



Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos  
Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos (PPGCTA)

## **AVALIAÇÃO DA CONTAMINAÇÃO POR AFLATOXINA M<sub>1</sub> EM LEITE CRU E LEITE UHT**

Michele Weigel  
Engenheira de Alimentos - UNISINOS

Dissertação apresentada ao Curso de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos como um dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Porto Alegre, Brasil  
Fevereiro 2007

Michele Weigel  
Engenheira de Alimentos - UNISINOS

## DISSERTAÇÃO

Submetida como parte dos requisitos para obtenção do grau de

### **MESTRE EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**

Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos (PPGCTA)

Universidade Federal do Rio Grande do Sul – Porto Alegre, RS, Brasil.

Aprovada em: 28/02/2007  
Pela Banca Examinadora:

Homologada em: 04/04/2007  
Por:

Isa Beatriz Noll  
Orientador – PPGCTA/UFRGS

Erna Vogt de Jong  
Coordenador do Programa de Pós  
Graduação em Ciência e Tecnologia  
de Alimentos (PPGCTA)

Eduardo César Tondo  
Co-orientador – PPGCTA/UFRGS

Alessandro Rios  
Banca – ICTA/UFRGS

Erna Vogt de Jong  
Banca – PPGCTA/UFRGS

Marisa da Costa  
Banca – PPGMAA/UFRGS

ADRIANO BRANDELI  
Diretor do Instituto de Ciência e  
Tecnologia de Alimentos.  
ICTA/UFRGS

## AGRADECIMENTOS

Dedico esta conquista principalmente aos meus pais, Plínio e Dalva, pela compreensão, incentivo, confiança e amor em todos os dias.

Ao meu irmão João Paulo, a minha vó Hertha, a minha madrinha Rosane e a minha prima e amiga Eliana, por todo o apoio durante estes dois anos.

A minha colega de apartamento Nicoli Henn, pela amizade e compreensão diária.

Aos colegas de mestrado, Ângela, Danielle, Fernanda, Jozi, Flávia, Marcelo e Patrícia, pelo incentivo e amizade durante todos os dias desta etapa da minha vida.

As colegas de laboratório, Ana Carolina Ritter, Juliane Welke e Michele Hoeltz, pela amizade e pelos momentos de descontração.

A todos os amigos que contribuíram para que os dias fossem mais alegres, com seus gestos e palavras.

Ao funcionário do ICTA, Roberval Bittencourt, pela colaboração e por disponibilizar os equipamentos necessários para a realização das análises.

Ao professor Eduardo César Tondo, pela dedicação, apoio e co-orientação neste trabalho.

À orientadora e professora Isa Beatriz Noll, por ter me dado esta oportunidade e pela dedicação no decorrer deste trabalho.

Agradeço a Deus, pela oportunidade recebida, pela família e amigos que tenho e pela pessoa que sou.

## AVALIAÇÃO DA CONTAMINAÇÃO POR AFLATOXINA M<sub>1</sub> EM LEITE CRU E LEITE UHT

Michele Weigel  
Eduardo César Tondo (Co-Orientador)  
Isa Beatriz Noll (Orientadora)

A aflatoxina M<sub>1</sub> (AFM<sub>1</sub>) é um metabólito tóxico resultante da biotransformação da aflatoxina B<sub>1</sub> e pode ser secretada no leite de animais que ingerem alimentos contaminados com esta última. Considerando os efeitos adversos que podem ocorrer devido à ingestão do produto contaminado e visto que as crianças, maiores consumidoras deste alimento, são potencialmente mais sensíveis que os adultos aos efeitos desta micotoxina, a avaliação da presença de AFM<sub>1</sub> no leite se faz necessária. Durante o período de março a novembro de 2006 foram analisadas 48 amostras de leite cru provenientes de 8 propriedades fornecedoras de leite para uma Cooperativa de Leite da Serra Gaúcha e 80 amostras de leite UHT, provenientes de 7 marcas distintas, comercializadas em Porto Alegre (RS). A metodologia empregada na análise de aflatoxina M<sub>1</sub> envolveu partição líquido-líquido na etapa de extração, uso de coluna de sílica gel na etapa de purificação e Cromatografia em Camada Delgada para a detecção. O limite de detecção foi de 10 ng e a avaliação da eficiência do método apresentou valor de 86% no teste de recuperação. Nas condições de trabalho e pelo método utilizado nenhuma das amostras analisadas foi positiva para a presença de AFM<sub>1</sub>, sugerindo que as mesmas encontram-se dentro das conformidades legais.

Palavras-chave: Aflatoxina M<sub>1</sub>, leite cru, leite UHT, Cromatografia em Camada Delgada

## EVALUATION OF AFLATOXIN M<sub>1</sub> CONTAMINATION IN RAW MILK AND UHT MILK

Michele Weigel  
Eduardo César Tondo (Co-Orientador)  
Isa Beatriz Noll (Orientadora)

Aflatoxin M<sub>1</sub> (AFM<sub>1</sub>) is a toxic metabolite resulting of the biotransformation of aflatoxin B<sub>1</sub>, and may be secreted in milk of animals that consume foods contaminated with aflatoxin B<sub>1</sub>. Considering the adverse effects that can occur when foods contaminated are consumed, and since children, the greatest milk consumer are potentially more susceptible than adults to the effects of this mycotoxin, the evaluation of the presence of AFM<sub>1</sub> in milk is necessary. From March to November of 2006 48 samples of raw milk from 8 dairy farms that integrate a Milk Cooperative of mountain region of Rio Grande do Sul and 80 samples of UHT milk from 7 different brands commercialized in Porto Alegre were analyzed. The methodology employed for the analysis of aflatoxin M<sub>1</sub> involved liquid-liquid partition on the extraction step, use of silic gel column for the purification step and Thin Layer Chromatography for the detection. The evaluation of the method efficiency present a value of 86% in the recovery test and the detection level was 10ng. Following analysis conditions and the method employed none of the samples analyzed were positive for the presence of aflatoxin M<sub>1</sub>, suggesting that samples analysed attend the legal conformities.

Key words: Aflatoxin M<sub>1</sub>, UHT milk, raw milk, Thin Layer Chromatography

**LISTA DE FIGURAS**

FIGURA 1. Estruturas químicas da aflatoxina B <sub>1</sub> , aflatoxina M <sub>1</sub> e aflatoxina G <sub>1</sub> .....	12
FIGURA 2. Vias do metabolismo da AFB <sub>1</sub> e da AFM <sub>1</sub> .....	14

**LISTA DE TABELAS**

TABELA 1. Pesquisa de AFM <sub>1</sub> em diferentes regiões do Brasil.....	22
---	----

## SUMÁRIO

<b>CAPÍTULO 1</b> .....	<b>8</b>
1.1 Introdução .....	8
1.2 Objetivos .....	9
1.2.1 Objetivo Geral.....	9
1.2.2 Objetivos específicos.....	9
1.3 Revisão Bibliográfica.....	10
1.3.1 Leite.....	10
1.3.2 Aflatoxinas .....	10
1.3.3 Biotransformação da aflatoxina B <sub>1</sub> em aflatoxina M <sub>1</sub> .....	13
1.3.4 Aflatoxina M <sub>1</sub> .....	14
1.3.4.1 Aspectos Toxicológicos.....	16
1.3.4.2 Efeitos de Processamentos.....	17
1.3.4.3 Detoxificação.....	18
1.3.4.4 Métodos para Determinação de Aflatoxina M <sub>1</sub> .....	18
1.3.5 Pesquisas Realizadas no Brasil.....	21
1.3.6 Limites de Aflatoxina M <sub>1</sub> Permitidos no Leite .....	22
<b>CAPÍTULO 2</b> .....	<b>24</b>
2.1 Artigo.....	24
<b>CAPÍTULO 3</b> .....	<b>38</b>
3.1 Discussão Geral.....	38
<b>CAPÍTULO 4</b> .....	<b>41</b>
4.1 Referências Bibliográficas.....	41



## CAPÍTULO 1

### 1.1 Introdução

O leite é um alimento amplamente consumido pelos humanos e, devido a sua riqueza em nutrientes, se constitui numa importante fonte alimentar, principalmente para crianças.

No Brasil, a produção e o consumo de leite e outros produtos lácteos têm crescido a cada ano. Ao mesmo tempo, aumentam-se as preocupações com a qualidade e a segurança do leite. Alguns riscos associados a este produto podem ser eliminados pelos tratamentos térmicos, mas outros precisam ser prevenidos ou controlados por procedimentos adequados, desde o manejo com o animal até o armazenamento.

Quando mamíferos ingerem ração contaminada com aflatoxina B<sub>1</sub>, esta micotoxina é biotransformada em aflatoxina M<sub>1</sub>, podendo ser secretada no leite. Por apresentar alta resistência a tratamentos químicos e físicos, a destruição completa dessa micotoxina não é viável.

Diferentes níveis de aflatoxina M<sub>1</sub> são encontrados em amostras de leite e de produtos lácteos. Isso ocorre, provavelmente, pelos variados métodos de análise e suas sensibilidades, já que os níveis deste composto muitas vezes são inferiores aos limites de detecção de algumas das técnicas utilizadas. Os métodos mais comumente empregados para verificar a presença desta micotoxina, em leite, são a Cromatografia em Camada Delgada e a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.

Levando-se em conta essas considerações, a avaliação da presença de aflatoxina M<sub>1</sub> em leite e produtos derivados faz-se necessária, considerando os efeitos adversos que podem ocorrer devido à ingestão do produto contaminado (hepatotoxicidade e hepatocarcinogenicidade), e visto que as crianças são potencialmente mais sensíveis que os adultos aos efeitos desta micotoxina.

Além disso, as indústrias brasileiras de laticínios começam a preocupar-se com a contaminação de seus produtos por aflatoxina M<sub>1</sub>. Soma-se a isso, o fato dos

limites propostos pelas legislações de diferentes países, referentes a este composto tóxico, serem bastante variáveis, muitos apresentando limites inferiores aos níveis propostos pela legislação brasileira, exigindo, dessa forma, um controle de qualidade cada vez mais rigoroso voltado aos mercados nacionais e internacionais.

## **1.2 Objetivos**

### **1.2.1 Objetivo Geral**

Este trabalho teve como objetivo avaliar a presença de aflatoxina  $M_1$  em amostras de leite cru provenientes de produtores ligados a uma Cooperativa de Leite de médio porte, localizada na Serra Gaúcha, e em leite UHT comercializado na cidade de Porto Alegre.

### **1.2.2 Objetivos específicos**

- Verificar a presença de aflatoxina  $M_1$  em sete marcas comerciais distintas de leite UHT;
- Pesquisar aflatoxina  $M_1$  em leite UHT desnatado e integral;
- Pesquisar aflatoxina  $M_1$  em leite cru de oito propriedades distintas, fornecedoras de leite;
- Detectar e quantificar aflatoxina  $M_1$  por Cromatografia em Camada Delgada por comparação visual;
- Analisar se os níveis encontrados estão de acordo com os limites permitidos pela legislação brasileira vigente.

## 1.3 Revisão Bibliográfica

### 1.3.1 Leite

O leite é um dos alimentos mais completos que existe para o ser humano, contendo grande variedade de nutrientes essenciais ao crescimento, desenvolvimento e manutenção de uma vida saudável. Sendo um alimento rico em proteínas, energia e minerais, deve ser ingerido principalmente por crianças (GUIMARÃES, 2007).

A produção de leite no Brasil aumentou cerca de 48% entre os anos de 1995 e 2005. O consumo de leite Ultra High Temperature (UHT) também aumentou consideravelmente nos últimos anos, atingindo 73,5% do mercado total de leite em 2004, sendo o tipo de leite de maior penetração nos domicílios brasileiros (PROGRAMA DE ESTUDOS DOS NEGÓCIOS DO SISTEMA AGROINDUSTRIAL, 2007).

A praticidade de se adquirir um produto que pode ser armazenado sem refrigeração, por longo período de tempo, é um fator essencial para o crescimento no consumo de leite UHT.

Sendo o leite e os produtos lácteos amplamente consumidos pela população, salienta-se a importância de avaliar sua contaminação por aflatoxina M<sub>1</sub> (PEREIRA et al., 2005), uma vez que ela tem sido encontrada em leites crus, pasteurizados e UHT, em diferentes países, demonstrando ser um problema mundial (MIDIO; MARTINS, 2000).

