CARLOS AUGUSTO FERNANDES DE OLIVEIRA

AFLATOXINA M₁ EM LEITE EM PÓ DISTRIBUÍDO PELO PROGRAMA DE
ALIMENTAÇÃO ESCOLAR DO MUNICÍPIO DE SÃO PAULO, SP-BRASIL:
UTILIZAÇÃO DO ENSAIO POR ENZIMAS IMUNO-ADSORVIDAS (ELISA)

Tese de Doutorado apresentada ao
Departamento de Prática de Saúde
Pública e à Comissão de Pós-
graduação da Faculdade de Saúde
Pública da Universidade de São Paulo.

Orientador:

Prof. Dr. Pedro Manuel Leal Germano

SÃO PAULO

1994

A

Maria Eunice,

Taís Helena e Rodrigo José,

esposa e filhos.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Pedro Manuel Leal Germano, pela orientação, apoio e amizade.

A NEOGEN Corporation e, em especial, a John B. Rathbone, pela gentil doação dos conjuntos de ELISA utilizados nas análises.

A Chuck Bird, da empresa NEOGEN Corporation, pelas valiosas contribuições técnicas prestadas a este estudo.

A Carlos Augusto Pinto, e a Alexandra Schmidt, da empresa ALTECH Comércio e Importação Ltda., sem os quais a realização deste trabalho não teria sido possível.

A Adão Sebastião de Bones, da empresa NESTLÉ Industrial e Comercial Ltda., pela gentil doação do leite em pó isento de aflatoxina M_1 .

A Cláudio Junji Fukumoto, pela inestimável colaboração na colheita de amostras e na preparação das amostras experimentalmente contaminadas com aflatoxina M_1 .

Ao Prof. Dr. Omar Miguel, responsável pela área de Saúde Pública Veterinária, da Faculdade de Saúde Pública da USP.

A todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para a elaboração deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	vi
LISTA DE TABELAS.....	vii
RESUMO.....	ix
SUMMARY.....	xi
1- INTRODUÇÃO.....	01
1.1- Considerações Gerais.....	02
1.2- Biotransformação da Aflatoxina B ₁	08
1.3- Toxicidade da Aflatoxina M ₁	13
1.3.1- Toxicidade Aguda.....	14
1.3.2- Mutagenicidade.....	16
1.3.3- Carcinogenicidade.....	17
1.3.3.1- Estudos em Animais de Experimen- tação.....	17
1.3.3.2- Carcinogenicidade para a Espécie Humana.....	20
1.3.4- Outros Efeitos Tóxicos.....	25
1.4- Métodos Imunoquímicos para a Análise de Aflato - xina M ₁	27
1.5- Ocorrência de Aflatoxina M ₁ em Leite e Derivados..	33
1.6- Características da Distribuição de Leite em Pó através do Programa de Alimentação Escolar do Município de São Paulo.....	35
2- OBJETIVOS.....	37
3- MATERIAL E MÉTODOS.....	39
3.1- Avaliação do Desempenho do Método de ELISA em Condições Experimentais.....	40
3.1.1- Amostras.....	40
3.1.2- Calibração do Padrão de Aflatoxina M ₁	40
3.1.3- Preparação das Amostras.....	41
3.1.4- Análise das Amostras.....	42
3.1.5- Procedimentos Estatísticos.....	46

3.2- Pesquisa de Aflatoxina M_1 no Leite em Pó Distri-	
buído pelo Programa de Alimentação Escolar do	
Município de São Paulo.....	47
3.2.1- Amostras.....	47
3.2.2- Colheita de Amostras.....	47
3.2.3- Análise das Amostras.....	48
3.2.4- Análise dos Resultados.....	48
3.2.4.1- Procedimentos Estatísticos.....	48
3.2.4.1- Estimativa da Ingestão Diária	
Média de Aflatoxina M_1	48
4- RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	50
4.1- Avaliação do Desempenho do Método de ELISA em	
Condições Experimentais.....	51
4.2- Pesquisa de Aflatoxina M_1 no Leite em Pó Distri	
buído pelo Programa de Alimentação Escolar do	
Município de São Paulo.....	59
5- CONCLUSÕES.....	72
6- RECOMENDAÇÕES.....	74
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	76

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura química dos principais tipos de aflatoxinas de interesse médico sanitário.....	06
Figura 2: Representação esquemática da ocorrência dos principais tipos de aflatoxinas de interesse médico sanitário em produtos alimentícios.....	07
Figura 3: Biotransformação da AFB ₁	08
Figura 4: Preparação de imunógeno para AFM ₁ , pelo método do CMO.....	29
Figura 5: Sequência básica para a execução de análises de aflatoxinas pela técnica de ELISA.....	32
Figura 6: Curva de calibração típica, obtida no método de ELISA quantitativo para a determinação de AFM ₁	51
Figura 7: Relação entre as concentrações médias obtidas nas análises e as concentrações reais das amostras contaminadas experimentalmente com AFM ₁	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Propriedades químicas e físicas dos principais tipos de aflatoxinas de interesse médico-sanitário.....	05
Tabela 2: Taxas de conversão de AFM_1 na ração, para AFM_1 ou AFB_1 residual, em produtos de origem animal.....	12
Tabela 3: Valores da DL_{50} após inoculação de dose única de AFB_1 em diferentes animais.....	14
Tabela 4: Valores da DT_{50} após ingestão prolongada de AFB_1 na dieta, para diversas variedades de animais.....	18
Tabela 5: Relação entre a ingestão de AFB_1 e a incidência de CHC, em países da África e Ásia.....	22
Tabela 6: Volumes da solução padrão (μ l) e quantidades de AFM_1 (ng), adicionados por frasco, e respectivas concentrações de AFM_1 (ng/ml) nas amostras utilizadas na fase de avaliação do desempenho do método de ELISA em condições experimentais.....	41
Tabela 7: Resultados obtidos nas análises realizadas em amostras de leite em pó reconstituído, contaminadas com diferentes concentrações de AFM_1 (ng/ml). São Paulo, 1994.....	53
Tabela 8: Resultados estatísticos, obtidos durante a avaliação do desempenho do método de ELISA em condições experimentais, em amostras de leite em pó contaminadas com diferentes concentrações de AFM_1 (ng/ml). São Paulo, 1994.....	54
Tabela 9: Amostras de leite em pó distribuído através do Programa de Alimentação Escolar do Município de São Paulo, segundo a concentração de AFM_1 (ng/ml). São Paulo, 1994.....	59

Tabela 11: Resultados da análise estatística aplicada às concentrações obtidas nas amostras positivas para AFM ₁ (acima de 0,01 ng/ml). São Paulo, 1994.....	61
---	----

RESUMO

Aflatoxina M_1 em leite em pó distribuído pelo Programa de Alimentação Escolar do Município de São Paulo, SP-Brasil: utilização do ensaio por enzimas imuno-adsorvidas (ELISA).

Aflatoxina M_1 (AFM_1) foi pesquisada em 300 amostras de leite em pó distribuído pelo Programa de Alimentação Escolar do Município de São Paulo, SP-Brasil. As análises foram efetuadas através do ensaio por enzimas imuno-adsorvidas (ELISA), mediante o emprego de conjuntos de reativos produzidos em escala comercial. As amostras foram reconstituídas em água a 1:8 e submetidas diretamente ao ensaio, sem etapas de purificação. Os resultados revelaram 72 amostras (24,0 %) positivas para AFM_1 , em concentrações de 0,01 - 1,00 ng/ml, com média de 0,15 ng/ml. Concentrações acima de 0,10 ng/ml foram observadas em 33 amostras (11,0%). O método de ELISA foi avaliado no laboratório, através da execução de análises repetidas em amostras de leite experimentalmente contaminado com a toxina. Para os níveis de 0,10; 0,20; 0,50 e 1,00 ng/ml, os percentuais de recuperação foram, respectivamente, 83,0%; 87,5%; 103,0% e 111,8%. O desvio padrão relativo, para as referidas concentrações foi, respectivamente, 65,5%; 31,8%; 10,9% e 13,6% ($n = 10$, para cada nível de contaminação). Utilizando-se os dados de consumo de leite, adotados pelo Programa, para crianças de 4 meses de idade (máxima ingestão), estimou-se a ingestão diária média de 3,7 ng de AFM_1 /kg de peso corpóreo/dia. Discute-se a importância destes dados para a saúde humana, bem como os principais aspectos relativos ao estabelecimento de limites de tolerância para a AFM_1 em leite e derivados.

SUMMARY

Aflatoxin M₁ in milk powder distributed by the School Food Supply Program of São Paulo, SP-Brazil: utilization of the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

Aflatoxin M₁ (AFM₁) was surveyed in 300 samples of milk powder distributed by the School Food Supply Program of São Paulo, SP-Brazil. The analysis were performed by commercially available test systems of competitive enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Samples were reconstituted in water (1:8) and submitted directly to the assay, without clean-up procedures. Results showed 72 (24.0%) positive samples for AFM₁ at levels of 0.01 - 1.00 ng/ml (mean: 0.15 ng/ml). Concentrations above 0.10 ng/ml were observed in 33 samples (11.0%). The method performance was evaluated experimentally in the laboratory, through repeated analysis of milk samples spiked with the toxin. Recoveries of AFM₁ added to milk at levels of 0.10, 0.20, 0.50 and 1.00 ng/ml were 83.0%, 87.5%, 103.0% and 111.8%, respectively. Relative standard deviations for the concentrations referred were 65.5%, 31.8%, 10.9% and 13.6%, respectively (n = 10, per spiking level). By using data on milk consumption patterns, adopted by the Program for children aging 4 months (highest intake), a mean daily intake of 3.7 ng of AFM₁/kg body weight/day was estimated. The implications of these data on human health, as well as the approaches for the establishment of regulations for AFM₁ in milk and milk products, are discussed.

