

27 A 29 DE OUTUBRO DE 2020



ON LINE

7º Simpósio de
Segurança Alimentar

Inovação com sustentabilidade

AFLATOXINAS B1 E M1 EM LEITE CRU OBTIDO DE PRODUÇÃO INTENSIVA

M.B.R. Cerqueira¹, K.C. Massarolo², S. Roselen³, E. Badiale-Furlong⁴, P. Nascente⁵, G.C. Dors⁶

1 - Universidade Federal do Rio Grande - Escola de Química e Alimentos - Laboratório de Micotoxinas e Ciência de Alimentos - CEP: 96203-900 - Rio Grande - RS - Brasil, Telefone: 55 (53) 3233-6796 - e-mail: (mariscerqueira@hotmail.com)

2 - Universidade Federal do Rio Grande - Escola de Química e Alimentos - Laboratório de Micotoxinas e Ciência de Alimentos - CEP: 96203-900- Rio Grande - RS - Brasil, Telefone: 55 (53) 3233-6796 - e-mail: (kelly_massa@hotmail.com)

3 - Universidade Federal de Pelotas - Faculdade de Agronomia - Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial - CEP: 96010-610- Capão do Leão - RS - Brasil, Telefone: 55 (53) 3275-7250- e-mail: (sedenirrosolen@gmail.com)

4 - Universidade Federal do Rio Grande - Escola de Química e Alimentos - Laboratório de Micotoxinas e Ciência de Alimentos - CEP: 96203-900 - Rio Grande - RS - Brasil, Telefone: 55 (53) 3233-6796- e-mail: (dqmebf@furg.br)

5 - Universidade Federal de Pelotas - Instituto de Biologia - Departamento de Microbiologia e Parasitologia - CEP: 96010-900 - Capão do Leão - RS - Brasil, Telefone: 55 (53) 3275-7335- e-mail: (pttsn@gmail.com)

6 - Universidade Federal de Pelotas - Faculdade de Agronomia - Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial - CEP: 96010-610- Capão do Leão - RS - Brasil, Telefone: 55 (53) 3275-7250- e-mail: (dorsgi@yahoo.com.br)

RESUMO – O objetivo deste trabalho foi analisar a ocorrência de aflatoxinas B1 e M1 em amostras de leite cru obtidos de produção intensiva. Foram coletadas 21 amostras de leite cru refrigerado diretamente do tanque de expansão, provenientes de 12 rebanhos leiteiros localizados nas regiões centro-leste e nordeste do Rio Grande do Sul. As aflatoxinas foram extraídas utilizando o método QuEChERS e quantificadas por cromatografia líquida de alta eficiência com detector de fluorescência. A aflatoxina B1 não foi detectada em nenhuma das amostras e a aflatoxina M1 foi encontrada em 57% das amostras, variando de 0,38 a 4,37 $\mu\text{g L}^{-1}$, sendo que 83% do total das amostras contaminadas estavam com valores acima do limite máximo permitido pela legislação brasileira que é 0,5 $\mu\text{g L}^{-1}$ para leite fluído. Esta ocorrência sugere que os animais foram alimentados com rações contaminadas com aflatoxina B1, provavelmente devido a falhas no controle das condições de armazenamento desses produtos.

ABSTRACT – The aim of this work was to analyze the occurrence of aflatoxins B1 and M1 in raw milk samples obtained from intensive production. Twenty one samples of chilled raw milk were directly collected of the expansion tank, from 12 dairy herds selected in the central-east and northeast regions of Rio Grande do Sul. Aflatoxins were extracted using the QUEChERS method and quantified by high-performance liquid chromatography with fluorescence detector. Aflatoxin B1 was not detected in any of the samples evaluated. Aflatoxin M1 was found in 57% of the samples, ranging from 0.38 to 4.37 $\mu\text{g L}^{-1}$. 83% of the total contaminated samples were with values above the maximum limit allowed by Brazilian legislation (0.5 $\mu\text{g L}^{-1}$) for fluid milk. This occurrence suggests that the animals were fed diets contaminated with aflatoxin B1, probably due to failures in the control of the storage conditions of these products.

