentração de 1,199 mg/mL.

### 3.2 VALIDAÇÃO DO IC-ELISA

A linearidade foi avaliada pela curva de calibração confeccionada com seis pontos de AFB<sub>1</sub> previamente quantificado. A equação de regressão obtida de sete curvas padrão foi  $y = -14,89\ln(x) + 61,234$ , com coeficiente de determinação ( $R^2$ ) de 0,9936. A Tabela 2 apresenta a porcentagem de ligação, a média de absorvância e o coeficiente de variação (CV) para cada concentração de AFB<sub>1</sub> (0,1 a 10,0 ng/mL) utilizada na confecção da curva padrão. A porcentagem de ligação variou de 26 a 92%, com média de absorvância variando de  $0,24 \pm 0,02$  a  $0,87 \pm 0,07$ , respectivamente.

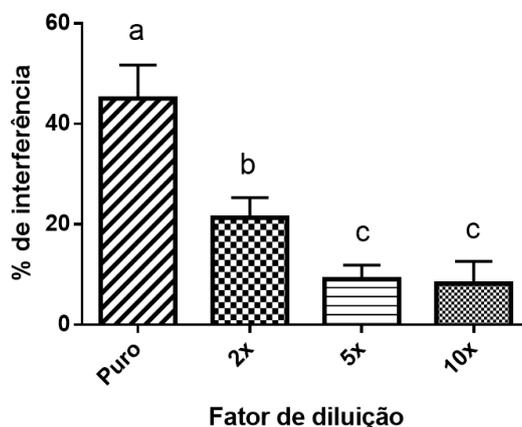
Tabela 2. Caracterização dos pontos da curva padrão de aflatoxina B<sub>1</sub> por ic-ELISA

AFB <sub>1</sub> (ng/mL)	% ligação	Média de absorvância*	CV (%)
0,1	92,48	$0,87 \pm 0,07$	8,34
0,2	86,39	$0,81 \pm 0,05$	6,35
0,5	73,94	$0,69 \pm 0,06$	9,77
1,5	57,05	$0,53 \pm 0,05$	9,81
5,0	35,43	$0,33 \pm 0,02$	7,17
10,0	26,40	$0,24 \pm 0,02$	9,94

\*Valores representam o valor médio de sete curvas padrão em triplicata realizadas em dias diferentes  
CV: coeficiente de variação

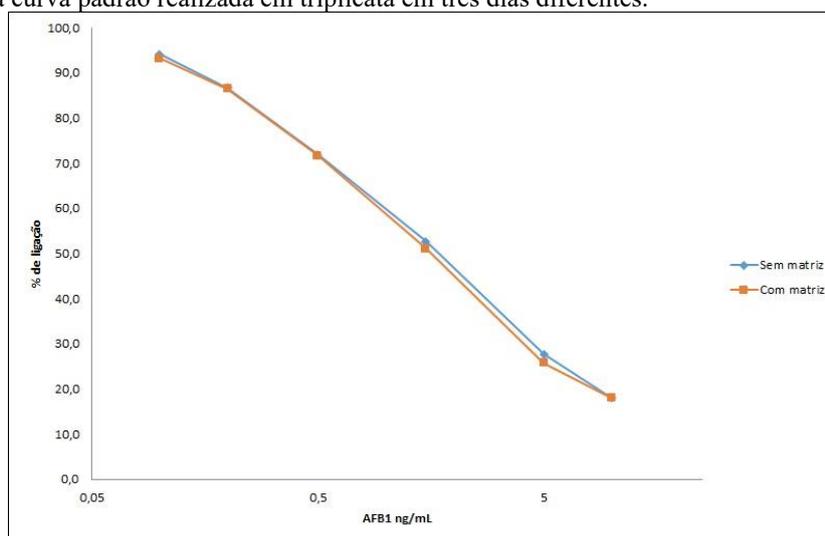
A especificidade foi avaliada primeiramente pela interferência de matriz diluindo as amostras no fator de 2, 5 e 10x (Figura 1). A amostra pura, diluída 2x, 5x e 10x apresentaram uma interferência de  $45,1 \pm 7,1\%$  (CV = 12%);  $21,3 \pm 3,63\%$  (CV = 4%);  $9,0 \pm 1,23\%$  (CV = 1%); e  $8,0 \pm 2,73\%$  (CV = 2%); respectivamente. As amostras diluídas no fator a partir de 5x não apresentaram interferência significativa ( $p < 0,05$ ) e apresentaram coeficiente de variação dentro do especificado pela legislação (CV < 15%; ANVISA, 2003). O fator de diluição de 5x da amostra foi escolhida para prosseguir com os demais testes de validação intra-laboratorial.

