

**Aflatoxina M₁ em Leite:
Um Risco para a Saúde
Pública**

Ministério da Agricultura,
Pecuária e Abastecimento



República Federativa do Brasil

Luiz Inácio Lula da Silva
Presidente

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

Roberto Rodrigues
Ministro

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

Conselho de Administração

Luis Carlos Guedes Pinto
Presidente

Silvio Crestana
Vice-Presidente

Alexandre Kalil Pires
Ernesto Paterniani
Hélio Tollini
Cláudia Assunção dos Santos Viegas
Membros

Diretoria-Executiva da Embrapa

Silvio Crestana
Diretor-Presidente

José Geraldo Eugênio de França
Kepler Euclides Filho
Tatiana Daene de Abreu Sá
Diretores-Executivos

Embrapa Agroindústria de Alimentos

Amauri Rosenthal
Chefe-Geral

Regina Isabel Nogueira
Chefe Adjunto de Pesquisa e Desenvolvimento

Marcos Luiz Leal Maia
Chefe Adjunto de Administração



Documentos67

Aflatoxina M₁ em Leite: Um Risco para a Saúde Pública

Antônio Xavier de Farias
Otniel Freitas-Silva
Maria Heloísa de Moraes
Maria de Lourdes Mendes de Souza
André Pires Montello

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Agroindústria de Alimentos

Av. das Américas, 29.501 - Guaratiba
 CEP: 23020-470 - Rio de Janeiro - RJ
 Telefone: (0xx21)2410-9500
 Fax: (0xx21)2410-1090
 Home Page: www.ctaa.embrapa.br
 E-mail: sac@ctaa.embrapa.br

Comitê de Publicações da Unidade

Presidente: Regina Isabel Nogueira
 Membros: Maria da Graça Fichel do Nascimento
 Maria Ruth Martins Leão
 Neide Botrel Gonçalves
 Ronoel Luiz de O. Godoy
 Virgínia Martins da Matta
 Secretária: Renata Maria Avilla Paldês

Supervisor editorial: Maria Ruth Martins Leão
 Revisor de texto: Comitê de Publicações
 Normalização bibliográfica: Maria Ruth Martins Leão
 Foto da capa: André Guimarães de Souza
 Tratamento de Ilustrações: André Guimarães de Souza
 Editoração eletrônica: André Luis Gomes do Nascimento
 André Guimarães de Souza

1ª edição

1ª impressão (2005): versão on-line

Todos os direitos reservados.

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação - CIP
 Embrapa Agroindústria de Alimentos**

Farias, Antônio Xavier de.
 Aflatoxinas M1 em leite: um risco para a saúde pública
 / por Antônio Xavier de Farias ... [et al.] - Rio de Janeiro:
 Embrapa Agroindústria de Alimentos, 2005.

20 p. ; 21 cm. - (Embrapa Agroindústria de Alimentos.
 Documentos, ISSN 0103-6068; 67).

1. Aflatoxina 2. Leite. 3. Detecção I. Freita-Silva, Otniel.
 II. Moraes, Maria Heloísa de. III. Souza, Maria de Lourdes M. de.
 IV. Montello, André Pires. V. Título VI. Série.

CDD 615.9529 (21. ed.)

© Embrapa, 2005

Referências Bibliográficas

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis...** 17th ed. Vírginia: AOAC, 2000. cap. 49, p. 1-64.

BRESSAN, M.; MARTINS, M. C. Segurança alimentar na cadeia produtiva, Juiz de Fora, **Revista de Política Agrícola**, Brasília, DF, v. 13, n. 3, p. 27-37, 2004.

DENNIS, P.; HSIEH, H. **Metabolism and transmission of mycotoxins**. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM AND WORKSHOP ON MYCOTOXINS, Cairo, 1981. Proceedings... Cairo, 1983. p. 151-165.

GIMENO, A.; MARTINS, M. L. **Micotoxinas y micotoxicosis en animales y humanos**. Buenos Aires: Special Nutrients, Inc., 2003. (Talleres graficos del SRL, Buenos Aires , Argentina). p. 1-160.