PALAVRAS-CHAVE: micotoxinas; leite; QuEChERS; HPLC-FL

KEYWORDS: mycotoxins, milk, QuEChERS, HPLC-FL

REALIZAÇÃO



ORGANIZAÇÃO



www.officeeventos.com.br



1. INTRODUÇÃO

A influência da alimentação animal na composição do leite tem sido foco de muitos estudos, pois está diretamente relacionada com alteração das características nutricionais e sensoriais do leite (Castagnetti et al., 2008). O leite é um alimento de grande valor nutritivo, que fornece macro e micronutrientes importantes para o crescimento, desenvolvimento e manutenção da saúde humana. Porém, pode ser o agente causador de diversas alterações fisiológicas nos indivíduos que o consomem, principalmente por ser veículo de contaminantes alimentares (Kwiatkowski e Alves, 2007), como as micotoxinas, metabólitos tóxicos produzidos por fungos filamentosos, provenientes da contaminação dos produtos agrícolas destinados à alimentação animal (Santili et al., 2015).

As micotoxinas de maior importância em alimentos e rações são as aflatoxinas (B1, B2, G1 e G2), produzidas por espécies do gênero *Aspergillus*, principalmente *A. flavus* e *A. parasiticus* (Creppy, 2002;). As aflatoxinas podem causar maiores danos aos seres humanos e animais devido a sua alta toxidez e ampla ocorrência, possuindo propriedades carcinogênicas, mutagênicas, teratogênicas (Sylos et al., 1996) e imunossupressoras (Nordin e Luchese, 1998). Quando os animais ingerem alimentos contaminados, as aflatoxinas são metabolizadas, biotransformadas e transferidas para os produtos, como por exemplo, o leite, tornando-se, conseqüentemente, um risco para a saúde humana (Bruerton, 2001).

A aflatoxina M1 é um metabólito hidroxilado da aflatoxina B1 e pode ser encontrada em leite e seus derivados provenientes de animais que ingeriram ração contaminada (Creppy, 2002). Apesar de a maioria dos relatos disponíveis na literatura indicarem que a aflatoxina B1 é completamente convertida em aflatoxina M1, há trabalhos demonstrando que é possível encontrar aflatoxina B1 no leite (Scaglioni et al., 2014; Gonçalves et al., 2018), o que vem a justificar o interesse desta verificação, uma vez que sua toxicidade é maior que a aflatoxina M1 (Zain, 2011).

O Brasil é grande produtor de matérias-primas agrícolas, no entanto, as condições climáticas do país facilitam o desenvolvimento de espécies de fungos toxigênicos, favorecido por umidade e temperatura elevadas (Lillejoh, 1991), que possibilita a produção de micotoxinas. Também ocupa a quinta colocação entre os principais países produtores de leite de vaca do mundo, com produção aproximada de 34 bilhões de litros em 2018 (IBGE, 2019). Desta forma, pesquisas sobre a incidência de aflatoxina M1 em leite produzido no Brasil a fim de avaliar a concordância dos níveis de contaminação com a legislação vigente determinada pela RDC da ANVISA nº7 de 2011, que estabelece que o valor máximo de aflatoxina M1 no leite fluído deve ser $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$, tornam-se muito importantes, bem como a avaliação da presença de aflatoxina B1. Assim, o objetivo deste trabalho foi analisar a ocorrência de aflatoxinas B1 e M1 em amostras de leite cru obtidos de produção intensiva.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Amostragem

Foram coletadas amostras de leite cru refrigerado provenientes de 12 rebanhos leiteiros localizados nas regiões centro-leste e nordeste do Rio Grande do Sul, totalizando 21 amostras. Os animais eram mantidos em confinamento e a dieta era composta por silagem de milho, feno de tifton, casca de soja, farelo de soja, ração comercial (concentrado proteico-energético) e suplemento mineral, homogeneizada em vagão forrageiro. A ordenha era realizada duas vezes ao dia, pela manhã e ao final da tarde, enquanto que os alimentos eram fornecidos três vezes ao dia. Os animais possuíam livre acesso aos alimentos e água, saindo do galpão de confinamento apenas no horário das ordenhas.



As coletas foram realizadas no período de novembro de 2017 a março de 2018. As amostras de leite cru refrigerado eram coletadas diretamente no tanque de expansão, após a ordenha de todos os animais. Antes de proceder a coleta das amostras o leite era agitado por 10 min, acionando-se o sistema de agitação do tanque.