### 1.3.2 Aflatoxinas

As micotoxinas de maior significância em alimentos e rações são as aflatoxinas, produtos tóxicos resultantes do metabolismo secundário de espécies do fungo *Aspergillus*, principalmente *A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. nomius* (RUSTOM, 1997; CREPPY, 2002; MOSS, 2002). Estas micotoxinas são contaminantes naturais

de alimentos, sendo sua maior incidência em regiões tropicais e subtropicais, devido às condições climáticas favoráveis ao desenvolvimento fúngico, como umidade e temperaturas elevadas (RUSTOM, 1997; MOSS, 2002).

Entre as culturas suscetíveis às aflatoxinas encontram-se: amendoim, milho, arroz, sementes de algodão (RUSTOM, 1997; MOSS, 2002), trigo, soja, arroz, sorgo, castanha-do-pará, mandioca, ervilha (TANGO, 1974). No entanto, em rações, as principais fontes de aflatoxina são o amendoim, o milho, o algodão e o sorgo (OSWEILER, 1990; CREPPY, 2002). A contaminação dos produtos por essas micotoxinas pode ocorrer praticamente em todas as fases de sua obtenção, desde a contaminação no campo, durante a colheita, até no transporte e no armazenamento (PITTET, 1998). Já foram encontradas também, em baixos níveis, em fígado, rins e urina de ovinos (ALLCROFT et al., 1966) e em rins, fígado, bile e baço de bovinos (HAYES; POLAN; CAMPBELL, 1977).

As quatro principais aflatoxinas são divididas nos grupos B e G, que se referem às suas propriedades fluorescentes. Sob luz ultravioleta de ondas longas, as aflatoxinas B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> apresentam fluorescência azul e as aflatoxinas G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub> apresentam fluorescência verde (TANGO, 1974; GOURAMA; BULLERMAN, 1995; HUSSEIN; BRASEL, 2001; BRAGA; CARDOSO; MACÊDO, 2002). A intensidade da emissão de fluorescência varia entre elas, constituindo-se assim como base para técnicas de detecção e quantificação. (TANGO, 1974; MIDIO; MARTINS, 2000). Os números 1 e 2 designam a mobilidade cromatográfica, ou fator de retenção (R<sub>f</sub>), dos compostos em placas de cromatografia em camada delgada (CCD) (GOURAMA; BULLERMAN, 1995).

Enquanto o *A. parasiticus* produz as aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub>, o *A. flavus* produz apenas as aflatoxinas B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> (GOURAMA; BULLERMAN, 1995; CREPPY, 2002). Entre elas, as aflatoxinas B<sub>1</sub> e G<sub>1</sub> são as de maior ocorrência e em um maior número de produtos (PITTET, 1998; SWEENEY; DOBSON, 1998).

Quando ingeridas, a aflatoxina B<sub>1</sub> e a aflatoxina B<sub>2</sub> são metabolizadas, podendo ser convertidas a diversos metabólitos, entre os quais se encontram seus compostos hidroxilados, a aflatoxina M<sub>1</sub> (AFM<sub>1</sub>) e a aflatoxina M<sub>2</sub> (AFM<sub>2</sub>), respectivamente (MASRI et al., 1967; GOLDBLATT, 1969; TANGO, 1974; GOURAMA; BULLERMAN, 1995).

Quando exposta à luz ultravioleta, a aflatoxina M<sub>1</sub> emite coloração azul-violeta (DE IONGH; VLES; VAN PELT, 1964; GOLDBLATT, 1969; TANGO, 1974), enquanto

a aflatoxina M<sub>2</sub> apresenta fluorescência mais violeta e com fator de retenção (Rf) menor em placa de CCD (TANGO, 1974). Em relação ao fator de retenção, a AFM<sub>1</sub> apresenta menor valor do que a AFB<sub>1</sub> (DE IONGH; VLES; VAN PELT, 1964).

O ponto de fusão, ou seja, a temperatura em que a AFB<sub>1</sub> e a AFG<sub>1</sub> se decompõem é 268-269°C e 244-246°C, respectivamente, enquanto o da AFM<sub>1</sub> é 299°C (GOLDBLATT, 1969), caracterizando-se assim como compostos com grande estabilidade térmica.

Entre todas, a aflatoxina B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>) é considerada a mais importante, devido a seu alto potencial tóxico, sendo considerada também um dos mais potentes hepatocarcinógenos conhecidos em grande variedade de espécies animais, e também em humanos (SWEENEY; DOBSON, 1998; HUSSEIN; BRASEL, 2001; IARC, 2002; MOSS, 2002).

Os espectros de absorção em ultravioleta e infravermelho são muito similares para as aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub>, indicando que estes quatro compostos apresentam estruturas semelhantes (TANGO, 1974).

Quimicamente, as aflatoxinas apresentam estruturas intimamente relacionadas entre si, formando um grupo único de compostos heterocíclicos altamente oxigenados (furocumarinas complexas). As aflatoxinas apresentam um núcleo central cumarínico ligado a uma estrutura bi-furanóide; as aflatoxinas B apresentam anel ciclopentona e as do grupo G apresentam anel lactona na molécula (GOURAMA; BULLERMAN, 1995). As aflatoxinas que possuem uma dupla ligação no carbono terminal do anel diidrofurano, como a aflatoxina B<sub>1</sub>, aflatoxina G<sub>1</sub> e aflatoxina M<sub>1</sub> (Figura 1), são mais suscetíveis aos efeitos de agentes oxidantes, como o peróxido de hidrogênio (YOUSEF; MARTH, 1985).

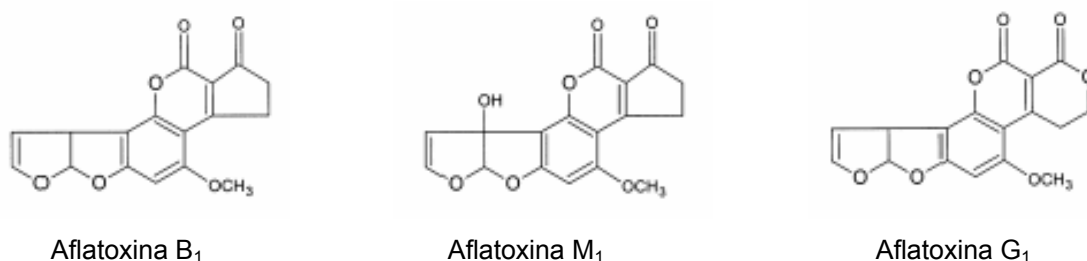


Figura 1: Estruturas químicas da aflatoxina B<sub>1</sub>, aflatoxina M<sub>1</sub> e aflatoxina G<sub>1</sub> (HUSSEIN; BRASEL, 2001).

Estas micotoxinas podem ser transmitidas para o homem pela ingestão direta de alimentos ou podem ser transferidas para produtos utilizados como matéria-prima na fabricação de rações animais. Desta forma, os animais podem converter as toxinas presentes nos alimentos contaminados em metabólitos tóxicos, que serão repassados a seus produtos (ALLCROFT; CARNAGHAN, 1963; VELDMAN et al., 1992; RUSTOM, 1997).

### **1.3.3 Biotransformação da aflatoxina B<sub>1</sub> em aflatoxina M<sub>1</sub>**

As aflatoxinas são absorvidas no trato gastrointestinal e biotransformadas primariamente no fígado, por enzimas microssomais relacionadas ao citocromo P450. A biotransformação da aflatoxina B<sub>1</sub> constitui um complexo processo, com múltiplas vias, entre as quais destacam-se a epoxidação e a hidroxilação. A ativação da AFB<sub>1</sub> conduz à formação do derivado AFB<sub>1</sub> – 8,9 epóxido, possuindo dois estereoisômeros, a endo-epóxido e a exo-epóxido, sendo esta última a responsável pelos efeitos tóxicos agudos, mutagênicos e carcinogênicos da AFB<sub>1</sub> (NEAL et al., 1998; JECFA, 2002). Já a hidroxilação, processo que pode ser reversível ou irreversível, forma derivados menos tóxicos e hidrossolúveis, como a AFM<sub>1</sub> (hidroxilado irreversível) (NEAL, 1998) (Figura 2), o que possibilita sua secreção através de fluidos corporais, como o leite (OLIVEIRA; GERMANO, 2003).

A aflatoxina M<sub>1</sub> e a B<sub>1</sub> são estruturalmente análogas, diferenciando-se apenas pela presença de uma hidroxila entre os anéis furano (GOLDBLATT, 1969), ou seja, as possíveis vias de transformação poderiam ser as mesmas (PONG; WOGAN, 1971; TAVEIRA; MIDIO, 1999). A AFM<sub>1</sub> também pode sofrer epoxidação e ser ativada para formar derivados mutagênicos, o que explica sua toxicidade apreciável em modelos experimentais (BAILEY et al., 1994; NEAL et al., 1998).

Em diversos estudos realizados, foi encontrada uma relação diretamente proporcional entre a quantidade de AFM<sub>1</sub> secretada no leite e a quantidade de AFB<sub>1</sub> ingerida pelo animal (ALLCROFT; CARNAGHAN, 1962; GOLDBLATT, 1969; VELDMAN et al., 1992; KAMKAR, 2005).

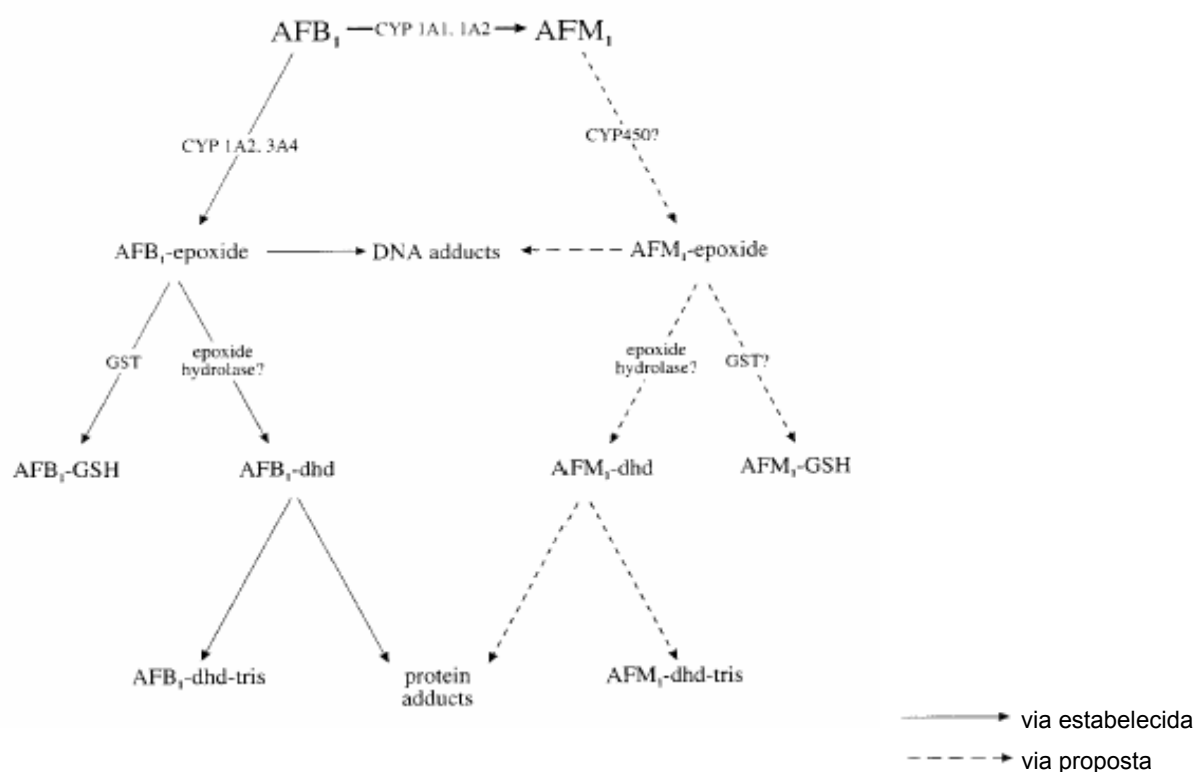


Figura 2: Vias do metabolismo da AFB<sub>1</sub> e da AFM<sub>1</sub> (NEAL et al., 1998)

A taxa de conversão de AFB<sub>1</sub> que é ingerida e biotransformada em AFM<sub>1</sub> é de cerca de 0,3 a 6,2% (TANGO, 1974; CREPPY, 2002; JECFA, 2002), no entanto, estima-se que esta conversão seja normalmente de 1 a 3% (MASRI et al., 1967; McKINNEY et al., 1973; POLAN; HAYES; CAMPBELL, 1974).