HESSELTINE, C. W. Conditions leading to mycotoxin contamination of foods feeds. In: RODRICKS, J.V. (Ed.) **Mycotoxins other fungal related food problems**. Washington, DC: American Chemical Society, 1976. p. 1-22.

KUIPER-GOODMAN, T. Prevention of human mycotoxicoses trough risk assesment risk management. In: MILLER, J.D.; TRENHOLM, H. L. (Eds.). **Mycotoxins in grain, compouns other than aflatoxin**. St.Paul, Minnesota: Eagan Press, 1994. p. 439 - 469.

LEGISLAÇÃO sobre micotoxinas. Disponível em: <<http://www.micotoxinas.com.br/legisla.html>> . Acesso em: 10 out. 2005.

MYCOTOXINS: risks in plant, animal, and human systems. Ames: Council for Agricultural Science and Technology, 2003. 199 p. (Série Task Force Report, 139).

OLIVEIRA, C. A. F.; GERMANO, P. M. L. Aflatoxina M₁ em leite e derivados. In: GERMANO, M. L.; GERMANO, M. J. S. **Higiene e vigilância sanitária de alimentos**. Ed. São Paulo: Livraria Varela, 2001. p. 99 - 102.

Autores

Antonio Xavier de Farias

Biól., M.Sc., Pesquisador da Embrapa Agroindústria de Alimentos, Av. Das Américas, 29.501 - Guaratiba, CEP 23020-470, Rio de Janeiro, RJ. Telefone: (0xx21) 2410-9585. E-mail: antxafar@ctaa.embrapa.br

Otniel Freitas-Silva

Eng. Agron., M.Sc., Pesquisador da Embrapa Agroindústria de Alimentos, Av. Das Américas, 29.501 - Guaratiba, CEP 23020-470, Rio de Janeiro, RJ. Telefone: (0xx21) 2410-9585. E-mail: ofreitas@ctaa.embrapa.br

Maria Heloisa de Moraes

Quím., M.Sc., Tecnologista do Instituto Nacional de Controle Qualidade em Saúde – Fundação Oswaldo Cruz Av. Brasil 4365 – Manguinhos, CEP 21045-900 Rio de Janeiro, RJ. Telefone: (0xx21) 3865-5123 E-mail: isa@incqs.fiocruz.br

Maria de Lourdes Mendes de Souza

Farmac., M.Sc., Técnico de Nível Superioro da Embrapa Agroindústria de Alimentos, Av. Das Américas, 29.501 - Guaratiba, CEP 23020-470, Rio de Janeiro, RJ. Telefone: (0xx21) 2410-7521. E-mail: mlourdes@ctaa.embrapa.br

André Pires Montello

Quím. Lic., Assist. Operacional da Embrapa Agroindústria de Alimentos, Av. Das Américas, 29.501 - Guaratiba, CEP 23020-470, Rio de Janeiro, RJ. Telefone: (0xx21) 2410-9586. E-mail: montello@ctaa.embrapa.br

Bulgária

- AFM₁: Produtos de leite fluido = 0,5 µg/kg; Leite em pó = 0,1 ppb; Leite em pó para dietas e alimentos infantis = 0 µg/kg

República Tcheca

- Leite: M₁ = 0,5 µg/kg
- Alimentos infantis na base de leite: M₁ = 0,1 ppb; B₁ = 0,1; B₂, G₁, G₂ = 0,2 µg/kg

Romênia

- Leite e laticínios: M₁ = 0 µg/kg

Suíça

- Leite e produtos: M₁ = 0,05 µg/kg
- Soro de leite e produtos: M₁ = 0,025 µg/kg

China

- Leite fluido e produtos lácteos (calculados na base de leite fluido): B₁ = 0,5 µg/kg