1 - INTRODUÇÃO

1.1- Considerações Gerais:

As micotoxinas são metabólitos secundários, produzidos por fungos que se desenvolvem em alimentos, capazes de originar uma ampla variedade de efeitos tóxicos no homem e em animais expostos^{38,88}. O termo micotoxina é empregado, também, para designar os produtos de biotransformação destes compostos pelo organismo humano e animal^{2,11}.

Denominam-se micotoxicoses as síndromes tóxicas agudas, causadas pela ingestão de alimentos contaminados com micotoxinas³⁸. No homem, estas enfermidades têm ocorrido esporadicamente desde tempos remotos⁸⁸. O reconhecimento desta relação causal, no entanto, somente ocorreu por volta de 1850, ao se verificar que o ergotismo, doença caracterizada por necrose e gangrena dos membros, era provocado pela ingestão de centeio contaminado com metabólitos tóxicos produzidos pelo fungo Claviceps purpurea⁸⁸.

A aleucia tóxica alimentar (ATA) constitui outro exemplo, cujos sintomas incluem leucopenia e lesões necróticas na cavidade bucal, esôfago e estômago⁸⁸. A doença, causada por toxinas produzidas por fungos dos gêneros Fusarium e Cladosporium, ocorreu de forma epidêmica em muitas áreas da Rússia, principalmente durante a segunda Guerra Mundial¹³⁶. Nesta mesma época, no Japão, a ocorrência de surtos de uma síndrome tóxica, caracterizada por vômitos, convulsões e paralisia ascendente, foi associada ao consumo de arroz contaminado com fungos do gênero Penicillium¹³⁶.

O conhecimento científico sobre as micotoxinas e seus efeitos sobre a saúde humana e animal, entretanto, aumentou consideravelmente nas últimas três décadas devido, sobretudo, à descoberta das aflatoxinas. Estes compostos são produzidos por algumas cepas de fungos do gênero Aspergillus, principalmente das espécies A.flavus e A.parasiticus, os quais desenvolvem-se naturalmente em produtos alimentícios, como

amendoim, milho, feijão, arroz e trigo, entre outros^{88,133}. Produtos de origem animal, particularmente o leite, também podem conter derivados tóxicos resultantes da biotransformação das aflatoxinas ingeridas pelos animais, através de rações contaminadas^{2,136,152}.

As aflatoxinas caracterizam-se pela elevada toxicidade que apresentam. Em Saúde Animal, várias espécies domésticas e de experimentação são sensíveis aos seus efeitos tóxicos agudos, mutagênicos, carcinogênicos e teratogênicos, sendo o fígado o principal órgão atingido^{89,106}. De modo análogo, em Saúde Pública, as aflatoxinas são identificadas como fatores envolvidos na etiologia do câncer hepático no homem, conseqüente à ingestão de alimentos contaminados^{13,67}.

A ocorrência de fungos do gênero Aspergillus, bem como das aflatoxinas nos alimentos e rações animais, apresenta distribuição mundial, com predomínio nas regiões de clima tropical e subtropical, inclusive no Brasil¹³². A ocorrência, entretanto, pode apresentar característica sazonal, sendo mais freqüente nos meses em que a umidade e a temperatura são elevadas, uma vez que estas condições favorecem o desenvolvimento fúngico e a formação de aflatoxinas¹³². A maioria das espécies de Aspergillus apresenta condições ideais de desenvolvimento na faixa de 80 - 85% de umidade e em temperatura ambiente ao redor de 30°C¹³³.

A contaminação dos produtos vegetais ocorre através do contato com os esporos do fungo, presentes no ambiente, sobretudo no solo, durante os procedimentos de colheita e secagem⁸⁸. Dentre os fatores que podem contribuir para a contaminação, destacam-se as lesões na superfície dos grãos, provocadas por insetos, e a utilização de práticas agrícolas incorretas que prolongam o contato dos produtos com o solo⁸⁸. O armazenamento inadequado, em locais úmidos e sem ventilação, favorece não apenas a contaminação, mas também o desenvolvimento fúngico nos produtos já contaminados²⁶.

Os estudos sobre as aflatoxinas iniciaram - se na Inglaterra, em 1960, a partir da ocorrência de surtos epizooticos, de proporções alarmantes, em que morreram milhares de aves de criações domésticas²⁸. O quadro clínico, caracterizado por evolução aguda e sintomatologia hepatotóxica, foi inicialmente denominado como "doença X", revelando forte associação com o consumo de torta de amendoim procedente do Brasil²⁸.

Intensas pesquisas científicas, realizadas em vários países, demonstraram, posteriormente, que o fator responsável pelos surtos, e contido nos produtos derivados de amendoim, tratava-se, na realidade, de um grupo de compostos até então desconhecidos, os quais receberam a denominação genérica de aflatoxinas¹³³.

Em 1963, BUTLER & BARNES¹⁹ demonstraram que as aflatoxinas eram poderosos agentes hepatocarcinogênicos para animais de experimentação. Este fato causou grande impacto devido as suas implicações em saúde humana, aumentando ainda mais o interesse do meio científico sobre estas toxinas.

São conhecidos, atualmente, 17 compostos similares designados pelo termo aflatoxina, porém, os principais tipos de interesse médico-sanitário são identificados como B₁, B₂, G₁, G₂, M₁ e M₂⁸⁸. As quatro primeiras representam as mais frequentemente produzidas pelo fungo em substratos vegetais, e em condições naturais⁸⁸.

As aflatoxinas B (do inglês "blue") e G (do inglês "green") foram assim denominadas devido às fluorescências azul e verde, respectivamente, que emitem quando expostas à luz ultravioleta de ondas longas¹³³. Esta intensa fluorescência, inclusive, constitui a base dos métodos cromatográficos para a análise de aflatoxinas em alimentos²⁸. As aflatoxinas M (do inglês "milk") também apresentam propriedades fluorescentes, porém, a sua nomenclatura deriva do fato de terem sido encontradas primeiramente no leite de vacas alimentadas

com rações contaminadas com aflatoxinas²⁸.

As aflatoxinas são compostos de natureza cristalina, termoestáveis e solúveis em solventes polares, como clo-rofórmio e metanol⁸⁸. No entanto , são relativamente instá-veis quando expostas à luz, particularmente à radiação ultra-violeta⁸⁸. Podem ser destruídas totalmente na presença de amônia, hipoclorito ou de soluções fortemente alcalinas⁸⁸. As propriedades químicas e físicas das principais aflatoxi-nas são apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1: Propriedades químicas e físicas dos principais tipos de aflatoxinas de interesse médico-sanitário.

Aflatoxina	Fórmula Molecular	Peso Molecular	Ponto de Fusão(°C)	Fluorescência (máx.emissão-nm)	ϵ^*
B ₁	C ₁₇ H ₁₂ O ₆	312	268-269	425	19.800
B ₂	C ₁₇ H ₁₄ O ₆	314	286-289	425	20.900
G ₁	C ₁₇ H ₁₂ O ₇	328	244-246	450	17.100
G ₂	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	330	237-240	450	18.200
M ₁	C ₁₇ H ₁₂ O ₇	328	299	425	18.815
M ₂	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	330	293	425	22.900

* ϵ = Coeficiente de extinção molar, a 350 nm, para os compostos dissol-vidos em benzeno + acetonitrila (98+2);

FONTE: ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD⁸⁸(1983), com exceção dos va-lores de ϵ , referidos por SCOTT¹¹⁹(1990).

A estrutura química dos diversos tipos de aflatoxi-nas é muito semelhante, conforme se observa na Figura 1. To-das apresentam um núcleo central cumarínico ligado a uma es-trutura bi-furanóide²⁸. As aflatoxinas B e M apresentam anel ciclopentanona na molécula, enquanto que as da série G pos-suem anel lactona. As aflatoxinas B₂ e G₂ são dihidroderiva-dos de B₁ e G₁, respectivamente²⁸.

É importante destacar que, embora tenham proprieda-des químicas e físicas semelhantes, as aflatoxinas apresen-tam diferentes graus de atividade biológica. A aflatoxina B₁

(AFB₁) é a que apresenta maior poder toxigênico, seguida de G₁, B₂ e G₂²⁸.

Figura 1: Estrutura química dos principais tipos de aflatoxinas de interesse médico-sanitário.

Fonte: ORGANIZACION PANAMERICANA DE LA SALUD⁸⁸ (1983).

As aflatoxinas M₁ e M₂, embora possam ser sintetizadas de modo ocasional pelos fungos, originam-se a partir da biotransformação hepática das aflatoxinas B₁ e B₂, respectivamente, ingeridas através de alimentos ou rações contaminadas¹⁵². Estes derivados podem permanecer em diversos tecidos, especialmente no hepático e no renal, ou ser excretados através da urina ou do leite^{2,11}. A aflatoxina M₁ (AFM₁), entretanto, apresenta maior importância, uma vez que preserva muitas propriedades toxigênicas de sua precursora (AFB₁)¹³⁶. Este fato evidencia a existência de riscos à saúde humana, originados a partir do consumo de produtos de origem animal, contaminados indiretamente por estas toxinas⁷⁶.

A ocorrência de aflatoxinas em produtos alimentícios, de origem vegetal e animal, encontra-se esquematizada na Figura 2. A contaminação do leite, contudo, assume desta-

cada relevância em Saúde Pública, ao se considerar que o mesmo oferece risco à população infantil, devido ao elevado consumo⁷⁴ e a maior susceptibilidade dos indivíduos, notadamente na faixa etária de 0 - 6 anos¹⁵⁴.

Figura 2: Representação esquemática da ocorrência dos principais tipos de aflatoxinas de interesse médico-sanitário em produtos alimentícios.