#### 1.3.4 Aflatoxina M<sub>1</sub>

A ingestão de rações contaminadas com AFB<sub>1</sub> e AFB<sub>2</sub>, por mamíferos, pode ocasionar o aparecimento em seu leite de metabólitos hidroxilados e também tóxicos, a aflatoxina M<sub>1</sub> e a aflatoxina M<sub>2</sub> (micotoxinas do leite) (GOLDBLATT, 1969; TANGO, 1974; GALVANO; GALOFARO; GALVANO, 1996). Assim, quando o gado leiteiro consome ração contaminada com as aflatoxinas precursoras, há degradação parcial destas no rúmem e o animal pode intoxicar-se ou transmitir as micotoxinas

através do leite (ALLCROFT; CARNAGHAN, 1962; DE IONGH; VLES; VAN PELT, 1964; RUSTOM, 1997; CREPPY, 2002).

A concentração de AFM<sub>1</sub> no leite pode variar entre animais, raças (STOLOFF et al., 1975), e mesmo entre fases de lactação (VELDMAN et al., 1992). A detecção deste composto no leite pode ocorrer 12-24 horas após a ingestão inicial de AFB<sub>1</sub>, atingindo a máxima concentração entre 3 e 6 dias de ingestão constante da sua precursora. No entanto, o nível de AFM<sub>1</sub> no leite diminui com o cessar da exposição do animal à ração contaminada, tornando-se indetectável em 2 a 4 dias (POLAN; HAYES; CAMPBELL, 1974; TANGO, 1974). Os animais que possuem infecção por bactérias *Staphylococcus* no úbere apresentam taxa de secreção de AFM<sub>1</sub> mais elevada do que os animais sadios (VELDMAN et al., 1992).

Embora a grande maioria dos dados encontrados na literatura sobre AFM<sub>1</sub> em leite reportam-se, com particular interesse, ao leite de vaca, sabe-se que a AFM<sub>1</sub> pode ser encontrada também no leite de ovelha (ALLCROFT et al., 1966), búfala, cabra e camelo (GALVANO; GALOFARO; GALVANO, 1996; PITTET, 1998).

A exposição de mulheres lactantes a uma dieta altamente contaminada por AFB<sub>1</sub> pode ocasionar, também, a contaminação de seu leite (IARC, 2002; MOSS, 2002). Em alguns casos, os níveis de AFM<sub>1</sub> encontrados são elevados, principalmente em amostras de leite de regiões tropicais e sub-tropicais (GALVANO; GALOFARO; GALVANO, 1996). Em um trabalho conduzido por El-Nezami et al. (1995), foi verificada a presença de AFM<sub>1</sub> no leite de mulheres lactantes de Victória (Austrália) e da Tailândia, sendo encontrado este composto em 11 amostras provenientes de Victória, numa concentração média de 0,071µg/L, e em 5 amostras da Tailândia, numa concentração média de 0,664µg/L. Em São Paulo, 50 amostras de leite de um Banco de Leite Humano, foram analisadas. Das 22 amostras coletadas no verão de 2001-2002 e das 28 amostras coletadas no inverno de 2002, apenas em 1 (coletada no inverno) foi encontrada a AFM<sub>1</sub>, numa concentração de 0,02ng/mL (NAVAS; SABINO; RODRIGUEZ-AMAYA, 2005). Por fim cabe ressaltar que como no leite, a AFM<sub>1</sub> pode também ser secretada na urina de humanos (CAMPBELL et al., 1970).

Além da AFB<sub>1</sub>, a ocratoxina A e a zearalenona, e seus metabólitos tóxicos, como o  $\alpha$ -zearalenol, também podem representar riscos para a saúde, devido a possibilidade de serem transmitidas para o leite (MASRI et al., 1967; GALTIER, 1998).



Em diversas pesquisas realizadas foi verificada sazonalidade quanto à contaminação do leite pela aflatoxina M<sub>1</sub>, sendo que os maiores índices ocorreram no período de inverno e os menores no verão, quando a quantidade de ração e silagem fornecida aos animais foi menor (GALVANO; GALOFARO; GALVANO, 1996; GALVANO et al., 1998; BAKIRCI, 2001; KAMKAR, 2005).

#### 1.3.4.1 Aspectos Toxicológicos

A conversão metabólica de AFB<sub>1</sub> para AFM<sub>1</sub> é normalmente considerada como um processo de detoxificação, apesar da sua toxicidade aguda e de seu potencial carcinogênico (NEAL et al., 1998).

A aflatoxina M<sub>1</sub> caracteriza-se pela sua hepatotoxicidade similar ou ligeiramente menor do que a da AFB<sub>1</sub> (ALLCROFT; CARNAGHAN, 1962, 1963; GALVANO; GALOFARO; GALVANO, 1996).

Resultados obtidos em estudos de carcinogenicidade indicam que a AFM<sub>1</sub> é um hepatocarcinógeno (SINNHUBER et al., 1970) com cerca de 10% da potência da sua precursora (BAILEY et al., 1994, 1998). O potencial genotóxico e citotóxico da AFM<sub>1</sub>, *in vitro*, é semelhante a aflatoxina B<sub>1</sub> (PONG; WOGAN, 1971) em várias espécies (JECFA, 2002), enquanto que, no teste de Ames, a AFM<sub>1</sub> apresenta potencial mutagênico muito menor do que a AFB<sub>1</sub> (BAILEY et al., 1994).

Segundo Neal et al. (1998), a AFM<sub>1</sub> em baixas doses (>0,5µg/mL) apresentou citotoxicidade para as células linfoblastóides na ausência de ativação metabólica, o que não foi observado com a AFB<sub>1</sub>.

Os efeitos tóxicos e carcinogênicos têm sido extensivamente demonstrados em diversas espécies, sobretudo em animais jovens (ALLCROFT; CARNAGHAN, 1963). Há, portanto, grande preocupação com relação à saúde das crianças, devido ao alto consumo de leite e produtos derivados, seu baixo peso corpóreo e a uma maior suscetibilidade às aflatoxinas (IARC, 2002).

Devido a informações experimentais, o IARC (2002) classifica as aflatoxinas, entre elas, a aflatoxina M<sub>1</sub>, na Classe 1, ou seja, são consideradas carcinogênicas para os homens.

### 1.3.4.2 Efeitos de Processamentos

Diversos estudos sugerem que a AFM<sub>1</sub> está associada à fração protéica do leite (caseína) (ALLCROFT; CARNAGHAN, 1962, 1963; GOLDBLATT, 1969; TANGO, 1974; HASSANIN, 1994), ficando nela retida após tratamento térmico e nos produtos derivados. Conseqüentemente, a concentração da matéria-prima, como o leite em pó e o leite condensado, pode aumentar a proporção de AFM<sub>1</sub> no produto final, devido à diminuição do teor de água (PITTET, 1998).

Sendo a AFM<sub>1</sub> insolúvel na gordura do leite, na fabricação de produtos derivados, o desnatamento afeta a distribuição da micotoxina no produto final, ficando a maior parte da AFM<sub>1</sub> retida na fração desnatada (STUBBLEFIELD; SHANNON, 1974; BAKIRCI, 2001).

Os diversos produtos derivados, como queijo, iogurte, nata, manteiga e soro apresentam distribuição diferenciada desta micotoxina (STUBBLEFIELD; SHANNON, 1974; HASSANIN, 1994; JECFA, 2002).

Em estudos sobre os efeitos dos tratamentos térmicos (pasteurização e processo UHT) na redução de AFM<sub>1</sub>, os resultados são bastante conflitantes quanto à percentagem de redução, ou não, nos níveis deste composto (GALVANO; GALOFARO; GALVANO, 1996; RUSTOM, 1997; BAKIRCI, 2001). Pereira et al. (2005) encontraram redução média de 15,6% da AFM<sub>1</sub> após pasteurização de suas amostras; essa redução, no entanto, não foi significativa estatisticamente, ou seja, o tratamento térmico não reduz apreciavelmente a concentração da micotoxina (ALLCROFT; CARNAGHAN, 1962; STOLOFF et al., 1975).

Também são variáveis os resultados obtidos em estudos sobre a estabilidade da AFM<sub>1</sub> no leite (cru e processado) e seus derivados durante o armazenamento sob condições de resfriamento ou congelamento. O resfriamento, entretanto, parece afetar mais o conteúdo de AFM<sub>1</sub> nas amostras do que o congelamento (McKINNEY et al., 1973; STOLOFF et al., 1975; HASSANIN, 1994; GALVANO; GALOFARO; GALVANO, 1996).

### 1.3.4.3 Detoxificação

A utilização de tratamentos térmicos não se revela muito eficaz na detoxificação da aflatoxina M<sub>1</sub>, uma vez que esta micotoxina é resistente a altas temperaturas, apresentando grande estabilidade a tais tratamentos (ALLCROFT; CARNAGHAN, 1962, 1963).

Esse composto pode ser parcialmente eliminado do leite por tratamentos físicos ou químicos, que incluem o uso de adsorventes, peróxido de hidrogênio e radiação ultravioleta (YOUSEF; MARTH, 1985; RUSTOM, 1997). A radiação ultravioleta deve ser aplicada com o máximo de cuidado, visto que quando utilizada em alta intensidade pode alterar as características organolépticas do leite (YOUSEF; MARTH, 1985). Estes tratamentos, no entanto, não são facilmente aplicáveis nas indústrias; sua segurança ainda não foi testada e seus custos são altos, fazendo com que a utilização em larga escala se torne inviável (JECFA, 2002).

Tendo em vista a alta estabilidade da aflatoxina M<sub>1</sub>, as ações para seu controle devem ser orientadas no sentido de prevenir ou reduzir a concentração da sua micotoxina precursora nas rações. Boas práticas no campo, de fabricação e no armazenamento podem diminuir o risco de contaminação fúngica (CREPPY, 2002; JECFA, 2002; OLIVEIRA; GERMANO, 2003). A redução da concentração de aflatoxina nas rações pode ser obtida com a utilização de tratamentos físicos, entre os quais encontra-se o uso de adsorventes, calor, microondas e luz ultravioleta; e químicos, como a utilização de amônia, bissulfito de sódio e hidróxido de sódio (PIVA et al., 1995; RUSTOM, 1997; CREPPY, 2002).

### 1.3.4.4 Métodos para Determinação de Aflatoxina M<sub>1</sub>

A distribuição da AFM<sub>1</sub> nos alimentos é uniforme, o que torna a amostragem uma etapa relativamente fácil. Já as etapas de extração e remoção de interferentes requerem um cuidado maior, uma vez que os níveis encontrados podem ser da ordem de ng/L ou ng/Kg (ppt) (SYLOS; RODRIGUEZ-AMAYA, 1996). Assim,

incertezas sobre as estimativas da aflatoxina M<sub>1</sub> em leite estão associadas provavelmente aos procedimentos analíticos (JECFA, 2002).

Com base na propriedade fluorescente da AFM<sub>1</sub> (GOLDBLATT, 1969; TANGO, 1974), foram desenvolvidos, em meados dos anos 60, os primeiros métodos para a determinação desta micotoxina em amostras de leite e derivados. A técnica de identificação e quantificação utilizada no início, e ainda hoje largamente empregada, é a Cromatografia em Camada Delgada (CCD).

A CCD constitui uma técnica tradicional para a determinação de micotoxinas (DOMINGUEZ et al., 1987; SABINO; PURCHIO; ZORZETTO, 1989; PRADO; NICÁCIO; LARA, 1994; SYLOS; RODRIGUEZ-AMAYA; CARVALHO, 1996; BAKIRCI, 2001; KAMKAR, 2005), por ser de fácil e rápida execução, não requerer o uso de equipamentos dispendiosos e ser de baixo custo (MIDIO; MARTINS, 2000; SOUZA et al., 2003). Por isso, a CCD é o método mais utilizado para a determinação da AFM<sub>1</sub> em muitos países, principalmente nos países em desenvolvimento (GILBERT; ANKLAM, 2002; JECFA, 2002).

Em CCD há uma estimativa visual da comparação entre a intensidade de fluorescência da mancha de AFM<sub>1</sub> extraída da amostra e do padrão em uma mesma cromatoplaça, sendo um método semi-quantitativo (MIDIO; MARTINS, 2000).

