**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Mensuração de Biomarcador de Exposição às
Aflatoxinas em Fluidos Biológicos**

Alessandra de Cássia Romero

**Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestre em Ciências. Área de concentração: Ciência
e Tecnologia de Alimentos**

**Piracicaba
2007**

Alessandra de Cássia Romero
Bacharel em Ciências dos Alimentos

**Mensuração de Biomarcador de Exposição às
Aflatoxinas em Fluidos Biológicos**

Orientador:
Prof. Dr. **EDUARDO MICOTTI DA GLORIA**

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestre em Ciências. Área de concentração: Ciência e
Tecnologia de Alimentos

Piracicaba
2007

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP

Romero, Alessandra de Cássia

Mensuração de biomarcador de exposição às aflatoxinas em fluidos biológicos /
Alessandra de Cássia Romero. - - Piracicaba, 2007.
90 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2007.
Bibliografia

1. Aflatoxinas 2. Biomarcadores 3. Consumo alimentar 4. Leite humano 5. Toxicologia
de alimentos 6. Urina I. Título

CDD 615.95292

“Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor”

DEDICATÓRIA

Dedico essa conquista a minha melhor definição de amor: MINHA FAMÍLIA,

à meu avô (<i>in memorian</i>): José Gomes	por sua herança maior: dignidade, honra e amor... Me ensinou a viver um pouco melhor, mesmo em seus piores momentos de vida;
à minha avó (<i>in memorian</i>): Clarisse Z. Fernandes Gomes	o melhor abraço do mundo e a ausência ainda mais marcante que sua presença;
à minha irmã: Daniele Romero De Nadai	nem oposta nem igual... Complementar. Minha outra edição, revisada;
à meu irmão: Rafael Wilton Romero	O mesmo menino de ontem, mas com coragem para conquistar tudo o que quiser;
à meu pai: Sidnei Francisco Romero	vinho amadurecido em todas as suas notas. Caráter acima de tudo;
à minha mãe: Fátima L. Gomes Romero	meu exemplo maior de força, dedicação e amor. Minha amiga (Fatí) e tão incondicionalmente mãe.

**DEDICO E AGRADEÇO PELOS MOMENTOS NOS QUAIS, MESMO ESTANDO AUSENTE,
VOCÊS SEMPRE ESTIVERAM COMIGO.**

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus, meu primeiro Autor em tudo,

Ao Dr. Eduardo Micotti da Gloria pela orientação e apoio incondicional, sempre;

À colega Tânia Rachel Barone Ferreira pelo empenho e dedicação nas horas mais importantes;

Aos amigos de todas as horas, pelo carinho e amizade: Maria Antonia Calori-Domingues (Tota), Ivani Zambello, Francisca Regina da Silva (Fran), a todos os amigos do Laboratório de Micotoxinas, Mariana S. Danelon e família;

À todas as pessoas que participaram deste trabalho como doadoras – Muito obrigada! Sem vocês, essa pesquisa não teria sido possível.

Às Comunidades de Santa Olímpia e Santana, pela acolhida calorosa);

Aos coordenadores e funcionários do Banco de Leite do “Hospital dos Fornecedores de Cana” de Piracicaba-SP;

Aos coordenadores e funcionários do Banco de Leite do “Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher” de Campinas-SP (CAISM/Unicamp);

À todos os funcionários do Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição e aos colegas do curso de Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos;

À bibliotecária Maria da Glória Eloi da Silva (Glória);

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio financeiro, através de bolsa de Mestrado concedida (processo 05/53308-6).

À todos, muito obrigada!

**“A Glória de Deus é encobrir as
cousas,mas a glória dos reis
é esquadrihá-las.”**

Pv. 25:2

SUMÁRIO

RESUMO.....	08
ABSTRACT.....	09
1 INTRODUÇÃO.....	10
2 DESENVOLVIMENTO.....	13
2.1 Definições gerais.....	13
2.2 Ocorrência de aflatoxinas em alimentos.....	16
2.3 Toxicologia das aflatoxinas.....	22
2.3.1 Mecanismo de biotransformação das aflatoxinas.....	22
2.3.2 Toxicidade das aflatoxinas.....	25
2.4 Biomarcadores de exposição às aflatoxinas.....	30
2.4.1 Relação entre a presença de biomarcadores e carcinogênese.....	33
2.4.2 Biomarcador de exposição em urina e leite: aflatoxina M ₁	35
2.4.3 Metodologias analíticas para AFM ₁ em urina e leite humanos.....	41
2.5 Materiais e Métodos.....	45
2.5.1 Amostragens.....	45
2.5.2 Inquéritos alimentares.....	46
2.5.3 Análise de aflatoxina M ₁	46
2.5.3.1 Cromatografia líquida.....	46
2.5.3.2 Preparo de solução padrão para aflatoxina M ₁	47
2.5.3.3 Curva de calibração.....	47
2.5.4 Metodologia utilizada na detecção de AFM ₁ em urina humana.....	48
2.5.5 Metodologia utilizada na detecção de AFM ₁ em leite humano.....	49
2.5.6 Avaliação da metodologia.....	51
2.5.6.1 Limite de detecção e quantificação das metodologias.....	51
2.5.6.2 Testes de recuperação da metodologia.....	51
2.5.7 Confirmação da identidade da AFM ₁	52
2.5.8 Análise estatística.....	52

2.6 Resultados e Discussão.....	53
2.6.1 Curva de calibração.....	53
2.6.2 Avaliação da metodologia.....	53
2.6.2.1 Limite de detecção e quantificação para as metodologias.....	53
2.6.2.2 Teste de recuperações das metodologias.....	53
2.6.3 Confirmação da identidade da AFM ₁	55
2.6.4 Excreção de AFM ₁	57
2.6.4.1 Concentrações de AFM ₁ nas amostras de urina analisadas.....	57
2.6.4.2 Concentrações de AFM ₁ nas amostras de leite analisadas.....	59
2.6.5 Análise do consumo de alimentos de risco.....	60
2.6.6 Correlação entre concentração de AFM ₁ e consumo de produtos de risco	65
CONCLUSÕES.....	66
REFERÊNCIAS.....	67
ANEXOS.....	83

RESUMO

As aflatoxinas são substâncias naturais que apresentam efeitos tóxicos aos humanos e são reconhecidamente carcinogênicas. Estas substâncias podem estar presentes na dieta humana ou, em casos específicos, no ar respirado. Desta maneira, a exposição humana às aflatoxinas é objeto de muita preocupação. Uma das maneiras mais eficazes de avaliar a exposição humana as aflatoxinas é através da mensuração da presença de biomarcadores da exposição a estas substâncias em fluidos biológicos. Dentre as possibilidades de biomarcadores de exposição às aflatoxinas tem-se que aflatoxina M₁ (AFM₁), presente na urina e leite humano, é considerada um biomarcador válido. Assim sendo, o objetivo deste trabalho de pesquisa foi avaliar a presença de AFM₁ em amostras de urina provenientes de indivíduos residentes na região urbana e rural da cidade de Piracicaba-SP, assim como, de leite de gestantes de Piracicaba e cidades da região. Nos indivíduos doadores de amostras de urina foi levantado também o padrão de ingestão de alimentos com alto risco de conter aflatoxinas, através da aplicação de inquéritos de frequência alimentar e recordatórios 24 horas. A análise de AFM₁ em urina e leite foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detecção por fluorescência. A extração e purificação do extrato foram realizadas com auxílio de colunas de imunoafinidade. No total 69 amostras de urina e 18 de leite foram analisadas. Entre as amostras de urina detectou-se a presença de AFM₁ em 54 (78%) das amostras, com concentrações variando de 1,8 até 39,9 pg/mL. Não foi observada diferença estatística entre as concentrações médias detectadas entre urinas de indivíduos da zona urbana e rural, bem como no nível de consumo de produtos de risco. Apesar das concentrações de AFM₁ detectadas serem inferiores as concentrações médias reportadas em outros países a frequência de amostras positivas foi bastante elevada mostrando que as populações estudadas estão sendo expostas às aflatoxinas. Assim, melhores avaliações dos níveis de exposição necessitam ser realizados considerando que a amostragem utilizada foi pontual, pode existir variação de contaminação sazonal com aflatoxinas na dieta e a contaminação é heterogênea dentro no alimento. Não foi observada uma correlação entre o nível do consumo de produtos de risco e as concentrações detectadas em amostras de urina. Apenas uma amostra de leite apresentou contaminação detectada; entretanto, o nível de contaminação estava entre o limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ).

Palavras-chave: Aflatoxinas, Exposição, Aflatoxina M₁, Biomarcador, Urina, Leite humano, Consumo alimentar

ABSTRACT

Aflatoxins are natural substances that present toxic and carcinogenic effects to humans. These substances may be present in human diet or, in specific cases, in the breathing air. Thus, the human exposition to aflatoxins is object of concern. One of the most effective ways to evaluate human exposition to aflatoxins is to measure the presence of biomarkers in biological fluids. Among the possibilities of aflatoxin presence biomarkers, the aflatoxin M₁ (AFM₁), present in human urine and milk, is considered a valid biomarker. The objective of this work was to evaluate the presence of AFM₁ in urine samples from individuals who live in urban and rural areas in the county of Piracicaba, state of São Paulo, Brazil, and in milk of pregnant women from Piracicaba and neighbor cities. Urine-donor individuals were researched in relation to the ingestion of food with high risk of containing aflatoxins through the application of a food frequency questionnaire and 24-hour recall. The analysis of AFM₁ in urine and milk was performed through high-performance liquid chromatography (HPLC) with fluorescence detection. The extract purification and extraction were performed with the aid of immunoaffinity columns. Overall, 69 urine and 18 human breast milk samples were analyzed. Among urine samples, the presence of AFM₁ was detected in 54 (78%), with concentrations ranging from 1.8 to 39.9 pg/mL. No statistical difference was observed between average concentrations detected in the urine of individuals from urban and rural areas, as well as the consumption of aflatoxin risky food. Although the AFM₁ concentrations detected are lower than those reported for other countries, the frequency of positive samples was quite high, showing that the populations studied are exposed to aflatoxins. Thus, further evaluations on the exposition levels should be performed, and considering that the sampling used in this work was punctual, there may be seasonal contamination variations in diet and the contamination level is heterogeneous within a food. No correlation between the consumption of risky food and concentrations detected in urine samples was observed. Only one milk sample presented detected contamination; however, the contamination level was between the limit of detection (LOD) and the limit of quantification (LOQ).

Keywords: Aflatoxins, Exposure, Aflatoxin M₁, Biomarker, Urine, Human breast milk, Food ingestion

1 INTRODUÇÃO

A aflatoxina M_1 é um metabólito da aflatoxina B_1 produzido pelo organismo após a ingestão de alimentos contaminados e que pode ser excretada através do leite, urina e fezes humana e animal. Embora a toxicidade da AFM_1 seja cerca de 10 vezes menor do que a toxicidade da AFB_1 , a intensidade dos efeitos produzidos varia tanto em função da dose administrada quanto entre as espécies animais ou diferenças entre indivíduos (CULLEN et al., 1987; VAN EGMOND, 1994).

Existem inúmeros relatos sobre a ocorrência de aflatoxinas em alimentos destinados ao consumo humano e animal. No Brasil, destacam-se os relatos envolvendo grãos como amendoim e milho, bem como produtos que os utilizem em sua composição, além de oleaginosas como castanhas em geral ou leite e derivados (SABINO et al., 2000; RODRIGUEZ-AMAYA; SABINO, 2002; CALDAS et al., 2002; KAWASHIMA, 2004). O alimento mais citado como contaminado por aflatoxinas e com maiores concentrações é o amendoim e seus derivados, cuja amplitude de contaminação relatada atinge desde concentrações próximas a 1 até cerca de 10.000 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Alimentos como castanhas e nozes podem apresentar concentrações de contaminação tão elevadas quanto o amendoim, por ambos possuírem características semelhantes. Outro alimento bastante citado em relatos de ocorrência é o milho e seus derivados, embora as concentrações de aflatoxinas encontradas entre esses produtos estejam normalmente abaixo do valor máximo tolerado pela Legislação Brasileira, de 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$. O leite e seus derivados podem apresentar contaminação por AFM_1 , derivada da AFB_1 .

Na literatura, inúmeros estudos relatam a alta incidência de biomarcadores relacionados à ingestão de aflatoxinas e a ocorrência de Carcinoma Hepatocelular em indivíduos que apresentavam conjuntamente o vírus da hepatite B (WANG et al., 2001; BAÑUELOS et al., 2000; QIAN et al., 1994; HATCH et al., 1993; AUTRUP; WAKHISI, 1985), além de outros fatores como tempo de residência na região de alta exposição às aflatoxinas ou fatores genéticos, como o metabolismo enzimático individual, e apontam para a necessidade de reduzir a exposição às aflatoxinas como fator decisivo para a prevenção de câncer (WILD et al., 2000; SUN et al., 2002; KEW, 2003).

A análise de biomarcadores tem sido extensamente utilizada para estimar a exposição às aflatoxinas de uma população, bem como para tentar estabelecer a correlação entre essa exposição e a incidência de doenças (HATCH et al., 1993; BAÑUELOS et al., 2000).

Em Taiwan, a análise da excreção urinária realizada por Hatch et al. (1993) com 250 pessoas resultou em concentrações entre 0,003 a 0,108 ng/mL. Os dados obtidos por Cheng et al. (1997), com pessoas residentes na China e em Taiwan resultaram em 64 e 66% de positividade, com concentrações entre 3,2 e 108 ng/12 horas e 2,7 a 17 ng/12 horas, entre residentes na China e Taiwan, respectivamente. Em Serra Leone, na África, as concentrações relatadas estão entre 0,1 e 374 ng/mL, segundo o estudo de JONSYB-ELLIS (2000). Na República de Gana, as concentrações relatadas por Jolly et al. (2006) atingiram concentrações máximas próximas a 12 ng/mg de creatinina. Na República Theca, Malir et al. (2006) numa revisão sobre o monitoramento de alimentos e biomarcadores relata a ocorrência de AFB₁ em 57,6% das amostras de urina analisadas, com concentrações entre 0,019 e 19,219 ng/g de creatinina. Nos Emirados Árabes Unidos, a análise de amostras de sangue do cordão umbilical de lactentes e de leite humano de lactantes indicou a excreção de 0,053 e 3,4 ng/mL, em 92% das amostras. No Egito, amostras de leite demonstraram a contaminação em 35,5% das amostras, com concentrações entre 0,005 e 5,0 ng/mL.

No Brasil os relatos sobre biomarcadores de exposição às aflatoxinas são escassos. Scussel et al. (2004) analisou amostras de sangue de 50 doadores de sangue de um banco de sangue São Paulo e constataram a presença de AFB₁-lisina em 62% das amostras analisadas, em concentrações entre 0,0036 e 0,57 µg/mg. Os valores das concentrações obtidas nesse estudo sugerem que o Brasil apresenta uma situação intermediária com relação à exposição às aflatoxinas. Isto segundo os autores, considerando que as concentrações obtidas são menores do que as encontradas em regiões de alto risco de exposição, como África, e maiores do que os valores encontrados em regiões da Europa, onde a exposição é baixa. Os valores de concentração observados indicam uma exposição compatível com regiões como Tailândia e Bangladesh. Navas (2003) relata a análise de 50 amostras de leite humano coletadas em um banco de leite humano em São Paulo. Apenas uma amostra

apresentou contaminação com concentração de 0,024 ng/mL. O limite de quantificação para a metodologia utilizada foi de 0,01 ng/mL.

Este trabalho teve por objetivo mensurar a exposição às aflatoxinas entre pessoas residentes na zona urbana e rural de Piracicaba-SP, através da análise dos fluidos biológicos leite e urina, bem como avaliar as diferenças na dieta alimentar entre esses dois grupos com relação ao consumo de alimentos considerados como sendo de risco para contaminação por aflatoxinas, segundo relatos da literatura. Foram coletadas amostras de urina e leite humanos entre novembro de 2006 e Junho de 2007.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 Definições Gerais

As micotoxinas são metabólitos secundários de fungos, que podem exercer efeitos tóxicos em animais e humanos. As aflatoxinas são micotoxinas produzidas pelo metabolismo de espécies fúngicas do gênero *Aspergillus spp.* e são consideradas potentes carcinógenos hepáticos para várias espécies animais e humanos. As aflatoxinas podem ser produzidas por *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus*, *Aspergillus nomius* e *Aspergillus pseudotamarii*, entretanto, apenas *A. flavus* e *A. parasiticus* apresentam interesse por serem contaminantes de inúmeros alimentos e produtos agrícolas (COUNCIL FOR AGRICULTURAL SCIENCE AND TECHNOLOGY, 2003) e por produzirem as aflatoxinas B₁ e B₂ e B₁, B₂, G₁ e G₂, respectivamente (HESSELTINE et al., 1970). A distinção das quatro substâncias acima descritas foi realizada baseando-se na sua fluorescência e mobilidade cromatográfica. As aflatoxinas M₁ e M₂ são substâncias derivadas da metabolização das aflatoxinas B₁ e B₂ e podem ser excretadas no leite de animais ou humanos que tenham ingerido alimentos contaminados por AFB₁ e AFB₂ (COUNCIL FOR AGRICULTURAL SCIENCE AND TECHNOLOGY, 2003).

A estrutura das aflatoxinas B₁ e G₁ foi determinada por Asao et al. (1963), enquanto B₂ foi determinada por Chang et al. (1963). As aflatoxinas são classificadas quimicamente como bisfuranocumarinas derivadas de um decacetídeo pela via biossintética dos policetídeos, no qual a unidade C₂ é perdida durante a formação dos anéis bisfuranos (SMITH; MOSS, 1985).

As aflatoxinas apresentam-se extremamente fluorescentes sob luz ultravioleta de ondas longas, o que permite sua quantificação em concentrações reduzidas e fornece a fundamentação para quase todos os métodos de detecção e quantificação. As aflatoxinas são altamente solúveis em solventes moderadamente polares, como o clorofórmio e metanol e, como substâncias puras, são altamente estáveis a elevadas temperaturas (WHO, 1979).

As aflatoxinas são substâncias altamente tóxicas, com ação biológica carcinogênica e mutagênica (ROEBUCK; MAXUITENKO, 1994) e foram descritas como potentes carcinógenos do grupo 1A pelo International Agency for Research on Cancer (IARC) em 1993 (IARC, 1993).

A AFM₁ é menos carcinogênica do que a aflatoxina B₁. Inúmeros autores estudaram os efeitos da AFM₁ em diversos animais e observaram que a toxicidade da AFM₁, assim como da AFB₁, varia tanto em função da dose administrada quanto entre as espécies animais (VAN EGMOND, 1994).

O conjunto de efeitos tóxicos na saúde humana e animal produzido pela ingestão de micotoxinas é denominado micotoxicose. A intensidade dos efeitos tóxicos produzidos depende de inúmeros fatores, tais como a toxidez da micotoxina e extensão da exposição, bem como fatores individuais como idade, estado nutricional e metabolismo e possíveis efeitos sinérgicos com outros agentes químicos aos quais o organismo tenha sido exposto (PERAICA et al., 1999; CULLEN; NEWBERNE, 1994).

O crescimento fúngico e a contaminação por micotoxinas são consequência da interação entre fungos, hospedeiro e ambiente. A combinação apropriada destes fatores determina a infecção, a colonização do substrato e o tipo e quantidade das micotoxinas produzidas (COUNCIL FOR AGRICULTURAL SCIENCE AND TECHNOLOGY, 2003).

A produção de micotoxinas em grãos, depende de inúmeros fatores físicos, como temperatura, luminosidade, aeração, danos mecânicos, longo período de armazenagem, presença de regiões com temperatura elevada na massa de grãos causada pelo desenvolvimento de microrganismos e insetos, além de fatores químicos, como a composição do substrato, pH, teor de oxigênio e gás carbônico do ambiente, atividade de água, presença de fungistáticos e fatores biológicos, como por exemplo, a linhagem fúngica toxigênica e quantidade de esporos viáveis, a competição e degradação microbianas e a presença de insetos. Outros fatores podem influenciar a produção de micotoxinas, tais como a resistência genética da variedade plantada e quaisquer fatores estressantes exercidos sobre o alimento (JARVIS, 1971; BULLERMAN et al., 1984).

Dentre os fatores citados, os mais importantes para o crescimento fúngico e produção de micotoxinas são a temperatura, a atividade de água e o teor de oxigênio presente. A atividade de água e a temperatura são fatores fortemente relacionados, sendo que os valores mínimos e máximos para crescimento e/ou produção de micotoxinas depende do valor assumido pelo outro parâmetro (NORTHOLT et al., 1996).

A principal rota de exposição geralmente ocorre através da ingestão de alimentos contaminados com micotoxinas, entretanto, a exposição pode ocorrer por contato com a pele ou por inalação (COUNCIL FOR AGRICULTURAL SCIENCE AND TECHNOLOGY, 2003).

Diversos países estabeleceram limites para presença de micotoxinas em alimentos e produtos agrícolas. Em 2003, 99 países possuíam regulamentação para micotoxinas. As aflatoxinas são as micotoxinas mais regulamentadas, sendo que 76 países adotaram concentrações máximas permitidas para a presença de aflatoxinas totais em alimentos. A AFM₁ é regulamentada em 60 países, com concentrações toleradas desde não detectáveis a até 15 µg/kg. A maioria dos 60 países com regulamentação adota limites entre 0,05 (34 países) e 0,5 µg/kg (23 países) (FAO, 2004).