1.2- Biotransformação da Aflatoxina B₁:

As aflatoxinas são absorvidas no trato gastrointes-
tinal e biotransformadas primariamente no fígado, por enzi-
mas microssomais do sistema de funções oxidases mistas¹¹. Es-
tas enzimas, pertencentes à superfamília de enzimas do cito-
cromo P-450, constituem parte do processo de detoxificação
de uma ampla variedade de xenobióticos no organismo^{37,40}.

A biotransformação das aflatoxinas, sobretudo da
AFB₁, tem sido estudada extensivamente, uma vez que guarda
estreita relação com seus mecanismos de ação tóxica⁴⁸.

A biotransformação da AFB₁ constitui um complexo
processo, com múltiplas vias, conforme se constata na Figu-
ra 3.

Figura 3: Biotransformação da AFB₁. Fonte: BIEHL & BUCK¹¹(1987).

Existe atualmente consenso, entre grande número de especialistas, de que a AFB₁ é, na realidade, um pró-carcinógeno, o qual requer ativação metabólica para manifestar seus efeitos tóxicos^{11,26,48,54,63,117,148}. A forma ativada da AFB₁ é o composto identificado como 8,9-óxido de AFB₁, ou AFB₁-epóxido (anteriormente denominado AFB₁-2,3 epóxido), originado através da epoxidação da dupla ligação do éter vinílico, presente na estrutura bi-furanóide da molécula de AFB₁⁵⁴. Este composto é altamente eletrofílico e capaz de reagir rapidamente, através de ligações covalentes, com sítios nucleofílicos de macromoléculas, como ácido desoxirribonucléico (DNA)¹¹⁷, ácido ribonucléico (RNA) celular⁶³ e proteínas¹²⁴. Estas ligações determinam a formação de adutos, os quais representam a lesão bioquímica primária produzida pelas aflatoxinas⁶³.

A AFB₁-epóxido pode também ser conjugada enzimaticamente com glutathione reduzida, através de glutathione - S - transferases, constituindo importante via de detoxificação deste composto⁵⁷.

A ligação da AFB₁-epóxido com o DNA modifica a sua estrutura e, conseqüentemente, a sua atividade biológica, originando assim os mecanismos básicos dos efeitos mutagênicos e carcinogênicos da AFB₁^{26,63}. A formação de adutos ocorre através da ligação com guaninas da molécula de DNA, na posição N₇^{54,117}.

Estudos efetuados em fígado de ratos demonstraram que os adutos AFB₁-N₇-guanina podem ser retirados após a sua formação, deixando sítios apurínicos na molécula de DNA⁴¹. Os sítios vagos tendem a ser preenchidos com adenina, resultando em transversão de guanina para timina, o que origina um ponto de mutação bastante significativo⁶³.

Os adutos AFB₁-N₇-guanina podem, ainda, formar derivados formamidopirimidílicos, denominados genericamente por AFB₁-FAPy-DNA⁶³. Estes adutos são resistentes à reparação e

à remoção, o que determina uma lesão persistente no DNA modificado, com possíveis prejuízos na replicação do DNA e na síntese de RNA DNA-dependente⁶³.

Os adutos de DNA, depois de sofrerem depuração espontânea, podem ser conjugados e excretados, sobretudo através da urina⁵⁰.

Os adutos de RNA e de proteínas determinam lesões bioquímicas, as quais devem, provavelmente, estar envolvidas com os mecanismos de toxicidade aguda da AFB₁, dado que conduzem à morte celular pela inativação de macromoléculas essenciais às células⁶³. A formação destes adutos inicia-se com a hidrólise da AFB₁-epóxido para produzir o 8,9-dihidro-8,9-dihidroxi-B₁ (ou B₁-diol), o qual reage com amino-grupos primários de proteínas, originando bases de Schiff¹³³. Os principais adutos de proteínas são formados com albumina, durante a sua síntese nos hepatócitos⁸⁶.

Além da epoxidação, a biotransformação primária da AFB₁ inclui a hidroxilação, para formar AFM₁, aflatoxina Q₁ (AFQ₁) e aflatoxina B_{2a} (AFB_{2a}); e, O-demetilação, para formar aflatoxina P₁ (AFP₁), conforme se observa na Figura 3. Todos estes compostos contêm o grupo hidroxila na molécula, o que permite a conjugação com ácido glicurônico ou sulfatos¹¹. Conseqüentemente, são bastante solúveis em água, possibilitando sua rápida excreção através da urina ou bile e, em seguida, nas fezes¹¹. Este fato sugere que a formação destes derivados pode constituir parte do processo de detoxificação da AFB₁¹¹.

A capacidade mutagênica dos derivados acima relacionados é menor do que a da AFB₁²⁸. Estes compostos, entretanto, apresentam também, em suas moléculas, a dupla ligação do éter vinílico (na estrutura bi-furanóide), com exceção da AFB_{2a}; portanto, podem ser igualmente epoxidados e ativados para formar derivados mutagênicos⁶³. Neste contexto, destaca-se a AFM₁, devido à toxicidade apreciável que apresenta em

modelos experimentais, além do fato de ser excretada também no leite.

O aflatoxicol (AFL) - Figura 3 - é originado através da redução do anel ciclopentanona da molécula de AFB_1 , por uma enzima citoplasmática NADPH-dependente¹¹. A toxicidade do AFL é, aparentemente, bem menor do que a da AFB_1 ; porém, a conversão de AFB_1 em AFL é reversível, o que faz deste último um reservatório potencial de AFB_1 ²⁸. O AFL pode originar, também, aflatoxicol H_1 ($AFLH_1$) e aflatoxicol M_1 ($AFLM_1$) - Figura 3.

Considerando os conceitos apresentados sobre a biotransformação da AFB_1 , é possível concluir que a potência dos efeitos desta toxina, bem como de seus derivados, sobre células ou organismos, depende, entre outros fatores, do balanço integrado entre as múltiplas vias, tanto de ativação metabólica, quanto de detoxificação¹⁰⁵. Os padrões de biotransformação da AFB_1 variam consideravelmente entre as espécies animais, o que poderia justificar os diferentes graus de susceptibilidade à AFB_1 observados em cada uma delas¹⁴⁸.

Experimentos realizados com aflatoxinas marcadas com radioisótopos demonstraram que a maior parte das toxinas e seus produtos de biotransformação são excretados em 72 - 96 horas após cessar a exposição, sendo que o fígado e os rins retêm resíduos por mais tempo¹²⁹.

A excreção de AFM_1 no leite tem sido estudada com particular interesse em vacas leiteiras, uma vez que este alimento constitui o mais vulnerável para a concentração dos resíduos de aflatoxinas². PARK & POHLAND⁹³ (1986) sumarizaram as taxas prováveis de conversão de AFB_1 na ração, para AFM_1 ou AFB_1 residual, em produtos de origem animal, cujos valores encontram-se na Tabela 2.

KIERMEIER et al.⁷² (1975) observaram que a concentração de AFM_1 no leite pode variar amplamente de um animal para outro, e até de uma fase de lactação para outra. A AFM_1

Tabela 2: Taxas de conversão de AFB₁ na ração, para AFM₁ ou AFB₁ residual, em produtos de origem animal.

Animal	Produto	Tipo de Aflatoxina	Taxa de conversão *
Bovinos de corte	fígado	B ₁	14.000
Bovinos leiteiros	leite	M ₁	75
Suínos	fígado	B ₁	800
Galinhas poedeiras	ovo	B ₁	2.200
Frangos	fígado	M ₁	1.200

* nível de AFB₁ na ração dividido pelo nível de AFM₁ ou AFB₁ residual, no produto especificado.
 Fonte: PARK & POHLAND⁹³ (1986).

pode ser detectada no leite 12 - 24 horas após a ingestão inicial de AFB₁, atingindo o equilíbrio com máxima concentração após 3 - 6 dias de ingestão constante e diária de AFB₁. Por outro lado, a AFM₁ torna-se indetectável no leite 2 - 4 dias depois de cessar a exposição à ração contaminada.

SIEBER & BLANC¹²² (1978) calcularam a quantidade de AFM₁ excretada no leite como uma porcentagem da AFB₁ ingerida na ração, encontrando estimativas entre 0 - 4%, com média de 1%. Estes autores compilaram resultados de vários estudos efetuados em vacas leiteiras, observando uma relação linear entre a ingestão de AFB₁ e a excreção de AFM₁ no leite, com a respectiva equação de regressão regida por $Y = -2,55 + 0,84.X$ ($r^2 = 0,73$; $n = 43$), onde Y representa a concentração de AFM₁ no leite (ng/ml), e X, a ingestão de AFB₁ (mg/dia).

É importante destacar que as taxas de conversão descritas acima foram resultantes de experimentos realizados com animais submetidos à ingestão de doses elevadas de AFB₁ (acima de 5 mg/dia). Deste modo, a equação de SIEBER & BLANC¹²² (1978) não é aplicável para estimar a concentração de AFM₁ no leite de animais expostos a baixos níveis de AFB₁.

na ração, os quais são mais característicos de exposição crônica e, portanto, mais próximos da realidade encontrada ao nível de campo¹³⁶.

Os estudos sobre a conversão de AFB₁ em AFM₁, em condições de exposição a baixas doses de AFB₁, são escassos. LAFONT et al.⁷⁷ (1980), utilizando vacas divididas em 4 grupos, cada um deles recebendo 0,09, 0,18, 0,86 e 2,58 mg/animal/dia, observaram a excreção de AFM₁, no leite de vacas em fase inicial de lactação, na proporção média de 0,78% do total de AFB₁ ingerida.

PATTERSON et al.⁹⁷ (1980), por outro lado, constataram que vacas alimentadas com rações contendo 10 µg/kg de AFB₁ (0,15 - 0,23 mg/animal/dia), excretaram AFM₁ no leite, na proporção média de 2,2% da AFB₁ ingerida.

