

## **DETERMINAÇÃO DE AFLATOXINAS DO TIPO M1 EM LEITE UHT E LEITE EM PÓ COMERCIALIZADOS NA CIDADE DE BELÉM**

Margareth Tavares SILVA

SILVA, Margareth Tavares. **Determinação de aflatoxinas do tipo M1 em leite UHT e leite em pó comercializados na cidade de Belém.** Projeto de investigação científica do Curso de Farmácia – Centro Universitário Fibra, Belém, 2018.

Micotoxinas são metabólitos secundários que apresentam massa molecular baixa. São formadas por vários compostos, os quais apresentam diferentes toxicidades, produzidas por diversos fungos filamentosos, principalmente os dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*. A presença dessas toxinas nos alimentos representa um grave problema de saúde pública devido aos efeitos tóxicos e mutagênicos que podem causar em animais e aos seres humanos. No Brasil, em razão das condições propícias ao desenvolvimento de diversos tipos de fungos aflatoxigênicos, os produtos de origem animal como carne, ovos e leite podem ser fontes indiretas de contaminações por aflatoxinas, cujas ocorrências foram

relatadas em diferentes tipos de alimentos, não possuindo algumas, ainda, legislação específica quanto aos limites aceitáveis. De acordo com a legislação em vigor, os únicos produtos lácteos contemplados pela legislação nacional, quanto aos limites máximos permitidos de AFM1, são o leite fluido, leite em pó e queijo (BRAZIL, 2002). Na cadeia produtiva de derivados lácteos, a contaminação por aflatoxinas ocorre pelo uso do leite contaminado com AFM1. De acordo com Hussein e Brasel (2001), quando um animal ingere o alimento contaminado com AFB1, de 0,5 a 5% da toxina são biotransformadas no fígado em AFM1, e, em geral, mais de 90% da AFB1 ingeridas são eliminadas pelo organismo em até 24h. A AFM1, apesar de ser um metabólito, não é um produto inativo, sendo cancerígeno para várias espécies, com efeitos na saúde pré e pós-natal em seres humanos ainda não totalmente esclarecidos. Nos últimos anos, diversas pesquisas foram conduzidas com o intuito de avaliar a qualidade química e microbiológica, e a presença de resíduos e contaminantes em queijos. Dentre esses contaminantes naturais, encontram-se as aflatoxinas, amplamente presentes no leite e derivados. Após ser ingerida pelo animal, AFB1

passa pelo processo de biotransformação primária no fígado. Nesse processo, ocorre a hidroxilação da molécula, resultando na formação de metabólitos tóxicos, tal como a AFM1. Esses compostos, por conterem o grupo hidroxila, são bastante solúveis em água, o que possibilita sua rápida excreção através da urina, bÍlis, fezes e leite, constituindo um processo de detoxificação da AFB1 (HUSSEIN; BRASEL, 2001). Os efeitos hepatotóxicos e carcinogênicos causados pela AFM1, quando no organismo humano, fizeram com que a International Agency for Research on Cancer (IARC) a classificasse como agente carcinogênico do grupo 1 para humanos. Esta capacidade mutagênica é característica da dupla ligação entre C2-C3 na estrutura de hidrofurofurano da molécula. Os métodos para a determinação de aflatoxina M1 em leite utilizam, em sua maioria, extração com solventes orgânicos e purificação cromatográfica em fase sÓlida ou imunoafinidade. Diante da preocupação com a qualidade do leite utilizado pela população, este trabalho teve por objetivo avaliar a qualidade do leite pasteurizado 'UHT', quanto à presença de aflatoxina do tipo M1, comercializado na cidade de Belém. Leite e produtos lácteos são os principais

nutrientes para os seres humanos, especialmente para as crianças. Entretanto esses produtos podem estar contaminados com aflatoxina M1 (AFM1), um perigo para a saúde humana, sendo as crianças mais susceptíveis aos efeitos adversos das micotoxinas (SYLOS; RODRIGUEZ-AMAYA; CARVALHO, 1996). Por essa razão, muitos países possuem regulamento para controlar os níveis de aflatoxina B1 em rações e propõem níveis máximos permissíveis de aflatoxina M1 em leite. Uma vez que a pasteurização ou processamento não destrói a AFM1 e o consumo de leite principalmente pela população infantil é muito significativo, por ser um nutriente primário, é prudente que se verifique a incidência de AFM1 nesse alimento. A presença desses fungos deve ser cuidadosamente investigada e/ou monitorada, atentando aos efeitos deletérios sobre a composição química, perda da atividade entre outros, além da capacidade de produzirem micotoxinas. O método analítico utilizado nesta investigação foi o de cromatografia em camada delgada. Foram coletadas 22 amostras de leite UHT integral, desnatado e semidesnatado de diferentes marcas em uma rede de supermercados na cidade de Belém. As análises foram