No Brasil, somente as aflatoxinas têm limite para o nível de sua presença em alimentos ou produtos agrícolas estabelecidos por norma legal pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e pelo Ministério da Saúde. Segundo a norma do MAPA, são permitidas concentrações de até 20 µg/kg para a somatória das aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂ em milho, amendoim e seus derivados para serem comercializados e de 0,5 e 5,0 µg/kg de aflatoxina M₁, para leite fluído e em pó, respectivamente (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, 1996). Em 2002, o Ministério da Saúde publicou no Diário Oficial da União a Resolução RDC 274, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Anvisa, de 15 de outubro de 2002, estabelecendo limites máximos permitidos para a contaminação por aflatoxinas em amendoim, milho e seus derivados. Nesta norma foram mantidos os limites e os produtos regulamentados pelo MAPA em 1996 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2002).

A União Européia fixou limites máximos para a presença de aflatoxina em grãos em concentrações que foram de 2 a 8 $\mu\text{g/kg}$ para B_1 em amendoim, nozes, frutas secas e cereais, bem como seus derivados destinados ao consumo humano, e concentrações entre 4 e 15 $\mu\text{g/kg}$ para a soma das quatro toxinas. O limite proposto para aflatoxina M_1 em leite foi de 0,05 $\mu\text{g/kg}$ (EUROPEAN COMMUNITIES, 1998).

2.2 Ocorrência de Aflatoxinas em Alimentos

A contaminação por micotoxinas em alimentos destinados ao consumo animal e humano tem sido frequentemente relatada pela literatura nacional e internacional ao longo das últimas décadas e pode ocorrer tanto em alimentos *in natura* como em alimentos processados.

Williams et al. (2004), numa revisão sobre aflatoxinas em países em desenvolvimento observaram que países como Índia, China, Ásia e América Central apresentam 66% dos 1,2 bilhões de pessoas apresentando alto risco de exposição às micotoxinas por ingestão de alimentos contaminados. Neste estudo, os produtos derivados de amendoim, milho e sorgo são citados como exemplos de alimentos com maior frequência de contaminação por aflatoxinas no Brasil.

Existem relatos sobre a ocorrência de contaminação por aflatoxinas em inúmeros produtos destinados à alimentação humana, tais como amendoim, milho e trigo, bem como seus derivados e leite, ovos, arroz, nozes e castanhas entre outros (RODRIGUEZ-AMAYA; SABINO, 2002; SILVA et al., 2002; CALDAS et al., 2002; SIMIONATO et al., 2003; SILVA, 2005; OLIVEIRA et al., 2006).

Estudos realizados no Brasil demonstram que os produtos derivados de milho e amendoim são altamente implicados em casos de ocorrência de micotoxinas, especialmente com relação à ocorrência de aflatoxinas (VALE, 1992; GLORIA et al., 1997; FONSECA et al., 1998; SHUNDO; SILVA, 2000; FARIAS et al., 2000; MACHINSKY JUNIOR et al., 2001; SANTOS et al., 2001; BITTENCOURT, 2002; CALDAS et al., 2002; OLIVEIRA et al., 2002; KAWASHIMA, 2004; GLORIA et al., 2006).

Vale (1992) analisaram a presença de aflatoxina B₁ em 70 amostras de milho pipoca coletadas na cidade de Fortaleza e provenientes, em sua maioria, do Estado do Ceará. Aproximadamente 16,5% das amostras apresentaram contaminação, com concentrações variando entre 22 a 130 µg/Kg.

Gloria et al. (1997) investigaram para presença de aflatoxinas, zearalenona, ocratoxina A em 292 carregamentos de milho que chegaram a uma indústria alimentícia localizada no Estado de São Paulo. Somente as aflatoxinas foram detectadas em 33,2% das amostras e a concentração variou de 2 a 89 µg/kg para a aflatoxina B₁.

Bittencourt (2002) analisou amostras de produtos como, fubá e farinha de milho comercializado no município de São Paulo. Embora tenha encontrado a presença de fungos do gênero *Aspergillus* em 96,6% das amostras, não houve contaminação por aflatoxinas nessas amostras. Em estudo semelhante, Farias et al. (2000) analisaram amostras de milho em grãos coletados no Paraná, visando identificar seu potencial toxigênico. Dentre os 109 isolados de fungos *Aspergillus flavus*, 103 apresentaram produção de aflatoxinas.

Em trabalho realizado no estado de São Paulo, Machinsky Júnior et al. (2001) analisaram amostras de milho recém-colhido e encontraram contaminação em 54,5% das amostras, com concentrações entre 6 e 1.600 µg/kg para aflatoxina B₁.

Caldas et al. (2002) relataram a ocorrência de aflatoxinas em alimentos como derivados de amendoim e milho, farinhas e castanhas comercializados no Distrito Federal, no período entre 1998 e 2001. Dentre as 366 amostras analisadas, houve uma maior incidência de contaminação entre amostras de milho em grão, seguida pelos derivados de amendoim, castanhas e milho pipoca, embora tenha sido o amendoim o produto com maiores concentrações detectadas.

Kawashima (2004) analisou a presença de aflatoxinas em produtos a base de milho adquiridas no comércio de Recife-PE, no período de 1999 a 2001. Apenas 6,75% das amostras analisadas apresentaram contaminação por aflatoxinas.

Inúmeros trabalhos relatam à ocorrência de aflatoxinas em milho *in natura* e em fubá e farinha, entretanto, a contaminação também pode ocorrer em outros produtos

processados à base de milho, tais como curau, polenta pronta e pré-cozida, quirera, canjica e canjiquinha, pipoca, flocos de milho, pipoca açúcarada e salgadinho (AMARAL et al., 2006; KAWASHIMA; SOARES, 2006), em concentrações que variam de valores inferiores a 1 µg/kg até 20 µg/kg.

Fonseca et al. (1998) relataram o resultado da análise de aflatoxinas em 1.115 amostras de amendoim *in natura* proveniente de diversas regiões do Estado de São Paulo. A percentagem de contaminação variou de 9 a 59% e a percentagem de amostras com nível acima de 30 µg/kg variou de 4,5 a 25%, indicando uma variação na qualidade do amendoim, muito provavelmente devido às variações climáticas entre os anos. A concentração média das amostras contaminadas, somando as aflatoxinas B₁ e G₁ foi de 948 µg/kg em 1990; 272 µg/kg em 1991; 327 µg/kg em 1992; 256 µg/kg em 1993; 143 µg/kg em 1994 e 63 µg/kg nos anos de 1995 e 1996.

Sabino et al. (2000) apresentaram resultados do monitoramento da contaminação por aflatoxinas em derivados de amendoim no período de 1980 a 1999, constatando que a ocorrência de contaminação nesse período ainda apresentou um risco de exposição às aflatoxinas pela ingestão desses tipos de alimentos investigados. Durante este monitoramento, foram analisadas 2.129 amostras e as concentrações encontradas estavam entre 2 µg/kg e 10.935 µg/kg. No ano de 1999, 10% das amostras investigadas apresentaram contaminação acima de 183 µg/kg.

Na cidade de Marília-SP foram investigadas 57 amostras de amendoim e seus derivados, que foram coletadas de março a outubro de 1999. Aproximadamente 71,9% das amostras estavam contaminadas e 47,9% excederam as concentrações estabelecidas pela legislação brasileira. A concentração de aflatoxinas nas amostras variou de 3 a 659 µg/kg (SHUNDO; SILVA, 2000).

Oliveira et al. (2002) verificaram a incidência de aflatoxinas em produtos como amendoim e seus derivados, comercializados em cidades do Estado de Minas Gerais, no período entre 1998 e 2000. Dentre as 120 amostras analisadas, 55% apresentaram contaminação com uma concentração média de 960 µg/kg.

Santos et al. (2001) relataram o monitoramento realizado pela Vigilância Sanitária em Ribeirão Preto, entre 1996 e 2000, quando foram coletadas 178 amostras

de amendoim e produtos derivados. Dentre as amostras, os autores ressaltam que 39,3% apresentaram contaminação por aflatoxinas, com concentrações desde 5 µg/kg, limite de detecção observado utilizada, até superiores a 30 µg/kg, limite então vigente para a soma das aflatoxinas B₁+G₁, segundo norma do Ministério da Saúde.

Gloria et al. (2006) analisaram amostras de produtos derivados de amendoim comercializados na cidade de Piracicaba-SP e constataram contaminação em 25% das 297 amostras. A concentração da contaminação por aflatoxinas esteve entre 1 e 346 µg/kg em produtos como amendoim japonês, ovinhos de amendoim, doces de amendoim e paçoca.

A aflatoxina M₁ é uma toxina produzida no organismo após a ingestão de alimentos contaminados por AFB₁ e é excretada no leite, urina e sangue, mas que também pode ser ingerida diretamente, através do consumo de leite contaminado. Inúmeros autores relatam a ocorrência de aflatoxina M₁ em leite bovino, bem como em leite humano (ZARBA et al. 1992; SAAD et al., 1995; EL-NEZAMI et al., 1995; OLIVEIRA et al., 1997; ABDULRAZZAQ et al., 2003; GARRIDO et al., 2003; GONZALEZ et al., 2005; PEREIRA et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2006; BAGGIO et al., 2006; SHUNDO; SABINO, 2006; OLIVEIRA; FERRAZ, 2007).

Oliveira et al. (1997) avaliaram a presença de AFM₁ em 300 amostras de leite em pó consumido por crianças em escolas municipais e creches de São Paulo e encontraram contaminação em 33 amostras, com concentrações entre 0,1 e 1,0 ng/mL. Os autores estimaram a ingestão de AFM₁ média utilizando os dados de consumo de leite entre crianças de 4 meses que é considerado elevado e obtiveram uma ingestão média diária de aflatoxinas de 3,7 ng/kg peso corpóreo (p.c.). Embora a estimativa de ingestão de AFM₁ obtida neste estudo ultrapasse os valores de ingestão diária toleráveis (IDT) propostos por Kuiper-Goodman (1990), obtidos com base em estudos com modelo animal e utilizando um fator de segurança de 50.000, de 0,2 ng/kg p.c./dia, as estimativas sobre o risco de desenvolvimento de câncer pela ingestão de aflatoxinas B₁ realizadas utilizando estudos epidemiológicos indicam que a ingestão obtida constitui um baixo risco de desenvolvimento de câncer. Os autores ressaltam, ainda, que as extrapolações sobre o risco de ingestão das aflatoxinas realizadas em modelo animal,

bem como as estimativas de risco citadas utilizando estudos epidemiológicos em população adulta, não são modelos ideais para avaliar o risco da exposição às AFM₁ neste estudo, considerando que existem diferenças metabólicas entre humanos e animais e diferenças com relação ao peso e idade entre os indivíduos expostos no presente estudo e em estudos epidemiológicos.

Garrido et al. (2003) analisaram a ocorrência de aflatoxinas M₁ e M₂ em 139 amostras de leite fluido comercializado e verificaram a contaminação por AFM₁ em 20,9% das amostras, em concentrações entre 0,05 e 0,24 µg/L.

Gonçalez et al. (2005) analisaram 43 amostras de leite bovino em algumas regiões do Estado de São Paulo e constataram que 39,5% das amostras apresentaram contaminação. Dentre essas amostras 64,7% apresentaram contaminação com concentrações superiores ao permitido pela Legislação Brasileira, de 0,5 µg/L.

Pereira et al. (2005) analisaram 36 amostras de leite cru de bovinos e 34 amostras pasteurizadas. Do total de amostras analisadas, 45,7% apresentaram contaminação por aflatoxina M₁ em concentrações dentro do limite máximo tolerado, sendo que 52,8% das amostras de leite cru apresentaram contaminações com concentrações variando desde valores considerados como traços por estarem entre o limite de detecção de 0,002 µg/L e o limite de quantificação, de 0,006 µg/L, até concentrações de 0,0741 µg/L. Entre as amostras de leite pasteurizado, 38,2% apresentaram com contaminações desde traços até 0,0589 µg/L.

Oliveira et al. (2006) analisaram 48 amostras de leite do tipo A-C e UHT (Ultra High Temperature) comercializados em São Paulo, quanto à presença de aflatoxina M₁ e encontraram concentrações entre 0,011 e 0,251 µg/L, em 77,1% das amostras.

Baggio (2006) analisou 40 amostras de leite pasteurizado tipo C comercializado no Paraná e encontrou contaminação em 57,4% das amostras, todas com concentrações de aflatoxina M₁ entre 0,01 e 0,17 µg/L.

Shundo; Sabino (2006) coletaram 107 amostras de leite em pó, pasteurizado e UHT comercializados na cidade de Marília-SP, e analisaram-nas quanto à presença

da aflatoxina M_1 . Em 73,8% das amostras foram detectadas concentrações entre 0,02 e 0,26 $\mu\text{g/L}$.

Oliveira; Ferraz (2007) analisaram amostras de produtos tais como, leite pasteurizado, UHT e leite em pó comercializado na cidade de Campinas-SP quanto à presença de AFM_1 . Dentre as 36 amostras analisadas, 69,4% apresentaram contaminação por aflatoxinas M_1 com concentrações entre 0,011 e 0,161 $\mu\text{g/L}$.

Na literatura internacional, diversos autores relatam a presença de aflatoxina M_1 em leite humano (SAAD et al., 1995; EL-NEZAMI et al., 1995; ABDULRAZZAQ et al., 2003). No Brasil, entretanto, os trabalhos utilizando leite humano são escassos.

El-Nezami et al. (1995) analisaram a presença de AFM_1 em leite humano de 73 lactantes da Austrália e entre 11 lactantes da Tailândia. Dentre as amostras analisadas, foi observada uma maior ocorrência e maior concentração de AFM_1 entre lactantes da Tailândia (11 amostras, com concentrações variando entre 0,039 e 1,736 ng/mL) do que entre as lactantes da Austrália (5 amostras, cujas concentrações variaram entre 0,028 a 1,031 ng/mL). O limite de detecção de AFM_1 da metodologia utilizada foi de 0,01 ng/mL de leite.

Em Abu Dhabi, Emirados Árabes Unidos (EAU), Saad et al. (1995) investigaram a presença de AFM_1 em leite de 445 doadoras, de diversas nacionalidades que estavam hospitalizadas e observaram a presença de aflatoxina M_1 em 99,5% das amostras, com concentrações entre 0,002 e 0,003 ng/mL . As lactantes residentes nos EAU (37 participantes) apresentaram as maiores concentrações de AFM_1 , entre 0,009 e 3 ng/mL de leite. Os autores consideram que a maior concentração de AFM_1 excretada pelas lactantes dos Emirados Árabes Unidos em relação as participantes de outras nacionalidades é devida à dieta regional de Abu Dhabi, que consiste em arroz misturado com diversas espécies de nozes, especiarias como pimentas, leite e carne com pão.

Em outro estudo realizado nos Emirados Árabes Unidos, Abdulrazzaq et al. (2003) investigaram a presença de AFM_1 em leite de 140 lactantes e, também constataram alta incidência de AFM_1 no leite materno. Das amostras analisadas, 92%

(129 amostras) apresentaram AFM₁ com concentração média de 0,560 ng/mL (faixa de 0,123 a 0,940 ng/mL).

Polychronaki et al. (2006) analisaram amostras de leite de 388 lactantes egípcias, durante Setembro de 2003. Aproximadamente 36% das amostras coletadas entre as participantes apresentaram contaminação por AFM₁ com concentração média de 0,013 ng/mL.

No Brasil, Navas (2003) relata a análise de 50 amostras de leite humano coletadas no Banco de Leite Humano do Hospital Regional Sul, em São Paulo. Apenas uma amostra apresentou contaminação na concentração de 0,024 ng/mL. O limite de quantificação para a metodologia utilizada foi de 0,01 ng/mL.

2.3 Toxicologia das Aflatoxinas

2.3.1 Mecanismo de biotransformação das aflatoxinas

O mecanismo de biotransformação das aflatoxinas é um importante processo para ativar a toxicidade destas micotoxinas e foi demonstrado por Garner et al., em 1972, utilizando *Salmonella typhimurium* TA 1530, que foram cultivadas num extrato de células microsossomais preparado a partir de tecidos do fígado de roedores (GARNER et al., 1972). A ativação metabólica das aflatoxinas envolve reações de epoxidação, hidroxilação ou σ -demetilação. A maioria dos estudos destaca o metabolismo da aflatoxina B₁, por ser a mais carcinogênica e também por ser normalmente encontrada em maior concentração nos alimentos contaminados (EATON et al., 1994).

Após a ingestão, as aflatoxinas são absorvidas no trato gastrointestinal devido a sua alta lipossolubilidade e são biotransformadas no fígado por enzimas microsossomais da família do citocromo P450. As enzimas CYP3A4 são responsáveis pela produção de AFQ₁ e do 8,9 exo-epóxido, enquanto a enzima CYP1A2 forma a AFM₁ e o 8,9 endo-epóxido. Em humanos, ocorre a produção de outros metabólitos da AFB₁, tais como aflatoxicol, AFP₁, AFB_{2α} e AFB₁-2,2 dihidrodiol (IARC, 2002).

As aflatoxinas podem ser metabolizadas por hidroxilação, produzindo AFM₁ e AFQ₁ ou por epoxidação, produzindo a AFB₁-8,9-epóxido. A σ -demetilação é a rota metabólica que produz a AFP₁, consideravelmente menos tóxica que AFB₁, mas que pode ser reconvertida em compostos reativos por epoxidação. As AFB_{2 α} são provenientes da hidratação da dupla ligação do anel furano terminal da AFB₁ (EATON et al., 1994).

A ativação das aflatoxinas ocorre por epoxidação, com a atuação de um conjunto de enzimas ligadas à membrana do retículo endoplasmático, pertencentes ao sistema citocromo P450, produz AFB₁ 8,9-epóxido, nas formas endo-epóxido e exo-epóxido, que são capazes de se ligarem ao material genético (EATON et al., 1994). A formação de adutos no DNA ocorre com a ligação do 8,9-epóxido à base guanina na posição N⁷, formando a AFB₁-N⁷-guanina que é excretada na urina após se desprender da molécula de DNA. Ao se desprender da molécula de DNA, o aduto deixa sítios apurínicos que tendem a ser preenchidos por adenina, resultando na transversão de uma base guanina para timina e, conseqüentemente, na mutação do material genético (OLIVEIRA; GERMANO, 1997).

Dentre os metabólitos produzidos pela biotransformação da AFB₁, alguns podem ser revertidos em outros ou convertidos em produtos de detoxificação. O aflatoxicol pode ser reconvertido em AFB₁, enquanto tanto o aflatoxicol quanto a AFP₁ podem ser convertidos em aflatoxicol M₁ e aflatoxina M₁-P₁, respectivamente, estes, por sua vez, são potencialmente convertidas em AFM₁, ou podem ainda ser transformadas em compostos conjugados com ácido glicurônico, constituindo um produto de detoxificação. O metabólito AFB_{2 α} pode originar adutos protéicos, enquanto a aflatoxina 8,9 epóxido pode originar adutos de DNA, adutos protéicos, AFB₁-8,9 dihidrodiol ou ainda formarem conjugados com glutathione S-transferase (GSH), um produto de detoxificação. A AFM₁ pode originar conjugados com ácido glicurônico diretamente ou através da sua reversão em aflatoxicol-M₁ ou em AFM₁-P₁ (EATON et al., 1994).

A Figura 1 abaixo apresenta as etapas para biotransformação da aflatoxina B₁, bem como seus metabólitos formados.

Fonte: Eaton et al., 1994

Figura 1 – Biotransformação metabólica da AFB₁

O padrão de biotransformação, bem como os passos metabólicos, da AFB₁ varia entre as espécies animais e entre indivíduos de mesma espécie. A toxicidade das aflatoxinas também é afetada por fatores da dieta e pela ingestão de compostos quimiopreventivos (EATON et al., 1994). Bennett; Klich (2003), numa revisão sobre micotoxinas, ressaltam que as diferenças de susceptibilidade, observadas entre espécies animais e os humanos, ocorrem em função de variações no nível do sistema de glutathione transferase e do citocromo P450.

Wogan et al. (1967) realizaram um estudo utilizando AFB₁ marcada com ¹⁴C visando identificar a taxa de excreção de AFB₁ em ratos e verificaram que cerca de

80% da dose intraperitoneal foi excretada em 24 horas. A maior rota de excreção da toxina marcada ocorreu através da excreção biliar nas fezes, em cerca de 60% da dose administrada. Apenas 20% da dose inicial foram excretados através da urina.

2.3.2 Toxicidade das aflatoxinas

As aflatoxinas são substâncias altamente tóxicas, com ação biológica carcinogênica e mutagênica (ROEBUCK; MAXUITENKO, 1994). Os efeitos metabólicos das aflatoxinas incluem inibição da síntese de DNA, RNA e proteínas, redução na atividade enzimática, depressão no metabolismo das glucoses, inibição da síntese de lipídeos (incluindo fosfolipídeos, ácidos graxos livres, triglicerídios e colesterol e seus ésteres) e depressão da síntese do fator de coagulação (BUSBY; WOGAN, 1984).

Dados da literatura têm mostrado que pode haver relação entre a presença de uma micotoxina específica na dieta e o aparecimento de algumas doenças em humanos e animais. Em humanos, as aflatoxinas são consideradas como um dos fatores potencializadores do aumento de incidência de Carcinoma Hepatocelular (CHC) (WANG et al., 1996), além de apresentarem relação com a etiologia de certas doenças, tais como kwashiorkor (DE VRIES et al., 1990; HENDRICKSE, 1991). O kwashiorkor tem sido geograficamente associado com a ocorrência sazonal da contaminação e distribuição de aflatoxinas em alimentos (COUNCIL FOR AGRICULTURAL SCIENCE AND TECHNOLOGY, 2003).

Willians et al. (2004) numa revisão sobre aflatoxicose humana descreveram a atuação das aflatoxinas como carcinógenas, imunossupressoras, além de possuírem efeitos associados à modulação de doenças infecciosas, por seu caráter imunossupressor e sua atuação sobre o estado nutricional do indivíduo.