1.3- Toxicidade da Aflatoxina M₁:

As aflatoxinas podem apresentar efeitos agudos ou crônicos. A síndrome tóxica aguda, denominada aflatoxicose, caracteriza-se por rápida deterioração do estado geral do animal, perda de apetite e morte⁸⁹. O fígado é o principal órgão afetado, com lesões decorrentes da necrose hemorrágica, infiltração gordurosa e proliferação das células dos ductos biliares¹⁰⁶. Os efeitos de toxicidade crônica ou de longa duração, incluem câncer hepático, defeitos congênitos e alterações genéticas^{88,89}.

A maioria dos estudos toxicológicos têm-se concentrado sobre a AFB₁, em razão de sua toxicidade mais elevada e pelo fato de ser a mais comumente encontrada nos produtos contaminados. O conhecimento sobre a toxicidade da AFM₁, por outro lado, é relativamente menor. Este fato pode ser justificado, segundo VAN EGMOND¹³⁶ (1989), pela dificuldade de obtenção de padrões de AFM₁ em quantidades suficientes para a execução de estudos experimentais, sobretudo de longa duração. Contudo, a compreensão das propriedades toxigênicas da

AFM₁ pode ser facilitada através da comparação com a AFB₁ devido às semelhanças que apresentam ambas as toxinas.

1.3.1- Toxicidade Aguda:

A sensibilidade aos efeitos tóxicos das aflatoxinas varia consideravelmente entre as espécies animais. Mesmo entre indivíduos de uma espécie, a relação dose-resposta pode variar de acordo com raça, sexo, idade e composição da dieta, entre outros fatores^{23,78,133}. Na Tabela 3 são relacionados os valores da Dose Letal Média (DL₅₀), após inoculação de dose única de AFB₁, para diferentes animais.

Tabela 3: Valores da DL₅₀ após inoculação de dose única de AFB₁ em diferentes animais.

Animal	DL ₅₀ (mg/kg de peso corpóreo)
Pato de 1 dia	0,3 - 0,5
Coelho	0,3 - 0,5
Truta arco-íris	0,5
Porco	0,6
Cão	1,0
Ovelha	1,0 - 2,0
Macaco	2,2
Galinha	6,0 - 16,0
Rato (macho)	7,0
Camundongo	9,0
Rato (fêmea)	18,0

Fonte: TROPICAL DEVELOPMENT AND RESEARCH INSTITUTE¹³³ (1984)

Não são conhecidas espécies refratárias aos efeitos das aflatoxinas, todavia, de modo geral, os jovens apresentam susceptibilidade acentuadamente maior do que os adultos¹³³. Para muitos animais, como os roedores, os machos são mais sensíveis do que as fêmeas¹³³.

A DL_{50} para a AFB_1 em bovinos ainda não está bem estabelecida, embora casos de intoxicação ao nível de campo tenham sido descritos¹¹⁶. SABINO¹¹⁰ (1990) observou que bezerros, inoculados com dose única de 0,8 e 1,8 mg de AFB_1 /kg de peso corpóreo (kg p.c.), apresentaram intoxicação aguda e morte após 14 e 8 dias, respectivamente. No entanto, os bovinos adultos, particularmente as fêmeas em fase de lactação, mesmo quando expostas a rações fortemente contaminadas com AFB_1 , desenvolvem sintomatologia indeterminada, com acentuada queda na produção de leite, porém, os efeitos tóxicos sobre o fígado revelam-se menos expressivos do que os observados em outras espécies².

Os relatos, na literatura médica, sobre a ocorrência de casos de aflatoxicose no homem são raros, contudo, quadros clínicos desta natureza foram descritos na Índia, em 1974, por ocasião de uma epidemia de hepatite tóxica associada ao consumo de milho altamente contaminado com AFB_1 ²⁸. O consumo de aflatoxinas, entre os doentes, foi estimado em 2 - 6 mg/dia, durante várias semanas²⁸. Os indivíduos do sexo masculino foram duas vezes mais afetados do que as mulheres, de modo similar ao que ocorre com muitas espécies animais²⁸.

Em outro episódio, ocorrido no sudoeste asiático, HARRISON & GARNER⁵⁵ (1991) observaram níveis elevados de adutos de DNA com AFB_1 em amostras de fígado, rins e pulmões de indivíduos autopsiados.

A toxicidade aguda da AFM_1 é muito semelhante à da AFB_1 , manifestando seus efeitos também em doses extremamente baixas. Os patos de tenra idade são particularmente sensíveis, com a DL_{50} ao redor de 12 - 16 μ g de AFM_1 /animal (0,3 mg/kg p.c.)¹³⁶. As lesões hepáticas produzidas pela AFM_1 são qualitativamente semelhantes às originadas pela AFB_1 ¹³⁶. Entretanto, diferentemente da AFB_1 , a AFM_1 ocasiona também lesão renal caracterizada por necrose tubular¹³⁶.

PONG & WOGAN¹⁰² (1971) compararam os efeitos da

AFM₁ e da AFB₁ produzidas sinteticamente (ou racêmicas, constituídas, cada uma, pela mistura de 2 isômeros), bem como da AFB₁ natural, em ratos Fisher machos, observando a morte dos animais após dose única de 1,5 mg/kg p.c. das toxinas sintéticas. As alterações hepáticas revelaram-se quantitativamente similares às lesões produzidas pela AFB₁ natural (não racêmica), a qual mostrou-se letal na dose de 0,6 mg/kg p. c. Os resultados deste estudo sugerem que a AFM₁ atua através do mesmo mecanismo de toxicidade da AFB₁, e que apenas o isômero natural de cada toxina sintética apresenta atividade biológica.

1.3.2- Mutagenicidade:

O processo de carcinogênese, fundamentado em trabalhos experimentais, envolve, geralmente, duas fases distintas, a iniciação e a promoção do câncer^{53,70,79,85,131}. A fase de iniciação é resultante de alterações mutagênicas nas células, ao passo que a de promoção relaciona-se com a expressão fenotípica das modificações ocorridas na primeira fase^{53,70,79,85,131}. Neste contexto, as mutações determinadas pelas aflatoxinas representam alterações genéticas permanentes nas células afetadas, o que possibilita a iniciação do processo cancerígeno⁶³.

A AFB₁ produz mutações em decorrência da substituição de guaninas na molécula de DNA, ao nível do códon 249, do gene supressor de tumores p53²⁶. A ocorrência deste tipo de alteração é característica de vários carcinomas no homem, sobretudo o de fígado^{15,53,90,103}.

A capacidade mutagênica das aflatoxinas e de seus derivados de biotransformação, incluindo a AFM₁, tem sido avaliada através do teste de mutagenicidade de Ames. Neste procedimento, em que a mutagenicidade do composto químico é medida com o auxílio de cepas de Salmonella typhimurium¹³⁶, apenas as aflatoxinas que apresentam a dupla ligação no éter

vinílico do anel bi-furânico, como AFB₁, AFG₁ e AFM₁, revelaram-se mutagênicas⁶³.

Diversos estudos têm demonstrado que a AFB₁ é um poderoso agente mutagênico para muitas células procarióticas e eucarióticas, incluindo células humanas¹⁴⁸. A mutagenicidade da AFM₁, entretanto, é consideravelmente menor (3,2% da atividade apresentada pela AFB₁, no teste de Ames¹⁵¹). De acordo com LUTZ⁸¹ (1979), a capacidade de ligação da AFM₁ com o DNA hepático de ratos, in vivo, é cerca de 15 vezes menor do que a da AFB₁. Apesar desta diferença, considera-se a AFM₁ como pertencente, também, ao grupo de hepatocarcinógenos de grande potência¹³⁶.

1.3.3- Carcinogenicidade:

1.3.3.1- Estudos em Animais de Experimentação:

A carcinogênese hepática representa o mais importante efeito de toxicidade crônica das aflatoxinas. Esta capacidade tem sido demonstrada extensivamente, sobretudo em relação à AFB₁, em muitas espécies animais, incluindo peixes, aves, roedores, carnívoros e primatas¹⁷. Nestes animais, a AFB₁ induz à formação de carcinoma hepatocelular (CHC), mesmo quando ingerida em quantidades muito baixas, o que permite considerá-la como um dos mais potentes hepatocarcinógenos naturais¹³³.

Embora o fígado seja o alvo primário, o desenvolvimento de tumores em outros órgãos, como pâncreas e intestino, tem sido observado em animais alimentados com rações contendo aflatoxinas¹⁷.

Existem inúmeros estudos sobre a carcinogenicidade da AFB₁ em diferentes espécies animais, sendo que diversas revisões encontram-se publicadas^{17,28,88,148}. A dose efetiva de AFB₁ ingerida para a indução de tumores hepáticos varia amplamente entre as espécies, de modo similar ao que ocorre em relação à toxicidade aguda. Peixes e aves são extremamen-

te sensíveis, e a dose efetiva para a indução de hepatomas situa-se entre 10 - 30 $\mu\text{g/kg}$ de AFB_1 na dieta¹⁴⁸. Contudo, a sensibilidade é particularmente variável entre os roedores, sendo que os ratos respondem em níveis de 15 - 1.000 $\mu\text{g/kg}$ de AFB_1 na dieta, enquanto que certas cepas de camundongos não apresentam nenhuma resposta em doses de até 150.000 $\mu\text{g/kg}$ ¹⁴⁸. Para a maioria das espécies estudadas, a sensibilidade é acentuadamente maior nos machos do que nas fêmeas¹⁴⁸.

A comparação quantitativa da potência carcinogênica da AFB_1 entre as espécies animais pode ser facilitada pelo cálculo estatístico da Dose Média para a Produção de Tumores (DT_{50}), pelo método de GOLD⁴⁷, expressa em $\mu\text{g/kg p. c. / dia}$. A Tabela 4 ilustra as extremas variações dos valores da DT_{50} para alguns animais, compilados por WOGAN¹⁴⁸ (1992).