realizadas no Centro Universitário Fibra. O padrão de AFM1 (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA) foi diluído em benzeno: acetonitrila (9:1), conforme a metodologia 971.22 descrita pela AOAC. Essa técnica conta com uma etapa de purificação que foi otimizada conforme Sabino *et al.* (1989), na qual, foi incluída uma etapa de precipitação de proteínas. Para tanto, após a extração com metanol e obtenção do filtrado, aproximadamente 5 mL de uma solução saturada de acetato de chumbo foram lentamente adicionados a este filtrado, até a completa precipitação das proteínas, procedendo-se, em seguida, a centrifugação (3000 xg) durante 10 minutos. Nesta modificação do método, as quantidades da amostra de leite e dos solventes empregadas na fase de extração foram proporcionalmente reduzidas à metade. A eficiência do método proposto foi avaliada por meio da obtenção de seus limites de detecção, quantificação, percentual de recuperação e coeficiente de variação. O limite de detecção corresponde à concentração mínima da substância medida e declarada com 95% ou 99% de confiança de que a concentração do analito é maior que zero, enquanto o limite de quantificação é a menor

concentração do analito que pode ser determinada com um nível aceitável de precisão e exatidão. Para a determinação dos limites de detecção, quantificação e percentual de recuperação do método, amostras, em que não foram detectadas AFM1, foram artificialmente contaminadas sequencialmente com níveis de 0,2; 0,3 e 0,5 µg/L de AFM1. Para cada nível de contaminação foram realizadas três repetições. O percentual de recuperação foi obtido pela diferença entre o valor real (valor inicial adicionado na amostra – 0,5µg/L) e o valor observado na análise, ou seja, o valor da leitura do extrato dessa amostra na cromatofolha, conferindo a exatidão do método. A precisão da metodologia foi avaliada pelo coeficiente de variação (CV) obtido em condições de repetibilidade. As amostras de leite coletadas foram analisadas pelo método de CCD segundo Sabino *et al* (1989). Para a detecção e a quantificação da AFM1, as cromatofolhas de sílica gel G 60 (Art.1.05553, Merk, Alemanha) foram submetidas a um desenvolvimento unidimensional, ao abrigo da luz, utilizando-se como fase móvel a mistura clorofórmio-acetona-álcool isopropílico (85:10:5). Essas cromatofolhas foram examinadas em câmara escura sob

luz ultravioleta de ondas longas (366nm), e a quantificação da AFM1 foi efetuada por meio da comparação visual das intensidades de fluorescência entre os pontos da solução padrão (1, 3, 5 e 7 µL) e aqueles referentes ao extrato da amostra. A confirmação da identidade química da AFM1 foi realizada por meio da reação com ácido sulfúrico (método 975.37 AOAC23) e por cromatografia em camada delgada bidimensional, utilizando-se clorofórmio – acetona – álcool isopropílico (85:10:5) e éter-metanol - hexano - água (85: 4: 5:1), como primeira e segunda fases móveis, respectivamente. Em relação aos aspectos éticos, neste estudo, todos os preceitos estabelecidos foram respeitados no que se refere a zelar pela legitimidade das informações e privacidade, e pelo sigilo das informações, tornando os resultados desta pesquisa públicos. A análise dos dados foi realizada, utilizando-se a ferramenta *Microsoft World* 2010 e transformada em gráficos. Os resultados do arraste da fase móvel de CCD em teste foram ilustrados com fotos e posteriormente discutidos. Das 22 amostras de leite UHT integral, desnatado e semidesnatado, nenhuma apresentou resultado positivo para AFM1. Esse resultado foi semelhante ao encontrado em outros

estudos no Brasil. Weigel (2007) analisou 128 amostras de leite proveniente da Serra Gaúcha, utilizando o método de detecção por cromatografia de camada delgada e não encontrou contaminação pela AFM1. Do mesmo modo, as 40 amostras analisadas por Baggio (2006), no estado do Paraná, estavam dentro do limite máximo permitido no Brasil. Pode-se concluir que o método de cromatografia em camada delgada para a determinação de aflatoxina M1 é eficiente; 10% das amostras de leite em pó estavam contaminadas; 100% das amostras de leite em UHT não estavam contaminadas. Ressalta-se, diante dos resultados, ser necessário haver contínua fiscalização pelos órgãos competentes a fim de proporcionar segurança e confiabilidade à saúde humana.

**PALAVRAS-CHAVE:** Aflatoxinas do tipo M1. Leite UHT e leite em pó. Belém – PA.

## REFERÊNCIAS

BAGGIO, Érica Cristina Ramirez. Determinação de Aflatoxina M1 em Leite pasteurizado pelos métodos de CCD e CLAE utilizando coluna de imunoafinidade. 2006. 111f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) -- Universidade Federal do Paraná, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde, Resolução RDC nº 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.

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

SABINO, M. et al. Ocorrência de aflatoxina B1 em produtos alimentícios e rações animais, consumidos no Estado de São Paulo e em várias outras regiões do Brasil, no período de 1980 a 1987. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, São Paulo, v. 48, n. 1/2, 1988.

SYLOS, C. M.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Estudo comparativo de métodos para determinação de aflatoxina M1. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 56, p. 87-97, 1996.

WEIGEL, M. Avaliação da contaminação por Aflatoxina M1 em leite cru e leite UHT. 2007. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos (PPGCTA), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2007.