Dados da Organização Mundial da Saúde demonstram um aumento no risco de incidência de câncer de fígado com o aumento da ingestão de aflatoxinas em regiões onde existe uma maior incidência de hepatite B viral (HBV). A estimativa da potência carcinogênica das aflatoxinas apresenta resultados variáveis conforme a aproximação utilizada para a sua análise. Para calcular a potência carcinogênica das

aflatoxinas, diversos autores utilizaram modelos matemáticos associados aos dados epidemiológicos disponíveis na literatura sobre a incidência de câncer em determinadas populações expostas às aflatoxinas. A potência carcinogênica das aflatoxinas, estimada por esses autores, indica que para cada nanograma de aflatoxinas ingerida por quilograma de peso corpóreo/dia, haverá uma incidência de câncer desde 0,0018 até 0,031 casos a cada 100.000 indivíduos não portadores de HBV, e entre 0,046 até 0,43 casos de câncer a cada 100.000 indivíduos portadores de HBV (WHO, 1998).

O estudo da etiologia de determinadas doenças e o consumo de aflatoxinas tem sido relatado há mais de trinta anos, entretanto, permaneceu sem uma associação comprovada até a realização de estudos epidemiológicos que utilizassem técnicas de dosimetria molecular para micotoxinas. Estes estudos visaram quantificar a dose efetivamente metabolizada através dos biomarcadores de exposição (GROOPMAN et al., 1995).

Estudos utilizando biomarcadores de exposição têm mensurado a exposição individual às aflatoxinas, como os realizados por Qian et al. (1994) e Wang et al. (1996). O Comitê de Especialistas em Aditivos Alimentares da FAO/WHO (JECFA) tem estimado a potência carcinogênica das aflatoxinas com base em estudos como o de Yeh et al. (1989) sobre a influência do vírus da hepatite B associado à ingestão de aflatoxinas no desenvolvimento de carcinoma hepático, combinados com a média quantitativa dos biomarcadores de exposição e ingestão diária às aflatoxinas citados pela literatura. Utilizando a quantificação de biomarcadores realizada por Qian et al. (1994), a potência carcinogênica estimada para as aflatoxinas foi de 0,011 e 0,11 entre indivíduos HBV negativo e positivo, respectivamente. Utilizando os dados fornecidos pelo estudo de Wang et al. (1996), a potência carcinogênica estimada das aflatoxinas foi de 0,0082 e 0,37 para HBV negativo e positivo, respectivamente, em 100.000 indivíduos (WHO, 1998).

O quadro clínico da aflatoxicose está diretamente relacionado com o nível de contaminação do alimento e sua frequência e quantidade de ingestão, bem como a outros fatores tais como estado nutricional individual (PERAICA et al., 1999).

A toxicidade das micotoxinas pode se manifestar de maneira aguda, quando a dose ingerida é alta e os sinais clínicos ocorrem simultaneamente, podendo causar a morte do animal. Os sintomas da toxicidade aguda para as aflatoxinas incluem necrose hemorrágica do fígado, proliferação do ducto biliar, edema e letargia. Estudos com animais têm indicado duas diferentes magnitudes de dose letal de AFB₁. As espécies mais susceptíveis, como coelhos e patos apresentam doses letais menores, em torno de 0,3 mg/kg enquanto galinhas e ratos apresentam maior tolerância, com dose letal média de 18 mg/kg (WILLIAMS et al., 2004).

A dose letal (LD₅₀) varia entre as diversas espécies animais, bem como em função da idade, sexo e maneira de ingestão (via oral ou sanguínea). Em ratos, a LD₅₀ varia entre 1 a 17,9 mg/kg de AFB₁, sendo que animais mais jovens apresentam maior susceptibilidade. Entre cães adultos, a LD₅₀ varia entre 0,5 a 1,0 mg/kg enquanto para hamster e marrecos a LD₅₀ é de 10,2 e 0,37 mg/kg, respectivamente (COUNCIL FOR AGRICULTURAL SCIENCE AND TECHNOLOGY, 2003). Animais como truta, coelhos, gatos e porcos apresentam maior sensibilidade as AFB₁, com LD₅₀ inferior a 1 mg/kg (0,81, 0,30, 0,55, 0,62 mg/Kg, respectivamente) (CULLEN; NEWBERNE, 1994).

Zlotowski et al. (2004) relataram um surto de aflatoxicose aguda em suínos ocorrido no Estado do Rio Grande do Sul. A alimentação fornecida aos animais continha altas concentrações de aflatoxinas. O milho continha 3.870 µg/kg para a soma das quatro toxinas e a ração, 6.140 µg/kg. Dos 108 animais da propriedade, 7 entre 18 porcas e 7 entre 90 leitões morreram. Dentre os sinais clínicos entre as porcas em período de lactação foram observadas apatia, anorexia, icterícia, urina de coloração amarela e com presença de sangue e fotossensibilização; entre os animais jovens, observou-se apatia e anorexia. Na necropsia foram observados lesões hepáticas e sinais de imunossupressão, indicando um quadro de aflatoxicose subaguda em suínos.

Embora a ingestão aguda apresente um quadro clínico mais severo, sua ocorrência em humanos está limitada a regiões geográficas onde a contaminação por aflatoxinas em alimentos é extremamente freqüente e em concentrações elevadas. Existem poucos relatos na literatura sobre episódios envolvendo humanos.

Em 1988, foram relatados 17 casos de aflatoxicose aguda em crianças e adultos no Estado de Perak, na Malásia. Os pacientes apresentavam sintomas como vômito ou vômito sanguinolento, convulsões, diarreia, febre e dor abdominal. Dentre os pacientes, o único adulto com vômito e convulsões, apresentou regressão dos sintomas após a internação. Uma criança apresentou regressão do vômito após três dias de internação, enquanto outra, com dor abdominal, vômito e convulsões morreu após 35 h do aparecimento desses sintomas. As outras 14 crianças desenvolveram encefalopatia hepática e 13 morreram entre o 1º e 7º dia de internação. Todos os pacientes relataram a ingestão de “*noodles*”, um tipo de massa cuja formulação contém arroz, farinha de milho, farinha de tapioca e farinha de trigo. O exame *pós-mortem* revelou a presença de concentrações elevadas de aflatoxinas e seus metabólitos no sangue, cérebro, fígado, pulmões e outros tecidos em 10 das 13 crianças. A análise dos ingredientes triturados utilizados para o preparo dos *noodles* não apresentou concentrações extremamente elevadas, mas valores aceitos legalmente na região em 1988, em torno de 35 µg/kg (LYE et al., 1995).

Outro relato de surto de aflatoxicose em humanos ocorreu em abril de 2004 no Quênia, resultando em 317 casos e 125 mortes. O Center for Disease Control and Prevention - CDC (AZIZ-BAUMGARTNER et al., 2004) relatam ter investigado os alimentos consumidos nas regiões afetadas quanto à contaminação por aflatoxinas e os resultados obtidos sugerem ter se tratado de um surto de aflatoxicose, assim como o que ocorreu em 1981, na mesma região (CDC, 2006). Lewis et al. (2005) realizaram um estudo no qual coletaram amostras nos locais de comercialização de produtos derivados de milho nessas regiões e constataram concentrações de aflatoxina total entre 1 e 46.400 µg/kg, sendo que 55% das amostras coletadas apresentaram contaminação acima do limite de 20 ppb.

A outra forma de manifestação da toxicidade das aflatoxinas ocorre pela ingestão crônica, através do consumo de alimentos contaminados com concentrações menores de aflatoxinas, durante um período de tempo prolongado.

Hendrickse et al. (1982), realizaram um estudo com 252 crianças Sudanesas, das quais 44 tinham kwashiorkor, 32 kwashiorkor marásmico, 70 marasmo e 106

estavam nutricionalmente saudáveis (grupo controle), visando analisar a presença das aflatoxinas B₁, B₂, G₁, G₂, M₁, M₂ e aflatoxicol em sangue e urina. Todos os grupos apresentaram excreção de uma ou mais aflatoxinas no sangue, sendo que o grupo com kwashiorkor apresentou maior concentração e frequência em relação aos demais grupos. Quanto às análises de urina, o grupo de crianças com kwashiorkor apresentou uma menor excreção de aflatoxinas em relação aos demais grupos. As maiores concentrações ocorreram entre os grupos de indivíduos com marasmo e kwashiorkor marásmico. Os autores observaram uma associação positiva entre deficiências no estado nutricional e a excreção de aflatoxinas e sugerem que o grupo de crianças com kwashiorkor deste estudo pode estar mais exposto às aflatoxinas do que os demais grupos ou podem possuir uma deficiência na capacidade de transportar e excretar as aflatoxinas causada pelo kwashiorkor, mas ressaltam a necessidade de novos estudos para verificar a hipótese proposta.

Em estudos posteriores, Coulter et al. (1986) realizaram biópsias em fígados de crianças Sudanesas com kwashiorkor, marasmo e kwashiorkor marásmico e confirmaram a presença de aflatoxinas no fígado de crianças com kwashiorkor, mas não nas demais crianças. Entretanto, Chao et al. (1994), analisando amostras de sangue e tecidos do fígado de cadáveres de indivíduos considerados saudáveis e de indivíduos portadores de doenças como hepatite B e carcinoma hepatocelular primário constataram maior presença de AFM₁ em indivíduos saudáveis, contrariando os resultados de Hendrickse et al. (1982) e Coulter et al. (1986).

Cullen et al. (1987) realizaram um estudo comparativo entre a toxicidade crônica da AFB₁ e AFM₁ em ratos Fischer machos e constataram que a AFM₁ é um carcinógeno hepático, embora com menor potência que AFB₁. Com relação aos efeitos produzidos na mesma faixa de dose, a AFM₁ necessita de um período maior de exposição para causar os mesmos efeitos produzidos pela AFB₁.

Jakab et al. (1994) realizaram um estudo visando demonstrar os efeitos imunossupressores da AFB₁ através da exposição respiratória e observaram que a AFB₁ suprime seletivamente células mediadoras da imunidade em ratos em fase de crescimento.

Kihara et al. (2000), em estudo com ratos em período pré-natal, observaram que a exposição da mãe às aflatoxinas pode provocar toxicidade na prole, demonstrada pelo atraso no desenvolvimento da coordenação motora e aprendizado. A exposição no início da gestação apresentou maiores efeitos do que a exposição mais tardia.

A exposição fetal e de crianças às aflatoxinas pode acarretar prejuízos no seu crescimento e desenvolvimento, tais como retardo no crescimento e aumento do risco de doenças durante a infância (TERRY; SUSSER, 2001).

Abdulrazzaq et al. (2002) verificaram uma correlação positiva entre o baixo peso dos neonatos com a presença de aflatoxina no sangue do cordão umbilical.

Agnes; Akbarsha (2003) pesquisaram os efeitos das aflatoxinas sobre a fertilidade em ratos albinos e constataram que as aflatoxinas são responsáveis pela diminuição da fertilidade em machos, através do decréscimo na contagem, na motilidade e no aumento de anormalidades dos espermatozóides.

Segundo Turner et al. (2003), a ingestão de aflatoxinas apresenta associação significativa com a excreção da imunoglobulina A salivar (IgAs) em crianças. Em trabalho realizado no Gâmbia, os autores analisaram a excreção salivar de imunoglobulina A em crianças expostas às aflatoxinas e constataram a redução desses anticorpos em indivíduos que apresentaram aflatoxina-albumina no sangue. As IgAs são anticorpos capazes de se ligarem a antígenos bacterianos e virais presentes na saliva, leite humano, lágrimas, mucosas dos brônquios, trato genital, urinário e digestivo, constituindo uma importante barreira a infecções. Isso sugere que a exposição às aflatoxinas pode influenciar no aumento da susceptibilidade à doenças e infecções.

2.4 Biomarcadores de Exposição às Aflatoxinas

Biomarcadores são substâncias ou seus produtos de biotransformação, ou ainda alterações bioquímicas precoces cuja determinação em fluidos biológicos, tecidos ou ar exalado permitam avaliar a intensidade da exposição a determinado agente, bem como o seu risco à saúde (WHO, 1996).

Para a validação de um biomarcador, é necessário que ele atenda alguns pré-requisitos, tais como: refletir a interação quantitativa ou qualitativa entre o organismo e ser sensível e específico com relação a esta interação, ser reprodutível qualitativamente e quantitativamente; estar presente num meio biológico cuja análise seja acessível e não destrutiva, sendo preferencialmente não invasivo; a sua análise deve apresentar exatidão e precisão adequadas; os valores do indicador utilizado em populações não expostas ao agente químico de interesse devem ser previamente conhecidos, assim como as variações intra e interindividuais (WHO, 1993).

As aflatoxinas são excretadas em fluidos biológicos humanos, tais como leite, urina e sangue e, podem ser detectadas através da mensuração de seus biomarcadores de exposição. Dentre os biomarcadores de exposição às aflatoxinas em fluidos biológicos, existem os adutos de DNA e de RNA. Os adutos de DNA, como a aflatoxina-N⁷-guanina (AFB-N⁷-guanina), representam a exposição recente às aflatoxinas (2-3 dias), enquanto os adutos protéicos, de RNA, representam uma exposição mais prolongada (2-3 meses) às aflatoxinas, como os adutos ligados à albumina sanguínea (GROOPMAN; WOGAN, 1994).

Segundo Van Egmond (1994), desde o início dos anos 60 inúmeros estudos têm sido realizados para estabelecer a conversão da AFB₁ em AFM₁. O primeiro método para detecção de AFM₁ foi utilizado por Allcroft; Carnaghan, em 1963. As aflatoxinas M₁ tiveram sua estrutura elucidada por Holzapfel et al. (1966) e posteriormente Campbell et al. (1970) identificaram a AFM₁ como sendo o maior metabólito hidroxilado da AFB₁ em urina. Desde então, inúmeros estudos sobre a ocorrência de AFM₁ em alimentos e fluidos biológicos têm sido realizados.

Essigmann et al. (1977) identificaram a estrutura química do maior aduto de aflatoxina B₁, a aflatoxina-N⁷-guanina, tornando possível o desenvolvimento de estudos posteriores sobre a dose de exposição que foi efetivamente metabolizada pelo organismo. Desde então, o mecanismo de ativação metabólica, toxicidade, capacidade de formação de adutos do DNA, RNA e proteínas, carcinogenicidade, mutagenicidade, bem como dose-resposta (SOTOMAYOR et al., 2003) e interações entre aflatoxinas e

outros agentes como sendo causadores de inúmeras doenças têm sido extensamente estudados (SYLLA et al., 1999; CHEN et al., 1996; GONG et al., 2003).

Gan et al. (1988) realizaram a investigação da excreção de aflatoxina soro-albumina e ingestão de AFB₁ e excreção de AFM₁ em urina. Ambos os biomarcadores apresentaram um coeficiente de correlação positivo com a ingestão de AFB₁.

Sabbioni et al. (1990) investigaram a presença do biomarcador para aflatoxinas em sangue humano, aflatoxina-lisina, isolada da aflatoxina-albumina, em amostras de sangue de moradores do município de Fusui, Província de Guangxi, República Popular da China. A ingestão de aflatoxinas foi monitorada por uma semana e a excreção deste biomarcador apresentou correlação significativa ($r = 0,82$, $0,67$ e $0,59$ e $P < 0,00001$, $0,023$ e $0,0001$ para população masculina, feminina e amostra total, respectivamente) com a ingestão de aflatoxinas na dieta.

A AFB₁-N⁷-guanina e a AFM₁ têm sido descritas como bons biomarcadores de exposição à AFB₁ em urina. Groopman et al. (1992) realizaram um estudo sobre a excreção de AFB₁-N⁷-guanina, aflatoxina M₁, P₁ e B₁, bem como sua relação com a ingestão de AFB₁. Os biomarcadores AFB₁-N⁷-guanina e AFM₁ apresentaram os maiores valores de correlação com a ingestão de AFB₁ ($r = 0,65$ e $p > 0,000001$ e $r = 0,55$ e $p > 0,000001$, respectivamente), enquanto a AFP₁ não apresentou correlação significativa. Os autores obtiveram resultados concordantes com estudos anteriores em relação à adequação da AFM₁ como biomarcador de exposição às aflatoxinas.

Groopman et al. (1993) relataram, como resultado de estudos envolvendo biomarcadores de exposição às aflatoxinas em urina, que a AFB₁-N⁷-guanina é um bom biomarcador, válido para mensurar a exposição recente às aflatoxinas e o risco de danos genéticos por elas causados.

Zhu et al. (1987) utilizaram AFM₁ para mensurar a ingestão de aflatoxinas e encontraram correlação positiva entre as concentrações de aflatoxina ingeridas e a excreção de aflatoxina M₁ na urina.

2.4.1 Relação entre a presença de biomarcadores e carcinogênese

Na literatura, inúmeros estudos relatam a alta incidência de biomarcadores relacionados à ingestão de aflatoxinas e a ocorrência de Carcinoma Hepatocelular em indivíduos que apresentavam conjuntamente o vírus da hepatite B (WANG et al., 2001; BAÑUELOS et al., 2000; QIAN et al., 1994; HATCH et al., 1993; AUTRUP; WAKHISI, 1985).

Hatch et al. (1993) realizaram um estudo em Taiwan, Ásia, visando mensurar a associação entre a presença de metabólitos de aflatoxinas em urina de 250 portadores de hepatite B crônica e a taxa de mortalidade por carcinoma hepatocelular. Amostras de urina foram analisadas quanto à presença de AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂, AFM₁, AFM₂, AFP₁ e AFQ₁. Dentre os 250 participantes, com exceção de 4, que foram excluídos, todos apresentaram excreção de aflatoxinas, entretanto, os autores não constataram uma associação entre a excreção destes metabólitos e o desenvolvimento de carcinoma hepatocelular na região de Taiwan.

Chao et al. (1994) analisaram a exposição às aflatoxinas em sangue de indivíduos de Cingapura. Entre os participantes, 302 eram portadores do vírus da hepatite B, 58 eram pacientes com carcinoma hepatocelular primário e 423 eram indivíduos normais. Dentre os indivíduos portadores do vírus da hepatite B, 0,7% (2 indivíduos) apresentaram aflatoxinas no sangue, com concentração média de 0,0075 e 0,0077 ng/mL. Entre os portadores de carcinoma hepatocelular 1,7% (1 indivíduo) apresentou excreção de 0,0075 ng/mL de AFB₁ e 0,017 ng/mL de AFG₁. O grupo de indivíduos normais apresentou contaminação de 15,1% (64 indivíduos), com a concentração média de 0,005 ng/mL (amplitude de 0,003 e 0,017 ng/mL). A diferença de concentração na concentração de aflatoxina entre os grupos de indivíduos é justificada pelos autores com base nas diferenças alimentares e/ou metabólicas desses indivíduos.

Bañuelos et al. (2000) analisaram a presença de AFB₁-N⁷-Guanina, AFM₁ e AFB₁ em amostras de urina de 210 pacientes do Instituto de Nutrição “Salvador Zubirán”, México, com diagnóstico de hepatite B (HBV) e C (HCV) crônicas, cirrose hepática viral (CHV), cirrose hepática alcoólica (CHA) e 3 grupos controles, formados

por indivíduos aparentemente saudáveis, indivíduos com insuficiência renal e indivíduos com enfermidade crônica não hepática. Os resultados indicaram a presença destes biomarcadores em 50% dos pacientes com HBV, 16,6% com HCV, 26% em pacientes com cirrose viral e 10% com cirrose alcoólica. Dentro do grupo controle, apenas 2 grupos apresentaram excreção de aflatoxinas, sendo que 3,3% dos pacientes com insuficiência renal e 10% dos pacientes saudáveis apresentaram a presença de biomarcadores de AFB₁. As concentrações de AFB₁-N⁷-guanina e AFM₁ obtidas entre os indivíduos dos grupos variaram entre 1,0 a 38,8 e 1,7 a 80,3 ng/mL (HBV), 1,2 a 4,10 e 1,4 a 40,3 ng/mL (HCV), 0,4 a 290,7 e 12,5 a 90,5 ng/mL (CHV), 0,9 a 1,7 ng/mL e não detectada (CHA), respectivamente. Entre o grupo controle, não foram encontradas concentrações detectáveis (ND) de AFB₁-N⁷-guanina e AFM₁ para os indivíduos com insuficiência renal e enfermidade crônica não hepática, mas entre ND a 1,38 e 1,1 a 3,7 ng/mL, entre os indivíduos sadios, respectivamente.

Wang et al. (2001) em um estudo em Zhuqing Village, no município de Fusui, China, encontraram alta contaminação com aflatoxinas nos alimentos consumidos, bem como excreção de AFM₁ em 88,9% dos participantes e AFB₁ N⁷-guanina em 40,7%. Os dados obtidos demonstram uma alta exposição às aflatoxinas nessa região que apresenta alto índice de mortalidade por carcinoma hepatocelular e de infecção crônica pelo vírus da hepatite B.

Tao et al. (2005) realizaram um estudo sobre os fatores que modulam as concentrações de AFB₁-albumina em três populações chinesas, e constataram que a hepatite viral B (HBV) apresentou sinergismo com a ingestão de AFB₁, potencializando seus efeitos e contribuindo para o aumento da morbidade de carcinoma hepatocelular.

Scussel et al. (2004) analisaram amostras de sangue de 50 doadores de sangue do banco de sangue em São Paulo e constataram a presença de AFB₁-lisina em 62% das amostras analisadas, em concentrações entre 0,0036 e 0,57 µg/mg. Os valores das concentrações obtidas nesse estudo sugerem que o Brasil apresenta uma situação intermediária com relação à exposição às aflatoxinas. Isto, segundo os autores, considerando que as concentrações obtidas são menores do que as encontradas em regiões de alto risco de exposição, como África, e maiores do que os

valores encontrados em regiões da Europa, onde a exposição é baixa. Os valores de concentração observados indicam uma exposição compatível com regiões como Tailândia e Bangladesh.