Tabela 4: Valores da DT_{50} após ingestão prolongada de AFB_1 na dieta, para diversas variedades de animais.

Animal	DT_{50} ($\mu\text{g/kg p.c./dia}$)
Rato Fisher macho	1,3
Rato Fisher fêmea	7,5
Rato Wistar macho	5,8
Rato Wistar fêmea	6,9
Rato Porton macho	3,1
Rato Porton fêmea	12,5
Camundongo C3H macho	>70
Camundongo C57Bl macho	>70
Camundongo Swiss macho	>5.300*
Macaco <u>Rhesus</u>	156
Macaco <u>Cynomolgus</u>	848

* valor baseado não na dose efetiva, mas no maior nível administrado aos animais, para o qual não foram observados tumores no fígado ou em outros órgãos;

Fonte: WOGAN¹⁴⁸ (1992).

Com relação à AFM_1 , os primeiros estudos de carcinogenicidade foram realizados em trutas arco-íris. SINNHUBER et al.¹²³ (1974) observaram que grupos de peixes, alimentados com dietas contendo 4 e 16 $\mu\text{g/kg}$ de AFM_1 , durante 12 meses, apresentaram incidências de hepatomas de 13% e 60%, respectivamente. Para fins de comparação, alguns animais foram alimentados com ração contendo 4 $\mu\text{g/kg}$ de AFB_1 , obtendo-se a incidência de 48% de hepatomas. Alguns lotes de peixes receberam, além da AFM_1 nas concentrações descritas, dietas contendo ácidos graxos ciclopropenóides, os quais são reconhecidos como promotores da atividade carcinogênica da AFB_1 . Nestes lotes, a incidência de tumores hepáticos foi de 70%, no grupo alimentado com 4 $\mu\text{g/kg}$ de AFM_1 , evidenciando o efeito promotor para esta toxina, similarmente à AFB_1 .

CANTON et al.²¹ (1975) confirmaram as observações de SINNHUBER et al.¹²³ (1974), em experimento semelhante, no qual trutas arco-íris apresentaram 2% de incidência de tumores, e 6% de nódulos hiperplásticos, após 16 meses de ingestão de dieta contendo 27,3 $\mu\text{g/kg}$ de AFM_1 . Os animais alimentados com ração contendo 5,8 $\mu\text{g/kg}$ de AFB_1 , por outro lado, apresentaram incidências de 13% de hepatomas, e 25% de nódulos hiperplásticos.

Utilizando AFM_1 produzida sinteticamente (racêmica), WOGAN & PAGLIALUNGA¹⁴⁹ (1974) realizaram estudo com ratos Fisher machos, os quais foram dosados com 25 μg de AFM_1 /dia (via oral, através de intubação), 5 dias por semana, durante 8 semanas. Outro grupo recebeu AFB_1 natural na mesma dose e sob as mesmas condições dos que receberam AFM_1 . Apenas 3% dos animais dosados com AFM_1 desenvolveram tumores, ao passo que 28% apresentaram lesões pré-neoplásticas. Entretanto, todos os animais tratados com AFB_1 desenvolveram hepatomas. Os autores confirmaram o menor poder carcinogênico da AFM_1 , em relação à AFB_1 , sugerindo, porém, que a dose efetiva da AFM_1 é provavelmente a metade da AFB_1 , considerando-se que apenas o isômero natural da mistura racêmica seja biolo-

gicamente ativo, de acordo com PONG & WOGAN¹⁰² (1971).

Em 1986, HSIEH et al.⁶⁴ obtiveram sucesso na preparação de quantidades razoáveis de AFM₁ a partir de culturas de A.flavus em arroz, o que possibilitou a CULLEN et al.³¹ (1987) a realização de estudo em ratos Fisher machos, utilizando AFM₁ natural. Os animais foram alimentados com rações contendo 0, 0,5, 5 e 50 µg/kg de AFM₁ e 50 µg/kg de AFB₁, durante 18 - 22 meses. Dentre os animais submetidos à ingestão de AFM₁, apenas os que receberam 50 µg/kg apresentaram hepatomas e nódulos pré-neoplásticos, cujas incidências foram de 5% e 16%, respectivamente. Neste grupo, foram observados, também, 3 animais com carcinoma intestinal. Os animais que receberam AFB₁ (50 µg/kg), por outro lado, apresentaram 95% de incidência de hepatomas. Os autores concluíram que a potência carcinogênica da AFM₁ é cerca de 10% da apresentada pela AFB₁. A DT₅₀, estimada por KUIPER-GOODMAN⁷⁵ (1990), a partir dos resultados obtidos neste estudo, para a AFM₁ em ratos Fisher machos, foi de 10,38 µg/kg p.c./dia.

1.3.3.2- Carcinogenicidade para a Espécie Humana:

O carcinoma hepatocelular é, mundialmente, um dos tipos mais comuns de câncer, apresentando, porém, uma acentuada variação geográfica no que concerne à incidência, com predomínio em alguns países da África, Ásia e ilhas do Pacífico⁹⁵. A incidência do CHC é maior nos homens do que nas mulheres, predominantemente na faixa etária de 30 - 50 anos⁷¹. Entre os países com maior incidência, destacam-se Moçambique, Zimbabwe, Etiópia, China (costa sudoeste) e Taiwan⁷¹. Os países com incidência intermediária incluem Swazilândia, Transkei, Japão e parte central e sudoeste da Europa⁷¹.

As diferenças extremas observadas na incidência do CHC entre os diversos países sugerem o envolvimento de fatores ambientais em sua etiologia^{10,35}. Dentre os fatores identificados, os que apresentam maior importância são as aflatoxi -

nas e o vírus da hepatite B (HBV)^{53,147,158}.

Diversos autores têm reportado a presença de aflatoxinas no soro⁸⁷ e em biópsias de fígado de pacientes com câncer hepático^{9,29,45}. Entretanto, a hipótese de que a ingestão de aflatoxinas constitui fator de risco para o CHC no homem é melhor amparada por evidências experimentais e epidemiológicas. As evidências experimentais derivam da extrapolação para o homem, dos resultados obtidos em estudos de biotransformação, mutagenicidade e carcinogenicidade em animais e em preparações in vitro⁴⁸. As evidências epidemiológicas resultam de estudos efetuados em áreas geográficas onde a contaminação de alimentos por aflatoxinas e o CHC são frequentes^{13,16}. Os resultados de alguns destes trabalhos, onde se constatou uma forte associação estatística entre a incidência de câncer hepático e o grau de exposição às aflatoxinas, são apresentados na Tabela 5. Esta associação é mais evidente em indivíduos do sexo masculino^{16,158}.

Com base nos estudos disponíveis, a INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC)⁶⁷ concluiu, em 1987, que existiam evidências suficientes para considerar a AFB₁ como fator etiológico do câncer hepático em populações humanas.

A análise global dos dados sobre a ingestão de aflatoxinas versus incidência do CHC, pelo método de GOLD⁴⁷, forneceu, de acordo com WOGAN¹⁴⁷ (1992), uma DT₅₀ igual a 132 µg/kg p.c./dia. Este valor está próximo da DT₅₀ observada em algumas espécies de primatas, porém, é consideravelmente superior às das espécies de roedores mais sensíveis (Tabela 4). Ao comparar estes valores, entretanto, deve-se ressaltar que a DT₅₀ para o homem é teórica, uma vez que, para o seu cálculo, foram assumidas várias condições, entre elas, a de que a AFB₁ seja a única causa do CHC e que a exposição a este carcinógeno tenha ocorrido continuamente durante cerca de 50 anos da vida do indivíduo¹⁴⁷.

Apesar da consistência dos dados apresentados na

Tabela 5: Relação entre a ingestão de AFB₁ e a incidência de CHC, em países da África e Ásia.

País	Ingestão de AFB ₁ (ng/kg p.c./dia)	Incidência do CHC (por 100.000/ano)	Referência
Tailândia	6,5	2,0	SHANK et al. ¹²¹
	61,0	6,0	(1972)
Kenia	3,5	1,2	LINSELL & PEERS ⁸⁰ (1977)
	5,9	2,5	
	10,0	4,0	
Moçambique	20,3	5,9	VAN RENSBURG et al. ¹³⁷ (1985)
	38,6	5,0	
	77,7	12,1	
	86,9	9,0	
	87,7	15,5	
	131,4	17,7	
Swazilândia	183,7	14,0	PEERS et al. ⁹⁸ (1987)
	11,4	5,7	
	14,3	2,9	
	18,6	6,1	
	32,9	11,1	
	38,6	5,7	
	40,0	9,2	
	42,9	19,6	
	72,9	23,7	
República Po- lar da China	127,1	22,4	YEH et al. ¹⁵⁹ (1989)
	158,6	24,9	
	21,0	175,4	
	157,0	182,2	
Transkei	1.232,0	288,5	VAN RENSBURG et al. ¹³⁸ (1990)
	3.545,0	613,5	
	5,1	5,3	
	18,0	3,2	
	19,6	9,0	
	23,2	10,3	

Tabela 5, não existe, até o presente, uma caracterização completa da relação dose-resposta para as aflatoxinas no homem. Isto se deve, entre outras causas, ao fato de que, nos estudos epidemiológicos, o grau de exposição não é preciso, uma vez que foi estimado a partir dos níveis de contaminação por AFB₁ na dieta das populações, e não na dose efetivamente ingerida individualmente, tal como ocorre em animais submetidos à experimentação¹³.