Figura 1. Interferência de matriz em ic-ELISA para determinação de AFB<sub>1</sub> em urina infantil. Resultados expressos em média de % de interferência, n = 12. Letras diferentes apresentam diferença significativa ( $p < 0,05$ ).



Definida a diluição da matriz no fator de 5x, foram comparadas as curvas padrão na ausência da matriz (AFB<sub>1</sub> em PBST:Metanol, 9:1, v/v) e na presença da matriz (AFB<sub>1</sub> em pool de urina diluída no fator de 5x em PBST:Metanol, 9:1, v/v). A Figura 2 apresenta a similaridade entre as curvas confeccionadas com concentrações de 0,1 a 10 ng de AFB<sub>1</sub>/mL ( $p > 0.05$ ). As curvas preparadas sem e com a matriz apresentaram CV variando de 0,7 a 6,5%, e 2,5 a 6,4%, respectivamente.

Figura 2. Comparação entre curva padrão sem matriz e a matrizada para determinação de AFB<sub>1</sub> em urina. Os quadrados representam média da curva padrão realizada em triplicata em três dias diferentes.



O limite de detecção (LD) e o Limite de Quantificação (LQ) foi de 0,096 e 0,115 ng/mL, respectivamente. O teste de recuperação permitiu avaliar a exatidão do método. A média da taxa de recuperação para urina infantil ( $n = 3$ ) contaminada em níveis de 1,0; 2,5 e 5,0 ng de AFB<sub>1</sub>/mL foram de  $100,0 \pm 8,71\%$  ( $CV = 8,7\%$ ),  $90,0 \pm 2,0\%$  ( $CV = 2,2\%$ ) e  $93,66 \pm 1,52\%$  ( $CV = 1,6\%$ ), respectivamente (Tabela 2). Nas três concentrações avaliadas, as taxas de recuperação para AFB<sub>1</sub> estão dentro do valor recomendado de 70 a 110% para concentrações de 1 a 10 ng/mL (EC, 2006).

Os parâmetros de precisão do método foram avaliados pela repetibilidade e precisão intermediária (Tabela 3). A média da repetibilidade para contaminação de 1,0; 2,5 e 5,0 ng de AFB<sub>1</sub>/mL foram  $0,90 \pm 0,01$ ;  $2,26 \pm 0,03$  e  $4,76 \pm 0,01$  ng/mL, respectivamente. Para precisão intermediária, considerando os mesmos níveis de contaminação, a média foi de  $1,00 \pm 0,08$ ;  $2,26 \pm 0,04$  e  $4,70 \pm 0,07$  ng/mL. Ambos os parâmetros de exatidão e precisão apresentaram valores de coeficiente de variação menor que 15% indicando pouca variação na leitura intracorrída e intercorrída.

Tabela 3. Parâmetros de exatidão (recuperação) e precisão (repetibilidade e precisão intermediária) de ic-ELISA para determinação de AFB<sub>1</sub> em urina infantil

AFB <sub>1</sub> (ng/mL)	Recuperação		Repetibilidade		Precisão intermediária	
	Média (%)	CV (%)	Média (ng/mL)	CV (%)	Média (ng/mL)	CV (%)
1,0	100,0 ± 8,71	8,71	0,90 ± 0,01	2,99	1,00 ± 0,08	8,94
2,5	90,00 ± 2,00	2,22	2,26 ± 0,03	4,70	2,26 ± 0,04	1,95
5,0	93,66 ± 1,52	1,63	4,76 ± 0,01	3,23	4,70 ± 0,07	1,50

CV: coeficiente de variação

A robustez foi avaliada pela precisão das análises em três variáveis no ic-ELISA. A primeira variável testada foi mudança de operador para confecção da curva padrão nas concentrações de 0,1 a 5,0 ng/mL, apresentando baixo coeficiente de variação 1,7 a 8,7 %. O resultado indicou baixa variação com a troca de analistas. O tempo de sensibilização de AFB<sub>1</sub> por 18 e 20h e o uso de micropipetas de diferentes marcas para realização do ic-ELISA foi avaliada pela repetibilidade e precisão intermediária. Ambos os parâmetros apresentaram baixos valores de coeficiente de variação como já discutida. Dessa forma, é possível afirmar que o método é robusto para as três variáveis testadas.