Alguns trabalhos correlacionam a ingestão de aflatoxinas com inúmeros outros fatores além da presença de vírus da hepatite, tais como tempo de residência na região de alta exposição às aflatoxinas, fatores genéticos, como o metabolismo enzimático individual e apontam para a necessidade de reduzir a exposição às aflatoxinas como fator decisivo para a prevenção de câncer (WILD et al., 2000; SUN et al., 2002; KEW, 2003).

2.4.2 Biomarcador de exposição em urina e leite: aflatoxina M₁

A aflatoxina M₁ é um biomarcador de exposição à AFB₁ excretado em fluidos biológicos e que tem demonstrado ser adequado para mensurar a ingestão de aflatoxina B₁ por apresentar uma boa correlação entre a concentração de ingestão e excreção de aflatoxinas (ZHU et al., 1987; GAN et al., 1988; GROOPMAN et al., 1992).

Em termos quantitativos, a aflatoxina M₁ é o principal metabólito da aflatoxina B₁ e é excretado na urina em humanos e em diversas espécies de animais. Em macacos, a excreção de AFM₁ ocorre entre 12-24h após a ingestão, assim como no leite de vaca (HSIEH; WONG, 1994) e apresenta uma boa correlação entre a dose de AFB₁ ingerida e AFM₁ excretada. A excreção de AFM₁ na urina humana reflete a ingestão de aflatoxinas num período de 24 horas antes da quantificação (GROOPMAN, 1994) e corresponde a apenas cerca de 1 a 4% da concentração de AFB₁ ingerida (CAMPBELL et al., 1970).

A aflatoxina M₁ também pode ser excretada em leite humano e de animais. Em animais que ingeriram ração contaminada com aflatoxina B₁, a excreção de AFM₁ situa-se numa faixa entre 1-2% da concentração de AFB₁ ingerida (VAN EGMOND, 1989). Zarba et al. (1992) realizaram um estudo no qual analisaram as concentrações de aflatoxinas ingeridas na dieta e as concentrações de AFM₁ excretadas no leite de 5 lactantes, visando estimar a porcentagem de AFM₁ excretada no leite. Segundo este

estudo, a excreção de AFM₁ no leite humano ocorre numa faixa entre 0,09 e 0,43% da concentração de aflatoxinas ingeridas.

Assim, considerando a baixa proporção de AFM₁ excretada em fluidos biológicos, torna-se extremamente importante que a metodologia analítica seja sensível o suficiente para detectar a presença de micotoxinas ingeridas em baixas quantidades.

Groopman et al. (1992), realizaram a análise de biomarcadores de aflatoxinas em urina. Neste estudo, foram quantificados os biomarcadores AFB₁-N⁷-guanina, AFB₁, AFQ₁, AFG₁, aflatoxicol e AFM₁ e foram analisadas a relação dose-resposta para excreção de AFB₁-N⁷-guanina, AFM₁ e AFP₁. Tanto a AFB₁-N⁷-guanina quanto a AFM₁ apresentaram correlação positiva ($r = 0,65$ e $p > 0,000001$ e $r = 0,55$ e $p > 0,000001$, respectivamente), demonstrando serem excelentes biomarcadores de exposição às aflatoxinas.

Gan et al. (1988) realizaram a investigação da excreção de aflatoxina-albumina em soro sanguíneo em 42 pessoas residentes na Província de Guangxi, República Popular da China, e conjuntamente analisou a ingestão de AFB₁ e excreção de AFM₁ em urina. Ambos os biomarcadores apresentaram um coeficiente de correlação positivo com a ingestão de AFB₁, sendo que a correlação entre a ingestão e excreção foi de $r = 0,60$ ($P < 0,0003$) para AFM₁ e de $0,69$ para aflatoxina-albumina ($P < 0,000001$).

Hatch et al. (1993), analisaram amostras de urina de 250 pessoas residentes em Taiwan e constataram a associação entre a excreção de aflatoxinas e aparecimento de câncer hepático, considerando que as maiores concentrações de aflatoxinas excretadas foram encontradas entre os participantes residentes nas áreas com maiores taxas de mortalidade por carcinoma hepatocelular. As concentrações médias totais das aflatoxinas B₁, B₂, G₁, G₂, M₁, M₂, P₁ e Q₁ entre as regiões analisadas variaram entre 0,003 a 0,108 ng/mL de urina.

Hendrickse et al. (1982) analisaram amostras de sangue e urina de 252 crianças Sudanesas, das quais 146 apresentavam deficiências no estado nutricional, tais como marasmo, kwashiorkor marasmico e kwashiorkor e 106 crianças saudáveis como grupo controle, visando avaliar a exposição às aflatoxinas nesses grupos de

indivíduos com deficiências no estado nutricional e entre os indivíduos do grupo controle. A AFM₁ foi mais freqüentemente encontrada (40 amostras) na urina dos grupos que apresentaram deficiências no estado nutricional do que no grupo controle (21 amostras), com concentrações que variaram entre 0,143 a 0,508 ng/mL e 0,191 ng/mL, respectivamente.

De Vries et al. (1990) analisaram amostras de urina, fezes e sangue de 5 crianças com kwashiorkor, 7 com marasmo e 1 com baixo peso, todas com alimentação controlada livre de aflatoxinas. Durante os primeiros dez dias, amostras de urina foram coletadas e analisadas quanto à presença de aflatoxinas B₁, B₂, G₁, G₂, M₁ e aflatoxicol. Dentre as amostras analisadas, a excreção de aflatoxinas de crianças com kwashiorkor cessou após os dois primeiros dias, enquanto as crianças com marasmo apresentaram excreção urinária persistindo até o 4º dia. Não houve excreção de aflatoxinas entre as crianças com baixo peso. As concentrações de AFM₁ excretadas em fezes e urina foram de 600, 86 e 339 ng/dia, em 3 das 5 crianças com kwashiorkor e 190, 1 e 7.352 ng/dia em 3 das 7 crianças com kwashiorkor marásmico. Todas as crianças apresentaram excreção de outros metabólitos de aflatoxinas ao longo do período deste estudo.

Cheng et al. (1997) realizaram um estudo com 138 amostras de urina de pessoas residentes na China e 32 residentes em Taiwan. A freqüência de contaminação por AFM₁ foi de 64 e 66% na China e em Taiwan, respectivamente. As concentrações médias e máximas excretadas foram de 3,2 e 108 ng/12 horas entre os participantes da China e de 2,7 e 17 ng/12 horas entre os participantes de Taiwan.

Jonsyn-Ellis (2000) coletaram amostras de urina de 134 meninos e 110 meninas em Serra Leone, África, durante a estação seca, e de 97 meninos e 93 meninas na estação chuvosa, visando analisar a presença de aflatoxina M₁, M₂, aflatoxicol e aflatoxina B₁, B₂, G₁ e G₂ nesses períodos. A AFM₁ foi encontrada com mais freqüência em urinas coletadas durante a estação chuvosa, para ambos os sexos. As concentrações encontradas entre as amostras dos meninos coletadas no período seco e chuvoso, variaram de 0,5-374 (44% das amostras) e 0,1-35 ng/mL (43% das amostras), respectivamente. Entre as meninas, a contaminação obtida nas amostras

coletadas no período seco variaram entre 2,3-34 ng/mL (44% das amostras), enquanto no período chuvoso, as concentrações obtidas estiveram entre 0,3 e 124 ng/mL (59% das amostras).

Mykkänen et al. (2005), realizaram um estudo visando quantificar a presença de três metabólitos da AFB₁ (AFM₁, AFQ₁ e AFB₁-N⁷-guanina) em fezes e urina de jovens chineses. A análise das fezes apresentou uma maior concentração de AFQ₁, cerca de sessenta vezes maior do que de AFM₁ (média de 137 ng/g e 2,3 ng/g de peso fresco para AFQ₁ e AFM₁, respectivamente). As análises de urina apresentaram excreção de AFM₁ com concentrações entre 0,01 e 0,33 ng/mL, entre ND e 2,15 ng/mL para AFB₁-N⁷-guanina e entre 3,39 a 23,3 ng/mL de AFQ₁. Os dados obtidos demonstram uma maior excreção de AFQ₁ entre os jovens chineses, sugerindo uma maior expressão das enzimas CYP3A4A do citocromo P450, bem como a necessidade de realização de novas investigações utilizando AFQ₁ como biomarcador de exposição nessa população.

Jolly et al. (2006) realizaram um estudo para determinar a excreção de aflatoxina-albumina em sangue e AFM₁ em urina de pessoas com alto consumo de amendoim e milho, na região de Ejura Sekyedumase, Distrito da República do Gana. Dentre os participantes, foram coletadas amostras de urina de 91 pessoas e 140 amostras de sangue. Foram encontradas concentrações de AFM₁ na urina de 83 participantes (91,2%), numa faixa entre ND e 11,562 ng/mg de creatinina e concentrações de aflatoxina-albumina em sangue de 91 (100%) dos participantes, numa faixa entre 0,12 a 3 pmol/mg albumina. A maioria desses participantes reportou o consumo diário de alimentos como amendoim (63,3%), milho (87,5%) e mandioca (81,6%).

Malir et al. (2006), numa revisão sobre o monitoramento de alimentos e biomarcadores de aflatoxina na República Tcheca relatam a ocorrência de AFM₁ em 57,6% das amostras de urina analisadas, em concentrações entre 0,019 e 19,219 ng/g de creatinina.

Van Egmond (1989) relata que a aflatoxina M₁ em leite bovino, foi provavelmente quantificada pela primeira vez em um estudo realizado por Van der

Linde et al., em 1964 (VAN EGMOND, 1989). Desde então, inúmeros estudos sobre a ocorrência de transferência da contaminação por aflatoxinas em leite de animais e humano têm sido realizados.

Bognanno et al. (2006) realizaram um estudo para avaliar a ocorrência de AFM₁ em leite de ovinos e constataram que das 240 amostras de leite coletadas em fazendas de Enna, na Sicília, Itália, 81% apresentaram contaminação entre 2 a 108 ng/L.

A exposição de crianças de idade reduzida às aflatoxinas pode ocorrer através da ingestão de leite materno contaminado com AFM₁, bem como ainda durante o período de gestação, através da transferência da contaminação por AFB₁ pelo cordão umbilical, quando a gestante ingere alimentos contaminados (Lamplugh et al., 1988; El-Nezami et al., 1995; Abdulrazzaq et al., 2002).

Lamplugh et al. (1988) realizaram um estudo com lactantes em Accra, República de Gana e da Nigéria. Os autores analisaram a presença de aflatoxinas B₁, B₂, G₁, G₂, M₁, M₂ e aflatoxicol em 142 amostras de doadoras de Accra coletadas no meio do período de seca e 122 amostras coletadas no início do período chuvoso, juntamente com 188 amostras de sangue do cordão umbilical de 188 bebês. Entre as participantes nigerianas, foram coletadas 77 amostras de sangue venoso durante a gravidez e sangue de seus bebês após a passagem completa pela placenta. As aflatoxinas foram detectadas em 90 (34%) das 264 amostras de leite com maior frequência no período chuvoso (50 amostras) e a AFM₁ foi detectada em 59 amostras, com concentrações entre 20 a 1.816 ng/L. Com relação a amostras de sangue, foram detectadas aflatoxinas em 63 (34%) das 188 amostras de sangue do cordão umbilical das participantes da República de Gana, sendo que a AFM₁ foi detectada em concentrações entre 34 a 7.320 ng/mL. Dentre as participantes da Nigéria, foram detectadas aflatoxinas em 16 (21%) das amostras de sangue materno, sendo 3 contendo AFM₁ em concentrações entre 38 e 483 ng/L e 9 (12%) amostras de sangue do cordão umbilical contendo aflatoxinas, das quais 3 apresentaram presença de AFM₁ em concentrações entre 25 e 593 ng/L.

Em trabalho realizado com 84 lactantes da Austrália e Tailândia, El-Nezami et al. (1995) avaliaram a exposição à aflatoxina B₁ utilizando AFM₁ como biomarcador em amostras de leite humano de 73 doadoras de Victoria, Austrália, e 11 doadoras da Tailândia. Dentre as lactantes da Austrália, as concentrações de AFM₁ quantificadas foram de 0,028 a 1,031 ng/mL, em 15,06% das amostras analisadas. Entre as doadoras da Tailândia, região onde a exposição às aflatoxinas é alta, as concentrações de contaminação obtidas em 45,45% das amostras estiveram entre 0,039 e 1,736 ng/mL.

Nos Emirados Árabes Unidos, Abdulrazzaq et al. (2002) realizaram um estudo prospectivo onde mensuraram a concentração de aflatoxina B₁, M₁ e M₂ encontradas no sangue do cordão umbilical de 201 mulheres e encontraram a presença de aflatoxinas em 54,7% das amostras, com uma correlação positiva entre a diminuição do peso dos recém-nascidos e o aumento da concentração de aflatoxinas M₁, cujas concentrações observadas variaram entre 0,11 e 4,06 ng/mL.

Num estudo posterior, Abdulrazzaq et al. (2003) analisaram amostras de leite de 140 lactantes, das quais 55 tiveram partos prematuros e 85 tiveram bebês que apresentaram problemas de saúde ou tiveram que ser internados posteriormente com suspeita de infecção. Dentre as amostras analisadas, 92% apresentaram aflatoxina M₁ em concentrações entre 0,053 e 3,4 ng/mL.

Turconi et al. (2004) investigaram a presença de biomarcadores de ingestão de aflatoxinas e ocratoxina A em leite de mulheres da região da Lombardia, Itália, e constataram uma baixa incidência de aflatoxina M₁. Apenas uma das 246 amostras coletadas apresentou AFM₁, com concentração de 194 ng/L.

Polychronaki et al. (2006) analisaram amostras de leite humano de 388 lactantes, no Egito, das quais 35,5% apresentaram contaminação por AFM₁ em concentrações entre 0,005 a 5,0 ng/mL. A excreção de AFM₁ encontrada foi maior no primeiro mês de lactação do que nos meses posteriores. Posteriormente, 55 dessas participantes que apresentaram contaminação por AFM₁ no leite foram revisitadas mensalmente por 12 meses e 55% das amostras coletadas entre essas participantes apresentaram contaminação por AFM₁ (POLYCHRONAKI et al., 2007).

Hassan et al. (2006) analisaram amostras de leite de 50 lactantes egípcias saudáveis, bem como amostras de sangue dessas lactantes participantes e seus lactentes, visando verificar a correlação entre a ingestão de aflatoxinas e alterações nas funções renal e hepática dos bebês amamentados. Embora não tenha obtido correlação positiva, 48% das amostras de leite apresentaram contaminação média por AFM₁ de 1,9 ng/mL, sendo que as concentrações médias de aflatoxina-albumina no sangue das lactantes foi de 0,0089 ng/mL e no sangue dos lactentes, de 0,0019 ng/mL.

No Brasil, Navas (2003) avaliou a presença de AFM₁ em leite humano em amostras provenientes de um banco de leite da cidade de São Paulo. Foram analisadas 50 amostras, das quais 28 foram coletadas no verão e 22 durante o outono. Apenas uma amostra coletada durante o inverno apresentou contaminação superior ao limite de quantificação da metodologia utilizada (0,01 ng/mL), com concentração de 0,024 ng/mL.

2.4.3 Metodologias analíticas para AFM₁ em urina e leite humanos

Inúmeras metodologias analíticas têm sido desenvolvidas e utilizadas para quantificar a presença de AFM₁ em urina e leite. Considerando que concentração da AFM₁ excretada em urina situa-se entre 1 e 4% da dose de AFB₁ ingerida (CAMPBELL et al., 1970) e em leite animal e humano abaixo de 2% (VAN EGMOND, 1989; ZARBA et al., 1992), a metodologia utilizada para quantificação desse biomarcador de exposição deve ser sensível o bastante, visando realizar uma quantificação na ordem de partes por trilhão do analíto no fluido analisado.

De Vries et al. (1990) analisaram amostras de urina quanto à presença de aflatoxinas B₁, B₂, G₁, G₂, M₁ e aflatoxicol, utilizando extração por clorofórmio e purificação em coluna de sílica e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), utilizando detector de fluorescência, coluna de fase reversa e fase móvel composta por água:metanol (50:50, v/v), para quantificação. Com a metodologia utilizada, os autores quantificaram concentrações entre 339 e 7.352 ng por dia de AFM₁ em urina e entre 1 e 86 ng por dia de AFM₁ em fezes.

Groopman et al. (1985) desenvolveram uma metodologia para quantificação de AFB₁-N⁷-guanina, AFM₁ e AFP₁ em urina, utilizando anticorpo monoclonal específico para aflatoxinas ligado covalentemente a Sepharose 4B, usado como coluna preparativa. As amostras foram aplicadas na coluna de anticorpo monoclonal dissolvidas em 2 mL de tampão fosfato salino para remover substâncias co-extratoras. As aflatoxinas foram eluídas com uma solução de dimetilsulfóxido/tampão fosfato salino (50%) e o eluato foi analisado por radioimunoensaio e quantificado por CLAE com detecção ultravioleta e coluna de fase reversa.

Groopman et al. (1992) realizaram um estudo para quantificar a excreção de AFB₁-N⁷-guanina, AFB₁, AFG₁, AFQ₁, aflatoxicol e AFM₁ em urina humana. A metodologia proposta utilizou coluna C₁₈ Sep-pak para extração e limpeza e CLAE com detecção com arranjo de diodos e coluna de fase reversa. A eluição foi realizada utilizando etanol 13% durante 20 minutos, seguida por uma elevação gradativa até uma concentração de 25% de etanol durante 25 minutos, permanecendo nessa concentração até a eluição do analíto.

Kussak et al. (1995) desenvolveram uma metodologia analítica visando quantificar simultaneamente aflatoxinas B₁, B₂, G₁, G₂, M₁ e Q₁ na urina de trabalhadores de uma fábrica de ração. Para tanto, utilizaram coluna de imunoafinidade para extração e limpeza da amostra e CLAE com pós-derivação com brometo, detector de fluorescência, coluna cromatográfica de fase reversa e fase móvel composta por acetonitrila:água (30:70, v/v) para detecção e quantificação. A avaliação do desempenho da metodologia foi realizada através do limite de detecção (LD) e recuperações. O método descrito apresentou LD para AFM₁ de 0,018 ng/mL de urina e recuperações de 100, 107 e 101%, para fortificações de 0,018, 0,048 e 0,097 ng/mL, respectivamente.

Simon et al. (1998) desenvolveu uma metodologia para quantificação de aflatoxina M₁ em urina e leite, utilizando a metodologia para limpeza da amostra proposta por Kussak et al. (1995) com modificações. As modificações consistiram na utilização de um sistema de lavagem durante a limpeza da amostra, onde um conjunto de bombas são interligadas a 4 válvulas de injeção e 3 colunas para a limpeza. Essas

modificações permitiram a redução do limite de detecção para até 2,5 ng/L para 1 mL de injeção, mantendo a faixa de recuperação entre 97% e 98,7% para fortificação com concentrações entre 10 e 100 ng/L de urina.

Mykkänen et al. (2005) quantificou a excreção de AFQ₁, AFM₁ e AFB₁-N⁷-guanina em urina e fezes humanas. Os biomarcadores de AFB₁ em urina foram quantificados simultaneamente, utilizando coluna C₁₈ para limpeza e extração das aflatoxinas e CLAE para detecção e quantificação com detector de fluorescência, fase reversa e eluição isocrática em acetonitrila:metanol 30% (1:1, v/v) seguida por gradiente 22 a 34% metanol:acetonitrila (1:2, v/v), em fluxo de 0,2 mL/minutos. O limite de detecção para AFM₁ e AFB₁-N⁷-guanina em fezes foi de 0,005 e para AFQ₁ foi de 0,5 ng/g. A menor concentração quantificada para AFM₁ em urina foi de 0,01 ng/mL.

Zarba et al. (1992) mensuraram a presença de AFM₁ em leite humano, em trabalho realizado no Gâmbia, África, utilizando coluna de imunoafinidade de anticorpo monoclonal para extração, conforme descrito por Groopman et al. (1984) e CLAE com detector de fluorescência, fase reversa com eluição com álcool etílico 23% em 5 Mm trietilamônio formato em pH 3,0, para detecção e quantificação. O limite de detecção utilizado correspondeu ao menor pico detectável pelo aparelho, representando uma massa de 0,01 ng de AFM₁ e a taxa de recuperação obtida para a metodologia utilizada foi de 40% de AFM₁.

El-Nezami et al. (1995) utilizaram a metodologia descrita por Takeda et al. (1984) com modificações. Os autores utilizaram coluna Sep-pak C₁₈ para extração e o eluato foi extraído com diclorometano, centrifugado e seco a 40°C sob pressão reduzida. A detecção e quantificação de AFM₁ foi realizada utilizando *Enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) e CLAE com detector de fluorescência, fase reversa e eluição gradiente com água:metanol:acetonitrila:ácido acético (77:15:8:0,05 v/v) durante 12 minutos, com mudança gradativa para fase móvel composta por água:metanol:acetonitrila:ácido acético (52:40:8:0,05 v/v) ao longo de 8 minutos, permanecendo nessa concentração por mais 8 minutos. O limite de detecção relatado foi de 0,0005 ng/mL para quantificação por ELISA e de 0,01 ng/mL de leite para quantificação em CLAE. A taxa de recuperação obtida foi de 97 ±12 para leite bovino e

de $95 \pm 11\%$ para leite humano em ELISA e de 93 ± 4 em leite bovino e $91,6 \pm 6$ em leite humano, utilizando CLAE.

Polychronaki et al. (2006) realizaram a quantificação de AFM_1 em leite humano utilizando colunas C_{18} para purificação e extração das aflatoxinas e CLAE para detecção e quantificação. A cromatografia líquida foi realizada com detector de fluorescência, coluna de fase reversa e fase móvel constituída de água:metanol:acetonitrila (66:17:17, v/v). A metodologia foi avaliada quanto ao desempenho através da taxa de recuperação. A fortificação foi realizada entre 0,012 e 0,500 ng de AFM_1 por mL de leite e os resultados situaram-se entre 88 ± 28 e $94 \pm 8\%$. O coeficiente de correlação entre os valores adicionados e recuperados foi de 0,993. O limite de detecção do método foi de 0,06 ng/mL e a repetibilidade apresentou um coeficiente de variação de 8%.