De acordo com STOLOFF¹²⁷ (1987), a comprovação científica do envolvimento das aflatoxinas na etiologia do câncer hepático, no homem, é dificultada pelo fato de que, em sua grande maioria, os estudos epidemiológicos foram realizados em áreas onde a infecção pelo HBV é endêmica e, também, correlacionada à incidência do CHC. Esta afirmativa encontra respaldo em alguns estudos posteriores, como o efetuado por CAMPBELL et al.²⁰ (1990), os quais não observaram relação entre a ingestão de aflatoxinas e a mortalidade por CHC em 48 áreas da República Popular da China, ao contrário da prevalência de portadores do antígeno de superfície da hepatite B (HBsAg), a qual revelou-se fortemente associada ao CHC. Este trabalho, entretanto, foi severamente criticado por WILD & MONTESANO¹⁴² (1991), notadamente em relação à metodologia empregada para estimar o grau de exposição dos indivíduos às aflatoxinas.

O HBV é considerado o principal fator de risco para o câncer hepático em certas populações, como a de Taiwan. Neste país, estudos prospectivos demonstraram que existe uma alta incidência do CHC em portadores de HBV⁶. Inversamente, em estudos clínicos, grande parte dos pacientes com CHC revelaram-se HBsAg seropositivos⁵. Sequências do vírus HBV têm sido encontradas no genoma de hepatócitos de pacientes com CHC¹⁰, embora esta integração não constitua componente obrigatório do câncer hepático ou da hepatite crônica¹⁴⁷.

As conclusões da IARC, porém, foram bastante favorecidas a partir do final da década de 80, pelos resultados

obtidos em estudos de biomonitoramento individual de adutos de AFB₁ com proteínas e DNA em populações expostas, sobretudo na China. Isto possibilitou uma quantificação mais precisa do grau de exposição às aflatoxinas. GROOPMAN et al.⁴⁹ (1988) concluíram que, no homem, cerca de 1 - 2% da AFB₁ ingerida liga-se covalentemente à albumina plasmática, e que a dosagem destes adutos evidencia exposição à AFB₁ ao longo de aproximadamente 20 dias.

WILD et al.¹⁴¹ (1990) pesquisaram a presença de adutos de albumina plasmática em adultos e crianças de vários países, como Kenia, Senegal, Gâmbia e Uganda, observando positividade entre 12 - 100% das amostras. Na Tailândia, os níveis destes adutos foram menores, sendo que nenhuma amostra foi positiva entre indivíduos da Polônia e França. Estes resultados são compatíveis com as incidências do CHC nos países citados¹⁴¹.

Estudos experimentais demonstraram que a formação de adutos AFB₁-DNA é diretamente proporcional à dose de AFB₁ ingerida¹⁸, e à indução de tumores hepáticos em animais expostos²⁴. Com relação a indivíduos humanos, GROOPMAN et al.⁵¹ (1992) observaram uma alta correlação entre a ingestão total de AFB₁ e a excreção urinária total de adutos AFB₁-N₇-guânica. Com base nestes fatos, ROSS et al.¹⁰⁸ (1992), em estudo prospectivo realizado em Shangai, República Popular da China, evidenciaram que a exposição às aflatoxinas potencializou o risco de câncer hepático associado ao HBV. Os autores observaram que o risco relativo para os indivíduos com seropositividade para o HBsAg, e com presença de adutos AFB₁-N₇-guânica na urina, foi de 60,1; em contraste, o risco relativo para os indivíduos seropositivos para o HBsAg, e com ausência de adutos e outros derivados da AFB₁ na urina, foi de 4,8.

Apesar da intensa discussão sobre este assunto, a tendência atual entre os pesquisadores, de modo geral, é considerar a etiologia do câncer hepático como multifatorial ,

com uma provável interação sinérgica entre as aflatoxinas, atuando como iniciadoras do processo cancerígeno, e o HBV, o qual teria um efeito promotor sobre o desenvolvimento do tumor (fenótipo transformado)^{10,35,53,147,157}.

COVA et al.³⁰(1990), experimentalmente, observaram ação sinérgica entre a AFB₁ e o vírus da hepatite B de patos (DHBV), no desenvolvimento de hepatomas em animais expostos a ambos os fatores. Este mesmo efeito foi constatado por SELL et al.¹²⁰(1991), com relação a camundongos transgênicos, ou seja, com seqüências do HBV no genoma, expostos à ingestão de AFB₁.

No Brasil, onde a contaminação de alimentos com aflatoxinas é relativamente frequente, não existem estudos de correlação entre a ingestão destas toxinas e a incidência de câncer hepático. SABINO¹¹⁰(1990), em estudo preliminar com fígados humanos, provenientes de pacientes com CHC autopsiados em São Paulo/SP, não observou níveis detectáveis de AFB₁, AFM₁ ou aflatoxicol nas amostras. A análise destes compostos foi realizada através de técnica de cromatografia de camada delgada, cujos cromatogramas revelaram, porém, várias manchas fluorescentes não identificadas nas amostras.

1.3.4- Outros Efeitos Tóxicos:

As aflatoxinas têm sido consideradas como fatores envolvidos na etiologia da síndrome de Reye, doença grave caracterizada por encefalopatia aguda e degeneração adiposa das vísceras⁸⁸. A doença afeta principalmente crianças, sendo que alguns estudos demonstraram a presença de aflatoxinas no fígado e em fluídos corporais dos pacientes em certos países, como Nova Zelândia, Estados Unidos, antiga Tchecoslováquia e Tailândia⁸⁸. Alguns trabalhos, entretanto, como o de NELSON et al.⁸⁴(1980), nos Estados Unidos, não evidenciaram associação entre a exposição às aflatoxinas e a ocorrência de síndrome de Reye.

Considera-se, atualmente, a etiologia da síndrome de Reye como multivariada, porém, os fatores de risco para esta enfermidade permanecem desconhecidos.

As aflatoxinas, sobretudo a AFB₁ e a AFM₁, também apresentam efeitos sobre o sistema imunitário⁸⁹. Entre os efeitos de imunossupressão, demonstrados em animais de experimentação, destacam-se aplasia do timo, redução do número e da atividade das células T, diminuição da resposta de anticorpos, supressão da atividade fagocitária e redução do complemento¹⁰⁰.

HENDRICKSE⁵⁸ (1991) sugeriu a participação das aflatoxinas na etiologia do kwashiorkor, o qual é considerado uma das principais formas de desnutrição protéico - calórica severa. A doença apresenta distribuição geográfica restrita a áreas tropicais, com predomínio em países africanos, onde a ingestão de aflatoxinas através de alimentos contaminados é também freqüente^{58,68}

As evidências que suportam a hipótese desta associação compreendem, entre outras:

- as aflatoxinas e/ou derivados de biotransformação foram detectados mais freqüentemente, e em altas concentrações, no soro e na urina de crianças com kwashiorkor, do que no de crianças normais³⁴;
- a AFB₁ e/ou aflatoxicol foram detectados em 100% das amostras de fígado de crianças autopsiadas, cujo óbito deveu-se ao kwashiorkor⁵⁸;
- a exposição de crianças às aflatoxinas, nas áreas prevalentes, inicia-se precocemente, durante o aleitamento, sobretudo na forma de AFM₁ excretada no leite materno¹⁶¹; e,
- os efeitos das aflatoxinas sobre o metabolismo das células determinam desarranjos bioquímicos, metabólicos, imunológicos e patológicos, os quais são muito semelhantes aos observados no kwashiorkor⁵⁸.

HOUSEHAM & HUNDT⁶¹ (1991), contudo, em estudo efetuado na África do Sul, observaram que as aflatoxinas não se caracterizaram como causa primária do kwashiorkor.

JELLIFFE & JELLIFFE⁶⁸ (1992) propuseram a etiologia desta doença como sendo multivariada, com a participação de diversos fatores, sobretudo deficiências nutricionais e influências ambientais, aí compreendida a exposição às aflatoxinas.

1.4- Métodos Imunoquímicos para a Análise de Aflatoxina M₁:

Os primeiros métodos para a determinação de AFM₁ em amostras de leite e derivados foram desenvolvidos em meados dos anos 60, tendo como base a propriedade fluorescente da toxina, quando exposta à luz ultra-violeta⁸⁸. Deste modo, a técnica de identificação e quantificação utilizada de início, e ainda largamente empregada na atualidade, foi a cromatografia de camada delgada (CCD)⁸⁸.

A maioria dos métodos preconiza a extração com solventes orgânicos, como metanol e clorofórmio¹¹⁸. A purificação do extrato pode ser realizada através de partição com solventes ou cromatografia de coluna¹¹⁸. É importante ressaltar que estas fases são particularmente trabalhosas, uma vez que o leite constitui um produto bastante complexo, composto por açúcares, proteínas, minerais, vitaminas, gorduras e outras substâncias interferentes¹³⁰. Além disso, as quantidades de toxina presentes no leite são extremamente baixas, situando-se na faixa de partes por bilhão (ng/ml) ou menos, dificultando a obtenção de um extrato puro de AFM₁¹³⁰.

A identificação e a quantificação das aflatoxinas pela técnica de CCD é geralmente realizada através da comparação visual das amostras com padrões de concentração conhecida¹³³. A quantificação pode ser realizada, com maior precisão, através da introdução da fotodensitometria para a leitura das placas, porém, com elevação considerável dos cus

tos das análises¹³⁰.

A partir dos anos 70, foram desenvolvidos diversos métodos de análise de aflatoxinas, incluindo a AFM_1 , através da cromatografia líquida de alta resolução (CLAR)¹³⁰. Isto possibilitou um incremento notável no grau de precisão das análises. Entretanto, a técnica requer grande investimento por parte dos laboratórios, não apenas para a aquisição, como para a manutenção do instrumental analítico²⁵. Devido à alta sensibilidade do método, por outro lado, as fases de extração e purificação tornam-se ainda mais críticas, exigindo procedimentos extensivos e morosos por parte do analista²⁵. Para contornar este problema, alguns autores têm preconizado a utilização de sistemas automatizados na sequência analítica básica por CLAR^{46,135}.