Chipre

- Leite e laticínios: todas micotoxinas: 0,5 µg/kg

Egito

- Leite e laticínios: G₁, G₂, M₁, M₂ =) µg/kg

Nigéria

- Leite fluido: M₁ = 1 µg/kg

Internacional

Mercosul

Legislação comum a todos integrantes

- Leite fluido: AFM₁ = 0,5 µg/L (ppb)
- Leite em pó: AFM₁ = 5,0 µg/kg (ppb)

Argentina

- Leite fluído e em pó: M₁ = 0,05 µg/kg

Uruguai

- Leite e produtos lácteos: Aflatoxina M₁ = 0,5 µg/kg

Barbados

- Leite fluído: M₁ = 0,05 µg/kg

Honduras

- Leite e laticínios: M₁ = 0,05 µg/kg

União Européia

- Legislação comum para todos os membros:
- Leite in natura ou destinado para elaboração de produtos à base de leite, e leite tratado termicamente: Aflatoxina M₁ = 0,05 ng/L

Alemanha

- Leite: M₁ = 0,05 µg/kg

França

- Leite, leite em pó (calculado no produto reconstituído):
Aflatoxina M₁ = 0,05 µg/kg
- Leite, leite em pó, (crianças menores que 3 anos): M₁ = 0,03 µg/kg

Apresentação

Nos últimos 25 anos, a produção brasileira de leite aumentou 119%, passando de 10,2 bilhões de litros em 1979 para 22,3 bilhões em 2003. Para o ano de 2005 a expectativa é de que se confirme uma produção de 22,9 bilhões de litros de leite.

Considerando a importância do leite para a economia, para a dieta humana e as exigências de qualidade dos consumidores faz-se necessário a produção de publicações que contemplem informações quanto a contaminação deste produto por substâncias e/ou resíduos químicos, sobre tudo as ocasionadas por metabólitos fúngicos, com foco na melhoria da qualidade, segurança e inocuidade do leite.

Amauri Rosenthal
Chefe Geral da Embrapa Agroindústria de Alimentos

Procedimento de detecção e quantificação

O procedimento mais utilizado é a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), com ou sem derivação pós-coluna, detector de fluorescência, os *kits* de Elisa, fluorimetria e Cromatografia de Camada Delgada (CCD) ou a Cromatografia de Camada Delgada de Alta Eficiência (CCDAE). Especificamente na CLAE a coluna cromatográfica mais utilizada é a C₁₈. Os volumes de injeções mais freqüentemente utilizados estão entre 50 e 150 µL, e a temperatura da coluna varia de ambiente à 50°C. Os componentes das fases móveis mais utilizados são os solventes: acetonitrila, metanol, água. No caso da derivação pré-coluna o reagente utilizado é o Ácido Trifluoracético (TFA), e na pós-coluna o reagente perbrometo de di-bromo pirimidina (C₅H₆Br₃N) e a razão de fluxo fica entre 0,25 a 0,75 mL/min. Nas metodologias que não realizam a derivação, a razão de fluxo varia de 0,25 até 1,75 mL/min. Os tipos de detectores são os de fluorescência, Ms, MS-Ms e UV (Association..., 2000).

Legislação

A legislação para as micotoxinas, inclusive a AFM₁ é muito controvertida, entretanto existe uma perspectiva de uma maior uniformização ao longo dos próximos anos em função das recomendações do *Codex Alimentarius*, principalmente, dos países signatários da Organização Mundial do Comércio. Existindo, porém, diferenças significativas na regulamentação de micotoxinas a nível nacional e internacional (Legislação..., s.d.).

Brasileira

Ministério da Saúde: Resolução RDC no 274, da ANVISA, de 15 de outubro de 2002, publicada no Diário Oficial da União, de 16/10/2002:

- Leite fluido: Aflatoxina M₁ = 0,5 µg/L (ppb)
- Leite em pó: Aflatoxina M₁ = 5,0 µg/L (ppb)

Métodos de detecção e quantificação de Aflatoxina M₁ em leite e derivados

Os métodos existentes para determinação de aflatoxina M₁ baseiam-se em alguma medida física ou característica química da mesma. A vantagem e utilidade do método analítico são diferenciadas pelas características práticas como aplicabilidade, o custo, a eficiência, o tempo requerido, o equipamento e o nível de treinamento necessário. A confiança é determinada pelas características científicas tais como precisão, exatidão, sensibilidade e especificidade. De um modo geral os métodos de análise de resíduos contêm cinco etapas básicas. A primeira é a amostragem, a segunda é a extração ou diluição, a terceira a *clean-up* ou limpeza do extrato, a quarta concentração e a quinta detecção ou quantificação.

