

OCORRÊNCIA DE AFLATOXINA M1 EM LEITE COMERCIALIZADO EM  
ALGUNS MUNICÍPIOS DO ESTADO DE SÃO PAULO**E. Gonzalez<sup>1</sup>, J.D. Felicio<sup>1</sup>, M.M. Pinto<sup>1</sup>, M.H. Rossi<sup>1</sup>, J.H.C. Nogueira<sup>1\*</sup>, S. Manginelli<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Instituto Biológico, Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Sanidade Animal, Av. Cons. Rodrigues Alves, 1252, CEP 040414-002, São Paulo, SP, Brasil. E-mail: goncalvez@biologico.sp.gov.br

## RESUMO

A aflatoxina M1 (AFM1) tem sido detectada em leite de animais alimentados com ração contaminada por aflatoxina B1 (AFB1). A ocorrência de aflatoxina M1 no leite de vacas lactantes é uma questão de saúde pública, pois o leite e seus derivados são consumidos por bebês, crianças e adultos em todo mundo. Essa toxina é classificada como possível carcinógeno para o homem (classe 2B). O objetivo deste trabalho foi verificar a qualidade do leite consumido em algumas regiões do Estado de São Paulo, quanto ao teor de aflatoxina M1. Foram analisadas 43 amostras de leite comercial, coletadas em 27 municípios do Estado de São Paulo. A determinação de AFM1 em leite foi realizada empregando-se coluna de imunoafinidade para a purificação e detecção por cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa. AFM1 foi detectada em 17 (39,5%) das 43 amostras analisadas, sendo que 64,7% destas amostras apresentavam concentrações acima do limite máximo permitido pela legislação (0,5 µg/L).

PALAVRAS-CHAVE: Aflatoxina M1, leite, imunoafinidade, bovino.

## ABSTRACT

OCCURRENCE OF M1 AFLATOXIN IN MILK COMMERCIALIZED IN SOME CITIES OF SÃO PAULO STATE, BRAZIL. The M1 aflatoxin (AFM1) has been detected in milk from animal fed with feed contaminated by aflatoxin B1 (AFB1) contaminated. This toxin is a possible carcinogenic to humans (2B class). This is a potential public health problem, because young individuals are among the greater milk consumers and more sensitive to its effects. This study was developed to determine AFM1 in pasteurized milk in some regions São Paulo state. Forty-three samples collected in several cities were analyzed. The method used for the M1 aflatoxins purification was the immunoaffinity column, with subsequent detection by reverse phase HPLC. AFM1 was detected in 17 (39.5%) out of 43 samples, 64.7% of the contaminated samples were above 0.5 µg/L.

KEY WORDS: Milk, aflatoxin, bovine, immunoaffinity.

## INTRODUÇÃO

A contaminação de alimentos humanos e animais por micotoxinas representa perdas econômicas bastante significativas, além de representar riscos à saúde (HUSSEIN & BRASEL, 2001).

Um dos principais gêneros de fungo implicado nos casos de intoxicação por micotoxinas (micotoxicoses) é o *Aspergillus* (OGA, 1996), do qual as espécies *A. flavus* e *A. parasiticus*, produtoras das aflatoxinas, são de grande importância na agricultura, sendo conhecidas por contaminar várias culturas, tanto na pré como pós colheita (STEINHART, 1996).

Aflatoxinas são metabólitos extremamente tóxicos para humanos e animais. Sua estrutura policíclica deriva de um núcleo cumarínico (OGA, 1996), ligado a um sistema reativo bifurânico de um lado, e do outro a uma pentanona (característica da série B) ou uma lactona de 6 membros (característica da série G). Foram isolados 17 compostos denominados aflatoxinas, porém, apenas 4 são bem conhecidos e estudados do ponto de vista toxicológico (SHARMA & SALUNKHE, 1991). Esses 4 compostos são designados por B1, B2, G1 e G2, conforme a fluorescência que emitem quando expostos à luz ultra violeta (HARTLEY & O'KELLY, 1963; NESBITT *et al.*, 1962).