### 3.3 DETERMINAÇÃO DE AFB<sub>1</sub> EM URINA INFANTIL

Neste estudo, optou-se pela utilização de amostras de urina devido às suas vantagens em relação à coleta de sangue, especialmente no caso de crianças. Essa escolha considerou aspectos éticos, práticos e clínicos, destacando-se o caráter não invasivo do procedimento, que proporciona maior conforto às crianças e melhor aceitação por parte de seus responsáveis. Esses fatores contribuem significativamente para a adesão aos estudos.

A Tabela 4 mostra os níveis de AFB<sub>1</sub> em 150 amostras de urina infantil. AFB<sub>1</sub> foi detectada em 39,3% (n = 59) das amostras, com níveis médios variando de 0,13 a 9,40 ng/mL (média de 1,63 ± 1,57). Um total de 14 amostras (21%) apresentaram contaminação variando de 0,13 a 0,99 ng/mL (média de 0,62 ± 0,28), e apenas 12 amostras (8%) apresentaram variação de 0,13 a 9,4 ng/mL (1,63 ± 1,57).

Tabela 4. Distribuição de níveis de AFB<sub>1</sub> em urina infantil naturalmente contaminada de crianças de Londrina, Paraná

AFB <sub>1</sub> (ng/mL)	n	Amostras positivas (%)	Varição (ng/mL)	Média (ng/mL)
n.d.	91	-	-	-
>0,096 – 0,99	21	14	0,13 - 0,99	0,62 ± 0,28
1,0 – 2,0	26	17,3	1,02 – 1,95	1,36 ± 0,26
>2,1	12	8	2,36 – 9,40	3,99 ± 2,14
TOTAL	150	39,3	0,13 – 9,4	1,63 ± 1,57

N.D.: não detectado

A aflatoxina possui a capacidade de atravessar a placenta, possibilitando a contaminação ainda durante a gestação (ALVITO, SILVA, 2022). Após o nascimento, a exposição pode continuar por meio do leite materno, caso a mãe tenha sido exposta à toxina. No Brasil, têm sido registrados baixos níveis de contaminação em leite materno e fórmulas infantis (ISHIKAWA et al., 2017; BARROS et al., 2024).

No entanto, níveis elevados de exposição foram relatados em países como Egito, Quênia, Marrocos, Nigéria e Tanzânia (ALVITO, SILVA, 2022). Após o período de amamentação, alimentos sólidos tornam-se potenciais fontes de contaminação por aflatoxinas. Estudos recentes indicam que a presença dessa toxina é bastante comum em produtos infantis, como cereais, leite e derivados (AÇAR, AKBULU, 2024).

Evidências recentes indicam que crianças são particularmente vulneráveis às aflatoxinas devido ao seu menor peso corporal, capacidade limitada de desintoxicar substâncias nocivas, dieta restrita, metabolismo e processos de eliminação imaturos, além de suas altas taxas de crescimento e desenvolvimento (AÇAR, AKBULU, 2024).

Segundo Alves (2024), em uma amostra de 169 países, há pelo menos 168 milhões de crianças em idade escolar que recebem alimentação escolar e que no Brasil, a Lei 11.947/2009, o Programa Nacional de Alimentação Escolar, o Programa de Aquisição de Alimentos e as diretrizes de Segurança Alimentar e Nutricional são bem articulados. Contudo, a autora ressalta os desafios na produção, transporte e distribuição desses alimentos. A susceptibilidade do produto alimentar à contaminação fúngica ocorre durante a pré-colheita, transporte, e armazenamento de alimentos e, as aflatoxinas tem sido detectadas em várias *commodities* agrícolas (IARC, 2002). As condições inadequadas de transporte e armazenamento impactam a qualidade dos alimentos, sendo que a exposição crônica a aflatoxinas pode prejudicar o crescimento físico, o desenvolvimento cognitivo e o desempenho escolar (Alvito e Silva, 2022; Dai et al., 2024). Estudos futuros com maior amostragem de crianças em idade escolar são indispensáveis, considerando que este trabalho analisou 150 amostras, das quais apenas 33 pertenciam à faixa etária obrigatória, conforme estabelecido pela Lei de Diretrizes e Bases da Educação Nacional.