A capacidade de separar as micotoxinas dos componentes interferentes, em placas de CCD, confere razoável nível de especificidade e sensibilidade ao método. Isso se deve ao fato de que a AFM<sub>1</sub> fluoresce sob luz UV, o que permite que concentrações de ordem de nanogramas sejam detectadas em uma placa (SOUZA et al., 2003).

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) (SYLOS; RODRIGUEZ-AMAYA; CARVALHO, 1996; PRADO et al., 1999; GARRIDO et al., 2003; NAKAJIMA et al., 2004) com detecção de fluorescência, é uma técnica também bastante utilizada para a separação, detecção e quantificação de aflatoxina M<sub>1</sub> em extratos de leite (SOUZA et al., 2003). Com essa técnica houve um incremento no grau de precisão das análises, porém com aumento significativo dos custos (OLIVEIRA; GERMANO, 1996). A CLAE pode ser de fase normal (GALVANO et al., 1998; VELASCO; DELSO; ESCUDERO, 2003; ELGERBI et al., 2004) ou de fase reversa (SABINO; PURCHIO; ZORZETTO, 1984; PEREIRA et al., 2005).

A espectrometria de massa e cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa (SORENSEN; ELBAEK, 2005) já foram estudadas e sugeridas, mas ainda

não são muito empregadas nos países em desenvolvimento, provavelmente pelo alto custo dos equipamentos e a necessidade de pessoal altamente capacitado (SOUZA et al., 2003).

Métodos imunológicos, ou imunoenaios, fundamentados nas reações específicas entre antígenos e anticorpos, destacando-se os radioimunoenaios (RIA) (SAITANU, 1997), e o ensaio por enzimas imuno-adsorvidas (ELISA) (OLIVEIRA; GERMANO, 1996; SOUZA; VARGAS; JUNQUEIRA, 1999; LÓPEZ et al., 2003; VELASCO; DELSO; ESCUDERO, 2003; SASSAHARA; NETTO; YANAKA, 2005), também estão sendo amplamente utilizados, principalmente como técnicas de triagem (OLIVEIRA; GERMANO, 1996; CREPPY, 2002; SOUZA et al., 2003). O método ELISA é o mais comumente utilizado; para propósitos regulatórios, entretanto, procedimentos de validação devem ser adotados (SOUZA; VARGAS; JUNQUEIRA, 1999; JECFA, 2002).

Anterior à análise cromatográfica, uma seqüência de operações, incluindo amostragem, preparação da amostra, extração, purificação e concentração do extrato obtido, devem ser realizadas. (BRAGA; CARDOSO; MACÊDO, 2002).

Inicialmente é feita uma extração para separar a AFM<sub>1</sub> da matriz, etapa que pode extrair também substâncias interferentes. Utilizam-se, em sua maioria, solventes orgânicos, relativamente polares, como o metanol, acetona, clorofórmio, acetonitrila, entre outros (BRAGA; CARDOSO; MACÊDO, 2002).

Visando a purificação do extrato obtido, procede-se uma etapa de limpeza ("clean-up"), que pode ser realizada através da partição líquido-líquido ou por uma purificação cromatográfica em fase sólida, com colunas e cartuchos de sílica gel (BLANC, 1980; SYLOS; RODRIGUEZ-AMAYA; CARVALHO, 1996) e de Florisil, cartucho de Sep-Pak C18 (SYLOS; RODRIGUEZ-AMAYA; CARVALHO, 1996) ou por colunas de imunoafinidade (BRAGA; CARDOSO; MACÊDO, 2002; SOUZA et al., 2003). Estas últimas estão sendo largamente empregadas nas pesquisas atuais (GALVANO et al., 1998; PRADO et al., 1999; VELASCO; DELSO; ESCUDERO, 2003; ELGERBI et al., 2004; NAKAJIMA et al., 2004; PEREIRA et al., 2005).

Nos últimos anos, a Eletroforese Capilar (EC) tem conquistado a atenção da comunidade científica, como uma técnica alternativa para a separação de compostos nas áreas química, bioquímica, farmacêutica, clínica, ambiental (TAVARES, 1995) e de alimentos (LINDEBERG, 1996).

A EC é considerada um método com grande potencial para a determinação de micotoxinas, como por exemplo, as aflatoxinas (NIELSEN; NIELSEN; FRISVAD, 1996; MARAGOS; GREER, 1997; PEÑA et al., 2002), podendo ser uma alternativa também para a detecção e quantificação da aflatoxina M<sub>1</sub>.

As diversas pesquisas realizadas apresentam grande variabilidade nos valores de AFM<sub>1</sub> encontrados, fato que pode ser atribuído à diversidade de métodos adotados (OLIVEIRA; GERMANO, 2003).

Por este motivo, o controle eficiente de aflatoxina M<sub>1</sub> em leite e derivados requer métodos analíticos de elevada sensibilidade, especificidade, precisão e exatidão, além da rapidez e da facilidade. Os métodos variam entre os laboratórios, dependendo da disponibilidade de equipamentos e de pessoal treinado (DOMINGUEZ et al., 1987).

Avaliações e validações de métodos para a determinação de AFM<sub>1</sub> são feitas constantemente com o intuito de aperfeiçoar as técnicas de extração, purificação e quantificação, visando melhorar a confiabilidade dos resultados relativos à incidência deste composto em leite (STUBBLEFIELD; SHANNON; SHOTWELL, 1973; SYLOS; RODRIGUEZ-AMAYA, 1996; SCUSSEL, 2003; SOUZA et al., 2003) e de micotoxinas nos alimentos em geral (GILBERT; ANKLAM, 2002).

### **1.3.5 Pesquisas Realizadas no Brasil**

Há poucos dados sobre a ocorrência de AFM<sub>1</sub> em leite cru e industrializado no Brasil (SHUNDO; SABINO, 2006), sendo que o maior número de pesquisas concentra-se nos estados de Minas Gerais e São Paulo. Além disso, estas pesquisas apresentam valores variados de incidência e níveis de contaminação (Tabela 1).

Apesar de haver grande incidência de contaminação por AFM<sub>1</sub> no leite, os níveis encontrados não são muito elevados, poucos estando acima do nível máximo exigido pela legislação brasileira.

Tabela 1: Pesquisa de AFM<sub>1</sub> em diferentes regiões do Brasil

ESTADO	TIPO DE LEITE	Nº AMOSTRAS	INCIDÊNCIA	MÉTODO	NÍVEIS	AUTORES
PR	Cru	42	24%	ELISA	0,25 a 1,99 µg/L	SASSAHARA; NETTO; YANAKA, 2005
SP	cru, pasteurizado, UHT	107	74%	CCD	0,02 a 0,26 µg/L	SHUNDO; SABINO, 2006
MG	pasteurizado, vitaminado, UHT	110	25%	ELISA	0,038 a 0,071 µg/L	SOUZA; VARGAS; JUNQUEIRA, 1999
MG	C, UHT, em pó	61	82%	CLAE	6 a 77ng/L	PRADO et al., 1999
SP	Pasteurizado	52	8%	CLAE	73 a 370ng/L	SYLOS; RODRIGUEZ-AMAYA; CARVALHO, 1996
MG	Cru	50	18%	CCD	0,1 a 1,68µg/L	PRADO; NICÁCIO; LARA, 1994
RS	Cru	50	2%	CCD	não consta	POZZOBON et al., 1976

### 1.3.6 Limites de Aflatoxina M<sub>1</sub> Permitidos no Leite

Visando minimizar os riscos à saúde humana, medidas para monitorar e controlar os níveis de aflatoxina M<sub>1</sub> foram introduzidas em vários países.

No Brasil, o Ministério da Saúde estabeleceu um Regulamento Técnico sobre os níveis máximos de AFM<sub>1</sub>. A Resolução RDC Nº 274 da ANVISA, de 15 de outubro de 2002, publicada no Diário Oficial da União de 16 de outubro de 2002,

estabelece o limite máximo para aflatoxina M<sub>1</sub> em leite fluido e em leite em pó (BRASIL, 2002):

Leite fluido: Aflatoxina M<sub>1</sub> = 0,5 µg/L (ppb)

Leite em pó: Aflatoxina M<sub>1</sub> = 5,0 µg/L (ppb)

Estes valores seguem a legislação vigente para os países do MERCOSUL. Já a Comunidade Européia, é mais rigorosa no controle da AFM<sub>1</sub>, tendo como limite o valor de 0,05µg/L em leite *in natura* ou destinado para elaboração de produtos à base de leite, e leite tratado termicamente (FAO, 2004).



## CAPÍTULO 2

**2.1 Artigo a ser submetido à Revista da Ciência e Tecnologia de Alimentos, seguindo as normas exigidas para a publicação.**

Título: “Avaliação da Contaminação por Aflatoxina M<sub>1</sub> em Leite Cru e Leite UHT”

## AVALIAÇÃO DA CONTAMINAÇÃO POR AFLATOXINA M<sub>1</sub> EM LEITE CRU E LEITE UHT

Michele WEIGEL, Eduardo C. TONDO, Isa B. NOLL

### RESUMO

A aflatoxina M<sub>1</sub> (AFM<sub>1</sub>) é um metabólito tóxico resultante da biotransformação da aflatoxina B<sub>1</sub>, e pode ser secretada no leite de animais que ingerem alimentos contaminados com esta última. Considerando os efeitos adversos que podem ocorrer devido à sua ingestão e, visto que as crianças, maiores consumidoras deste alimento, são potencialmente mais sensíveis que os adultos aos efeitos desta micotoxina, a avaliação da presença de AFM<sub>1</sub> no leite se faz necessária. Durante o período de março a novembro de 2006 foram analisadas 48 amostras de leite cru provenientes de 8 propriedades fornecedoras de leite para uma Cooperativa de Leite da Serra Gaúcha e 80 amostras de leite UHT, provenientes de 7 marcas distintas, comercializadas na cidade de Porto Alegre (RS). A metodologia empregada na análise de aflatoxina M<sub>1</sub> envolveu partição líquido-líquido, uso de coluna de sílica gel e detecção por Cromatografia em Camada Delgada. O método demonstrou um limite de detecção de 10 ng, com valor de 86% no teste de recuperação. Nas condições de trabalho e pelo método utilizado nenhuma das amostras analisadas foi positiva para a presença de AFM<sub>1</sub>, sugerindo que as mesmas encontram-se dentro das conformidades legais.

Palavras-chave: Aflatoxina M<sub>1</sub>, leite cru, leite UHT, Cromatografia em Camada Delgada

## EVALUATION OF AFLATOXIN M<sub>1</sub> CONTAMINATION IN RAW MILK AND UHT MILK

Michele WEIGEL, Eduardo C. TONDO, Isa B. NOLL

### SUMMARY

Aflatoxin M<sub>1</sub> (AFM<sub>1</sub>) is a toxic metabolite resulting of the biotransformation of aflatoxin B<sub>1</sub>, and may be secreted in milk of animals that consume foods contaminated with aflatoxin B<sub>1</sub>. Considering the adverse effects that can occur when foods contaminated are consumed, and since children, the greatest milk consumer are potentially more susceptible than adults to the effects of this mycotoxin, the evaluation of the presence of AFM<sub>1</sub> in milk is necessary. From March to November of 2006 48 samples of raw milk from 8 dairy farms that integrate a Milk Cooperative of mountain region of Rio Grande do Sul and 80 samples of UHT milk from 7 different brands commercialized in Porto Alegre were analyzed. The methodology employed in the analysis of aflatoxin M<sub>1</sub> involved liquid-liquid partition, use of silic gel column and detection by Thin Layer Chromatography. The detection level was 10 ng, with a value of 86% in the recovery test. Following analysis conditions and the method employed none of the samples analyzed were positive for the presence of aflatoxin M<sub>1</sub>, suggesting that samples analysed attend the legal conformities.

Key words: Aflatoxin M<sub>1</sub>, raw milk, UHT milk, Thin Layer Chromatography

### 1. INTRODUÇÃO

As aflatoxinas são metabólitos tóxicos produzidos por espécies do fungo *Aspergillus*, principalmente *A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. nomius* [12, 28, 35]. A aflatoxina B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>) é considerada a mais importante, devido a seu alto potencial tóxico e hepatocarcinogênico [20, 21, 28]. A ingestão de rações contaminadas com AFB<sub>1</sub> por mamíferos pode levar a biotransformação da AFB<sub>1</sub> em AFM<sub>1</sub>, um metabólito hidroxilado e também tóxico, que pode ser secretado no leite [1, 12, 13, 17, 35].