Dragacci; Grosso (2001) descreveram um estudo colaborativo onde foi avaliada a efetividade de uma metodologia para quantificação de AFM_1 em leite utilizando coluna de imunoafinidade para limpeza de extrato e CLAE com detector de fluorescência, coluna cromatográfica de fase reversa. A fase móvel utilizada pela maioria dos participantes foi composta por água:acetonitrila (75:25, v/v), entretanto, alguns participantes optaram por utilizar água:acetonitrila:metanol (65:25:10, v/v) ou água:isopropanol:acetonitrila (80:12:8, v/v), conforme o tipo de coluna utilizada. O método descrito mostrou-se adequado quanto à repetibilidade, apresentando desvio padrão relativo de 18%, assim como mostrou-se adequado quanto à reprodutibilidade, com desvio padrão relativo de 31%. O limite de detecção para a metodologia avaliada foi de 0,02 ng/mL.

Navas (2003) realizou a quantificação de AFM_1 e ocratoxina A em leite humano, ambas utilizando coluna de imunoafinidade para extração/purificação e CLAE para quantificação, com detector de fluorescência, coluna de fase reversa e eluição gradiente. A taxa de recuperação do método utilizado foi de 97% para fortificação com 0,01 ng/mL de AFM_1 e forneceu um coeficiente de variação de 17,5% entre 5 repetições. O limite de quantificação para a metodologia utilizada foi de 0,01 ng/mL.

2.5 Materiais e Métodos

2.5.1 Amostragens

Foram coletadas amostras de urina de 69 indivíduos residentes nas zonas urbana e rural de Piracicaba-SP, que foram selecionados voluntariamente, sendo a aceitação o critério exclusivo para inclusão dos mesmos neste levantamento. Cada indivíduo realizou a coleta de uma amostra de urina, sem volume estabelecido, colhida no período da manhã. Dentre os participantes, 34 pessoas eram residentes na zona urbana, em bairros diversos, e 35 pessoas eram residentes na zona rural. A primeira amostragem foi realizada com 14 moradores da zona urbana e 14 da zona rural, no bairro Santa Olímpia. A segunda amostragem foi realizada com 13 pessoas residentes na zona urbana, que apresentavam uma possibilidade de exposição adicional às aflatoxinas por exercerem atividades em laboratórios de análise de micotoxinas e com 14 pessoas residentes no bairro rural de Santana. A terceira amostragem foi novamente realizada nas zonas urbana e rural, sendo amostras coletadas 7 amostras de pessoas residentes na zona urbana e 7 na zona rural, em Santa Olímpia.

Foram analisadas 18 amostras de leite humano, que foram coletadas mediante disponibilidade dos bancos de leite de Piracicaba e Campinas-SP, bem como de lactantes que não foram doadoras de urina, residentes em Piracicaba e Rio Claro-SP. Dentre as amostras coletadas em bancos de leite, 1 foi doada pelo Banco de Leite do “Hospital dos Fornecedores de Cana” de Piracicaba-SP e 13 pelo banco de leite do “Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher” (CAISM/Unicamp) de Campinas-SP. As amostras doadas pelos bancos de leite consistiam em amostras pasteurizadas que seriam destinadas ao descarte por terem sido armazenadas por um período de tempo elevado ou ainda porque os bebês que receberiam essas amostras saíram da internação. As amostras coletadas de doadoras consistiram de amostras de leite cru, sendo 3 por lactantes de Piracicaba e 1 de Rio Claro - SP.

Todas as amostras de urina e leite humanos foram coletadas após aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade de Campinas/Unicamp, conforme certificado anexo (Anexo

A). Após as coletas de urina e leite humanos, os frascos foram levados imediatamente ao laboratório e armazenados em freezer a temperatura de -18°C até o momento da análise.

2.5.2 Inquéritos alimentares

No momento da seleção dos participantes doadores de urina, foram aplicados os inquéritos sócio-econômico (Anexo B), de frequência alimentar (Anexo C) e o recordatório 24 horas (Anexo D).

O modelo do questionário utilizado pelo IBGE, na realização da Pesquisa de Orçamento Familiar (POF) 2002-2003 (IBGE, 2006) foi utilizado como base para elaboração do inquérito de frequência alimentar, contemplando alimentos que apresentassem alto risco de contaminação por aflatoxinas, segundo relatos da literatura. Assim, no inquérito de frequência alimentar foram questionados os consumos de diversos alimentos distribuídos em 4 grupos, constituídos por milho e derivados, amendoim e derivados, leite e derivados e castanhas, nozes, amêndoas e frutas secas.

Os participantes foram instruídos sobre o preenchimento do inquérito recordatório 24 horas, onde deveriam relatar o consumo de todos os alimentos ingeridos no dia anterior a coleta da amostra de urina, entretanto, no dia das coletas das amostras o inquérito foi completado ou corrigido, caso o participante relatasse algum outro item consumido e não anotado anteriormente. As porções foram estimadas com base em medidas caseiras comuns aos participantes, tais como xícaras, copos, colheres, etc. Para análise do consumo, apenas os alimentos pertencentes aos grupos de risco foram selecionados.

2.5.3 Análise de aflatoxina M₁

2.5.3.1 Cromatografia líquida

A detecção e quantificação dos extratos das amostras foram realizadas por cromatografia líquida de alta eficiência. O sistema de cromatografia utilizado consistiu

de um sistema com uma bomba marca Shimadzu, modelo LC-10AT, detector de fluorescência marca Shimadzu, modelo RF-10AXL, alça de injeção de capacidade de 100 μ L, coluna cromatográfica e pré-coluna de fase reversa marca Phenomenex, modelo Synergy Fusion 250x4,6 mm com tamanho de partículas de 3 μ m, mantida a temperatura ambiente.

O sistema foi operado no modo isocrático com uma fase móvel constituída por água Milli-Q (Sistema de filtragem Milli-Q, marca Millipore, modelo Simplicity 185 – Simpact 1) e acetonitrila grau cromatográfico na proporção de 75:25 (v/v). O fluxo da fase móvel foi mantido a 1,0mL/min. e o comprimento de ondas utilizado foi de 365 para excitação e 435 para emissão.

2.5.3.2 Preparo da solução padrão para aflatoxina M₁

O padrão de aflatoxina M₁ adquirido marca Sigma-Aldrich (A-6428) foi dissolvido em acetonitrila. A solução preparada foi checada quanto a sua concentração conforme a metodologia 970.44 descrita pela Association of Official Analytical Chemists (AOAC) (Trucksess, 2006). Antes da checagem de concentração, o aparelho marca Shimadzu, modelo UV mini 1240, foi checado quanto a sua calibração através de uma solução de dicromato de potássio, conforme descrito pela metodologia 970.44, AOAC (Trucksess, 2006).

2.5.3.3 Curva de calibração

Para quantificação dos picos cromatográficos de aflatoxina M₁ foi necessária a construção de uma curva de calibração. Soluções com cinco diferentes concentrações de padrão de AFM₁ dissolvido em fase móvel foram preparadas com esse propósito. As concentrações utilizadas foram as seguintes: 50, 100, 200, 300 e 400 pg/mL. Cada solução foi injetada 4 vezes e utilizou-se a média aritmética dessas replicatas para a construção da curva de calibração.

A linearidade da curva foi verificada através da determinação do coeficiente de determinação (R^2).

2.5.4 Metodologia utilizada na detecção de AFM₁ em urina humana

A metodologia utilizada para detecção e quantificação de AFM₁ foi baseada na metodologia preconizada por Kussak et al. (1995).

As amostras de urina armazenadas a -18°C foram descongeladas e após atingirem a temperatura ambiente iniciou-se a realização das etapas da metodologia visando à detecção da aflatoxina M₁, que são descritas a seguir e apresentadas na Figura 2.

Inicialmente, 20 mL de urina foram diluídos com 20 mL de acetato de sódio 0,1M e o pH da solução foi checado e, se necessário, corrigido para pH 5,0 com auxílio de uma solução de ácido acético glacial 0,1M. O volume de 40 mL da solução urina + acetato de sódio foi passado pela coluna de imunoafinidade Neocolumn (Neogen Europa), com fluxo de passagem de aproximadamente 1 mL/minuto. Após a passagem da urina diluída, a coluna de imunoafinidade foi lavada com 40 mL de água destilada, a qual foi esgotada da coluna. A eluição foi realizada com 2 mL de metanol. O eluato foi concentrado sob fluxo de nitrogênio e foi redissolvido em 500 µL da fase móvel utilizada, composta por água Milli-Q e acetonitrila grau cromatografia líquida na proporção de 75:25 (v/v).

Figura 2 – Fluxograma da metodologia empregada na detecção de AFM₁ em urina

2.5.5 Metodologia utilizada na detecção de AFM₁ em leite humano

A metodologia para detecção e quantificação de AFM₁ em leite foi baseada no método preconizado por Dragacci et al. (2001). As amostras de leite armazenadas a -18°C foram descongeladas e após atingirem a temperatura ambiente iniciou-se a realização das etapas da metodologia visando à detecção da aflatoxina M₁, que são descritas a seguir e apresentadas na Figura 3.

Das amostras de leite foram retirados 30 mL de leite, os quais foram transferidos para tubos de centrífuga de 50 mL para aquecimento à 37°C durante 5 minutos sob leve agitação manual. Em seguida, as amostras foram centrifugadas por 15 minutos a 2000 g e retirou-se a camada de gordura, coletando-se a fração intermediária contida no tubo de centrífuga. A alíquota coletada foi filtrada em filtro de microfibra Whatman (artigo nº 1827900646) e foram coletados 15 mL, os quais foram passados pela coluna de imunoafinidade para aflatoxinas Neocolumn (Neogem Europa), em fluxo 1,0 mL/minutos; a coluna foi então lavada com 20 mL de água destilada, a qual foi esgotada da coluna antes de realizar a eluição. A toxina ligada foi eluída com 2 mL de metanol, o eluato foi seco e redissolvido para 500 µL de fase móvel.

Figura 3 – Fluxograma da metodologia empregada para detecção de AFM₁ em leite

2.5.6 Avaliação da metodologia

2.5.6.1 Limite de detecção e quantificação das metodologias

O limite de detecção (LD) da metodologia utilizada para extração de AFM₁ foi considerado como o menor valor de concentração que resultasse em um pico de altura maior que 3 vezes a amplitude do ruído da linha de base. O limite de quantificação (LQ) foi considerado como sendo 3 vezes o valor do limite de detecção.

2.5.6.2 Testes de recuperação das metodologias

Durante a padronização das metodologias de detecção de AFM₁ o parâmetro exatidão foi avaliado através do teste de recuperação. Os testes de recuperação foram realizados adicionando-se alíquotas da solução de padrão analítico, que fornecessem uma concentração desejada, sobre amostras que não apresentaram contaminação detectável de AFM₁. Foram realizados testes de recuperação para avaliações iniciais da metodologia e, posteriormente, entre as bateladas de extração para acompanhamento e aceitação ou não das amostras extraídas.

A metodologia para extração de AFM₁ em urina foi avaliada inicialmente através da realização de 7 repetições dos testes de recuperação. Em cada amostra deste teste adicionou-se alíquotas da solução de padrão analítico que permitissem produzir uma contaminação com concentração de 4,0 pg/mL. A amostra fortificada foi sonicada (Ultrasson marca Branson, modelo 1510R-MT) por 30 segundos e a análise foi realizada conforme as etapas da metodologia descrita.

A avaliação inicial da metodologia para detecção de AFM₁ em leite foi realizada através de 6 repetições do teste de recuperação. Em cada amostra deste teste adicionou-se alíquotas da solução de padrão analítico que permitissem produzir uma contaminação com concentração de 10,0 pg/mL. A amostra fortificada foi sonicada por 30 segundos e a análise foi realizada conforme as etapas da metodologia descrita.

Entre as bateladas para detecção de AFM₁ em urina e leite humanos, foram realizados testes de recuperação para acompanhamento das amostras. Foram adicionadas concentrações que produzissem uma contaminação de 4 e 10,0 pg/mL, respectivamente.

União Européia recomenda como critério para aceitação das recuperações, valores entre 60 e 120% de recuperação, quando a concentração de AFM₁ adicionada está entre 10,0 e 50,0 pg/mL. Embora os níveis de AFM₁ adicionados nas recuperações em amostras de urina para este estudo tenham sido inferiores ao limite mínimo de contaminação utilizado pela União Européia, manteve-se a faixa de 60-120% de recuperação como referência para aceitação das recuperações deste estudo (EUROPEAN COMMUNITIES, 2006).

2.5.7 Confirmação da identidade da AFM₁

A confirmação da identidade da AFM₁ foi realizada co-cromatografia e pela formação de AFM_{2a}, seguindo o protocolo de Polychronaki (2007). O extrato de amostra foi evaporado até a secura sob fluxo de nitrogênio e ao frasco contendo o extrato seco foi adicionado 200 µL de n-hexano e 200 µL de ácido trifluoroacético. A mistura foi sonicada durante 30 segundos, mantida em repouso durante 10 minutos, evaporada até secura e reconstituída com 500 µL de fase móvel.

2.5.8 Análise estatística

As médias de concentração de AFM₁ e as médias de consumo dos produtos de risco encontrados foram comparadas, visando avaliar estatisticamente se os valores observados entre a população da zona rural e urbana, dentro de cada amostragem e no total de amostras foram diferentes. Para isto, foram utilizados três métodos de comparação de médias o teste T, o teste de Duncan e o teste de Tukey.

A correlação entre os dados de consumo de alimentos de risco, obtidos pelo inquérito de frequência alimentar e pelo recordatório 24 horas, foi avaliada pelo coeficiente de correlação de Pearson.

2.6 Resultados e Discussão

2.6.1 Curva de calibração

A curva de calibração construída (Figura 4) resultou em uma equação com um coeficiente de determinação (R^2) igual a 0,9907. Portanto, a reta mostrou-se com uma linearidade adequada na faixa de concentração testada.

Figura 4 – Curva de calibração AFM₁

2.6.2 Avaliação da metodologia

2.6.2.1 Limite de detecção e quantificação para as metodologias

O limite de detecção de AFM₁ em urina e leite calculado foi de 0,6 pg/mL, considerando o volume do extrato final e de injeção de 500 e 100 µL, respectivamente. O limite de quantificação foi de 1,8 pg/mL.

2.6.2.2 Testes de Recuperações das Metodologias

Os testes de recuperação para verificar a adequação inicial da metodologia em urina forneceram valores entre 73 e 97%, com média de 83%, para fortificação de 4,0 pg/mL entre as 7 replicatas. Os dados referentes às replicatas desta avaliação são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 – Testes de recuperações efetuados para avaliação da metodologia de detecção de AFM₁ em urina

Replicata	Concentração de AFM ₁ recuperada (pg/mL)	Recuperação (%)
1	3,0	75
2	3,9	97
3	3,2	79
4	3,6	89
5	3,2	79
6	3,6	89
7	2,9	73
Média	3,3	83
DP*	0,35	8,80
CV**	10,6	10,6

* DP – Desvio Padrão

** CV – Coeficiente de Variação

Os testes de recuperação para verificar o desempenho da metodologia durante as bateladas das análises para detecção de AFM₁ em urina apresentaram resultados entre 61 e 99,7%, com uma média de 70,2%.

Os testes de recuperação para verificar a adequação inicial da metodologia em leite forneceram valores entre 69 e 116%, com média de 93%, para fortificação de 10 pg/mL entre as 6 replicatas. Os dados referentes às replicatas desta avaliação são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 – Testes de recuperações efetuados para avaliação da metodologia de detecção de AFM₁ em leite

Replicata	Concentração de AFM ₁ recuperada (pg/mL)	Recuperação (%)
1	8,6	86
2	6,9	69
3	10,0	100
4	11,2	112
5	11,6	116
6	9,6	96
Média	9,6	96
DP*	1,7	17,0
CV**	17,6	17,6

* DP – Desvio Padrão

** CV – Coeficiente de Variação

Os testes de recuperação para verificar o desempenho da metodologia durante as análises das bateladas de amostras para detecção de AFM₁ em leite apresentaram resultados de 92% e 82% (média 87%).

Observa-se que os valores dos testes de recuperação, para validação inicial das metodologias, assim como, dos testes realizados para acompanhamento das análises, apresentaram-se dentro da faixa adotada como aceitável, entre 60 e 120%.

2.6.3 Confirmação da Identidade da AFM₁

A co-cromatografia, utilizada para verificar a coincidência do pico cromatográfico de AFM₁ da amostra com o pico cromatográfico gerado pela adição de uma alíquota de padrão de AFM₁ sobre o extrato da mesma amostra, mostrou uma sobreposição total dos picos e aumento da área do pico proporcional à concentração de padrão adicionada.

A confirmação da identidade através da derivatização mostrou que o pico de AFM₁ observado inicialmente próximo de 13,3 minutos desapareceu após o processo de derivatização e um novo pico apareceu com o TR de aproximadamente 5,2 minutos. Isto confirmou a identidade da AFM₁.

As Figuras 5 e 6 mostram a confirmação da identidade da AFM₁ realizada em urina, através da injeção da amostra sem e com derivatização, respectivamente.

Figura 5 – Amostra de urina sem derivatização (TR = 13,38 min.)

Figura 6 – Amostra de urina derivatizada (TR = 5,26 minutos)

2.6.4 Excreção de AFM₁

2.6.4.1 Concentração de AFM₁ nas amostras de urina analisadas

A análise das amostras de urina dos 69 indivíduos mostrou que 54 (78%) das amostras apresentaram contaminação com concentrações detectáveis de AFM₁, superiores ao limite de quantificação da metodologia utilizada. Entre os dois grupos analisados, 31 (91%) dos 34 indivíduos residentes na zona urbana e 23 dos 35 (66%) indivíduos residentes na zona rural apresentaram concentrações de AFM₁ na urina.

A Tabela 3 apresenta as concentrações de AFM₁ detectadas em amostras de urina coletadas entre as amostragens.

Tabela 3 – Concentrações de AFM₁ excretadas entre os grupos nas 3 amostragens

1ª Amostragem				2ª Amostragem				3ª Amostragem			
Zona Urbana		Zona Rural		Zona Urbana		Zona Rural		Zona Urbana		Zona Rural	
		Santa Olímpia		Exp. Ocupacional		Santana				Santa Olímpia	
Part. n°	cc M ₁ pg/mL	Part. n°	cc M ₁ pg/mL	Part. n°	cc M ₁ pg/mL	Part. n°	cc M ₁ pg/mL	Part. n°	cc M ₁ pg/mL	Part. n°	cc M ₁ pg/mL
1	7,3	15	10,5	29	6,1	42	ND	56	Traços	63	3,6
2	2,1	16	11,1	30	2,7	43	Traços	57	4,3	64	2,3
3	3,9	17	11,8	31	2,7	44	ND	58	8,8	65	ND
4	ND*	18	1,8	32	1,9	45	ND	59	2,4	66	ND
5	10,2	19	1,8	33	6,6	46	6,4	60	3,2	67	Traços
6	19,8	20	3,6	34	5,8	47	ND	61	ND	68	3,4
7	2,4	21	1,9	35	8,5	48	9,8	62	ND	69	3,2
8	2,4	22	1,9	36	Traços	49	ND				
9	Traços**	23	9,6	37	5,9	50	ND				
10	Traços	24	39,9	38	3,4	51	9,8				
11	2,0	25	4,3	39	6,5	52	ND				
12	2,8	26	2,4	40	Traços	53	ND				
13	Traços	27	2,0	41	Traços	54	ND				
14	2,1	28	3,3			55	ND				
M***	5,5a****		7,6a		5,0a		8,7 ^a		4,7a		3,1a

* ND – concentração não detectada pela metodologia utilizada

** Traços – concentrações entre o LD (0,6 pg/mL) e LQ (1,8 pg/mL)

*** M - média entre as contaminações com concentrações iguais ou acima do LQ

**** Letras iguais significam que não houve diferença significativa entre os dados (p<0,05)

Nas três amostragens realizadas na zona urbana, a frequência de contaminação de AFM₁ nas amostras de urina dos indivíduos participantes foi de 93%, 100% e 71%, para primeira, segunda e terceira amostragens, respectivamente.

As amostragens realizadas na zona rural apresentam diferenças quanto à frequência de excreção tanto entre amostragens como entre os dois bairros analisados. No bairro Santa Olímpia, foi observada uma frequência de excreção de AFM₁ de 100% na primeira amostragem e de 71% na terceira, enquanto no bairro Santana observou-se uma menor frequência de excreção (21%).

As concentrações de contaminação de AFM₁ observadas entre os participantes deste estudo apresentaram grande variabilidade, tanto entre os indivíduos de uma mesma amostragem quanto entre indivíduos de amostragens diferentes. Não houve diferença significativa entre as concentrações de AFM₁ observadas entre as amostras de urina dos indivíduos da zona urbana e rural.

As concentrações médias de AFM₁ quantificável na urina dos indivíduos da zona urbana e rural foram de 6,5 e 5,0 pg/mL, respectivamente. As médias de concentração das três amostragens na zona urbana apresentaram valores de 5,5, 5,0 e 4,7 pg/mL, para primeira, segunda e terceira amostragens, respectivamente, com uma amplitude de concentrações de amostras quantificáveis desde 1,8 até 19,8 pg/mL. Na zona rural, a segunda amostragem apresentou a maior média de excreção entre os indivíduos, de 8,7 pg/mL, enquanto a primeira e terceira, ambas realizadas em Santa Olímpia, apresentaram concentrações médias de 7,6 e 3,1 pg/mL, respectivamente. A faixa de concentrações de AFM₁ observadas teve uma amplitude de 1,8 até 39,9 pg/mL.