A extração

Os solventes de extração mais utilizados nas metodologias disponíveis na literatura para análise de aflatoxina M₁ em leite em pó e líquido são: água, acetonitrila, metanol, além de clorofórmio, diclorometano, acetato de etila, hexano, solução de cloreto de sódio, NaOH, tampão fosfato, dentre outros.

Procedimento de extração

Os tratamentos mais utilizados no leite líquido e leite em pó são: *blender* e homogeneização com solvente, centrifugação, agitação mecânica com solvente, adição de NaCl, dentre outros. Existem metodologias que utilizam também ultrassom, ultra turrax e extração com água quente ou gelada para a análise de micotoxinas em leite em pó.

Procedimento de limpeza ou *clean-up*

Os mais utilizados são as colunas de imunoafinidades, e os *clean-up* químicos mais utilizados são os cartuchos de sílica tipo Sep-PaK ou SPE.

Sumário

Introdução	9
As Aflatoxinas	9
A Aflatoxina M₁ (AFM₁)	10
Mecanismos de Contaminação do Leite por AFM₁	11
Principais Efeitos Tóxicos	11
Relação de AFB₁ ingerida e a concentração de AFM₁, excretada no leite	12
Prevenção	12
Métodos de detecção e qualificação de Aflatoxina M₁ em leite e derivados	13
Legislação	15
Referências Bibliográficas	18

Prevenção

A melhor forma de prevenção contra a contaminação por AFB₁ consiste em não administrar aos animais rações contaminadas por AFB₁. Os métodos de seleção dos grãos de cereais e posterior separação mecânica da casca e do pó, do resto do cereal, são adequados para minimizar a contaminação, uma vez que normalmente a maior concentração de micotoxinas se verifica no pericarpo do grão e no pó do cereal. Estes procedimentos podem ser utilizados tanto nos alimentos para animais como para seres humanos.

Portanto, é fundamental a aquisição de milho e rações de boa procedência, bem como dispensar os devidos cuidados na armazenagem destes produtos, tais como : controle da temperatura, da umidade, e de pragas.

Os tratamentos térmicos aplicados para o controle de aflatoxinas, a uma matéria-prima ou a um alimento composto, não são muito eficazes, uma vez que a AFB₁ é resistente a altas temperaturas, cerca de 120°C. Apesar de, em alguns tipos de processamento onde a temperatura utilizada ser superior a 120°C, o tempo de permanência nessa temperatura é insuficiente para uma redução significativa do teor de AFB₁.

As rações destinadas a alimentação de animais poligástricos e, conseqüentemente, para vacas leiteiras normalmente contém matérias-primas secas (12-13% de umidade ou água livre), como também, forragens com um teor de umidade ou de água livre muito elevado, na ordem dos 70 a 85%. Estes valores que podem dar origem a atividades de água (Aa) muito elevadas de cerca de 0,85-0,98 em temperaturas entre 20 e 25°C. Estas condições são ideais para o desenvolvimento dos *Aspergilli* e conseqüentemente para a síntese de AFB₁.

A aplicação de normas de higiene, de limpeza, bem como de fumigação contra insetos, roedores, bactérias e fungos nas fábricas de alimentos e de rações devem ser observadas. É aconselhável, sempre que possível, o armazenamento das matérias primas com teores de umidade situados entre 8 e 11,5% no caso das oleaginosas, ou entre 12-13% para amiláceas como é o caso dos cereais, proporcionando atividades de água (aA) da ordem de 0,65-0,70 a 25-30°C. Desse modo pode-se minimizar o desenvolvimento de fungos e a conseqüente produção de micotoxinas (Gimeno & Martins, 2003).