<sup>2</sup>Codeagro, São Paulo, SP, Brasil.

\*Bolsista FUNDAP.

Todas as aflatoxinas tem efeito carcinogênico, sendo que a aflatoxina B1 (AFB1) é especialmente relacionada à hepatocarcinogênese (BENNET & FERNHOLZ, 1978). A AFB1 é considerada uma das substâncias mais carcinogênicas conhecidas (SHARMA & SALUNKHE, 1991; ZERINQUE *et al.*, 1993), sendo também a mais comumente encontrada nos alimentos contaminados por aflatoxinas.

A ingestão de aflatoxinas pode levar a um quadro de intoxicação aguda ou crônica, dependendo da concentração ingerida. Seus efeitos toxicológicos somente ocorrem após a ativação metabólica de suas moléculas pelas enzimas hepáticas. A aflatoxina B1 pode ser biotransformada no fígado de animais, incluindo o homem, em vários outros metabólitos tóxicos, tais como aflatoxina M1 (AFM1) que é excretada pelo leite, daí seu nome (milk toxin). Quando um animal ingere um alimento contaminado com aflatoxina B1, de 0,5 a 5% da toxina ingerida é biotransformada em aflatoxina M1 (HUSSEIN & BRASEL, 2001).

A imprecisão dos valores de conversão de AFB1 em AFM1 reforça a importância de realizar análises rotineiras no leite e em seus derivados como fator imprescindível para o controle da presença de AFM1 (PEREIRA *et al.*, 2005).

A ocorrência de aflatoxina M1 no leite de vacas lactantes, é uma questão de saúde pública, pois o leite e seus derivados são consumidos por bebês, crianças e adultos em todo mundo (WOOD, 1991). Essa toxina é classificada como possível carcinógeno para o homem (classe 2B), sendo também observado uma alta atividade genotóxica em animais de experimentação (LÓPES *et al.*, 2001). Portanto, a Organização Mundial de Saúde recomenda a redução do consumo de aflatoxina M1 para um nível que minimize o risco potencial de sua ingestão. Para isso, muitos países regulamentaram o limite máximo permitido de aflatoxina M1 no leite (LÓPES, 2001). No Brasil, o limite máximo de aflatoxina M1 permitido segue a definição do Mercosul, GMC/RES. n°56/94, onde estabelece 0,5 µg/L (ppb) em leite fluído e 5,0 µg/L (ppb) para leite em pó (BRASIL, 2002).

Face a importância da detecção de aflatoxina M1 em leite *in natura* e após a pasteurização, várias pesquisas foram realizadas na Europa e no Brasil (ROUSSI *et al.*, 2002; MARTINS & MARTINS, 2000; SASSAHARA *et al.*, 2005; GARRIDO *et al.*, 2003; PRADO, 1999.). Desta forma o objetivo deste trabalho foi verificar a qualidade do leite consumido em algumas cidades do Estado de São Paulo, quanto ao teor de aflatoxina M1.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Amostras

Quarenta e três amostras de leite comercial (originários de diferentes usinas), foram adquiridas no comércio de 27 municípios do Estado de São Paulo e submetidos a análise para detecção de aflatoxina M1.

### Avaliação de AFM1

As amostras foram analisadas através de dois métodos:

#### Ensaio imunocromatográfico de interpretação visual, com limite de detecção 0,5 ng.mL<sup>-1</sup>

A amostra foi centrifugada a 1.500 rpm por 3min, separando-se imediatamente a porção desnatada (inferior) para análise. Foram pipetados 300 mL de leite desnatado na tira teste aquecida a 55° C por 8min e efetuada a interpretação visual. As amostras que apresentaram resultados positivos foram submetidas a purificação e quantificação.