2.2 Extração de aflatoxinas B1 e M1

A extração foi realizada pelo método de QuEChERS, descrito por Gonçalves et al. (2018). Primeiramente, os tubos contendo 30 mL de leite foram centrifugados por 5 min a 3000 x g para remoção da camada superior de gordura. Esse procedimento foi realizado três vezes para cada amostra. Depois, 5 mL de leite foram adicionados de 10 mL de hexano e 15 mL de acetonitrila acidificada (1% ácido acético, v/v) e submetidos à agitação manual durante 1 min. Após, foram adicionados à mistura 6 g de sulfato de magnésio anidro e 1,5 g de cloreto de sódio e os tubos foram imediatamente agitados em vórtex durante 1 min e 30 s, para, então, serem centrifugados a 2330 x g durante 7 min. A fase orgânica contendo hexano foi removida e uma alíquota de 5 mL da fase contendo acetonitrila foi recolhida em frasco âmbar e submetida a secagem a 50°C em banho-maria. Os extratos secos foram mantidos a -4°C até o momento da quantificação das aflatoxinas. As extrações foram realizadas em triplicata para cada amostra.

2.3 Quantificação de aflatoxinas B1 e M1

A exatidão do método foi avaliada através de ensaios de recuperação fortificando as amostras de leite com os padrões de AFM1 e AFB1, em três níveis de concentração (0,5; 2,5 e 5,0 µg L⁻¹). As alíquotas dos padrões foram adicionadas aos tubos falcon, evaporadas sob fluxo de nitrogênio e posteriormente foram adicionados 5 mL de leite que passaram pelo processo de extração. Após, foram quantificadas por cromatografia líquida de alta eficiência com detector de fluorescência (HPLC-FI). A porcentagem de recuperação foi obtida através da Equação 1:

$$R(\%) = \frac{(C1 - C2) \times 100}{C3} \quad (1)$$

Onde: R(%) = porcentagem de recuperação; C1 = concentração determinada na amostra fortificada; C2 = concentração determinada na amostra não fortificada e C3 = concentração do padrão utilizado para a fortificação.

A quantificação foi realizada utilizando cromatógrafo líquido de alta eficiência acoplado a detector de fluorescência com derivatizador pós coluna fotoquímico (Romer Derivatization Unit RDU TM), processamento no software LC Solution, coluna Kromasil C18 (5 µm, 15 cm x 4,6 mm), com vazão de fase móvel de 1 mL min⁻¹ e temperatura do forno de 40°C. Os comprimentos de onda de excitação e emissão foram 370 e 410 nm, respectivamente, o volume de injeção da amostra de 20 µL e o tempo da análise cromatográfica foi de 12 min. Os extratos foram eluídos em uma fase móvel composta por acetonitrila: metanol: água ultrapura (24:15:60, v/v). O composto foi identificado com base no tempo de retenção relacionando com os padrões de aflatoxinas M1 e B1 (6,6 e 11,3 min, respectivamente) e, para confirmação, foi realizada co-cromatografia adicionando solução padrão à amostra, que promoveu o aumento de sinal.

Previamente, foi verificada a interferência significativa quando utilizada a curva no solvente; portanto, utilizou-se a curva na matriz com concentrações que variaram de 0,25 a 8,0 µg L⁻¹. Para determinação do limite de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ) foram feitas injeções de diferentes concentrações da solução padrão de trabalho, até que se obtivesse uma relação de 3:1 e 10:1, respectivamente, entre o pico do analito e o ruído da linha de base (Comissão Europeia 2006/401/EC).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os percentuais de recuperação de aflatoxinas do método empregado foram de 80% para aflatoxina B1 e de 103% para aflatoxina M1, estando dentro do limite recomendado pela Comissão Europeia para ensaios de recuperação de micotoxinas (70 a 110%) (2006/401/EC). Os valores de LOD ($0,038 \mu\text{g L}^{-1}$ para aflatoxina M1 e $0,027 \mu\text{g L}^{-1}$ para aflatoxina B1) e LOQ ($0,125 \mu\text{g L}^{-1}$ para aflatoxina M1 e $0,083 \mu\text{g L}^{-1}$ para aflatoxina B1) foram considerados satisfatórios, apresentando valor inferior ao legislado para a aflatoxina M1 em leite no Brasil ($0,5 \mu\text{g L}^{-1}$). Os coeficientes de correlação das curvas analíticas foram respectivamente 0,99 e 0,98 para aflatoxinas M1 e B1. A Tabela 1 apresenta os resultados de contaminação por aflatoxinas B1 e M1 nas amostras de leite analisadas.