A relevância de enfrentar esse problema transcende a saúde individual, configurando-se como um desafio global de segurança alimentar e saúde pública. Abordá-lo exige intervenções coordenadas focadas na prevenção, diagnóstico precoce e mitigação de seus impactos.

#### 4 CONCLUSÃO

O anticorpo monoclonal anti-AFB1 produzido neste estudo demonstrou-se adequado para o desenvolvimento de um método ic-ELISA voltado à detecção de AFB1. O método mostrou-se sensível, específico e preciso para aplicação em amostras de urina infantil, além de possibilitar a utilização de volumes reduzidos de solventes orgânicos, tornando-o menos nocivo à saúde. Os resultados preliminares indicaram baixos níveis de contaminação por AFB1 em crianças da região de Londrina, Paraná, Brasil. Dado o impacto potencial da exposição crônica às aflatoxinas no crescimento físico e no desenvolvimento cognitivo das crianças, são fundamentais intervenções coordenadas voltadas à prevenção, diagnóstico precoce e mitigação desses efeitos.



## REFERÊNCIAS

AÇAR, Y.; AKBULUT, G. Evaluation of aflatoxins occurrence and exposure in cereal-based baby foods: An update review. *Current Nutrition Reports*, v. 13, p. 59–68, 2024. <https://doi.org/10.1007/s13668-024-00519-x>.

ALVES, L.S. Algumas considerações sobre a alimentação escolar no Espírito Santo. *REVISTA ARACÊ*, v.6, n.3, p.4323-4342, 2024. <https://doi.org/10.56238/arev6n3-004>

ALVITO, P.; SILVA, L. P. Mycotoxin exposure during the first 1000 days of life and its impact on children's health: A clinical overview. *Toxins*, v. 14, n. 3, p.189, 2022. <https://doi.org/10.3390/toxins14030189>.

BARROS, H, L.; KLUCZKOVSKI, A, M.; KLUCZKOVSKI, A, J; PINTO, S. C. B. Risk assessment of the occurrence of aflatoxin M1 in breast milk from a population group in the Brazilian Amazon region. *Brazilian Journal of Health Review*, v. 7, n. 5, p. 01-12, 2024. <https://doi.org/10.34119/bjhrv7n5-513>.

BBOSA, G. S.; KITYA D.; LUBEGA A.; OGWAL-OKENG J.; ANOKBONGGO W. W.; KYEGOMBE, D. B. Review of the Biological and Health Effects of aflatoxins on body organs and body systems. *Aflatoxins-Recent Advances and Future Prospects*; Intech: London, UK, Chapter 12, 2013. <https://doi.org/1-.5772/51201>.

BELOGLAROZA, N. V.; EREMIN, S. A. Rapid screening of aflatoxin B1 in beer by fluorescence polarization immunassay. *Talanta*, v. 142, p. 170-175, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2015.04.027>.

BIANCO, G.; RUSSO, R.; MARZOCCO, A.; VELOTTO, S.; SEVERINO, L. Modulation of macrophage activity by aflatoxins B1 and B2 and their metabolites aflatoxins M1 and M2. *Toxicon*, v. 59, n. 6, p. 644-650, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2012.02.010>.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 2003. Resolução de Diretoria Colegiada e RDC Nº 899, de maio de 2003. Ministério da Saúde (MS)/Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), Diário Oficial da União.

DAI, C.; TIAN, E.; LI, H.; GUPTA, S.; HAO, Z.; WNAG, Z.; VELKOV, T.; SHEN, J. Molecular mechanisms of aflatoxin neurotoxicity and potential neuroprotective agentes. *Food Science and Human Wellness*, v. 13, n. 5, p. 2445-2455, 2024. <https://doi.org/10.26599/FSHW.2022.9250201>.