No início da década de 80, surgiu uma nova perspectiva para a análise de aflatoxinas, com a introdução dos métodos imunoquímicos, ou imunoensaios, fundamentados nas reações específicas entre anticorpos e antígenos, cujos princípios constituem a base dos sistemas de defesa dos organismos vertebrados superiores⁴³. Estas técnicas têm sido empregadas extensivamente, sobretudo na área clínica, para a análise de substâncias de alto peso molecular, tais como toxinas bacterianas, ou para o diagnóstico de agentes infecciosos⁴³.

Os anticorpos utilizados nestes sistemas analíticos são preparados a partir da imunização de animais de experimentação²⁵. As aflatoxinas, no entanto, não apresentam propriedades imunogênicas, havendo a necessidade de conjugá-las, previamente à imunização, com proteínas, como a albumina sérica bovina ou polipeptídeos²⁵.

As aflatoxinas, por outro lado, não reagem diretamente com grupos protéicos, o que torna necessário a preparação de um derivado reativo para posterior conjugação e formação do imunógeno²⁵. Um dos métodos mais utilizados para a AFM_1 consiste na introdução de um grupo carboximetil -

oxima (CMO) no anel ciclopentanona da molécula⁵², conforme a Figura 4.

Figura 4: Preparação de imunógeno para AFM₁, pelo método CMO.

(1): Conversão da AFM₁ em um derivado carboximetil-oxima;

(2): Conjugação com a proteína (P).

Fonte: HARDER & CHU⁵²(1979).

A especificidade dos anticorpos é determinada, primariamente, pelo grupo exposto da molécula conjugada, ou seja, pela porção não ligada à proteína⁴³. Deste modo, os imunógenos preparados a partir do método CMO produzem anticorpos que reconhecem o grupo hidroxi-bi-furânico, o qual é característico da molécula de AFM₁⁵².

Após a injeção do imunógeno, geralmente em coelhos, os animais produzem diferentes tipos de imunoglobulinas²⁵. No entanto, a IgG é o principal tipo utilizado nos imunossaios, uma vez que representa 75% do total de imunoglobulinas produzidas⁴³. O soro dos animais, assim imunizados, con-

têm anticorpos policlonais, os quais geralmente não são monoespecíficos para o antígeno em questão, o que torna necessária a sua purificação antes de aplicá-los nos imunoensaios⁴³.

Nos últimos anos têm-se utilizado métodos de preparação de anticorpos monoclonais, os quais apresentam características físicas, bioquímicas e imunológicas idênticas aos policlonais⁴³.

Diversas técnicas de imunoensaios têm sido desenvolvidas para a determinação de aflatoxinas, com destaque para as de radioimunoensaio, cromatografia de imunoafinidade e de ensaio por enzimas imuno-adsorvidas (ELISA)⁴³. O método de ELISA, do tipo direto, porém, é um dos mais utilizados, principalmente para a AFM_1 ¹¹⁸. Esta técnica tem sido empregada, também, para a análise de outras micotoxinas, tais como zearalenona⁹⁹, ocratoxina A⁸³ e deoxinivalenol¹ em produtos alimentícios. Em amostras clínicas, ELISA tem sido utilizado na análise de AFB_1 ³³, AFM_1 ¹²⁶ e adutos AFB_1 -DNA⁴⁵ e AFB_1 -proteínas¹⁴¹.

Nos ensaios ELISA, os anticorpos são imobilizados em uma fase sólida, por exemplo, microcubetas de plástico⁴³. Utiliza-se, ainda, uma solução de conjugado, constituído pela toxina ligada a uma enzima, de modo geral a peroxidase (HRP) ou a fosfatase alcalina (FA), a qual, juntamente com a solução extraída da amostra, é submetida à reação com os anticorpos imobilizados⁴³. A competição pelos sítios de ligação nos anticorpos, entre a toxina livre da amostra e a toxina conjugada, é posteriormente avaliada através da adição de um substrato cromogênico, constituído geralmente por tetra - metilbenzidina (para conjugados com HRP) ou para-nitro-fenil-fosfato (para conjugados com FA).⁴³. Utiliza-se, também, uma solução estabilizadora da reação, normalmente composta por álcalis fortes e substâncias corantes⁴³.

A cor resultante das soluções depende, diretamente, da quantidade de conjugado ligado aos anticorpos, a qual é

inversamente proporcional à quantidade de toxina presente na amostra. Este fato permite comparar as cores mediante observação visual com padrões conhecidos, em testes qualitativos⁹¹, ou por espectrofotometria, para a obtenção de resultados quantitativos⁹². A sequência básica para a execução do método de ELISA, do tipo direto, para a determinação de aflatoxinas em produtos alimentícios, encontra-se esquematizada na Figura 5.

Existem, atualmente, conjuntos de ELISA, produzidos em escala comercial, para a execução de análise de aflatoxinas em alimentos. No Brasil, é possível adquiri-los através de importação. Estes sistemas são de execução simples, e podem ser empregados diretamente nas amostras, uma vez que não requerem etapas de purificação devido às altas especificidade e sensibilidade dos anticorpos⁸³. Esta característica representa uma vantagem considerável do método, especialmente em relação à análise de AFM_1 em leite e derivados, pois permite a sua aplicação em grande número de amostras, em intervalo de tempo relativamente pequeno, o que não ocorre com os métodos cromatográficos⁸³. Para o leite "in natura", o método de ELISA, assim aplicado, possibilitou a PESTKA et al.¹⁰¹ (1981) a detecção de AFM_1 a partir de 0,25 ng/ml. Este limite pode ser reduzido para níveis em torno de 0,01 ng/ml, mediante a utilização de mini-colunas para a purificação das amostras, previamente à execução do ensaio⁶⁶.

SCOTT¹¹⁸ (1989), em revisão sobre os métodos quantitativos aplicados à análise de AFM_1 em leite e derivados, concluiu que os ensaios de ELISA têm apresentado desempenho satisfatório, inclusive em faixas de concentração ao nível de partes por trilhão (ng/ml). Entretanto, o autor não encontrou referências sobre a realização de estudos interlaboratoriais para a confirmação destes resultados. Por este motivo, considera-se fundamental a adoção de procedimentos para a avaliação do desempenho deste método, previamente a sua aplicação no laboratório⁴³. Esta necessidade é reforçada em

Figura 5: Sequência básica para a execução de análises de aflatoxinas pela técnica de ELISA.

razão dos conjuntos de ELISA requererem condições especiais de conservação, pois como material biológico, são sensíveis às variações de temperatura que podem ocorrer, em especial, durante o transporte e armazenagem⁴³.

A avaliação intralaboratorial de métodos analíticos consiste, geralmente, na realização de um determinado número de análises repetidas em amostras contaminadas experimentalmente com a substância pesquisada³⁹. Deste modo, avalia-se a capacidade de recuperação do método, bem como a precisão dos resultados, frente a diversas concentrações do composto analisado³⁶. Com relação aos métodos aplicados à AFM₁, o número de análises repetidas situa-se entre 5 - 14, para cada nível de contaminação¹¹⁸.

1.5- Ocorrência de Aflatoxina M₁ em Leite e Derivados:

A descoberta da AFM₁ impulsionou a realização de levantamentos sobre a ocorrência desta toxina no leite destinado ao consumo humano, em diversos países, sobretudo na Europa e América do Norte.

Diversos estudos sugerem que a AFM₁, no leite, associa-se à fração protéica (caseína), ficando nela retida mesmo após a pasteurização¹⁴³ e o beneficiamento para a produção de derivados¹⁶⁰. A concentração da matéria-prima, como a que se obtém na fabricação de leite em pó, leite condensado, requeijão e queijos⁷, conseqüentemente, pode aumentar a proporção de AFM₁ no produto final, em função da diminuição do teor de água^{3,144,145,146}.

A maioria dos estudos disponíveis sobre a ocorrência de AFM₁ no leite foi realizada na década de 80. VAN EGMOND¹³⁶ (1989) sumarizou os resultados de 28 trabalhos realizados em diversos países, principalmente europeus, no período de 1980-8, demonstrando a grande variabilidade dos percentuais de amostras positivas para a AFM₁ que, em alguns casos, atingiram 100%. Este fato pode ser atribuído à diversi-

dade de critérios metodológicos adotados nestes trabalhos sobretudo, com relação à amostragem, métodos analíticos utilizados e época de realização dos estudos. As concentrações médias de AFM_1 referidas, porém, situaram-se, de modo geral, entre 0,01 - 0,10 ng/ml¹³⁶.

No Brasil, a ocorrência de aflatoxinas tem sido observada com frequência, principalmente no Estado de São Paulo, em alimentos utilizados para consumo humano e animal, como amendoim e derivados^{107,115}, milho^{4,113,114}, feijão¹¹¹ e rações destinadas aos animais^{104,112}. As pesquisas e levantamentos sobre a ocorrência de AFM_1 no leite, entretanto, são raros.

No Rio Grande do Sul, em 1975, POZZOBON et al., citados por MARTINS⁸² (1984), constataram a presença de pequenas quantidades de AFM_1 em 2% das 50 amostras de leite "in natura" comercializado no Município de Santa Maria.

SABINO¹⁰⁹ (1983), em São Paulo/SP, analisou 100 amostras de leite pasteurizado, relativas a nove marcas comercializadas no Estado, observando AFM_1 em apenas uma delas. Este resultado foi atribuído, pelo autor, à diluição da toxina decorrente da mistura de leite contaminado e não contaminado, durante o beneficiamento pelas usinas. A formulação desta hipótese foi auxiliada pelos resultados, obtidos no mesmo trabalho, referentes à análise de 50 amostras de leite colhidas diretamente em fazendas da Região do Vale do Paraíba, que revelaram 9 amostras com teores de AFM_1 entre 0,1 - 1,68 ng/ml.