#### Cromatografia de imunoafinidade com detecção por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

O leite desnatado (50 mL) foi aplicado em uma coluna de imunoafinidade para aflatoxina M1. A amostra foi eluída com 1,25 mL de acetonitrila:metanol (3:2) e 1,25 mL de água, coletadas no mesmo frasco. A solução foi agitada e 100 mL da amostra foi injetada no cromatógrafo em triplicata, tendo como fase móvel água:acetonitrila:metanol (68:24:8), vazão de 1,0 mL.min<sup>-1</sup> e detector de fluorescência em 360 nm de excitação e 440 nm de emissão (DRAGACCI *et al.*, 2001). O método de quantificação das amostras foi padrão externo, utilizando curva de calibração com 5 pontos (0,161; 0,322; 0,643; 1,287; 2,573 ng.mL<sup>-1</sup>).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das 43 amostras analisadas, 17 (39,5%) apresentaram resultados positivos quanto a presença da toxina AFM1, pelo método de imunocromatografia. Estas amostras foram analisadas por CLAE, e a presença da aflatoxina M1 foi confirmada em todas. As Figuras 1, 2 e 3 mostram os cromatogramas do padrão de AFM1 e das amostras de leite comercial com e sem a toxina, respectivamente. A quantificação mostrou que a concentração de AFM1 nas amostras contaminadas, apresentam valores variáveis, num intervalo de 0,04 a 4,64 mg/L (fig. 4). Das 17 amostras quantificadas 11 (64,7%) apresentaram concentração maior que 0,5 mg/L, limite máximo permitido pela legislação brasileira para a presença de AFM1 em leite fluído.

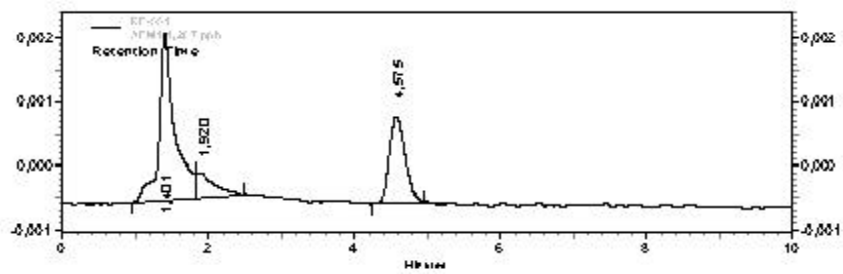


Fig. 1 - Cromatograma do padrão de aflatoxina M1 (4,575 minutos).

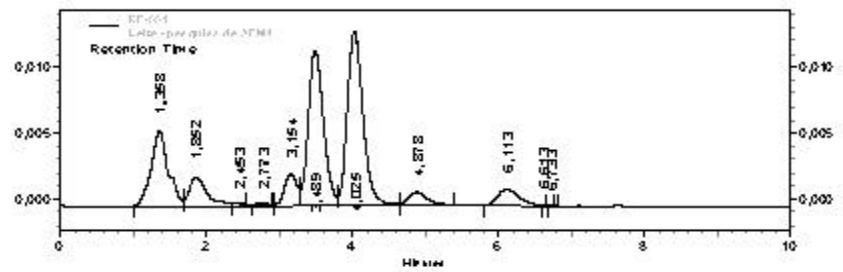


Fig. 2 - Cromatograma da amostra de leite comercial naturalmente contaminado com aflatoxina M1 (4,025 minutos).

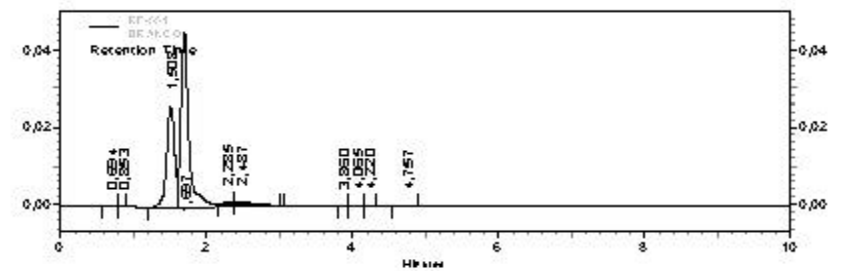


Fig. 3 - Cromatograma da amostra de leite comercial com níveis não detectáveis de aflatoxina M1.