A aflatoxina M<sub>1</sub> caracteriza-se pela sua hepatotoxicidade similar ou ligeiramente menor do que a da AFB<sub>1</sub> [1, 2, 15]. Estudos de carcinogenicidade

indicaram que a AFM<sub>1</sub> é um hepatocarcinógeno [40] com cerca de 10% da potência da sua precursora [3, 4]. O potencial genotóxico e citotóxico da AFM<sub>1</sub>, *in vitro*, é semelhante ao da aflatoxina B<sub>1</sub> [32] em várias espécies [22], enquanto que, no teste de Ames, a AFM<sub>1</sub> apresenta potencial mutagênico muito menor do que a AFB<sub>1</sub> [3].

Os efeitos tóxicos e carcinogênicos têm sido extensivamente demonstrados em diversas espécies, sobretudo em animais jovens [2]. Há, portanto, grande preocupação com relação à saúde de crianças, devido ao alto consumo de leite e derivados, seu baixo peso corpóreo e sua maior suscetibilidade às aflatoxinas [21].

Segundo avaliação baseada em dados experimentais, o IARC [21] classifica as aflatoxinas, entre elas, a aflatoxina M<sub>1</sub>, na Classe 1, ou seja, são consideradas carcinogênicas para os homens. No Brasil, o Ministério da Saúde estabeleceu, pela Resolução RDC N° 274 da ANVISA, de 15 de outubro de 2002 [9], que os limites máximos para aflatoxina M<sub>1</sub> em leite fluido e em leite em pó são de 0,5µg/L (ppb) e 5,0µg/L (ppb), respectivamente.

Diversos estudos sugerem que a AFM<sub>1</sub> associa-se à fração protéica do leite (caseína) [1, 2, 17, 18, 45], ficando nela retida após tratamento térmico e nos produtos derivados. Estudos sobre os efeitos dos tratamentos térmicos na redução de AFM<sub>1</sub> demonstraram que não houve redução apreciável nos teores da micotoxina [1, 5, 30, 35, 42]. Quanto à estabilidade, durante o armazenamento sob condições de resfriamento ou congelamento, observou-se que o resfriamento parece afetar mais o conteúdo de AFM<sub>1</sub> [15, 18, 26, 42].

Tendo em vista a alta estabilidade da aflatoxina M<sub>1</sub>, as ações para seu controle devem ser orientadas no sentido de prevenir ou reduzir a concentração da micotoxina precursora, principalmente nas rações de gado leiteiro. Nesse sentido, as boas práticas no campo, boas práticas de fabricação e de armazenamento podem diminuir o risco de contaminação fúngica [12, 22], e conseqüentemente a contaminação de alimentos lácteos pela aflatoxina M<sub>1</sub>.

Entre os métodos de análise mais difundidos para a determinação de aflatoxina M<sub>1</sub> estão a Cromatografia em Camada Delgada (CCD) [5, 14, 23, 34, 36, 44] e a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) com detecção de fluorescência [16, 29, 33, 44]

O objetivo deste trabalho foi avaliar a presença de aflatoxina M<sub>1</sub> em amostras de leite cru provenientes de produtores ligados a uma Cooperativa de Leite de médio

porte, localizada na Serra Gaúcha, e em leite UHT comercializado na cidade de Porto Alegre.

## **2. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1 Amostras**

Quarenta e oito amostras de leite cru, provenientes de 8 propriedades distintas fornecedoras de leite à uma Cooperativa de Leite, de médio porte, da Serra Gaúcha, foram analisadas durante o período de setembro a novembro de 2006. De cada propriedade foram analisadas um total de seis amostras, que foram coletadas diretamente do tanque de resfriamento das propriedades, transportadas sob refrigeração até o laboratório, sendo analisadas em um período máximo de 4 dias.

Durante o período de março a novembro do mesmo ano analisou-se também oitenta amostras de leite UHT (integral e desnatado), pertencentes a 7 marcas distintas, que foram coletadas em diversos estabelecimentos comerciais na cidade de Porto Alegre (RS). Sessenta amostras foram coletadas de 6 marcas diferentes, sendo 10 amostras de cada marca, metade integral e metade desnatado. As outras vinte amostras foram coletadas de uma marca pertencente à mesma Cooperativa citada acima.

A quantidade adquirida de cada amostra, em ambos os casos, correspondeu a 1L de leite.

### **2.2 Padrão de Aflatoxina M<sub>1</sub>**

O padrão de aflatoxina M<sub>1</sub> utilizado nas análises foi obtido da Sigma-Aldrich Company (A 6428).

A solução padrão foi preparada adicionando-se 10mL de clorofórmio a 10µg de padrão de aflatoxina M<sub>1</sub> [5]. A concentração desta solução foi determinada conforme os itens 970.44 e 971.22 da AOAC [19], por método espectrofotométrico e a absorvidade molar utilizada no cálculo da concentração real da AFM<sub>1</sub>, 1,12µg/mL, no solvente utilizado, foi obtido de Stubblefield e Shotwell [43]. Esta solução foi vedada e mantida sob temperatura de congelamento, para as posteriores análises.

## **2.3 Determinação de Aflatoxina M<sub>1</sub>**

### **2.3.1 Extração e Purificação**

As etapas de extração e purificação foram realizadas conforme método descrito por Blanc [6], com as modificações feitas por Scussel [38] na etapa de purificação.

A etapa de extração consistiu em uma partição líquido-líquido, com o uso de clorofórmio, metanol e solução saturada de NaCl (125:125:50), incorporados à uma alíquota de leite (50mL), à temperatura ambiente. A fase clorofórmica foi separada e filtrada através de uma camada de sulfato de sódio anidro (cerca de 3g), e posteriormente concentrada em um evaporador rotatório (Fisatom 802). Este concentrado foi submetido a uma purificação em coluna cromatográfica de sílica gel. Para a eliminação de interferentes utilizou-se hexano e éter etílico e, uma mistura de clorofórmio-acetona (2:1), foi utilizada para a eluição da micotoxina.

O extrato final obtido foi evaporado até *secura* e armazenado em frasco âmbar sob refrigeração, para posterior análise.

### **2.3.2 Cromatografia em Camada Delgada**

A Cromatografia em Camada Delgada foi o método empregado utilizado para a separação e detecção de aflatoxina M<sub>1</sub> nas amostras de leite.

Os extratos obtidos anteriormente foram redissolvidos em 100µL de clorofórmio e aplicados em placas cromatográficas de Sílica gel 60 (marca Sigma, 20x20cm e 0,20mm de espessura) juntamente com o padrão. Em seguida, a placa foi desenvolvida em sentido unidimensional, por 12cm, utilizando como fase móvel uma mistura de clorofórmio-acetona-isopropanol (87:10:3 v/v/v), seguindo as recomendações do item 980.21 da AOAC [19]. Após secar a temperatura ambiente, a placa foi analisada sob luz ultravioleta de onda longa (360nm). A aflatoxina M<sub>1</sub> foi detectada por comparação visual entre a intensidade das fluorescências das manchas dos extratos aplicados com a do padrão.

### 2.3.3 Recuperação e Limite de Detecção

O teste de recuperação, para determinar a eficiência do método analítico, foi realizado pela adição de uma concentração conhecida da solução padrão de AFM<sub>1</sub>, 1µg/L, em 2 amostras de leite não contaminadas. Os procedimentos para a determinação da AFM<sub>1</sub> foram os mesmos que os descritos nos itens 2.3.1 e 2.3.2. Sob luz ultravioleta de onda longa, foi comparada a intensidade de fluorescência da mancha do extrato contaminado com as manchas das alíquotas do padrão aplicados na mesma placa cromatográfica.

Para a determinação do limite de detecção, foram aplicadas, com auxílio de microseringa Hamilton, em placa cromatográfica, valores decrescentes da solução padrão de AFM<sub>1</sub>.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise das 128 amostras de leite, tanto UHT quanto cru, não revelou a presença de aflatoxina M<sub>1</sub>.

A recuperação do método utilizado nesta pesquisa foi de 86%, encontrando-se dentro dos padrões exigidos, uma vez que, para níveis de aflatoxinas a recuperação do método utilizado deve ser de no mínimo 70% [10]. O limite de detecção do método utilizado foi de 10ng. Apesar de não ter sido encontrada contaminação em nenhuma das amostras, este limite e recuperação obtidos seriam suficientes para detectar níveis de contaminação dentro do limite permitido pela legislação brasileira vigente, que estabelece como limite máximo de AFM<sub>1</sub> em leite fluido uma concentração de 0,5µg/L [9]. Logo, as amostras analisadas encontram-se dentro das conformidades legais.

Empregando a mesma técnica de extração e purificação que foram utilizadas neste trabalho, Scussel [38] verificou recuperação de 97% utilizando HPTLC e 94% utilizando CCD bidimensional. Já Blanc [6] encontrou recuperação de 96% utilizando CLAE, quando o leite foi contaminado com 5µg/L de aflatoxina M<sub>1</sub>.

A CCD é um método de fácil e rápida execução, não requer o uso de equipamentos dispendiosos [27, 41] e a sua capacidade de separar as aflatoxinas, confere um razoável nível de especificidade e sensibilidade ao método, permitindo que concentrações de ordem de nanogramas sejam detectadas em uma placa

cromatográfica [41]. O fato das publicações com este método terem diminuído, segundo Trucksess (2001 apud SHUNDO; SABINO) [39], não reflete, necessariamente, a realidade, ou seja, aparentemente este método ainda é bastante difundido entre os pesquisadores. Barkici [5], Kamkar [23] e Shundo e Sabino [39] são alguns dos pesquisadores que escolheram esta técnica para suas análises.

O resultado obtido nesta pesquisa condiz com o resultado encontrado por Corrêa et al. [11] que também não encontraram AFM<sub>1</sub> em 144 amostras de leite cru, coletadas diretamente do animal e de tanques de leite no final do dia, analisadas em 4 regiões produtoras de leite do estado de São Paulo; a detecção e quantificação também foram realizadas por CCD. Utilizando o mesmo método, com um limite de detecção de 0,25µg/L e valores de recuperação entre 83 e 92%, Prado, Nicácio e Lara [34] encontraram contaminação em 2 (5,3%) das 38 amostras de leite cru analisadas no estado de Minas Gerais. Já Shundo e Sabino [39], em São Paulo e Marília, verificaram contaminação em 79 (74%) das 107 amostras de leite (cru, pasteurizado e UHT) analisadas por CCD unidimensional, com purificação com coluna de imunoafinidade, o que aumentou a sensibilidade do método; o valor de recuperação encontrado por estes pesquisadores variaram de 85,8 a 73,9% e o limite de detecção foi 0,02µg/L.

Outras pesquisas realizadas no Brasil que empregaram outros métodos analíticos, como a ELISA e CLAE encontraram diferentes resultados. Sassahara, Netto e Yanaka [37] encontraram AFM<sub>1</sub> em 10 (24%) das 42 amostras de leite cru analisadas no estado do Paraná; Garrido et al. [16] verificaram contaminação em 111 (79,9%) das 139 amostras de leite pasteurizado e UHT, em Ribeirão Preto; Pereira et al. [30] analisaram 36 amostras de leite cru e que sofreram posterior pasteurização, detectando AFM<sub>1</sub> em 19 (52,8%) e 17 (38,2%) das amostras de leite cru e pasteurizadas, respectivamente, na região de Lavras – MG, e Prado et al. [33] verificaram a presença de AFM<sub>1</sub> em 40 (80%) das 50 amostras analisadas de leite pasteurizado e esterilizadas, na cidade de Belo Horizonte – MG.

A estabilidade desta micotoxina durante o armazenamento sob condições de resfriamento ou congelamento é um fato importante a ser considerado, já que foi observado que o resfriamento afeta mais o conteúdo de AFM<sub>1</sub> [15, 18, 26, 42].

A partir do ano de 2002 entrou em vigor a Instrução Normativa N° 51 do Ministério Agricultura, Pecuária e Abastecimento [8], a qual estabeleceu temperaturas limites, de 4 a 7°C, para a chegada do leite na indústria beneficiadora.



Desta forma, as propriedades produtoras de leite foram obrigadas a exercer maior controle no que se refere ao resfriamento do seu leite.