EUROPEAN COMMUNITY (EC). Commission Directive 2006/17/EC of 8 February of 2006. Implementing Directive 2004/23/EC of the European Parliament and of the Council as regards certain technical requirements for the donation, procurement and testing of human tissues and cells. *Official Journal of the European Union*, L 38, 40-52, 2006.

Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). Aflatoxin research on grain in Asia-its problems and possible solutions. Available at: <http://www.fao.org/docrep/x5036e/x5036E1e.htm#Aflatoxin>. Accessed 22 September 2014.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). Bad Bug Book: Pathogenic Microorganisms and natural toxins handbook aflatoxins. Available at: <http://www.fda.gov/Food/FoodborneIllnessContaminants/CausesOfIllnessBadBugBook/ucm071020.htm>. Accessed 30 Jan 2016.



GREINER B.; BRACARENSE A. P. F. L.; SCHWARTZ H. E.; LUCIOLLI J.; COSSALTER A. M.; MOLL W-D.; SCHATZMAYR G.; OSWALD I. P. Biotransformation approaches to alleviate the effects induced by Fusarium Mycotoxins in Swine. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, v. 61, n. 27, p. 6711-6719, 2013. <https://doi.org/10.1021/jf400213q>.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ (IAL). Métodos físico-químicos para análise de alimentos. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008, 1020 p.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE (INMETRO). Portaria Inmetro n.º 348, de 13 de setembro de 2007. Rio de Janeiro: Inmetro, 2007.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC). Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene - IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Vol. 82. Lyon (France): World Health Organization, 2002.

ISHIKAWA, A. T.; HIROOKA, E. Y.; SILVA, P.; BRACARENSE, A.; FLAIBAN, K.; AKAGI, C.Y.; KAWAMURA, O.; COSTA, M. C.; ITANO, E. N. Impact of a single oral acute dose of aflatoxin B-1 on liver function/cytokines and the lymphoproliferative response in C57Bl/6 mice. *Toxins*, v. 9, n. 11, p. 374. <https://doi.org/10.3390/toxins9110374>.

KAWAMURA, O.; NAGAYAMA, S.; SATO, S.; OHTANI, K.; UENO, I.; UENO, Y. A monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay of aflatoxin B1 in peanut products. *Mycotoxin Research*, v. 4, n. 2, p. 75-87, 1988. <https://doi.org/10.1007/BF03192102>.

KENSLER, T. W.; QIAN, G. S.; CHEN, J. G.; GROOPMAN, J. D. Translational strategies for cancer prevention in liver. *Nature Reviews*, v. 3, n. 5, p. 321-329, 2003. <https://doi.org/10.1038/nrc1076>.

LIU, B. H.; HSU, Y. T.; LU, C. C.; YU, F. Y. Detection aflatoxin B1 in foods and feeds by using sensitive rapid enzyme-linked immunosorbent assay and gold nanoparticle immunochromatographic strip. *Food Control*, v. 30, n. 1, p. 184-189, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.07.008>.

MWANDA, O. W.; OTIENO, C. F.; OMONGE, E. Acute aflatoxicosis: case report. *East African Medical Journal*, v. 82, n. 6, p. 320-325, 2005. <https://doi.org/10.4314/eamj.v82i6.9305>.

SAMUEL, N.; EZRI, Y.; FARAH, R.; IGOR, V.; HUSSEIN, A.; RUBINSHTEIN O.; ASSY, N. Acute aflatoxicosis resulting in fulminant hepatic failure and rhabdomyolysis. *Gastroenterology Research*, v. 2, n. 1, p. 48-50, 2009. <https://doi.org/10.4021/gr2009.01.1254>.

SHARMA V.; SHARMA C.; PRACHETA, P. R.; SHARMA S. Protective potential of Curcuma longa and Curcumin on aflatoxin B1 induced hepatotoxicity in Swiss albino mice. *Asian Journal of Pharmaceutical and Health Sciences*, v. 1, n. 10, p. 116-122, 2011.

VARGA, J.; FRISVAD, J. C.; SAMSON, R. A. Two new aflatoxin producing species, and an overview of Aspergillus section Flavi. *Studies in Mycology*, v. 69, n. 1, p. 57-80, 2011. <https://doi.org/10.3114/sim.2011.69.05>.