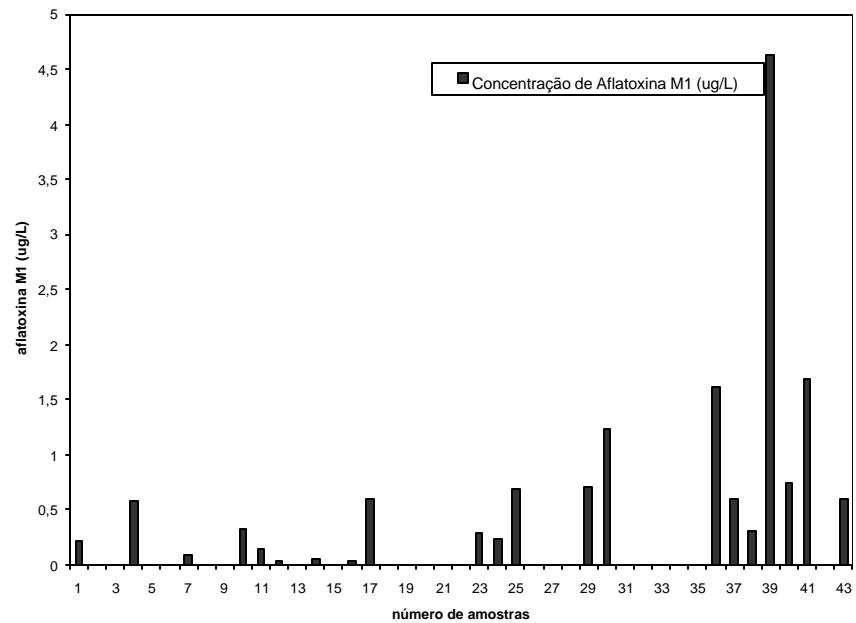


Fig. 4 - Concentração de aflatoxina M1 nas 43 amostras de leite comercial analisada.

A aflatoxina M1 é encontrada em leite comercial e seus produtos em vários países, tais como Estados Unidos, Japão, França, Itália, Alemanha e Espanha (WOOD, 1991; NAKAJIMA, *et al.*, 2004). No Brasil, o trabalho de SABINO *et al.* (1989) analisaram 100 amostras de leite comercial na Cidade de São Paulo e apenas uma apresentou aflatoxina M1. Estudo semelhante foi realizado em Campinas, onde, das 52 amostras analisadas, 4 estavam contaminadas com aflatoxina M1 (DE SYLOS *et al.*, 1996). Já na cidade de Ribeirão Preto, 20,9% das amostras de leite apresentaram AFM1 (GARRIDO *et al.*, 2003). Geralmente, baixos níveis de contaminação são encontrados durante o verão, quando a suplementação alimentar quase não é incluída na dieta de animais lactantes (WOOD, 1991).

Os resultados encontrados mostram a necessidade de um controle por parte de autoridades competentes na fiscalização do leite consumido pela população, visto que a aflatoxina M1 está sendo detectada em leite comercial em concentrações, muitas vezes, acima do limite estabelecido pela legislação.