Nas oito propriedades, de onde as amostras de leite cru foram coletadas, havia produção de leite bastante variada, entre 100 a 2.500 L ao dia. O recolhimento do leite, pela Cooperativa, é realizado no máximo de 2 em 2 dias. Durante o período em que ficou na propriedade, o leite permaneceu, misturado, em tanques resfriadores. Ao chegar na indústria beneficiadora o leite foi armazenado, juntamente com todo o leite recebido (de diversas propriedades produtoras, situadas em diferentes regiões) em tanques refrigerados até o momento do beneficiamento. Estes aspectos poderiam justificar o resultado obtido neste trabalho.

Ainda neste contexto, pelo fato de a  $AFM_1$  ter distribuição uniforme no leite [22, 44] ela pode ser facilmente misturada e diluída ao ser agregada a uma quantidade maior de leite [1, 2, 15, 36], tanto na propriedade, como na indústria.

A  $AFB_1$  é encontrada em diversas culturas e também em rações destinadas aos animais [12, 28, 35, 45]. A presença de  $AFM_1$  em leite ocorre devido a biotransformação da  $AFB_1$  ingerida pelo animal [15, 17, 45], estimando-se que taxa de conversão de  $AFB_1$  para  $AFM_1$  seja normalmente entre 1 e 3% [25, 26, 31]. A alimentação fornecida ao gado leiteiro durante o período em que foram coletadas as amostras de leite cru foram silagem (milho, torta de cevada), azevém e milho. Na maior parte dos casos, o milho é produzido na própria propriedade e deixado no campo até secar. A ração fornecida aos animais é comprada ou feita na própria propriedade, sendo composta, basicamente, de sorgo, milho, farelo de soja e farelo de trigo. A ração feita nas propriedades é produzida em quantidades pequenas, para ser utilizada em 2-3 dias, não ficando armazenada por longos períodos, e este pode ser um dos fatores para a ausência da  $AFM_1$  nas condições do experimento conduzido.

A Cooperativa possui também uma fábrica de rações, que vende e, eventualmente, fornece ração aos seus associados. Neste caso, todos os grãos destinados à fabricação das rações são fornecidos por empresas que se responsabilizam pela qualidade dos seus produtos, sendo que as análises de micotoxinas estão entre as análises realizadas, uma vez que há um limite legal a ser cumprido [7]. Assim como a fábrica citada acima, pode-se supor que outras fábricas de rações tenham o mesmo controle de qualidade com seus produtos, como também foi considerado por Sabino, Purchio e Zorzetto [36]. Sassahara, Netto e

Yanaka [37] verificaram, no entanto, a presença de AFB<sub>1</sub> em sete das 27 amostras de ração comercial analisadas em municípios do norte do Paraná.

Segundo Martins, Martins [24], no Brasil, as condições de produção e armazenamento das rações parecem não favorecer a produção de micotoxinas. Em virtude das condições climáticas não apresentarem temperaturas muito baixas, por longo período de tempo, as quantidades de rações produzidas, nas propriedades, são em pequena quantidade, para ser consumida em um curto período de tempo.

#### 4. CONCLUSÕES

As 48 amostras de leite cru, provenientes de propriedades ligadas a Cooperativa de Leite da Serra Gaúcha, analisadas entre setembro e novembro de 2006, não apresentaram contaminação por AFM<sub>1</sub>.

As 80 amostras de leite UHT, coletadas de estabelecimentos comerciais da cidade de Porto Alegre, no período de março a novembro do mesmo ano, também não foram positivas para a presença de aflatoxina M<sub>1</sub>.

Apesar de não ter sido encontrada contaminação em nenhuma das amostras, os valores encontrados para o limite de detecção (10ng) e para a recuperação do método (86%), permitiriam a detecção de níveis de contaminação de AFM<sub>1</sub> dentro do limite estabelecido pela legislação brasileira vigente, sugerindo que as amostras analisadas encontram-se dentro dos padrões exigidos.

A ausência de contaminação de aflatoxina M<sub>1</sub> no leite, nas condições analisadas, entretanto, não descarta a contínua monitorização da presença desta micotoxina, uma vez que as condições favoráveis à produção de aflatoxinas, podem variar com a época do ano e com a região.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1] ALLCROFT, R.; CARNAGHAN, R. B. A. Groundnut Toxicity – *Aspergillus flavus* toxin (aflatoxin) in animal products: preliminary communication. **The Veterinary Record**, v.74, n.31, p.863-864, 1962.

[2] \_\_\_\_\_; \_\_\_\_\_. Groundnut Toxicity: an examination for toxin in human food products from animals fed toxic groundnut meal. **The Veterinary Record**, v.75, n.10, p.259-264, 1963.

- [3] BAILEY, G. S. et al. Effect of ammoniation of aflatoxin B<sub>1</sub>-contaminated cottonseed feedstock on the aflatoxin M<sub>1</sub> content of cows' milk and hepatocarcinogenicity in the trout bioassay. **Food and Chemical Toxicology**, v.32, n.8, p.707-715, 1994.
- [4] BAILEY, G. S. et al. Molecular dosimetry in fish: quantitative target organ DNA adduction and hepatocarcinogenicity for four aflatoxins by two exposure routes in rainbow trout. **Mutation research**, v.339, p.233-244, 1998.
- [5] BAKIRCI, I. A study on the occurrence of aflatoxin M<sub>1</sub> in milk and milk products produced in Van province of Turkey. **Food Control**, v.12, n.1, p.47-51, 2001.
- [6] BLANC, M. Méthode rapide de dosage de l'aflatoxine M<sub>1</sub> dans les produits laitiers. **Industries Alimentaires et Agricoles**, v.97, p.893-901, 1980.
- [7] BRASIL. Portaria N° 07, de 09 de novembro de 1988. Ministério Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA. Estabelece, os padrões mínimos, das diversas matérias primas empregadas na alimentação animal. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 14 de novembro de 1988.
- [8] BRASIL. Instrução Normativa N° 51, de 18 de setembro de 2002. Ministério Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA. Aprova os Regulamentos Técnicos de Produção, Identidade e Qualidade do Leite tipo A, do Leite tipo B, do Leite tipo C, do Leite Pasteurizado e do Leite Cru Refrigerado e o Regulamento Técnico da Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 20 de setembro de 2002.
- [9] BRASIL. Ministério da Saúde. Resolução RDC N° 274, 15 de outubro de 2002. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Regulamento Técnico sobre Limites Máximos de Aflatoxinas Admissíveis no Leite, no Amendoim, no Milho. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 16 de outubro de 2002.
- [10] CEN - EUROPEAN COMMITTEE FOR STANDARDIZATION. **CEN report: food analysis-biotoxins: criteria for analytical methods for mycotoxins**, 1999.
- [11] CORRÊA, B. et al. Distribution of molds and aflatoxins in dairy cattle feeds and raw milk. **Revista de Microbiologia**, v.28, p.279-283, 1997.
- [12] CREPPY, E. E. Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe. **Toxicology Letters**. v.127, n.1-3, p.19-28, 2002.
- [13] DE IONGH, H.; VLES, R. O.; VAN PELT, J. G. Milk of mammals fed an aflatoxin-containing diet. **Nature**, v.202, p.466-467, 1964.
- [14] DOMINGUEZ, L. et al. Determination of aflatoxin M<sub>1</sub> in milk and milk products contaminated at low levels. **Journal of Association of Official Analytical Chemists**, v.70, n.3, p.470-472, 1987.

- [15] GALVANO, F.; GALOFARO, V.; GALVANO, G. Occurrence and stability of Aflatoxin M<sub>1</sub> in milk and milk products: a worldwide review. **Journal of Food Protection**, v.59, n.10, p.1079-1090, 1996.
- [16] GARRIDO, N. S. et al. Occurrence of aflatoxins M<sub>1</sub> and M<sub>2</sub> in milk commercialized in Ribeirão Preto – SP, Brazil. **Food Additives and Contaminants**, v.20, n.1, p.70-73, 2003.
- [17] GOLDBLATT, L. A. Aflatoxin: scientific background, control, and implications. **Food Science and Technology**, a Series of Monographs. New York: Academic Press, 472p., 1969.
- [18] HASSANIN, N. I. Stability of aflatoxin M<sub>1</sub> during manufacture and storage of yoghurt, yoghurt-cheese and acidified milk. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.65, p.31-34, 1994.
- [19] HORWITZ, W. **Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists**. 17.ed. Arlington: AOAC, 2002.
- [20] HUSSEIN, H. S.; BRASEL, J. M. Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. **Toxicology**, v.167, n.2, p.101-134, 2001.
- [21] IARC – INTERNATIONAL AGENCY OF RESEARCH ON CANCER, **Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans**. Lyon: WHO, v.82, 2002.
- [22] JECFA - JOINT FAO/WHO EXPERT COMMITTEE ON FOOD ADDITIVES. **Evaluation of certain mycotoxins in food: Fifty-sixty report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives**. Geneva: WHO, 2002. 62p.
- [23] KAMKAR, A. A study on the occurrence of aflatoxin M<sub>1</sub> in raw milk produced in Sarab city of Iran. **Food Control**, v.16, n.7, p.593-599, 2005.
- [24] MARTINS, J. L. S.; MARTINS, I. S. Aflatoxina M<sub>1</sub> no leite “B” comercializado no município de São Paulo, SP (Brasil). **Revista da Saúde Pública**, v.20, n.4, p.303-308, 1986.
- [25] MASRI, M.S. et al. Crystalline aflatoxin M<sub>1</sub> from urine and milk. **Nature**, v.215, p.753-755, 1967
- [26] McKINNEY, J. D. et al. Effects of ammoniation on aflatoxins in rations fed lactating cows. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v.50, p.79-84 , 1973.
- [27] MIDIO, A. F.; MARTINS, D. I. Agentes tóxicos contaminantes diretos de alimentos. In: **Toxicologia de Alimentos**. São Paulo: Varela, Cap.3, p.61-102, 2000.
- [28] MOSS, M. O. Mycotoxin review: *Aspergillus* and *Penicillium*. **Mycologist**, v. 16, n. 3, p. 116-119, 2002.

- [29] NAKAJIMA, M. et al. Occurrence of aflatoxin M<sub>1</sub> in domestic milk in Japan during the winter season. **Food Additives and Contaminants**, v.21, n.5, p. 472-478, 2004.
- [30] PEREIRA, M. M. G. et al. Aflatoxinas em alimentos destinados a bovinos e em amostras de leite da região de Lavras, Minas Gerais – Brasil. **Ciência e Agrotecnologia**, v.29, n.1, p.106-112, 2005.
- [31] POLAN, C. E.; HAYES, J. R.; CAMPBELL, T. C. Consumption and fate of aflatoxin B<sub>1</sub> by lactating cows. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.22, n.4, p.635-638, 1974.
- [32] PONG, R. S.; WOGAN, G. N. Toxicity and biochemical and fine structural effects of synthetic aflatoxins M<sub>1</sub> and B<sub>1</sub> in rat liver. **Journal of the National Cancer Institute**, v.47, n.3, p.585-590, 1971.
- [33] PRADO, G. et al. Ocorrência de aflatoxina M<sub>1</sub> em leite consumido na cidade de Belo Horizonte – Minas Gerais / Brasil – agosto/98 à abril/99. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.3, n.19, p.420-423, 1999.
- [34] PRADO, G.; NICÁCIO, M. A. S.; LARA, M.A. Incidência de aflatoxina M<sub>1</sub> em leite cru e em pó no estado de Minas Gerais. **Higiene Alimentar**, v.8, n.32, p.34-36, 1994.
- [35] RUSTOM, I. Y.S. Aflatoxin in food and feed: occurrence, legislation and inactivation by physical methods. **Food Chemistry**, v.59, n.1, p.57-67, 1997.
- [36] SABINO, M.; PURCHIO, A.; ZORZETTO, M. A. P. Variations in the levels of aflatoxin in cows milk consumed in the city of São Paulo. **Food Additives and Contaminants**, v.6, n.3, p.321-326, 1989.
- [37] SASSAHARA, M.; NETTO, D. P.; YANAKA, E. K. Aflatoxin occurrence in feeds supplied to dairy cattle and aflatoxin M<sub>1</sub> in raw milk in the North of Paraná state. **Food and Chemical Toxicology**, v.43, n.6, p.981-984, 2005.
- [38] SCUSSEL, V. M. Comparison of methods by TLC and HPTLC for determination of aflatoxin M<sub>1</sub> in milk and B<sub>1</sub> in eggs. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.23(Supl), p.46-52, 2003.
- [39] SHUNDO, L.; SABINO, M. Aflatoxin M<sub>1</sub> in milk by immunoaffinity column cleanup with TLC/HPLC determination. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.37, n.2, p.164-167, 2006.
- [40] SINNHUBER, R. O. et al. Aflatoxin M<sub>1</sub>, a potent liver carcinogen for rainbow trout. **Federation Proceedings**, v.29, p.568 Abs, 1970.
- [41] SOUZA, S. V.C. et al. Validação intralaboratorial de método para determinação de aflatoxina M<sub>1</sub> em leite por Cromatografia em Camada Delgada. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.23(Supl), p.213-220, 2003.