A faixa de concentração de contaminação por AFM₁ em urina observadas neste estudo é mais restrita e menor do que as faixas de concentrações relatadas em outros países. Entretanto, a frequência de positividade detectada neste estudo foi elevada (78%), indicando que as populações estudadas apresentaram uma exposição significativa às aflatoxinas, no entanto, a avaliação das concentrações pode ter sido subestimada, considerando que a AFM₁ é rapidamente excretada, tanto a amostragem quanto a coleta foram pontuais, existe uma elevada heterogeneidade e uma

sazonalidade da contaminação por aflatoxinas entre os alimentos considerados de risco.

A Tabela 4 apresenta um breve resumo das concentrações de AFM₁ em urina observadas em regiões onde existe uma incidência de contaminação por aflatoxinas nos alimentos.

Tabela 4 – Concentrações de AFM₁ em urina relatadas em outros países

Local	Faixa de Concentração (média)	Frequência	Autor
China	10 – 330 pg/mL (40)	50%	Mykkänen et al. (2005)
Serra Leone	300 – 374.000 pg/mL (-)	~47%	Jonsyn-Ellis (2000)
Gana	11.562 pg/mg (472,67)	91,2%	Joly et al. (2006)
República Tcheca	19 – 19.219 pg/g (390,5)	57,6%	Malir et al. (2006)

Embora a região da cidade de Piracicaba – SP, seja uma região que apresente características indicativas de uma região com padrão de desenvolvimento sócio-econômico alto, a frequência de positividade de contaminação por AFM₁ entre os indivíduos mostrou-se elevada, sugerindo que em outras localidades do Estado e do País, com características sócio-econômicas menos favoráveis possa existir uma exposição ainda mais freqüente e elevada às aflatoxinas.

2.6.4.2 Concentração de AFM₁ nas amostras de leite analisadas

Dentre as 18 amostras de leite analisadas, apenas uma apresentou concentração de contaminação entre o limite de detecção (0,6 pg/mL) e o limite de quantificação (1,8 pg/mL).

Navas analisou 50 amostras de leite provenientes de bancos de leite e obteve apenas uma amostra contaminada com concentração de 24 pg/mL, utilizando uma metodologia que apresentou um LQ de 10 pg/mL.

2.6.5 Análise do Consumo de alimentos de risco

A análise dos dados de consumo do inquérito de frequência alimentar e do recordatório 24 horas não demonstraram diferenças significativas entre os consumos relatados pelos indivíduos da zona urbana e da rural, como um todo nem entre as amostragens. A única exceção foi a diferença significativa observada no inquérito de frequência alimentar entre os indivíduos da zona urbana e da zona rural da 3ª amostragem.

Não houve correlação entre os dados de consumo relatados nos inquéritos de frequência alimentar e recordatórios 24 horas dos indivíduos. Os dados de consumo relatados pelos indivíduos para os grupos de alimentos investigados apresentaram grande variabilidade. Para um mesmo grupo de alimentos, para os derivados de leite, por exemplo, foram reportados tanto consumos com valores próximos a 10 g ou mL, como consumos superiores a 1.000 g ou mL/dia.

Observou-se um padrão de consumo comum aos indivíduos das amostragens relativo ao consumo de alimentos derivados de leite. Esses alimentos foram os mais consumidos em quantidade e em frequência de relatos de consumo, considerando tanto os resultados do inquérito de frequência alimentar quanto pelo recordatório 24 horas. A média de consumo para derivados de leite relatada no inquérito de frequência alimentar foi 315,87 g ou mL, enquanto no recordatório 24 horas, a média foi de 343,84 g ou mL. Comparando os dados de consumo obtidos com os dados reportados pela POF 2002-2003 para a Região Sudeste, cujo consumo diário de derivados de leite é de 181,18 g ou mL, observa-se que os dados obtidos por este estudo, para esses alimentos, é quase duas vezes maior, tanto pelo inquérito de frequência quanto pelo recordatório 24 horas. Entretanto, a amplitude do consumo relatado para esses alimentos variou entre valores desde nenhum consumo até valores como 1.111,62 g ou mL/dia.

O grupo de alimentos derivados de milho foi o segundo tipo mais consumido, segundo o inquérito de frequência, cuja média de consumo de 22,07 g/dia foi semelhante aos dados de consumo desses alimentos citados pela POF (19,07 g/dia). Entretanto, o consumo obtido pelo recordatório 24 horas foi inferior com média de 11,7

g. A amplitude do consumo relatado para esse grupo de alimentos varia desde consumo zero até 66,66 g/dia.

Com relação aos derivados de amendoim, observa-se o oposto em relação às médias dos dois tipos de inquéritos. Enquanto o inquérito de frequência apresentou uma média de 4,45 g/dia, o recordatório demonstrou um consumo médio de 6,25 g/dia. A amplitude de consumo relatada para esse tipo de alimento variou desde nenhum consumo até 60 g/dia.

O consumo dos alimentos como castanhas, nozes, amêndoas e frutas secas foi muito pouco relatado. A ingestão destes alimentos normalmente se restringiu a períodos do ano e a estimativa das quantidades pelos indivíduos tornou-se bastante difícil. Nenhum participante relatou o consumo desses alimentos no recordatório 24 horas. Apenas os indivíduos da zona rural da primeira e segunda amostragens e da zona urbana da segunda amostragem relataram no inquérito de frequência a ingestão ocasional desses alimentos. Apenas um indivíduo apresentou um consumo extremamente diferente dos demais, de 19,04 g/dia, sendo que a amplitude dos demais participantes para esses alimentos foi de 0 até 1,5 g/dia. A média obtida pelo inquérito de frequência alimentar foi de 0,27 g/dia, valor 2,5 vezes maior que a média diária obtida pela POF, de 0,104 g para esses alimentos.

Os dados de consumo de produtos de risco divididos por categorias e obtidos através do inquérito de frequência alimentar e recordatório 24 horas, são apresentados nas Tabelas 5, 6, 7, 8, 9 e 10.

Tabela 5 – Consumo da Zona Urbana na 1ª Amostragem

Part. Nº	Derivados de milho (g/dia)		Derivados de amendoim (g/dia)		Derivados de leite (g ou ml/dia)		Castanhas, nozes, etc (g/dia)		CONSUMO TOTAL (g ou ml/dia)		Excreção AFM ₁ (pg/mL)
	IQF	IR24H	IQF	IR24H	IQF	IR24H	IQF	IR24H	IQF	IR24H	
15	49,99	120,00	34,99	0,00	655,98	560,00	0,00	0,00	740,96	680,00	10,5
16	66,66	180,00	8,33	0,00	275,82	790,00	0,00	0,00	350,81	970,00	11,1
17	24,16	0,00	4,16	60,00	277,31	260,00	0,00	0,00	305,63	320,00	11,8
18	63,16	0,00	0,00	60,00	427,99	250,00	0,55	0,00	492,25	310,00	1,8
19	30,00	0,00	4,16	25,00	488,31	150,00	0,14	0,00	522,61	175,00	1,8
20	50,66	0,00	10,82	50,00	365,60	200,00	0,00	0,00	418,08	250,00	3,6
21	53,25	120,00	8,32	0,00	556,09	450,00	0,00	0,00	617,66	570,00	1,9
22	23,99	50,00	0,00	0,00	337,89	0,00	0,00	0,00	361,88	50,00	1,9
23	42,95	0,00	7,03	10,00	680,54	800,00	19,04	0,00	849,98	810,00	9,6
24	19,99	0,00	3,88	0,00	214,66	250,00	0,00	0,00	238,53	250,00	39,9
25	28,32	0,00	0,00	0,00	424,83	400,00	0,00	0,00	453,15	400,00	4,3
26	7,49	0,00	2,08	0,00	82,63	550,00	0,00	0,00	92,20	550,00	2,4
27	13,31	0,00	0,00	0,00	181,16	400,00	0,00	0,00	194,47	400,00	2,0
28	8,33	0,00	0,00	0,00	175,50	650,00	0,00	0,00	183,83	650,00	3,3
média	34,45	33,57	0,00	14,64	367,45	407,85	0,00	0,00	740,96	456,07	7,6

* ND – não detectado pela metodologia utilizada

** Traços – concentrações entre o LD e LQ da metodologia

Tabela 6 – Consumo da Zona Rural na 1ª Amostragem

Part. Nº	Derivados de milho (g/dia)		Derivados de amendoim (g/dia)		Derivados de leite (g ou ml/dia)		Castanhas e frutas secas (g/dia)		CONSUMO TOTAL (g ou ml/dia)		Excreção AFM ₁ (pg/mL)
	IQF	IR24H	IQF	IR24H	IQF	IR24H	IQF	IR24H	IQF	IR24H	
42	48,87	0,00	50,00	0,00	10,54	20,00	0,04	0,00	109,45	20,00	ND*
43	4,16	0,00	0,00	0,00	495,10	340,00	0,07	0,00	499,33	340,00	Traços**
44	0,00	0,00	0,00	0,00	58,31	315,00	0,14	0,00	58,45	315,00	ND
45	17,17	0,00	1,66	0,00	183,53	250,00	0,03	0,00	202,38	250,00	ND
46	15,82	0,00	1,66	0,00	44,99	50,00	0,00	0,00	62,47	50,00	6,4
47	41,65	0,00	0,00	20,00	446,41	300,00	0,00	0,00	488,06	320,00	ND
48	2,19	0,00	0,00	0,00	58,31	320,00	0,00	0,00	60,50	320,00	9,8
49	35,81	0,00	10,13	0,00	362,49	180,00	0,07	0,00	372,69	180,00	ND
50	12,66	0,00	0,00	0,00	319,99	300,00	0,00	0,00	332,65	300,00	Traços
51	28,32	0,00	0,00	0,00	179,12	300,00	0,00	0,00	207,44	300,00	9,8
52	24,99	0,00	0,00	0,00	84,31	310,00	0,00	0,00	109,30	310,00	Traços
53	24,15	0,00	19,15	0,00	139,30	315,00	0,00	0,00	182,60	315,00	Traços
54	15,81	0,00	0,00	0,00	44,44	0,00	0,00	0,00	60,25	0,00	ND
55	41,65	0,00	0,00	20,00	446,41	300,00	0,00	0,00	488,06	320,00	Traços
média	22,37	0,00	5,90	2,86	205,23	235,71	0,02	0,00	230,97	238,57	8,7

* ND – não detectado pela metodologia utilizada

** Traços – concentrações entre o LD e LQ da metodologia

Tabela 7 – Consumo da Zona Urbana na 1ª Amostragem

Part. Nº	Derivados de milho (g/dia)		Derivados de amendoim (g/dia)		Derivados de leite (g ou ml/dia)		Castanhas, nozes, etc (g/dia)		CONSUMO TOTAL (g ou ml/dia)		Excreção AFM ₁ (pg/mL)
	IQF	IR24H	IQF	IR24H	IQF	IR24H	IQF	IR24H	IQF	IR24H	
29	23,59	0,00	1,66	0,00	287,61	250,00	0,00	0,00	312,86	250,00	6,1
30	15,26	0,00	2,73	0,00	433,33	0,00	0,07	0,00	451,39	0,00	2,7
31	24,99	0,00	3,33	0,00	240,26	270,00	0,00	0,00	268,58	270,00	2,7
32	16,65	30,00	0,00	0,00	76,05	250,00	0,00	0,00	92,7	280,00	1,9
33	38,41	0,00	16,66	50,00	425,41	200,00	0,00	0,00	480,48	250,00	6,6
34	82,46	0,00	3,33	0,00	102,26	870,00	0,07	0,00	188,12	870,00	5,8
35	32,88	0,00	13,22	21,00	174,32	250,00	0,00	0,00	220,43	271,00	8,5
36	19,15	0,00	3,33	0,00	215,99	200,00	0,00	0,00	238,48	200,00	Traços*
37	4,10	0,00	12,85	0,00	221,61	285,00	0,00	0,00	238,56	285,00	5,9
38	4,54	100,00	0,45	0,00	234,71	250,00	0,30	0,00	240,00	350,00	3,4
39	19,01	0,00	2,04	0,00	215,54	950,00	0,70	0,00	237,29	950,00	6,5
40	21,01	0,00	4,26	0,00	296,48	300,00	1,50	0,00	323,25	300,00	Traços
41	34,13	0,00	0,00	0,00	71,32	0,00	0,27	0,00	105,72	0,00	Traços
média	24,01	9,28	4,56	5,07	213,92	313,46	0,21	0,00	242,70	382,92	5,0

* ND – não detectado pela metodologia utilizada

** Traços – concentrações entre o LD e LQ da metodologia

Tabela 8 – Consumo da Zona Rural na 2ª Amostragem

Part. Nº	Derivados de milho (g/dia)		Derivados de amendoim (g/dia)		Derivados de leite (g ou ml/dia)		Castanhas, nozes, etc (g/dia)		CONSUMO TOTAL (g ou ml/dia)		Excreção AFM ₁ (pg/mL)
	IQF	IR24H	IQF	IR24H	IQF	IR24H	IQF	IR24H	IQF	IR24H	
42	48,87	0,00	0,00	0,00	10,54	20,00	0,04	0,00	109,45	20,00	ND*
43	4,16	0,00	0,00	0,00	495,1	340,00	0,07	0,00	499,33	340,00	Traços**
44	0,00	0,00	0,00	0,00	58,31	315,00	0,14	0,00	58,45	315,00	ND
45	17,17	0,00	1,66	0,00	183,53	250,00	0,03	0,00	202,38	250,00	ND
46	15,82	0,00	1,66	0,00	44,99	50,00	0,00	0,00	62,47	50,00	6,4
47	41,65	0,00	0,00	20,00	446,41	300,00	0,00	0,00	488,06	320,00	ND
48	2,19	0,00	0,00	0,00	58,31	320,00	0,00	0,00	60,50	320,00	9,8
49	35,81	0,00	10,13	0,00	362,49	180,00	0,07	0,00	372,69	180,00	ND
50	12,66	0,00	0,00	0,00	319,99	300,00	0,00	0,00	332,65	300,00	Traços
51	28,32	0,00	0,00	0,00	179,12	300,00	0,00	0,00	207,44	300,00	9,8
52	24,99	0,00	0,00	0,00	84,31	310,00	0,00	0,00	109,30	310,00	Traços
53	24,15	0,00	19,15	0,00	139,3	315,00	0,00	0,00	182,60	315,00	Traços
54	15,81	0,00	0,00	0,00	44,44	0,00	0,00	0,00	60,25	0,00	ND
55	41,65	0,00	0,00	20,00	446,41	300,00	0,00	0,00	488,06	320,00	Traços
média	22,37	0	2,33	2,86	41,84	235,71	0,02	0,00	230,97	238,57	8,7

* ND – não detectado pela metodologia utilizada

** Traços – concentrações entre o LD e LQ da metodologia

Tabela 9 – Consumo da Zona Urbana na 3ª Amostragem

Part. Nº	Derivados de milho (g/dia)		Derivados de amendoim (g/dia)		Derivados de leite (g ou ml/dia)		Castanhas, nozes, etc (g/dia)		CONSUMO TOTAL (g ou ml/dia)		Excreção AFM ₁ (pg/mL)
	IQF	IR24H	IQF	IR24H	IQF	IR24H	IQF	IR24H	IQF	IR24H	
56	30,92	0,00	0,00	0,00	60,62	120,00	0,00	0,00	91,54	120,00	Traços*
57	0,00	0,00	1,23	0,00	318,64	270,00	0,00	0,00	319,87	270,00	4,3
58	16,07	0,00	0,26	0,00	199,32	220,00	0,00	0,00	215,65	220,00	8,8
59	29,30	0,00	0,00	0,00	47,66	270,00	0,00	0,00	2,56	270,00	2,4
60	16,65	0,00	0,00	30,00	76,05	750,00	0,00	0,00	92,70	780,00	3,2
61	11,66	0,00	0,00	0,00	128,32	150,00	0,00	0,00	139,98	150,00	ND**
62	15,33	0,00	0,00	0,00	447,58	120,00	0,00	0,00	0,00	120,00	ND
média	17,13	0,00	0,21	4,28	182,60	271,43	0,00	0,00	123,19	275,71	4,7

* ND – não detectado pela metodologia utilizada

** Traços – concentrações entre o LD e LQ da metodologia

Tabela 10 – Consumo da Zona Rural na 3ª Amostragem

Part. Nº	Derivados de milho (g/dia)		Derivados de amendoim (g/dia)		Derivados de leite (g ou ml/dia)		Castanhas, nozes, etc (g/dia)		CONSUMO TOTAL (g ou ml/dia)		Excreção AFM ₁ (pg/mL)
	IQF	IR24H	IQF	IR24H	IQF	IR24H	IQF	IR24H	IQF	IR24H	
63	5,99	0,00	0,00	0,00	88,40	320,00	0,00	0,00	94,39	320,00	3,6
64	10,66	0,00	3,33	0,00	440,30	450,00	0,00	0,00	454,29	450,00	2,3
65	14,44	0,00	0,00	0,00	35,78	100,00	0,00	0,00	50,22	100,00	ND
66	20,83	0,00	0,00	0,00	441,03	850,00	0,00	0,00	461,86	850,00	ND
67	19,98	0,00	6,66	0,00	373,75	400,00	0,00	0,00	393,73	400,00	Traços
68	23,99	50,00	0,00	0,00	337,89	0,00	0,00	0,00	361,88	50,00	3,4
69	10,66	0,00	3,33	0,00	440,3	550,00	0,00	0,00	454,29	550,00	3,2
média	16,74	7,14	1,90	0,00	308,21	381,43	0,00	0,00	324,38	388,57	3,1

* ND – não detectado pela metodologia utilizada

** Traços – concentrações entre o LD e LQ da metodologia

2.6.6 Correlação entre concentração de AFM₁ e consumo de produtos de risco

A Tabela 11 apresenta os resultados das análises de correlação entre a concentração de AFM₁ na urina e os inquéritos alimentares para $p < 0,05$, entre o total de indivíduos.

Tabela 11 – Avaliação da correlação entre a concentração de AFM₁ na urina e consumo levantado através dos inquéritos alimentares

Parâmetros	Inquérito de Frequência	Recordatório 24 horas
Concentração AFM ₁	$r = 0,07831$ $p < 0,5224^*$	$r = 0,07736$ $p < 0,5275$

* $p < 0,05$

A avaliação da correlação entre os resultados de concentração de AFM₁ em urina e os dados de consumo de produtos de risco, obtidos pelos inquéritos alimentares, através do coeficiente de correlação de Pearson, não mostrou correlação entre estes parâmetros. Isso pode ter ocorrido principalmente em função da análise da correlação não ter sido realizada utilizando as concentrações de contaminação de alimentos que foram ingeridos, mas sim com a ingestão média de alimentos que poderiam ou não estar contaminados. Existe a possibilidade de um tipo específico ou de todos os alimentos de risco consumidos e considerados neste estudo não estarem contaminados assim como, existe a possibilidade de que outros alimentos, não investigados nos inquéritos, serem os responsáveis pela exposição as aflatoxinas nos indivíduos com AFM₁ detectada em suas urinas.

Outra observação relevante é a que os indivíduos podem apresentar taxa de excreção de AFM₁ variável, pois fatores inerentes ao organismo ou não podem interferir com a metabolização da AFB₁ até AFM₁. Assim, a variabilidade na utilização deste caminho metabólito pelos indivíduos participantes deste estudo pode ter também ter contribuído para não permitir uma correlação entre consumo de produtos de risco e concentração de AFM₁ detectada na urina.

3 CONCLUSÕES

Entre os 69 indivíduos participantes deste estudo, 54 (78%) apresentaram excreção de AFM₁ na urina, em concentrações desde 0,6 pg/mL até 39,9 pg/mL. A zona urbana apresentou maior frequência de excreção de AFM₁ do que a zona rural.

Não foram observadas diferenças entre as concentrações de AFM₁ detectadas em amostras de urina dos indivíduos da zona urbana e rural, nem entre os níveis de consumo de alimentos de risco relatados nos inquéritos de frequência alimentar e recordatório 24 horas. Entretanto, observou-se uma variabilidade muito grande entre os consumos reportados pelos indivíduos participantes deste estudo.

O consumo de alimentos como castanhas, amêndoas, nozes e frutas secas foi extremamente esporádico entre os indivíduos e entre os grupos.

Não houve correlação entre a ingestão de alimentos de risco avaliada pelos dois instrumentos de inquérito e as concentrações de AFM₁ detectadas em amostras de urina.

Foi observada contaminação detectável de AFM₁ em apenas uma amostra das 18 amostras de leite humano analisadas. A concentração desta amostra apresentou-se entre 0,6 e 1,8 pg/mL (nível de traços).

Embora as concentrações de contaminação por AFM₁ sejam inferiores as observadas em outros países, a frequência de positividade de contaminação entre os indivíduos foi elevada, demonstrando que a exposição às aflatoxinas pode ser significativa nessa localidade. São necessários novos estudos utilizando amostragens mais abrangentes para avaliar adequadamente a exposição às aflatoxinas das populações estudadas.

REFERÊNCIAS

ABDULRAZZAQ, Y.M.; OSMAN, N.; IBRAHIM, A. Fetal exposure to aflatoxinas in the United Arab Emirates. **Annals of Tropical Paediatrics**, Guildford Surrey, v. 22, p. 3-9, 2002.

ABDULRAZZAQ, Y.M.; OSMAN, N.; YOUSIF, Z.M.; AL-FALAH, S. Aflatoxin M₁ in breast-milk of UAE women. **Annals of Tropical Paediatrics**, Guildford Surrey, v. 23, p. 173-179, 2003.

AGNES, V.F.; AKBARSHA, M.A. Spermatotoxic effects to aflatoxin B₁ in the albino mouse. **Food and Chemical Toxicology**, London, v. 41, p. 119-130, 2003.