Principais Efeitos Tóxicos

O potencial carcinogênico da AFM₁ é significativamente inferior ao da AFB₁, como tal, a AFM₁ e a AFB₁ possuem uma TD50 (teor de micotoxina passível de desenvolver tumores malignos em 50% dos indivíduos) de 10,38 e 1,15 microgramas/kg p.c. (peso corporal) / dia, respectivamente, o que pressupõe que a AFM₁ é cerca de nove vezes menos carcinogênica que a AFB₁. Os fatores que influenciam a toxicidade da AFM₁ em seres humanos, são similares aos mesmos que influenciam a toxicidade das micotoxinas, de uma maneira geral (Kuiper-Goodman, 1994), tais como:

- a) a biodisponibilidade das micotoxinas;
- b) os sinergismos que ocorrem entre elas;
- c) o teor de micotoxinas ingerido diariamente em função da concentração de substâncias e da quantidade dos alimentos ingeridos;
- d) a continuidade ou intermitência da ingestão do alimento contaminado;
- e) o peso do indivíduo, respectivo estado de saúde e condição fisiológica;
- f) a idade do indivíduo, as crianças e os jovens são mais sensíveis à toxicidade das micotoxinas devido à maior variabilidade do metabolismo basal e que eventualmente não possuem todos mecanismos bioquímicos suficientes para a destoxificação.

Relação de AFB₁ ingerida e a concentração de AFM₁ excretada no leite

Em vacas leiteiras, a relação entre a concentração de AFB₁ na ração e a da AFM₁ produzida é muito variável, podendo oscilar entre 34:1 a 1600:1. Esta variação pode ocorrer de um animal para outro, bem como, de uma lactação para outra.

Aflatoxina M₁ em Leite: Um Risco para a Saúde Pública

Antônio Xavier de Farias

Otniel Freitas-Silva

Maria Heloísa de Moraes

Maria de Lourdes M. de Souza

André Pires Montello

Introdução

O leite está entre os produtos alimentícios que apresentarão maior crescimento de produção e de consumo nos próximos anos. Entretanto, o leite é altamente susceptível a contaminações microbianas que o torna facilmente deteriorável, podendo ser um veículo de toxi-infecção alimentar. Existe, ainda a contaminação ocasionado por substâncias e/ou resíduos químicos entre os quais a aflatoxina M₁ (AFM₁). Este composto, potencialmente hepatocarcinogênico, é sintetizado a partir da biotransformação de aflatoxina B₁, um metabólito secundário, produzido por algumas espécies fúngicas pertencentes ao gênero *Aspergillus*, que se desenvolvem principalmente em grãos, cereais e rações. Estas matérias-primas são cada vez mais utilizadas na complementação da alimentação de bovinos, a medida que se busca maior produtividade, e pela insuficiência de pasto, e quando a silagem, não são suficientes para alimentação de rebanhos de alta produtividade. A presença de AFM₁ no leite, destinado ao consumo humano, é altamente preocupante para a segurança alimentar (Bressan & Martins, 2004), considerando-se que grande parte deste produto é destinado a alimentação infantil.

As Aflatoxinas

São substâncias tóxicas, essencialmente produzidas por espécies de *Aspergillus flavus* e *A. parasiticus*. Embora estes microrganismos desenvolvam-se a temperatura média de 30° C, a síntese de micotoxinas situa-se na faixa entre 10 - 12° C. A atividade de água (A_w) mínima necessária para o início do desenvolvimento e conseqüente produção destas

micotoxinas situa-se entre 0,75 e de 0,83, respectivamente. Os *Aspergilli* crescem e podem produzir micotoxinas a 25° C, com uma atividade de água de 0,95. No entanto, existem algumas espécies de *Aspergillus flavus* que podem produzir aflatoxinas em condições mais extremas em arroz, com produção entre 6 e 45° C, tendo um comportamento ótimo a 37° C, ocorrendo a produção de micotoxinas entre 11 e 36° C, com um nível máximo de produção a 30°C (Hesseltine, 1976; Mycotoxins, 2003). Atualmente, conhecem-se 18 tipos de aflatoxinas, entre as quais a mais tóxica é a aflatoxina B1 (AFB₁).