[42] STOLOFF, L. et al. Stability of aflatoxin M in milk. **Journal of Dairy Science**, v.58, n.12, p.1789-1793, 1975.

[43] STUBBLEFIELD, R. D.; SHOTWELL, O. L. Aflatoxins M<sub>1</sub> and M<sub>2</sub> and parasiticol: Thin layer Chromatographt and physical and chemical properties. **Journal of Association of Official Analytical Chemists**, v.55, n.4, p.762-767, 1972.

[44] SYLOS, C. M.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B.; CARVALHO, P. R. N. Occurrence of aflatoxin M<sub>1</sub> in milk and dairy products commercialized in Campinas, Brazil. **Food Additives and Contaminants**, v.13, n.2, p.169-172, 1996.

[45] TANGO, J. S. Aflatoxina. **Boletim do Instituto de Tecnologia de Alimentos**, n.37, p.37-95, 1974.

## CAPÍTULO 3

### 3.1 Discussão Geral

A análise das 128 amostras de leite, UHT e cru, não revelou a presença de aflatoxina M<sub>1</sub>.

A recuperação do método utilizado nesta pesquisa foi de 86%, com a adição de solução padrão de AFM<sub>1</sub> numa concentração de 1µg/L em leite não contaminado, estando dentro dos padrões exigidos. Esta recuperação, juntamente com o limite de detecção do método (10ng) assegurariam a detecção de níveis de contaminação dentro do limite estabelecido pela legislação brasileira vigente de 0,5µg/L (BRASIL, 2002). Como não foi encontrada contaminação em nenhuma das amostras analisadas, pode-se dizer que as amostras analisadas encontram-se dentro das conformidades legais.

A capacidade de separar as aflatoxinas confere razoável nível de especificidade e sensibilidade ao método de CCD, permitindo que concentrações de ordem de nanogramas sejam detectadas em uma placa cromatográfica (SOUZA et al., 2003). O fato das publicações com este método terem diminuído, segundo Trucksess (2001 apud Shundo; Sabino, 2006), não reflete, necessariamente, a realidade, ou seja, aparentemente é um método ainda bastante difundido entre os pesquisadores (BARKICI, 2001; KAMKAR, 2005; SHUNDO; SABINO, 2006).

O resultado obtido nesta pesquisa condiz com os resultados encontrados por outros pesquisadores (PRADO; NICÁCIO; LARA, 1994; CORRÊA et al., 1997) que, utilizando a mesma técnica, encontraram baixo índice de contaminação ou não encontraram aflatoxina M<sub>1</sub> nas amostras de leite cru analisadas. Shundo e Sabino (2006), entretanto, verificaram contaminação em 79 (74%) das 107 amostras de leite (cru, pasteurizado e UHT) analisadas por CCD unidimensional, com purificação com coluna de imunoafinidade, o que aumentou a sensibilidade do método; o valor de recuperação encontrado por estes pesquisadores variaram de 85,8 a 73,9% e o limite de detecção foi 0,02µg/L.

Outras pesquisas realizadas no Brasil, através de métodos analíticos como ELISA e CLAE, encontraram diferentes índices de contaminação. Na cidade de Belo

Horizonte (MG), Prado et al. (1999) verificaram a presença de AFM<sub>1</sub> em 40 (80%) das 50 amostras analisadas de leite pasteurizado e esterilizado, assim como Garrido et al. (2003) que, em Ribeirão Preto (SP), também verificaram contaminação em 111 (79,9%) das 139 amostras de leite pasteurizado e UHT analisadas. Já Sassahara, Netto e Yanaka (2005) encontraram AFM<sub>1</sub> em 10 (24%) das 42 amostras de leite cru analisadas no norte do Paraná, enquanto Pereira et al. (2005) analisaram 36 amostras de leite cru e que sofreram posterior pasteurização, detectando AFM<sub>1</sub> em 19 (52,8%) e 17 (38,2%) das amostras de leite cru e pasteurizado, respectivamente, na região de Lavras (MG).

Um fato interessante a ser mencionado foi o aparecimento de manchas amarelas e amarelo-esverdeadas com um valor de R<sub>f</sub> menor do que o da AFM<sub>1</sub> nas placas cromatográficas onde os extratos foram aplicados. Outros pesquisadores, que utilizaram métodos de extração e purificação diferentes desta pesquisa, também verificaram este fato (DE IONGH; VLES; VAN PELT, 1964; SABINO; PURCHIO; ZORZETTO, 1989).

Durante o período em que ficou na propriedade, o leite permaneceu, misturado, em tanques resfriadores, e ao chegar na indústria beneficiadora, o leite foi armazenado, juntamente com todo o leite recebido (de diversas propriedades produtoras, situadas em diferentes regiões) em tanques refrigerados até o beneficiamento. A possível diluição de leite contaminado com AFM<sub>1</sub> no total do leite (ALLCROFT; CARNAGHAN, 1962; 1963; SABINO; PURCHIO; ZORZETTO, 1989; GALVANO; GALORAFO; GALVANO, 1996) e o fato de que a refrigeração afeta o conteúdo da AFM<sub>1</sub> (McKINNEY et al., 1973; STOLOFF et al., 1975; HASSANIN, 1994; GALVANO; GALOFARO. GALVANO, 1996), podem ser fatores que tenham contribuído para a não detecção desta micotoxina.

Os tratamentos térmicos não afetam, de maneira significativa, a aflatoxina M<sub>1</sub> (ALLCROFT; CARNAGHAN, 1962; STOLOFF et al., 1975; RUSTOM, 1997; BAKIRCI, 2001; PEREIRA et al., 2005), fato que pode ser observado em diversas pesquisas, onde a presença desta micotoxina é verificada com frequência, em diferentes níveis de contaminação e em diversos países, em leite pasteurizado e leite UHT (GALVANO et al., 1998; GARRIDO et al., 2003; LÓPEZ et al., 2003; NAKAJIMA et al., 2004; ALBORZI et al., 2006).

No período em que foram coletadas as amostras de leite cru, a alimentação fornecida ao gado leiteiro era silagem (milho, torta de cevada), azevém e milho. A



ração dada aos animais era composta basicamente de sorgo, milho, farelo de soja e farelo de trigo. A ração feita nas propriedades foi produzida em quantidades pequenas, para ser utilizada em poucos dias, não ficando armazenada por longos períodos, o que pode ser um dos fatores para a ausência de AFM<sub>1</sub> nas condições realizadas.

A fábrica de rações pertencente à Cooperativa exige de seus fornecedores de grãos qualidade dos seus produtos, sendo que as análises de micotoxinas estão entre as análises realizadas, uma vez que as fábricas de rações precisam cumprir um limite legal para a presença de micotoxinas em seus produtos (BRASIL, 1988). Assim, supõe-se que todas tenham um rígido controle de qualidade com seus produtos, como também foi considerado por Sabino, Purchio e Zorzetto (1989).

O fato da pesquisa com leite cru ter sido realizada num curto período de tempo, não permite concluir que, em outras épocas do ano, o leite produzido nestas propriedades não possua contaminação com AFM<sub>1</sub>.

A ausência de contaminação de AFM<sub>1</sub> no leite analisado, não dispensa o contínuo monitoramento, visto que as condições favoráveis à produção de aflatoxinas podem variar com a época do ano e com a região.

## CAPÍTULO 4

### 4.1 Referências Bibliográficas

ALBORZI, S. et al. Aflatoxin M<sub>1</sub> contamination in pasteurized milk in Shiraz (south of Iran). **Food Control**, Guildford, v.17, n.7, p.582-584, 2006.

ALLCROFT, R.; CARNAGHAN, R. B. A. Groundnut Toxicity – *Aspergillus flavus* toxin (aflatoxin) in animal products: preliminary communication. **The Veterinary Record**, London, v.74, n.31, p.863-864, 1962.

\_\_\_\_\_. Groundnut Toxicity: an examination for toxin in human food products from animals fed toxic groundnut meal. **The Veterinary Record**, London, v.75, n.10, p.259-264, 1963.

ALLCROFT, R. et al. Metabolism of aflatoxin in sheep: excretion of the “milk toxin”. **Nature**, London, v.209, p.154-155, 1966.

BAILEY, G. S. et al. Effect of ammoniation of aflatoxin B<sub>1</sub>-contaminated cottonseed feedstock on the aflatoxin M<sub>1</sub> content of cows' milk and hepatocarcinogenicity in the trout bioassay. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v.32, n.8, p.707-715, 1994.

\_\_\_\_\_. Molecular dosimetry in fish: quantitative target organ DNA adduction and hepatocarcinogenicity for four aflatoxins by two exposure routes in rainbow trout. **Mutation research**, Amsterdam, v.339, p.233-244, 1998.

BAKIRCI, I. A study on the occurrence of aflatoxin M<sub>1</sub> in milk and milk products produced in Van province of Turkey. **Food Control**, Guildford, v.12, n.1, p.47-51, 2001.

BLANC, M. Méthode rapide de dosage de l'aflatoxine M<sub>1</sub> dans les produits laitiers. **Industries Alimentaires et Agricoles**, Paris, v.97, p.893-901, 1980.

BRAGA, S. M. L. F. M.; CARDOSO, M. A. A. ; MACÊDO, R. O. Micotoxinas em produtos naturais: alguns aspectos e perspectivas. **Revista Brasileira de Toxicologia**, São Paulo, v.15, n.1, p.53-68, 2002.

BRASIL. Portaria N° 07, de 09 de novembro de 1988. Ministério Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA. Estabelece, os padrões mínimos, das diversas

matérias primas empregadas na alimentação animal. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 14 de novembro de 1988.

BRASIL. Ministério da Saúde. Resolução RDC N° 274, 15 de outubro de 2002. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Regulamento Técnico sobre Limites Máximos de Aflatoxinas Admissíveis no Leite, no Amendoim, no Milho. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 16 de outubro de 2002.

CAMPBELL, T. C. et al. Aflatoxin M<sub>1</sub> in human urine. **Nature**, London, v.227, p.403-404, 1970.

EUROPEAN COMMITTEE FOR STANDARDIZATION. **CEN report, food analysis-biotoxins: criteria for analytical methods for mycotoxins**. [s.l.], 1999. 8 p.

CORRÊA, B. et al. Distribution of molds and aflatoxins in dairy cattle feeds and raw milk. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v.28, p.279-283, 1997.

CREPPY, E. E. Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe. **Toxicology Letters**, Amsterdam, v.127, n.1-3, p.19-28, 2002.

DE IONGH, H.; VLES, R. O.; VAN PELT, J. G. Milk of mammals fed an aflatoxin-containing diet. **Nature**, London, v.202, p.466-467, 1964.

DOMINGUEZ, L. et al. Determination of aflatoxin M<sub>1</sub> in milk and milk products contaminated at low levels. **Journal of Association of Official Analytical Chemists**, Arlington, v.70, n.3, p.470-472, 1987.

ELGERBI, A. M. et al. Occurrence of aflatoxin M<sub>1</sub> in randomly selected North African milk and cheese samples. **Food Additives and Contaminants**, London, v.21, n.6, p. 592-597, 2004.

EL-NEZAMI, H.S. et al. Aflatoxin M<sub>1</sub> in human breast milk samples from Victoria, Australia and Thailand. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v.33, n.3, p.173-179, 1995.

FAO . FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. Worldwide regulations for mycotoxins in food and feed in 2003, **FAO Food and Nutrition Paper**. Rome : FAO, 2004. v. 81

GALTIER, P. Biological fate of mycotoxins in animals. **Revue de Médecine Vétérinaire**, Toulouse, v.149, n.6, p.549-554, 1998.

GALVANO, F.; GALOFARO, V.; GALVANO, G. Occurrence and stability of Aflatoxin M<sub>1</sub> in milk and milk products: a worldwide review. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 59, n.10, p.1079-1090, 1996.

GALVANO, F. et al. Survey of the occurrence of aflatoxin M<sub>1</sub> in dairy products marketed in Italy. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.61, n.6, p.738-741, 1998.