ALLCROFT, R.; CARNAGHAN, R.B.A. Groundnut toxicity: an examination for toxin in human food products from animals fed toxic groundnut meal. **Veterinary Record**, London, v. 75, p. 259-263, 1963.

AMARAL, K.A.S.; NASCIMENTO, G.B.; SEKIYAMA, B.L.; JANEIRO, V.; MACHINSKY JR., M. Aflatoxinas em produtos de milho comercializados no Brasil e riscos para a saúde humana. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n. 2, p. 336-342, 2006.

ASAO, T.; BUCHI, G.; ABDEL-KADER, M.M.; CHANG, S.B.; WICK, E.L.; WOGAN, G.N. Aflatoxins B and G. **Journal American Chemical Society**, Easton, v. 85, p. 1706-1707, 1963.

AUTRUP, H., WAKHISI, J., VAHAKANGAS, K., WASUNNA, A., HARRIS, C.C. Detection of 8,9-dihydro-(7'-guanyl)-9-hydroxyafatoxin B₁ in human urine. **Environmental Health Perspectives**, v. 62, p. 105-108, 1985. Disponível em: <<http://www.ehponline.org/docs/1985/062/toc.html>>. Acesso em: 10 jun. 2007.

AZIZ-BAUMGARTNER, E.; LINDBLADE, K.; GIESEKER, K.; ROGERS, H.S.; KIESZAK, S.; NJAPAU, H.; SCHLEICHER, R.; McCOY, L.; MISORE, A.; DeCOCK, K.; RUBIN, C.; SLUTSKER, L.; Aflatoxin Investigation Group. Case-control study of an acute aflatoxicosis outbreak, Kenya, 2004. **Environmental Health Perspectives**, v. 113, n. 12, p. 1779-1784, 2005. Disponível em: <<http://www.ehponline.org/members/2005/8384/8384.pdf>>. Acesso em: 07 jul. 2007.

BAGGIO, E.C.R. **Determinação de aflatoxina M₁ em leite pasteurizado pelos métodos de CCD e CLAE utilizando coluna de imunoafinidade.** 2006. 95 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

BAÑUELOS, M.T.A.; CARVAJAL, M.M.; PEÓN, N.R.; ROJO, F. Aductos-ADN-Aflatoxina como biomarcadores de exposición en grupos de riesgo de cáncer de hígado. **Revista Cubana de Oncologia**, Cuba, v. 16, n. 1, p. 35-39, 2000.

BENNETT, J.W.; KLICH, M. Mycotoxins. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 16, n. 3, p. 497-516, 2003.

BITTENCOURT, A.B.F. **Avaliação da microbiota fúngica e determinação de aflatoxinas e fumonisinas em fubá de milho e farinha de milho comercializados no município de São Paulo.** 2002, 81 p. Dissertação (Mestrado em Nutrição) - Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, 2002.

BOGNANNO, M.; FAUCI, L.L.; RITIENI, A.; TAFURI, A.; LORENZO, A.; MICARI, P.; RENZO, L.; CIAPPELLANO, S.; SARULLO, V.; GALVANO, F. Survey of the occurrence of aflatoxin M₁ in ovine milk by HPLC and its confirmation by MS. **Molecular Nutritional Food Research**, Weinheim, v. 50, p. 300-350, 2006.

BRASIL, Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 274, de 15 de outubro de 2002. Disponível em: <<http://e-legis.bvs.br/leisref/public/home.php>>. Acesso em: 10 fev. 2005.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Abastecimento e Reforma Agrária. Portaria n. 183, de 21 de março de 1996. Dispõe sobre adotar regulamento técnico para MERCOSUL sobre limites máximos de Aflatoxinas admissíveis no leite, amendoim e milho, aprovado pela resolução do Grupo Mercado Comum do Sul n. 56/94, de 01 de janeiro de 1995. **Diário Oficial da União**, Brasília, 25 mar. 1996.

BULLERMAN, L.B.; SHOROEDER, L.L.; PARK, K.Y. Formation and control of mycotoxins in food. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 47, p. 637- 646, 1984.

BUSBY, W.F.; WOGAN, G.N. Aflatoxins. In: SEARLE, C.E. (Ed.). **Chemical Carcinogens**, Washington: American Chemical Society, 1984, chap. 16, p. 945-1136, 2.v.

CALDAS, E.D.; SILVA, S.C.; OLIVEIRA, N.O. Aflatoxinas e ocratoxinas A em alimentos e riscos para a saúde humana. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 36, n. 3, p. 319-323, 2002.

CAMPBELL, T.C.; CAEDO, J.P.; BULATO-JAYME, J.; SALAMAT, L.; ENGEK, R.W. Aflatoxin M₁ in human urine. **Nature**, Londres, v. 227, p. 403-404, 1970.

CENTER FOR DISEASE OF CONTROL (CDC). Outbreak of Aflatoxin Poisoning - Eastern and Central Provinces, Kenya, January-July 2004. **MMWR Weekly**, v. 53, n. 34, p. 790-793, 03 Sept. 2004. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5334a4.htm>>. Acesso em: 10 jan. 2007.

CHANG, S.B.; KADER, M.M.A.; WICK, E.L.; WOGAN, G.N. Aflatoxin B₂: chemical identity and biological activity. **Science AAAS**, United Kingdom, v. 142, n. 3596, p. 1191-1192, 1963.

CHAO, T.C.; LO, D.S.T.; BLOODWORTH, B.C.; GUNASEGARAM, B.C.; KOH, T.H. Aflatoxin exposure in Singapoure: blood aflatoxin levels in normal subjects, hepatitis B virus carriers and primary hepatocellular carcinoma patients. **Medicine Science Law**, London, v. 34, n. 4, p. 289-298, 1994.

CHEN, C.-J., WANG, L.-Y, LU, S.-N., WU, M.-H., YOU, S.-L., ZHANG, Y.-J., WANG, L.-W., SANTELLA, R.M. Elevated aflatoxin exposure and increased risk of hepatocellular carcinoma. **Hepatology**, Baltimore, v. 24, n. 1, p. 38-42, 1996.

CHENG, Z.; ROOT, M.; PAN, W.; CHEN, J.; CAMPBELL, C.T. Use of improved method for analysis of urinary aflatoxin M₁ in a survey of Mailand China e Taiwan. **Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention**, Denville, v. 6, p. 523-529, 1997.

COULTER, J.B.S; SULIMAN, G.I.; LAMPLUGH, S.M.; MUKHTAR, B.I.; HENDRICKSE, R.G. Aflatoxins in liver biopsies from Sudanese children. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 35, n. 2, p. 360-365, 1986.

COUNCIL FOR AGRICULTURAL SCIENCE AND TECNOLOGY. **Mycotoxins**: risk's in plant, animal and human systems. Washington, 2003, 199 p. (Task force report, 139).

CULLEN, J.M.; NEWBERNE, P.M. Acute hepatotoxicity of aflatoxinas. In: EATON, D.L. GROOPMAN, J.D. (Ed.). **Toxicology of aflatoxinas**: human health, veterinary and agricultural significance, London: Academic Press, 1994, p. 3-26.

CULLEN, J.M.; RUEBNER, B.H.; HSIEH, L.S.; HYDE, D.M.; HSIEH, D.P. Carcinogenicity of dietary aflatoxin M₁ in male Fischer rats compared to aflatoxin B₁. **Cancer Research**, Baltimore, v. 47, n. 1, p. 1913-1917, 1987.

De VRIES, H.R.; MAXWELL, S.M.; HENDRICKSE, R.G. Aflatoxin excretion in children with kwashiorkor or marasmic kwashiorkor – a clinical investigation. **Mycopathologia**, Den Haag, v. 110, p. 1-9, 1990.

DRAGACCI, S.; GROSSO, F. Immunoaffinity column cleanup with liquid chromatography for determination of aflatoxin M₁ in liquid milk: collaborative study. **Journal of AOAC International**, Arlington, v. 84, n. 2, p. 437-443, 2001.

EATON, D.L., RAMSDELL, H.S., NEAL, G.E., Biotransformation of aflatoxinas. In: EATON, D.L., GROOPMAN, J.D. (Ed). **The Toxicology of Aflatoxins**: human health, veterinary, and agricultural significance. London: Academic Press, 1994, p. 45-72.

EC. European Communities. Commission Regulation Directive (EC) 98/53. Laying down the sampling methods of analysis for the official control of the levels for certain contaminants in foodstuffs. **Official Journal of the European Communities**, p. 93-101, 1998. Disponível em: <<http://europa.eu.int/eur-lex/lex/JOYear.do?year=1998>>. Acesso em: 15 abr. 2005.

EC. European Communities. Commission Regulation (EC) 401/2006. Laying down the methods of sampling and analysis for the official control of the levels of mycotoxins in foodstuffs. **Official Journal of the European Communities**, p. 12-34, 2006. Disponível em: <<http://europa.eu.int/eur-lex/lex/JOHtml.do?uri=OJ:L:2006:070:SOM:EN:HTML>>. Acesso em: 23 maio 2005.

EL-NEZAMI, H.S.; NICOLETTI, G.; NEAL, G.E.; DONOHUE, D.C.; AHOKAS, J.T. Aflatoxin M₁ in human breast milk samples from Victoria, Australia and Thailand. **Food and Chemical Toxicology**, London, v. 33, n. 3, p. 173-179, 1995.

ESSIGMANN, J.M., GROY, R.G., NADZAN, A.M., BUSBY JR., W.F., REINHOLD, V.N., BÜCHI, G., WOGAN, G.N. Structural identification of the major DNA adduct formed by aflatoxin B₁ *in vitro*. **Procedures National Academic Science USA**, Whashington, v. 74, n. 5, p. 1870-1874, 1977. Disponível em: <<http://www.pnas.org/cgi/reprint/74/5/1870>>. Acesso em: 10 jun. 2007.

FAO. **Reglamentos a nivel mundial para las micotoxinas en los alimentos y en las raciones en el año 2003**. Roma, 2004, 45 p.

FARIAS, A.X.; ROBSS, C.F.; BITTENCOURT, A.M.; ANDERSEN, P.M.; CORREA, T.B.S. Contaminação endógena por *Aspergillus spp.* em milho pós-colheita no estado do Paraná. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 35, n. 3, 2000.

FONSECA, H.; CALORI-DOMINGUES, M.A.; GLORIA, E.M.; ZAMBELLO, I.V. SEGATTI-PIEADDE, F. Ocorrência de amendoim contaminado no Estado de São Paulo nos anos de 1990 a 1996. In: ENCONTRO NACIONAL DE MICOTOXINAS, 9., 1998, Florianópolis. **Resumos...**, Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina, 1998, p. 118.

GAN, L.S.; SKIPPER, P.L.; PENG, X.C.; GROOPMAN, J.D.; CHEN, J.S.; WOGAN, G.N.; TANNENBAUM, S.R. **Carcinogenesis**, London, v. 9, n. 7, p. 1323-1325, 1988.

GARNER, C.R.; MILLER, E.C.; MILLER, J.A. Liver microsomal metabolism of aflatoxin B₁ to a reactive derivative toxic to *Salmonella typhimurium* TA 1530. **Cancer Research**, Baltimore, v. 32, p. 2058-2066, 1972.

GARRIDO, N.S., IHA, M.H., SANTOS ORTOLANI, M.R., DUARTE FÁVARO, R.M. Occurrence of aflatoxins M₁ and M₂ in milk commercialized in Ribeirão Preto-SP, Brazil. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 20, n.1, p. 70-79, 2003.

GLORIA, E.M.; FONSECA, H.; SOUZA, I.M. Occurrence of mycotoxins in maize delivered to the food industry in Brasil. **Tropical Science**, London, v. 37, p. 107-110, 1997.

GLORIA, E.M.; ROMERO, A.C.; CARVALHO, A.P.P.; CALORI-DOMINGUES, M.A.; GONÇALVES, P.V.M. Perfil da contaminação com aflatoxinas entre embalagens de produtos de amendoim. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n. 2, p. 660-665, 2006.

GONÇALEZ, E.; FELICIO, J.D.; PINTO, M.M.; ROSSI, M.H.; NOGUEIRA, J.H.C.; MANGINELLI, S. Ocorrência de aflatoxina M₁ em leite comercializado em alguns municípios do estado de São Paulo. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 72, n. 4, p. 435-438, 2005.

GONG, Y.Y., EGAL, S., HOUNSA, A., TURNER, P.C., HALL, A.J., K.F. CARDWELL, WILD, C.P. Determinants of aflatoxin exposure in young children from Benin and Togo, West Africa: the critical role of weaning. **International Journal of Epidemiology**, London, v. 32, p. 556-562, 2003.

GROOPMAN, J.D. Molecular dosimetry methods for assessing human aflatoxin exposures. In: EATON, D.L., GROOPMAN, J.D. (Ed). **The Toxicology of Aflatoxins: human health, veterinary, and agricultural significance**. London: Academic Press, 1994, p. 259-280.

GROOPMAN, J.D.; DONAHUE, P.R.; ZHU, J.; CHEN, J.; WOGAN, G. Aflatoxin metabolism in humans: detection of metabolites and nucleic acids adducts in urine by affinity chromatography. **Procedures National Academic Science USA**, Washington, v. 82, p. 6492-6496, 1985.

GROOPMAN, J.D.; TRUDEL, L.J.; DONAHUE, P.R.; MARSHAK-ROTHSTEIN, A.; WOGAN, G.N. High affinity monoclonal antibodies for aflatoxins and their application to solid phase immunoassays. **Procedures National Academic Science USA**, Washington, v. 81, n. 15, p. 7728-7731, 1984. Disponível em: <<http://www.pnas.org/cgi/reprint/81/24/7728>>. Acesso em: 10 jun. 2007.

GROOPMAN, J.D.; WANG, J.-C.; SCHOLL, P. Molecular biomarkers for aflatoxins: from adducts to gene mutations to human liver cancer. **Cancer Journal Physiology and Pharmacology**, Kraków, v. 74, p. 203-209, 1995.

GROOPMAN, J.D.; WILD, C.P.; HASLER, J.; JUNSHI, C.; WOGAN, G.N.; KENSLE, T.W. Molecular epidemiology of aflatoxin exposures: validation of Aflatoxin-N⁷-Guanine levels in urine as a biomarker in experimental rat models and humans. **Environmental Health Perspectives**, v. 99, n. 2, p. 107-113, 1993. Disponível em: <<http://www.ehponline.org/docs/1993/099/toc.html>>. Acesso em: 10 jun. 2007.

GROOPMAN, J.D.; WOGAN, Molecular biomarkers for aflatoxinas and their application to human cancer prevention. **Cancer Research**, London, v. 54, n. 7, p. 1907s-1911s, 1994, supplement.

GROOPMAN, J.D.; ZHU, J.Q.; DONAHUE, P.R.; PIKUL, A.; ZHANG, L.S.; CHEN, J.S.; WOGAN, G.N. Molecular dosimetry of urinary aflatoxin-DNA adducts in people living in Guangxi Autonomous Region, People's Republic of China. **Cancer Research**, London, v. 1, n. 52, p. 45-52, 1992.

HATCH, M. C.; CHEN, C.-J.; LEVIN, B.; JI, B.-T.; YANG; HSU, S.-W.; WANG, L.-W.; HSIEH, L.-L.; SANTELLA, R.M. Urinary aflatoxin levels, hepatitis-B virus infection an hepatocellular carcinoma in Taiwan. **International Journal of Cancer**, New York, v. 54, p. 931-934, 1993.

HASSAN, A.M.; SHEASHAA, H.A.; FATTAH, M.F.A.; IBRAHIM, A.Z.; GABER, O.A. Does aflatoxin as na environmental mycotoxin adversely affect the renal and hepatic functions of Egyptian lactating mother's and their infants? A preliminary report. **International Urology and Nephrology**, v. 38, p. 339-342, 2006. Disponível em: <<http://www.springerlink.com/content/m360162834857413/fulltext.pdf>>. Acesso em: 10 jun. 2007.

HENDRICKSE, R.G.; COULTER, J.B.S.; LAMPLUGH, S.M.; MACFARLANE, S.B.J.; WILLIAMS, T.E.; OMER, M.I.A.; SULIMAN, G.I. Aflatoxins and kwashiorkor: a study in Sudanese children. **British Medical Journal**, London, v. 285, p. 843-846, 1982.

HENDRICKSE, R.G. Kwashiorkor the hypothesis that incriminates aflatoxins. **Pediatrics**, Elk Grove Village, v. 88, p. 376-379, 1991.

HESELTIME, C. W., SORENSEN, W. G.; SMITH, M. Taxonomic studies of the aflatoxin producing strains in the *Aspergillus flavus* group. **Mycologia**, Lancaster, v. 62, p. 123-132, 1970.

HOLZAPFEL, C.W.; STEYN, P.S.; PURCHASE, I.F.H. Isolation and structure of aflatoxins M₁ and M₂, **Tetrahedron Letters**, Oxford, v. 25, p. 2799-2803, 1966.

HSIEH, D.P.H., WONG, J.J. Pharmacokinetics and excretion of aflatoxins. In: EATON, D.L., GROOPMAN, J.D. (Ed). **The Toxicology of Aflatoxins**: human health, veterinary, and agricultural significance. London: Academic Press, 1994, p. 45-72.

IBGE. Pesquisa de Orçamentos Familiares 2002-2003 (POF). Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/pesquisas/pof/default.asp?o=13i=P>>. Acesso em: 05 jul. 2006.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC). **IARC Monograph series on the evaluation of carcinogenic risks to humans**, Lyon, n. 56, 1993.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC). **IARC Monograph series on overall evaluations of carcinogenicity: an updating of IARC Expert Committee**. Lyon, v. 82, n. 171, 2002.

JAKAB, G.J.; HMIELSKI, R.R.; ZARBA, A.; HEMENWAY, D.R.; GROOPMAN, J.D. Respiratory aflatoxicosis: suppression of pulmonary and systemic host defenses in rats and mice. **Toxicology applied pharmacology**, New York, v. 125, p. 198-205, 1994.

JARVIS, B. Factors affecting the production of mycotoxins. **Journal Applied Bacteriology**, Oxford, v. 34, p. 199, 1971.

JOLLY, P.; JIANG, Y.; ELLIS, W.; AWUAH, R.; NNEDU, O.; PHILLIPS, T.; WANG, J.-S.; AFRIYIE-GYAWU, E.; TANG, L.; PERSON, S.; WILLIAMS, J.; JOLLY, C. Determinants of aflatoxin levels in Ghanaians: sociodemographic factors, knowledge of aflatoxin and food handling and consumption practices. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, Jena, v. 209, p. 345-358, 2006.

JONSYN-ELLIS, F. Seasonal variation in exposure frequency and concentration levels of aflatoxins and ochratoxins in urine samples of boys and girls. **Mycopathologia**, Den Haag, v. 152, p. 35-40, 2000.

KAWASHIMA, L.M. **Micotoxinas em alimentos e bebidas nacionais produzidos e comercializados em diferentes regiões do Brasil**. 2004. 94 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos na Área Ciências de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos - UNICAMP, Campinas, 2004.

KAWASHIMA, L.M.; VALENTE SOARES, L.M. Incidência de fumonisinas B₁, aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂ e ocratoxina A e zearalenona em produtos de milho. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n. 3, p. 516-521, 2006.

KEW, M.C. Synergistic interaction between aflatoxin B₁ and hepatitis B virus in hepatocarcinogenesis. **Liver International**, Oxford, v. 23, p. 405-409, 2003.

KIHARA, T.; MATSUO, T.; SAKAMOTO, M.; YASUDA, Y.; YAMAMOTO, Y.; TANIMURA, T. Effects of prenatal aflatoxin B₁ exposure on behaviors of rats offspring. **Toxicological Sciences**, Orlando, v. 53, p. 392-399, 2000.

KUIPER-GOODMAN, T. Risk assessment to humans to mycotoxins in animal-derived food products. **Veterinary and Human Toxicology**, Manhattan, v. 33, p. 325-333.

KUSSAK, A., ANDERSSON, B., ANDERSSON, K. Immunoaffinity column clean-up for the high-performance liquid chromatographic determination of aflatoxins B₁, B₂, G₁, G₂, M₁ and Q₁ in urine. **Journal of Chromatography B**, Amsterdam, v. 672, p. 253-259, 1995.

LAMPLUGH, S.M.; APEAGYEI, F.; DE VRIES, H.R.; MWANMUT, D.D.; HENDRICKSE, R.G. Aflatoxins in breast milk, neonatal cord blood, and serum of pregnant women. **British Medical Journal**, London, v. 296, p. 968, 1988.

LEWIS, L.; ONSONGO, M.; NJAPAU, H.; SCHURZ-ROGERS, H.; LUBER, G.; KIESZAK, S.; NYAMONGO, J.; BACKER, L.; DAHIYE, A.M.; MISORE, A.; DE COCK, K.; RUBIN, C.; KENYA AFLATOXICOSIS INVESTIGATION GROUP. Aflatoxin contamination of commercial maize products during on outbreak of acute aflatoxicosis in eastern and central Kenya. **Environmental Health Perspectives**, v. 113, n. 12, p. 1763-1767, 2005. Disponível em: <<http://www.ehponline.org/members/2005/7998/7998.pdf>>. Acesso em: 10 jun. 2007.

LYE, M.S.; GHAZALI, A.A.; MOHAN, J.; ALWIN, N.; NAIR, R.C. An outbreak of acute hepatic encephalopathy due to severe aflatoxicosis in Malaysia. **American Journal Tropical of Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 53, n. 1, p. 68-72, 1995.

MACHINSKY JR., M.; VALENTE SOARES, L.M.; SAWAZAKI, E.; BOLONHEZI, D.; CASTRO, J.L.; BORTOLLETO, N. Aflatoxins, ochratoxin A and zearalenone in Brazilian corn cultivars. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 81, p. 1001-1007, 2001.