A Aflatoxina M₁ (AFM₁)

A aflatoxina M₁ (AFM₁) é um derivado 4-monohidroxiado (Fig. 1) proveniente de um complexo processo de biotransformação da aflatoxina B₁ no organismo de alguns animais. Assumindo importância destacada, considerando-se que pode ser excretada no leite e na urina (Oliveira & Gemano, 2001).

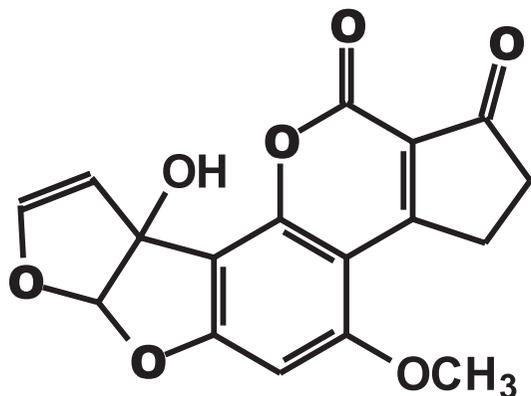


Fig. 1. A aflatoxina M₁ (AFM₁)

Mecanismo de Contaminação do Leite por AFM₁

A contaminação do leite por Aflatoxina M₁ se dá a partir da ingestão de ração ministrada ao gado contaminada por Aflatoxina B₁, sendo absorvida via trato gastrointestinal, passando ao sistema sangüíneo e transportada para o fígado onde se processa a sua metabolização. Uma parte desta aflatoxina é ativada e fixada nos tecidos hepáticos. Outros metabólitos conjugados da AFB₁ hidrossolúveis são excretados via bÍlis, através das fezes. Outras formas conjugadas hidrossolúveis, produtos de degradação da AFB1 e respectivos metabólitos não conjugados são excretados no sistema circulatório sangüíneo distribuindo-se por via sistêmica e transferindo-se para o leite, ovos, músculos e demais tecidos comestíveis (Dennis & Hsieh, 1981) (Fig. 2).

A AFM₁ é um desses derivados metabólicos que passa para o leite, contaminando-o. A partir da AFB₁ poderão se formar outros metabólitos. Na maioria das vezes o organismo animal produz estes metabólicos como um sistema de auto-destoxificação. A reação que se produz a partir da micotoxina original não é, necessariamente completa, nem irreversível.

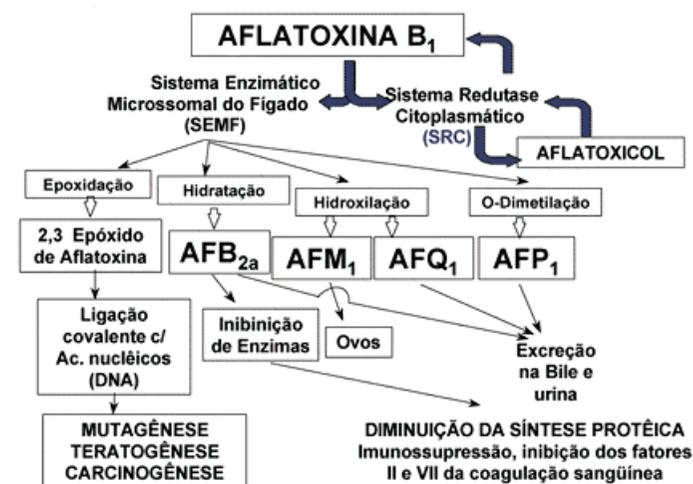


Fig. 2. Metabolismo de Aflatoxina B1 no fígado de aves