GARRIDO, N. S. et al. Occurrence of aflatoxins M<sub>1</sub> and M<sub>2</sub> in milk commercialized in Ribeirão Preto – SP, Brazil. **Food Additives and Contaminants**, London, v.20, n.1, p. 70-73, 2003.

GILBERT, J; ANKLAM, E. Validation of analytical methods for determining mycotoxins in foodstuffs. **Trends in Analytical Chemistry**, Amsterdam, v.21, n.6-7, p.468-486, 2002.

GOLDBLATT, L. A. Aflatoxin: scientific background, control, and implications. **Food Science and Technology**, a series of monographs. New York: Academic Press, 472p., 1969.

GOURAMA, H.; BULLERMAN, L. B. *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*: aflatoxigenic fungi of concern in foods and feeds. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.58, n.12, p.1395-1404, 1995.

GUIMARÃES, Pautilha. [Valor Nutritivo do Leite]. **Ciência do Leite**. Disponível em: <<http://www.cienciadoleite.com.br/valornutritivo.htm>> Acesso em: 10 jan. 2007.

HASSANIN, N. I. Stability of aflatoxin M<sub>1</sub> during manufacture and storage of yoghurt, yoghurt-cheese and acidified milk. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v.65, p.31-34, 1994.

HAYES, J. R.; POLAN, C. E.; CAMPBELL, T. C. Bovine liver metabolism and tissue distribution of aflatoxin B<sub>1</sub>. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v.25, n.5, p.1189-1193, 1977.

HUSSEIN, H. S.; BRASEL, J. M. Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. **Toxicology**, Limerick, v.167, n.2, p.101-134, 2001.

IARC. INTERNATIONAL AGENCY OF RESEARCH ON CANCER, **Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans**. Lyon: WHO, 2002. v.82

JECFA - JOINT FAO/WHO EXPERT COMMITTEE ON FOOD ADDITIVES. **Evaluation of certain mycotoxins in food**: fifty-sixty report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Geneva: WHO, 2002. 62p.

KAMKAR, A. A study on the occurrence of aflatoxin M<sub>1</sub> in raw milk produced in Sarab city of Iran. **Food Control**, Guildford, v.16, n.7, p.593-599, 2005.

LINDEBERG, J. Capillary electrophoresis in food analysis. **Food Chemistry**, London, v.55, n.1, p.73-94, 1996.

LÓPEZ, C. E. et al. Presence of aflatoxin M<sub>1</sub> in milk for human consumption in Argentina. **Food Control**, Guildford, v.14, n.1, p.31-34, 2003.

MARAGOS, C. M.; GREER, J. I. Analysis of aflatoxin B<sub>1</sub> in corn using capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v.45, n.11, p.4337-4341, 1997.

MASRI, M.S. et al. Crystalline aflatoxin M<sub>1</sub> from urine and milk. **Nature**, London, v.215, p.753-755, 1967.

McKINNEY, J. D. et al. Effects of ammoniation on aflatoxins in rations fed lactating cows. **Journal of the American Oil Chemists Society**, Chicago, v.50, p.79-84, 1973.

MIDIO, A. F.; MARTINS, D. I. Agentes tóxicos contaminantes diretos de alimentos. In: **Toxicologia de Alimentos**. São Paulo: Varela, Cap.3, p.61-102, 2000.

MOSS, M. O. Mycotoxin review: *Aspergillus* and *Penicillium*. **Mycologist**, Cambridge, v.16, n.3, p.116-119, 2002.

NAKAJIMA, M. et al. Occurrence of aflatoxin M<sub>1</sub> in domestic milk in Japan during the winter season. **Food Additives and Contaminants**, London, v.21, n.5, p.472-478, 2004.

NAVAS, S. A.; SABINO, M.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Aflatoxin M<sub>1</sub> and ochratoxin A in human milk bank in the city of São Paulo. **Food Additives and Contaminants**, London, v.22, n.5, p.457-462, 2005.

NEAL, G. E. Participation of animal biotransformation in mycotoxin toxicity. **Revue de Médecine Vétérinaire**, Toulouse, v.149, n.6, p.555-560, 1998.

NEAL, G. E. et al. Metabolism and toxicity of aflatoxins M<sub>1</sub> and B<sub>1</sub> in human-derived *in vitro* systems. **Toxicology and Applied Pharmacology**, San Diego, v.151, n.1, p.152-158, 1998.

NIELSEN, M. S.; NIELSEN, P. V.; FRISVAD, J. C. Micellar electrokinetic capillary chromatography of fungal metabolites. Resolution optimized by experimental design. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v.721, n.2, p.337-344, 1996.

OLIVEIRA, C. A. F.; GERMANO, P. M. L. Aflatoxina M<sub>1</sub> em leite e derivados. In: GERMANO, P. M. L. **Higiene e vigilância sanitária de alimentos**. 2.ed. São Paulo: Varela, 2003. Cap.6, p.103-109.

OLIVEIRA, C. A. F.; GERMANO, P. M. L. Avaliação do desempenho do método de ensaio por enzimas imuno-adsorvidas (ELISA) em leite em pó reconstituído contaminado experimentalmente com aflatoxina M<sub>1</sub>. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v.30, n.6, p.542-548, 1996.

OSWEILER, G. D. Mycotoxins and livestock: What role do fungal toxins play in illness and production losses? **Veterinary Medicine**, Lenexa, v.85, n.1, p.89-94, 1990.

PEÑA, R. et al. Screening of aflatoxins in feed samples using a flow system coupled to capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v.967, n.2, p.303-314, 2002.

PEREIRA, M. M. G. et al. Aflatoxinas em alimentos destinados a bovinos e em amostras de leite da região de Lavras, Minas Gerais – Brasil. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.29, n.1, p.106-112, 2005.

PITTET, A. Natural occurrence of mycotoxins in foods and feeds – an updated review. **Revue de Médecine Vétérinaire**, Toulouse, v.149, n.6, p.479-492, 1998.

PIVA, G. et al. Detoxification methods of aflatoxins. A review. **Nutrition Research**, Tarrytown, v.15, n.5, p.767-776, 1995.

POLAN, C. E.; HAYES, J. R.; CAMPBELL, T. C. Consumption and fate of aflatoxin B<sub>1</sub> by lactating cows. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v.22, n.4, p.635-638, 1974.

PONG, R. S.; WOGAN, G. N. Toxicity and biochemical and fine structural effects of synthetic aflatoxins M<sub>1</sub> and B<sub>1</sub> in rat liver. **Journal of the National Cancer Institute**, Bethesda, v.47, n.3, p.585-590, 1971.

POZZOBON, E. D. T. et al. Determinação de Aflatoxina M<sub>1</sub> em leite cru consumido na cidade de Santa Maria. **Revista do Centro de Ciências Rurais**, Santa Maria, v.6, n.4, p.423-425, 1976.

PRADO, G.; NICÁCIO, M. A. S.; LARA, M.A. Incidência de aflatoxina M<sub>1</sub> em leite cru e em pó no estado de Minas Gerais. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v.8, n.32, p.34-36, 1994.

PRADO, G. et al. Ocorrência de aflatoxina M<sub>1</sub> em leite consumido na cidade de Belo Horizonte – Minas Gerais / Brasil – agosto/98 à abril/99. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas n.19, v.3, p.420-423, 1999.

PROGRAMA DE ESTUDOS DOS NEGÓCIOS DO SISTEMA AGROINDUSTRIAL - PENZA. [Mapeamento da Cadeia do Leite - 2005]. Disponível em: < <http://www.fundacaofia.com.br/pensa> > Acesso em: 09 jan. 2007.

RUSTOM, I. Y.S. Aflatoxin in food and feed: occurrence, legislation and inactivation by physical methods. **Food Chemistry**, London, v.59, n.1, p.57-67, 1997.

SAITANU, K. Incidence of aflatoxin M<sub>1</sub> in Thai milk products. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.60, n.8, p.1010-1012, 1997.

SABINO, M.; PURCHIO, A.; ZORZETTO, M. A. P. Separação e determinação das aflatoxinas M<sub>1</sub> e M<sub>2</sub> em amostras de leite de vaca por Cromatografia Líquida de Alta Resolução. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v.44, n.2, p.87-99, 1984.

SABINO, M.; PURCHIO, A.; ZORZETTO, M. A. P. Variations in the levels of aflatoxin in cows milk consumed in the city of São Paulo. **Food Additives and Contaminants**, London, v.6, n.3, p.321-326, 1989.

SASSAHARA, M.; NETTO, D. P.; YANAKA, E. K. Aflatoxin occurrence in foodsuff supplied do dairy cattle and aflatoxin M<sub>1</sub> in raw milk in tht North of Paraná state. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v.43, n.6, p.981-984, 2005.

SCUSSEL, V. M. Comparison of methods by TLC and HPTLC for determination of aflatoxin M<sub>1</sub> in milk and B<sub>1</sub> in eggs. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.23(Supl), p.46-52, 2003.

SINNHUBER, R. O. et al. Aflatoxin M<sub>1</sub>, a potent liver carcinogen for rainbow trout. **Federation Proceedings**, Bethesda, v.29, p.568 Abs, 1970.

SHUNDO, L.; SABINO, M. Aflatoxin M<sub>1</sub> in milk by immunoaffinity column cleanup with TLC/HPLC determination. **Brazilian Journal of Microbiology**, Sao Paulo, v.37, n.2, p.164-167, 2006.

SORENSEN, L. K.; ELBAEK, T. H. Determination of mycotoxins in bovine milk by liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, Amsterdam, v.820, n.2, p.183-196, 2005.

SOUZA, S. V. C.; VARGAS, E. A.; JUNQUEIRA, R. G. Eficiência de um *kit* de ELISA na detecção e quantificação de aflatoxina M<sub>1</sub> em leite e investigação da ocorrência no estado de Minas Gerais. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.19, n.3, p.401-405, 1999.

SOUZA, S. V.C. et al. Validação intralaboratorial de método para determinação de aflatoxina M<sub>1</sub> em leite por Cromatografia em Camada Delgada. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.23(Supl.), p.213-220, 2003.

STOLOFF, L. et al. Stability of aflatoxin M in milk. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.58, n.12, p.1789-1793, 1975.

STUBBLEFIELD, R. D.; SHANNON, G. M; SHOTWELL, O. L. Aflatoxin M<sub>1</sub> in milk: Evaluation of Methods. **Journal of Association of Official Analytical Chemists**, Arlington, v.56, n.5, p.1106-1110, 1973.

STUBBLEFIELD, R. D.; SHANNON, G. M. Aflatoxin M<sub>1</sub>: Analysis in dairy products and distribution in dairy foods made from artificially contaminated milk. **Journal of Association of Official Analytical Chemists**, Arlington, v.57, n.4, p.847-851, 1974.

SYLOS, C. M.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. Estudo comparativo de métodos para a determinação de aflatoxina M<sub>1</sub>. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v.56, n.1, p.87-97, 1996.

SYLOS, C. M.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B.; CARVALHO, P. R. N. Occurrence of aflatoxin M<sub>1</sub> in milk and dairy products commercialized in Campinas, Brazil. **Food Additives and Contaminants**, London, v.13, n.2, p.169-172, 1996.

SWEENEY, M. J.; DOBSON, A. D. W. Mycotoxin production by *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium* species. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.43, n.8, p.141-158, 1998.

TANGO, J. S. Aflatoxina. **Boletim do Instituto de Tecnologia de Alimentos**, Campinas, n.37, p.37-95, 1974.

TAVARES, M. F. M. Eletroforese capilar: conceitos básicos. **Química Nova**, São Paulo, v.19, n.2, p.173-181, 1995.

TAVEIRA, J. A.; MIDIO, A. F. Aflatoxina M<sub>1</sub> – A micotoxina do leite. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.33, n.1, p.115-126, 1999.

VELASCO, M. L. R.; DELSO, M. M. C.; ESCUDERO, D. O. ELISA and HPLC determination of the occurrence of aflatoxin M<sub>1</sub> in raw cow's milk. **Food Additives and Contaminants**, London, v.20, n.3, p.276-280, 2003.

VELDMAN, A. et al. Carry-over of aflatoxin from cows' food to milk. **Animal Production**, Bletchley, n.55, p.163-168, 1992 .



YOUSEF, A. E.; MARTH, E. H. Use of ultraviolet energy to degrade aflatoxin M<sub>1</sub> in raw or heated milk with and without added peroxide. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.69, p.2243-2247, 1985.