MALIR, F.; OSTRY, V.; GROSSE, Y.; ROUBAL, T.; SKARKOVA, J.; RUPRICH, J. Monitoring the mycotoxins in food and their biomarkers in the Czech Republic. **Molecular Nutrition Food Research**, Weinheim, v. 50, p. 513-518, 2006.

MYKKÄNEN, H.; ZHU, H.; SALMINEN, E.; JUVONEN, R.O.; LING, W.; MA, J.; POLYCHRONAKI, N.; KEMILAINEN, H.; MYKKÄNEN, O.; SALMINEN, S.; EL-NEZAMI, H. Fecal and urinary excretion of aflatoxin B₁ metabolites (AFQ₁, AFM₁ and AFB-N⁷-guanine) in young Chinese males. **International journal of cancer**, New York, v. 115, p. 879-884, 2005.

NAVAS, S.A. **Possível exposição de crianças as aflatoxinas M₁ e ocratoxina A, através do leite materno, na cidade de São Paulo**. Dissertação. 72 p. (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade de Campinas, Campinas, 2003.

NORTHOLT, M.D.; FRISVALD, J.C.; SAMSON, R.A. Occurrence of food-borne fungi and factors for growth. In: SAMSON, R.A.; FILTENBORG, O.; FRISVAD, J.C.; HOEKSTRA, S.E. (Ed.) **Introduction to food-borne fungi**. Wageningen: Ponsen Looyen, 1996, p. 243-251.

OLIVEIRA, C.A.F.; FERRAZ, J.C.O. Occurrence of aflatoxin M₁ in pasteurized, UHT milk and milk powder from goat origin. **Food Control**, Guildford, v. 18, p. 375-378, 2007.

OLIVEIRA, C. A. F.; GERMANO, P. M. L.; BIRD, C.; PINTO, C. A. Immunochemical assessment of aflatoxin M₁ in milk powder consumed by infants in São Paulo, Brazil. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 14, n. 1, p. 7-10, 1997.

OLIVEIRA, M.S.; PRADO, G.; ABRANTES, F.M.; SANTOS, L.G.; VELOSO, T. Incidência de aflatoxinas, desoxinivalenol e zearalenona em produtos comercializados em cidades do estado de Minas Gerais no período de 1998-2000. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 61, n. 1, p. 1-6, 2002.

OLIVEIRA, C.A.; ROSMANINHO, J.; ROSIM, R. Aflatoxin M₁ and cyclopiazonic acid in fluid milk traded in São Paulo, Brazil. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 23, n. 2, 2006.

PERAICA, M.; RADIC, B.; LUCIC, A.; PAVLOVIC, M. Toxic effects of mycotoxins in humans. **Bulletin of the World Health Organization**, New York, v. 77, p. 754-766, 1999.

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. **Ciências Agrotécnicas**, Lavras, v. 29, n. 1, p. 106-112, 2005.

POLYCHRONAKI, N. **Biomarkers of aflatoxin exposure and a dietary intervention: studies in infants and children from Egypt and Guinea and young adults from China**. 2007. 114 p. Dissertation (Doctoral in Public Health and Clinic Nutrition) – University of Kuopio, Kuopio, 2007.

POLYCHRONAKI, N.; TURNER, P.C.; MYKKÄNEN, H.; GONG, Y. AMRA, H.; ABDEL-WAHAB, M.; EL-NEZAMI, H. Determinants of aflatoxin M₁ in breast milk in a selected group of Egyptian mothers. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 23, n. 7, p. 700-708, 2006.

POLYCHRONAKI, N.; WEST, R.M.; TURNER, P.C.; AMRA, H.; ABDEL-WAHAB, M.; MYKKÄNEN, H.; EL-NEZAMI, H. A longitudinal assessment to aflatoxin M₁ excretion in milk of selected Egyptian mother's. **Food and Chemical Toxicology**, London, v. 45, n. 7, p. 1210-1215, 2007.

QIAN, G.S., ROSS, R.K., YU, M.C., YUAN, J.M., GAO, Y.T., HENDERSON, B.E., WOGAN, G.N., GROOPMAN, J.D. A follow-up study of urinary markers of aflatoxin exposure and liver cancer risk in Shanghai, People's Republic of China. **Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention**, Denville, v. 3, n. 1, p. 3-10, 1994.

ROEBUCK, B.D.; MAXUITENKO, Y. Biochemical mechanisms and biological implications of the toxicity of aflatoxinas as related to aflatoxin carcinogenesis. In: EATON, D.L.; GROOPMAN, J.D. **The Toxicology of Aflatoxinas**: human health, veterinary, and agricultural significance. London: Academic Press, 1994, p. 27-44.

RODRIGUEZ-AMAYA, D.B.; SABINO, M. Micotoxin research in Brazil: the last decade in review. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 33, n. 1, p. 1-11, 2002.

SAAD, A.M.; ABDELGADIR, A.M.; MOSS, M.O. Exposurre of infants to aflatoxin M₁ from mother's breast milk in Abu Dabhi, UAE. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 12, n. 2, p. 225-261, 1995.

SABINO, M.; LAMARDO, L.C.A.; MILANES, T.V.; INOMATA, E.I.; ZORZETTO, M.A.P.; NAVAS, S.A.; GALVÃO, M.S. Twenty years of Aflatoxin contamination in groundnuts and groundnut products in São Paulo State, Brazil. In: INTERNATIONAL IUPAC SYMPOSIUM ON MYCOTOXINS AND PHYCOTOXINS, 10., 2000, Guarujá. **Resumos...** Guarujá: s.n., 2000, p. 151.

SABBIONI, G.; AMBS, S.; WOGAN, G.; GROOPMAN, J.D. The aflatoxin-lysine adduct quantified by high-performance liquid chromatography from human serum albumin samples. **Carcinogenesis**, London, v. 11, n. 11, p. 2063-2066, 1990.

SANTOS, C.C.M.; LOPES, M.R.V.; KOSSEKI, S.Y. Ocorrência de aflatoxinas em amendoim e produtos de amendoim comercializados na região de São José do Rio Preto/SP. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 60, n. 2, p.153-157, 2001.

SCUSSEL, V.M.; HAAS, P.; GONG, Y.Y.; TURNER, C.P.; WILD, C.P. Study of aflatoxin exposure in a Brazilian population using an aflatoxin-albumin biomarker. In: MYCOTOXINS AND PHYCOTOXINS: Advances in determination, toxicology and exposure management, 2006, Bethesda. INTERNATIONAL IUPAC SYMPOSIUM ON MYCOTOXINS AND PHYCOTOXINS, 11., 2004, Bethesda. **Proceedings...** Netherlands: Wageningen Academic, 2006, p. 197-202.

SHUNDO, L.; SABINO, M. Aflatoxin M₁ in milk by immunoaffinity column cleanup with TLC/HPLC determination. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 37, p. 164-167, 2006.

SHUNDO, L.; SILVA, R.A. Occurrence of aflatoxins in peanuts and peanuts products in the region of Marília (SP)-Brazil. In: INTERNATIONAL IUPAC SYMPOSIUM ON MYCOTOXINS AND PHYCOTOXINS, 10., 2000, Guarujá. **Resumos...** Guarujá: s.n., 2000, p. 133.

SILVA, J.L.; MESQUITA, A.J.; OLIVEIRA, J.P.; COSTA, J.L.S.; RIBEIRO, K.O.; NICOLAU, E.S.; OLIVEIRA, A.N. Ocorrência de aflatoxinas em feijões comercializados no comércio varejista de Goiânia-GO. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 32, n. 2, p. 109-114, 2002.

SILVA, J.O. **Ocorrência de aflatoxinas B₁ em arroz consumido por militares do exército brasileiro por cromatografia em camada delgada e cromatografia líquida de alta eficiência.** 2005. 101 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

SIMIONATO, E.M.R.S.; ASTRAY, R.M.; SYLOS, C.M. Ocorrência de ocratoxina A e aflatoxina em arroz. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 62, n. 2, p. 123-130, 2003.

SIMON, P.; DELSAUT, P.; LAFONTAINE, M.; MORELE, Y.; NICOT, T. Automated column-switching high-performance liquid chromatography for the determination of aflatoxin M₁. **Journal of chromatography B**, Amsterdam, v. 712, p. 95-104, 1998.

SMITH, J.E.; MOSS, M.O. **Mycotoxins:** formation, analysis, and significance, New York: Wiley, 1985, 148 p.

SOTOMAYOR, R.E., WASHINGTON, M., NGUYEN, L, NYANG'ANYI, R., HINTON, D.M., CHOU, M. Effects of intermittent exposure to Aflatoxin B₁ on DNA and RNA adduct formation in rat liver: dose-response and temporal patterns. **Toxicological Sciences**, Orlando, v. 73, p. 329-338, 2003.

STATISTICAL ANALYSES SYSTEM. SAS INSTITUTE. **SAS**. Cary, 2003.

SUN, C.-A.; WU, D.-M.; WANG, L.-Y.; CHEN, C.-J.; YOU, S.-L.; SANTELLA, R.M. Determinants of formation of aflatoxin-albumin adducts: a seven-township study in Taiwan. **British Journal of Cancer**, London, v. 87, p. 966-970, 2002.

SYLLA, A., DIALLO, M.S., CASTEGNARO, J.-J., WILD, C.P. Interactions between hepatitis B virus infection and exposure to aflatoxins in the development of hepatocellular carcinoma: a molecular epidemiological approach. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 428, p. 187-196, 1999.

TAKEDA, N. Determination of aflatoxin M₁ in milk by reversed phase high performance liquid chromatography. **Journal of chromatography**, Amsterdam, v. 288, p.484-488, 1984.

TAO, P.; ZHI-MING, L.; TANG-WEI, L.; LE-QUN, L.; MIN-HAO, P.; XUE, Q.; LU-NAM, Y.; REN-XIANG, L.; ZONG-LIANG, W.; LIAN-WEN, W.; QIAO, W.; HAN-MING, S.; CHOON-NAM, O.; SANTELLA, R.M. Associated factors in modulating aflatoxin B₁-albumin adduct level in three Chinese populations. **Digestive Disease and Sciences**, v. 50, n. 3, p. 525-532, 2005.

TERRY, M.B.; SUSSER, E. Commentary: The impact of fetal and infant exposures along the life course. **International Journal of Epidemiological**, London, v. 30, p. 95-96, 2001.

TURCONI, G.; GUARCELLO, M.; LIVIERI, C.; COMIZZOLI, S.; MACCARINI, L.; CASTELLAZZI, A.; PIETRI, A.; PIVA, G.; ROGGI, C. Evaluation of xenobiotics in human milk and ingestion by the newborn. **European Journal of Nutrition**, Darmstadt, v. 43, n. 4, p. 191-197, 2004.

TRUCKSESS, M.W. Natural Toxins. In: HORWITZ, W.; LATIMER, G. W. (Ed.) **Official Methods of Analysis of AOAC International**, 18 ed. Gaithersburg: AOAC International, 2006, chap. 49, p.3-4.

TURNER, P.C.; MOORE, S.E.; HALL, A.J.; PRENTICE, A.M.; WILD, C.P. Modification of immune function through exposure to dietary aflatoxin in Gambian Children. **Environmental Health Perspectives**, v. 111, n. 2, p. 217-220, 2003. Disponível em: <<http://www.ehponline.org/docs/1993/099/toc.html>>. Acesso em: 10 jun. 2007.

VALE, V. Variação dos níveis de aflatoxina B₁, em milho de pipoca comercializado em Fortaleza, durante 1991. ENCONTRO NACIONAL DE MICOTOXINAS, 7., 1992, São Paulo. **Resumos...** 1992, São Paulo, p. 13.

Van der LINDE, J.A.; de IONG, M.; Vles, R.O. Inspection of milk from cows fed aflatoxin-containing groundnut meal. **Ned Tijdschr Geneesk**, Diergenesk, v. 89, p. 1082-1088, 1964.

Van EGMOND, H.P. Aflatoxin M₁: Occurrence, toxicity, regulation. In: Van EGMOND, H.P. (Ed.). **Mycotoxins in Dairy Products**, New York: Elsevier Science, 1989, cap. 2, p.11-55.

Van EGMOND, H.P. Mycotoxins: regulations, quality assurance and reference materials. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 12, p. 321-330, 1994.

WANG, L.Y.; HATCH, M.; CHEN, C.J.; LEVIN, B.; YOU, S.L.; LU, S.N.; WU, M.H.; WU, W.P.; WANG, L.W.; WANG, Q.; HUANG, G.T.; YANG, P.M.; LEE, H.S.; SANTELLA, R.M. Aflatoxin exposure and risk of hepatocellular carcinoma in Taiwan. **International Journal of Cancer**, New York, v. 67, p. 620-625, 1996.

WANG, J.-S., HUANG, T., SU, J., LIANG, F., WEI, Z., LIANG, Y., LUO, H., KUANG, S.Y., QIANG, G.S., SUN, G., HE, S., KENSLER, T.W., GROOPMAN, J.D. Hepatocellular carcinoma and aflatoxin exposure in Zhuqing Village, Fusui Conty, People's Republic of China. **Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention**, Denville, v. 10, n. 2, p. 143-146, 2001.

WHO. International Programme on Chemical Safety. **Mycotoxins**. Environmental health criteria 11, 1979. Disponível em: <<http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc011.htm>>. Acesso em: 10 jun. 2007.

WHO. International Programme on Chemical Safety. **Safety Evaluation of Certain Food Additives and Contaminants**. Who food additives series 40, Geneva, 1998.

WHO. International Programme on Chemical Safety (IPCS). **Environmental Healthy Criteria nº 155**. Biomarkers and risk assesment: concepts and principes, Geneva, 1993.

WHO. International Programme on Chemical Safety. **Safety Evaluation of Certain Food Additives and Contaminants**. Who food additives series 40, Geneva, 1996.

WILD, C.P.; YIN, F.; TURNER, P.C.;CHEMIN, I.; CHAPOT, B.; MENDY, M.; WHITTLE, H.; KIRK, G.D.; HALL, A.J. Environmental and genetic determinants of aflatoxin-albumin adducts in the Gambia. **International Journal of Cancer**, New York, v. 86, p. 1-7, 2000.

WILLIAMS, J.H., PHILLIPS, T.D., JOLLY, P.E., STILES, J.K., JOLLY, C.M., AGGARWAL, D. Human aflatoxicosis in developing countries: a review of toxicology, exposure, potential health consequences, and interventions. **American Journal Clinical Nutrition**, Philadelphia, v. 80, p. 1106-1022, 2004.

WOGAN, G.N.; NEWBERNE, P.N. Dose-response characteristics of aflatoxin B₁ carcinogenesis in the rat. **Cancer Research**, Baltimore, v. 27, p. 2370-2376, 1967.

YEH, F.-S., YU, M.C.; MO, C.-C.; LUO, S.; TONG, M.J.; HENDERSON, B.E. Hepatitis B virus, aflatoxins, and hepatocellular carcinoma in Southern Guangxi, China. **Cancer Research**, Baltimore, v. 49, p. 2506-2509, 1989.

ZARBA, A., WILD, C.P., HALL, A.J., MONTESANO, R., HUDSON, G.J., GROOPMAN, J.D. Aflatoxin M₁ in human breast milk from the Gambia, West Africa, quantified by combined monoclonal antibody immunoaffinity chromatography and HPLC. **Carcinogenesis**, London, v. 13, p. 891-894, 1992.

ZHU, J.Q., ZHANG, L.S., HU, X., XIAO, Y., CHEN, J.S., XU, Y.C., FREMY, J., CHU, F.S. Correlation of dietary aflatoxin B₁ levels with excretion of aflatoxin M₁ in human urine. **Cancer Research**, Baltimore, v. 47, n. 7, p. 1848-1852, 1987.

ZLOTOWSKI, P.; CORREA, A.M.R.; ROZZA, D.B.; DRIEMEIER, D.; MALLMANN, C.A.; MIGLIAVACCA, F.A. Surto de aflatoxicose em suínos no estado do Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 24, n. 4, 2004.

ANEXOS

Anexo A – Certificado de Aprovação CEP

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

CERTIFICADO

O Comitê de Ética em Pesquisa da FOP-UNICAMP certifica que o projeto de pesquisa "Mensuração de biomarcadores de exposição às aflatoxinas em fluidos humanos", protocolo nº **095/2005**, dos pesquisadores **EDUARDO MICOTTI DA GLORIA** e **ALESSANDRA DE CASSIA ROMERO**, satisfaz as exigências do Conselho Nacional de Saúde – Ministério da Saúde para as pesquisas em seres humanos e foi aprovado por este comitê em 22/11/2005.

The Research Ethics Committee of the School of Dentistry of Piracicaba - State University of Campinas, certify that project "Biomarkers measurement of aflatoxins by human fluids", register number **095/2005**, of **EDUARDO MICOTTI DA GLORIA** and **ALESSANDRA DE CASSIA ROMERO**, comply with the recommendations of the National Health Council – Ministry of Health of Brazil for researching in human subjects and was approved by this committee at 22/11/2005.

Cinthia Pereira Machado Tabchoury
 Secretária
 CEP/FOP/UNICAMP

Jacks Jorge Junior
 Coordenador
 CEP/FOP/UNICAMP

Nota: O título do protocolo aparece como fornecido pelos pesquisadores, sem qualquer edição.
 Notice: The title of the project appears as provided by the authors, without editing.

Anexo B – Questionário Sócio-Econômico:

*** Participante:** _____ Sexo: () F () M

NOME: _____

ENDEREÇO: _____

TELEFONE: _____ CEL: () _____

PROFISSÃO: _____

ENDEREÇO COMERCIAL: _____

TELEFONE COMERCIAL: _____

IDADE: _____ PESO: _____

*** ESCOLARIDADE:**

() Primário () Ginásio () 2º Grau () Graduação () Pós-Graduação

*** FAIXA DE RENDA FAMILIAR:** em salário mínimo (R\$ 350,00)

() até 2 () 2 a 5 () 5 a 10 () acima de 10

***OBSERVAÇÕES:**

Anexo C - Inquérito de Frequência Alimentar

Alimento¹	Quantidade²	Peso unitário³	Frequência de compra⁴	Nº de pessoas que consomem⁵	Frequência de Consumo⁶
Milho pipoca					
Fubá de milho					
Farinha de milho					
Milho em lata					
Espiga de milho					
Flocos de milho					
Bolo de milho					
Bolo de fubá					
Creme de milho: - pamonha - curau					
Pão de milho					
Outros produtos com milho: - - - -					
Leite					
Leite fermentado					
Leite em pó					
Creme de leite					
Leite condensado					
Iogurte					
Manteiga					
Sorvete					
Queijo fatiado					
Queijo em pedaço					
Queijo fresco					
Queijo ralado					
Ricota					
Coalhada					
Amendoim em grãos (cru)					
Amendoim salgado					
Amendoim japonês					
Ovinhos de amendoim					

Alimento¹	Quantidade²	Peso unitário³	Frequência de compra⁴	Nº de pessoas que consomem⁵	Frequência de Consumo⁶
Confeito de amendoim (com chocolate, etc)					
Paçoca					
Doce de amendoim					
Pé de moleque					
Creme de amendoim					
Bala de amendoim					
Nozes					
Castanha					
Pistache					
Amêndoas					
Avelãs					
Uva passa					

1 – Alimento cuja aquisição ou consumo será questionado.

2 – Quantidade do produto adquirido em unidades de pacotes, caixas, latas, garrafas, etc.

3 – Peso unitário de cada produto adquirido, em litros, gramas ou quilogramas.

4 – Frequência de compra (mensal, semanal, diária, etc.).

5 – Número de pessoas que consomem os alimentos informados no inquérito; se o entrevistado for um dos consumidores, será anotado um asterisco junto ao nº.

6 – Frequência de consumo refere-se ao nº de vezes num determinado período que o alimento é ingerido pelos consumidores.

Anexo D – Inquérito recordatório 24 horas

**ANOTAR O CONSUMO DE TODOS OS ALIMENTOS INGERIDOS NO DIA.
LEMBRE-SE DE ANOTAR A DATA!**

ALIMENTO:

Citar qual alimento (descrever se houver diferença entre o tipo. Por exemplo, arroz integral ou arroz polido (branco), pão francês ou pão caseiro, leite em pó ou fluido, café em pó ou instantâneo, farinha de milho branca ou amarela, etc...)

QUANTIDADE:

Descrever o número de porções ingeridas, de acordo com a unidade de medida citada

UNIDADE DE MEDIDA:

Número de pacotes (com peso ou tamanho de cada um), xícaras, colheres, pedaços, unidade, copo, caixa (peso da mesma), etc.

OBS: Quando a unidade de medida informada corresponder a colher, xícara, copo, etc., o objeto mencionado será verificado in loco para avaliar a sua capacidade em peso ou volume.

OBRIGADA!

EXEMPLO DE PREENCHIMENTO

Recordatório 24 horas – Consumo Individual			
Alimento	Unidade de medida	Quantidade	Observações
ARROZ	COLHER	2	
FEIJÃO	CONCHA	1	
FARINHA DE MILHO	COLHER	1	
PÃO FRANCÊS	UNIDADE	1/2	
FARINHA DE MILHO	COLHER	1	
MILHO EM LATA	LATA	1/2	
ESPIGA DE MILHO	UNIDADE	2	
FLOCOS DE MILHO	COPO	1	COPO AMERICANO
BOLO DE MILHO	FATIA	1	PEQUENA
BOLO DE FUBÁ	PEDAÇO	2	
CREME DE MILHO	COLHER	1	
QUEIJO	FATIA	1	FINA
IOGURTE	UNIDADE	2	
MANTEIGA	COLHER	3	BOLO E PÃO
PAÇOCA	UNIDADE	3	TIPO ROLHA
AMENDOIM JAPONÊS	PACOTE	1	PEQUENO
OVINHOS DE AMENDOIM	XÍCARA	1	
SORVETE	COPO	1	
MILHO PIPOCA	PACOTE	1	P/ MICROONDAS