#### REFERÊNCIAS

- BENNET, J.W. & FERNHOLZ, F.A. Effect of light on aflatoxines, anthraquinones, and sclerotia in *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. *Mycologia*, v.70, p.106-116, 1978.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Resolução RDC n° 274, de 2002. Agência Nacional de Vigilância Sanitária ANVS. Regulamento técnico Mercosul sobre limites máximos de aflatoxinas admissíveis no leite, no amendoim, no milho. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília DF, 16 outubro 2002.
- DE SYLOS, C.M.; RODRIGUEZ-AMAYA, D.B.; CARVALHO, P.R. Occurrence of aflatoxin M1 in milk and dairy products commercialized in Campinas, Brazil. *Food Addit. Contam.*, v.13, n.2, p.169-172, 1996.
- DRAGACCI, S.; GROSSO, F.; GILBERT, J. *Immunoaffinity column clean-up with liquid chromatography for determination of aflatoxin M1 in liquid milk*. São Paulo: VICAM, 2001. p.1-24. (Estudo colaborativo: doc. 0219-99e).
- GARRIDO, N.S.; HA, M.H.; SANTOS, O.M.R.; DUARTE, R.M.F. Occurrence of aflatoxins M1 and M2 in milk commercialized in Ribeirão Preto-SP, Brasil. *Food Additives and Contaminants*, v.20, n.1, p.70-73, 2003.
- HARTLEY, R.D. & O'KELLY, J. Toxicity and fluorescence properties of aflatoxins. *Nature*, v.196, p.1001, 1963.
- HUSSEIN, S.H. & BRASEL, J.M. Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. *Toxicology*, v.167, p.101-134, 2001.
- LÓPEZ, C.; RAMOS, L.; RAMADÁN, S.; BULACIO, L.; PÉREZ, J. Distribution of aflatoxin M1 in cheese obtained from milk artificially contaminated. *International Journal of Food Microbiology*, v.64, p.211-215, 2001.
- MARTINS, M.L. & MARTINS, H.M. Aflatoxin M1 in raw and ultra high temperature treated milk commercialized in Portugal. *Food Additives and Contaminants*, v.17, n.10, p.871-874, 2000.
- NAKAJIMA, M.; TABATA, S.; AKIYAMA, H.; ITOH, Y.; TANAKA, T.; SUNAGAWA, H.; TYONAN, T.; YOSHIKAWA, T.; KUMAGAI, S. Occurrence of aflatoxin M1 in domestic milk in Japan during the winter season. *Food Additives and Contaminants*, v.21, n.5, p.472-478, 2004.
- NESBITT, B.F.; O'KELLY, J.; SARGEANT, K.; SHERIDAN, A. Toxic metabolites of *Aspergillus flavus*. *Nature*, v.195, p.1062-1063, 1962.
- OGA, S. *Fundamentos de toxicologia*. 2.ed. São Paulo: Atheneu, 1996. 474p.
- PEREIRA, M. M. G.; CARVALHO E.P.; PRADO G.; ROSA C.A.R.; VELOSO T.; SOUZA L.A.F.; RIBEIRO J.M.M. 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.
- PRADO, G. Ocorrência de aflatoxina M1 em leite consumido na cidade de Belo Horizonte-Minas Gerais. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.19, p.420-423, 1999.
- ROUSI, V.; GOVARIS, A.; VARAGOULI, A.; BISOGLIOU, N. A. Occurrence of aflatoxin M1 in raw and market milk commercialized in Greece. *Food Additives and Contaminants*, v.19, n.9, p.863-868, 2002.
- SABINO, M.; PURCHIO, A.; ZORZETTO, M.A.P. Variations in the levels of aflatoxin in cow milk consumed in the city of São Paulo, Brazil. *Food Additives and Contaminants*, v.6, p.321-326, 1989.
- SASSAHARA, M.; PONTES NETTO, D.; YANAKA, E.K. Aflatoxina occurrence in foodstuff supplied to dairy cattle and aflatoxin M1 in raw milk in the North of Paraná state. *Food and Chemical Toxicology*, v.43, n.6, p.981-984, 2005.
- SHARMA, R.P. & SALUNKHE, D.K. Introduction to mycotoxins. In: SHARMA, R.P. & SALUNKHE, D.K. (Eds.). *Mycotoxins and phytoalexins*. Londres: CRC Press, 1991. p.775.
- STEINHART, C.E.; DOYLE, M.E.; COCHRANE, B.A. *Food safety 1996*. New York: Marcel Dekker, 1996. p.376-394.
- WOOD, G.E. Aflatoxin M1. In: SHARMA, R.P. & SALUNKHE, D.K. (Eds.). *Mycotoxins and phytoalexins*. London: CRC Press, 1991. p.145-164.
- ZERINGUE JUNIOR, H.J.; BHATNAGAR, D.; CLEVELAND, T.E. C15H24 volatile compounds unique to aflatoxigenic strains of *Aspergillus flavus*. *Applied Environmental Microbiology*, v.59, p.2264-2270, 1993.

Recebido em 9/11/05

Aceito em 16/12/05