Tabela 1. Contaminação das amostras de leite cru obtidas de produção intensiva por aflatoxinas B1 e M1

AMOSTRAS	Aflatoxina B1 ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Aflatoxina M1 ($\mu\text{g L}^{-1}$)
1	nd	$3,41 \pm 0,24$
2	nd	$3,44 \pm 0,31$
3	nd	$0,76 \pm 0,07$
4	nd	$2,02 \pm 0,31$
5	nd	$1,51 \pm 0,19$
6	nd	nd
7	nd	$0,38 \pm 0,01$
8	nd	nd
9	nd	nd
10	nd	nd
11	nd	nd
12	nd	nd
13	nd	nd
14	nd	$4,37 \pm 0,59$
15	nd	$0,82 \pm 0,01$
16	nd	$0,46 \pm 0,05$
17	nd	$2,09 \pm 0,01$
18	nd	$1,29 \pm 0,04$
19	nd	nd
20	nd	$0,76 \pm 0,02$
21	nd	nd

nd = não detectado;

Aflatoxina B1 não foi detectada em nenhuma das amostras avaliadas e aflatoxina M1 foi encontrada em 57% das amostras, variando de $0,38$ a $4,37 \mu\text{g L}^{-1}$, sendo que 83% das amostras contaminadas estavam com valores acima do limite máximo permitido pela legislação brasileira que é $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$ para leite fluído. Esta ocorrência sugere que os animais foram alimentados com rações contaminadas com aflatoxina B1, provavelmente devido a falhas no controle das condições de armazenamento desses produtos. Isso reforça a necessidade da aplicação de boas práticas agrícolas como medida para reduzir a contaminação do leite por aflatoxina M1 através do controle dos produtos destinados a alimentação animal.



4. CONCLUSÕES

A aflatoxina B1 não foi detectada em nenhuma das amostras avaliadas e a aflatoxina M1 foi encontrada em 12 amostras, destas, apenas 2 amostras estavam com valores abaixo do limite máximo permitido pela legislação brasileira que é $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$ para leite fluido.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bruerton, K. (2001) Finding practical solutions to mycotoxins in commercial production: a nutritionist's perspective. In Proceedings of *Alltech's 17th Annual Symposium*. 2001. p.161-168.
- Castagnetti, G. B., Delmonte, P., Melia, S., Gori, A., & Losi, G. (2008). The effect of extruded whole linseed flour intake on the variation of CLA (Conjugated Linoleic Acid) content in milk-The Reggiana cattle's case. *Progress in Nutrition*, 10(3), 174-183.
- Creppy, E. E. (2002). Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe. *Toxicology letters*, 127(1-3), 19-28.
- Gonçalves, K.D.M.; Sibaja, K.V.M.; Feltrin, A.C.P.; Remdi, R.D.; Garcia, S.O.; Garda-Bufferon, J. (2018) Occurrence of aflatoxins B₁ and M₁ in milk powder and UHT consumed in the city of Assomada (Cape Verde Islands) and southern Brazil. *Food Control*, v.93, p. 160-164.
- IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. IBGE, Diretoria de Pesquisas, Coordenação de Agropecuária, Pesquisa da Pecuária Municipal, disponível em: <<https://www.ibge.gov.br/>>. Acesso em 18 de março de 2019.
- Kwiatkowski, A.; Alves, A. P. F. (2007) Importância da detecção e do controle de aflatoxinas em alimentos. *Revista de Saúde e Biologia*, v.2, p.44-53.
- Lillejoh, E.B. Aflatoxins: an ecologically elicited genetic activation signal. In: Smith, JE, Henderson S. *Mycotoxins and Animal Foods* (1991). Boca Ratón: Eds. CRC Press.
- Nordin, N.; Luchese, R. H. (1998) Detecção de aflatoxina e zearalenona em milho (*Zea mays*), destinado à alimentação animal. *Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia dos Alimentos*, v.32, n.1, p.35-39.
- Santilli, A.B.; De Camargo, A.C.; Nunes, R.S.; Da Gloria, E.M.; Machado, P.F.; Cassoli, L.D.; Calori-Domingues, M.A. (2015) Aflatoxin M₁ in raw milk from different regions of São Paulo state-Brazil. *Food Addit Contam Part B Surveill*, v. 8, p. 2007-2014.
- Scaglioni, P.T.; Algeri-Becker, T.; Drunkler, D.; Badiale-Furlong, E. (2014). Aflatoxin B₁ e M₁ em leite. *Analytica Chimica Acta*, v. 829, p. 68-74.
- Sylos, C. M.; Rodriguez-Amaya, D. B. (1996) Estudo comparativo de métodos para determinação de aflatoxina M1. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, v.56, p.87-97.
- Zain, M.E. (2011) Impact of mycotoxins on humans and animals. *Journal of Saudi Chemical Society*, v.15, p.129-144.