MARTINS⁸² (1984) analisou 224 amostras de leite pasteurizado tipo "B", relativas às quatro marcas de maior consumo em São Paulo/SP, observando traços de AFM_1 em 4 amostras (1,8%), sendo uma de cada marca estudada.

PARREIRAS et al.⁹⁶ (1987) analisaram 92 amostras de leite "in natura" colhidas diretamente na Usina Piloto de La

ticínios da Universidade Federal de Viçosa , em Viçosa/MG , constatando a presença de AFM_1 em 57 amostras (62%) , cuja concentração média variou entre 0,13 - 0,18 ng/ml.

Considerando a toxicidade e a ocorrência freqüente das aflatoxinas, muitos países têm estabelecido limites máximos de tolerância para grãos, cereais e produtos de origem animal¹³⁶. O Brasil, em 1977, fixou limites apenas para alimentos vegetais destinados ao consumo humano, através da Resolução nº 34, da Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos (CNNPA)¹⁴. Esta norma estabeleceu a concentração máxima de 30 µg/kg, correspondente à soma das aflatoxinas B_1 e G_1 .

Com relação à AFM_1 , a FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA), citada por STOLOFF et al.¹²⁸(1991), adotou, como nível máximo da toxina no leite, o valor de 0,5 ng/ml . Em particular, no Brasil, embora este limite tenha sido proposto há vários anos¹³⁶, até o presente não existe legislação específica para a AFM_1 .

1.6- Características da Distribuição de Leite em Pó Através do Programa de Alimentação Escolar do Município de São Paulo:

No Brasil, o leite como importante fonte alimentícia, de alto valor nutritivo⁷⁴, é distribuído na forma de leite em pó, às crianças da rede escolar pública , através dos programas de suplementação alimentar, denominados, popularmente de "merenda escolar".

Dentre os principais programas desta natureza, destaca-se o desenvolvido pela Prefeitura do Município de São Paulo, cuja estimativa de consumo de leite em pó é de cerca de 86 toneladas ao mês. O número de escolares atendidos pelo programa é estimado em um milhão de crianças, das quais aproximadamente 32.000 encontram-se na faixa etária de 0 - 6 anos, matriculados em 310 creches municipais.

O número médio de crianças, por creche , é de 100 escolares, os quais consomem mensalmente cerca de 150 kg de leite em pó. O consumo de leite "per capita" é maior em crianças de 4 meses de idade, devido ao estágio de desenvolvimento em que se encontram, cuja alimentação básica depende , necessariamente, deste produto.

As empresas autorizadas a comercializar o leite em pó através do programa são em pequeno número. No entanto, as compras são realizadas mensalmente, de modo que a escolha de uma determinada marca de leite em pó depende das regras de mercado na ocasião da compra, com ênfase no preço, bem como na qualidade do produto, avaliada mediante análises laboratoriais prévias. A determinação de AFM_1 , porém, por não estar prevista na legislação do país, não é incluída entre os parâmetros de qualidade adotados para este produto.

2 - OBJETIVOS

Considerando a importância que o conhecimento dos níveis de contaminação do leite por AFM_1 representa para a Saúde Pública, especialmente em relação ao produto em pó utilizado em programas de alimentação escolar, bem como a carência de dados sobre este problema em nossas condições, constituem objetivos do presente trabalho:

- a- avaliar o desempenho do método de ELISA frente a amostras de leite em pó reconstituído, contaminadas experimentalmente com AFM_1 ;
- b- pesquisar, quantitativamente, a presença de AFM_1 , mediante o método de ELISA, em amostras de leite em pó distribuído às creches mantidas pelo Programa de Alimentação Escolar do Município de São Paulo; e,
- c- complementarmente, estimar a ingestão diária média de AFM_1 pelas crianças de 4 meses de idade (maior consumo de leite) atendidas pelo Programa.

3 - MATERIAL E MÉTODOS

3.1- Avaliação do Desempenho do Método de ELISA em Condições Experimentais:

3.1.1- Amostras:

Foram utilizadas 62,5 g de leite em pó integral, i sentas de AFM₁ e divididas em 5 amostras de igual quantidade.

A comprovação da ausência da toxina foi realizada no Laboratório Central de Controle de Qualidade da empresa NESTLÉ Industrial e Comercial Ltda., após 3 análises negativas pelo método ZCI (Zuivelcontroleinstituut), sumarizado por SCOTT¹¹⁸ (1989), como se segue:

"As amostras são extraídas com clorofórmio e solução de cloreto de sódio resfriado a 4° C. Para evitar emulsões, acrescenta-se dodecil-sulfato de sódio. O extrato clorofórmico é, então, secado com sulfato de sódio anidro, filtrado e posto a evaporar. Em seguida, o resíduo é dissolvido em éter dietílico e purificado em coluna de sílica gel, sendo a AFM₁ eluída com clorofórmio + metanol (95 + 5), após o descarte do éter utilizado na pré-lavagem. Submete-se o extrato final à cromatografia de camada delgada unidimensional com densitometria, utilizando-se, como fase móvel, éter dietílico + metanol + água (94 + 4,5 + 1,5)".

O método em apreço foi submetido a estudo interlaboratorial na Holanda, e apresenta, como limite de detecção, 0,1 µg/kg de leite em pó¹¹⁸.

3.1.2- Determinação da Concentração do Padrão de Aflatoxina M₁:

O padrão de AFM₁ (5 µg, fornecidas por SIGMA CHEMICAL COMPANY), depois de dissolvido em volume conveniente de clorofórmio p.a. (3,0 ml), foi calibrado espectrofotometricamente através da técnica preconizada pelo TROPICAL DEVELOPMENT AND RESEARCH INSTITUTE¹³³ (1984).

A solução padrão, assim preparada, contendo 1,74 µg/ml da toxina, foi utilizada para a preparação das amostras contaminadas com AFM₁.

3.1.3- Preparação das Amostras:

Reconstituiu-se cada amostra de leite em pó através da diluição de 12,5 g em 100 ml de água destilada, previamente aquecida a 40°C. Em etapa posterior, foram acrescentadas às amostras diferentes quantidades de AFM₁, considerando, como referência, as concentrações dos padrões utilizados no método de ELISA, bem como o limite de tolerância recomendado pela FDA (0,5 ng/ml).

Para esta finalidade, adotando-se o procedimento utilizado por DELLA ROSA³²(1979) para a contaminação experimental de leite "in natura" com AFM₁, a solução padrão foi transferida para frascos volumétricos de 100 ml, numerados de 1 a 5, conforme apresentado na Tabela 6.

Tabela 6: Volumes da solução padrão (µl) e quantidades de AFM₁ (ng), adicionados por frasco, e respectivas concentrações de AFM₁ (ng/ml) nas amostras utilizadas na fase de avaliação do desempenho do método de ELISA em condições experimentais.

Amostras	S o l u ç ã o padrão (µl)	AFM ₁ (ng)	Concentração de AFM ₁ (ng/ml)
1*	0	0	0
2	5,8	10	0,10
3	11,5	20	0,20
4	28,8	50	0,50
5	57,5	100	1,00

* Controle

Na seqüência do método, o conteúdo dos frascos foi evaporado até a secagem total, sob fluxo de nitrogênio. Em

seguida, com o auxílio de um funil analítico, transferiu-se 100 ml do leite reconstituído (aquecido a 40°C) para cada um dos frascos, sob agitação constante, através da adição de alíquotas de 25 ml, com intervalos de 5 minutos entre cada uma, até completar o volume. As concentrações estimadas de AFM₁, nestas amostras, estão relacionadas na Tabela 6.

3.1.4- Análise das Amostras:

As amostras preparadas foram analisadas, por um mesmo técnico, através do método de ELISA quantitativo para AFM₁, mediante a utilização de conjuntos de reativos comercialmente produzidos pela empresa NEOGEN CORPORATION, de marca VeratoxTM®.

Previamente à execução dos ensaios, as amostras foram submetidas à centrifugação a 3.000 rpm, por 15 minutos, para a remoção e descarte da camada sobrenadante de gordura.

Estabeleceram-se 10 análises para cada amostra, com a finalidade de possibilitar o processamento estatístico dos resultados obtidos, para cada nível de contaminação por AFM₁.

Os elementos que constituem os conjuntos de reativos, bem como os procedimentos do método de ELISA empregado, encontram-se descritos a seguir:

- Reagentes e materiais do conjunto:

- 24 microcubetas de plástico cobertas com anticorpos policlonais anti-AFM₁;
- 24 microcubetas de plástico para mistura;
- 5 frascos contendo padrões de AFM₁, em leite liofilizado, nas concentrações de 0; 0,25; 0,50; 1,00 e 2,00 ng/ml;
- 1 frasco contendo 3 ml do conjugado AFM₁ - peroxidase a 0,1%;
- 1 frasco contendo 3 ml da solução estabilizadora, contendo hidróxido de sódio a 1% e corante Vermelho 40 a 1%;

- 1 pacote com 6 tubos contendo, cada um, 1,5 ml de solução de tetra-metilbenzidina (TMB) a 1%;
- 1 frasco contendo solução de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) a 0,3%;
- 5 tubos contendo, cada um, 2,0 ml de água destilada, para a reconstituição dos padrões; e,
- 80 ponteiros para pipetas.

- Material complementar:

- pipeta multicanal, ajustável para volumes de 50 - 200 μ l;
- leitora de microcubetas de ELISA, com filtro de 650 nm , marca BIO-TEK, modelo EL-301, com capacidade para 12 microcubetas;
- suporte para microcubetas;
- cronômetro; e,
- material absorvente (papel toalha ou lenço de papel).

- Preparo das soluções:

- Padrões: Os padrões foram preparados através da adição de 2,0 ml de água destilada, contida nos tubos que acompanham o conjunto, a cada um dos frascos de padrão liofilizado, seguida de agitação vigorosa. A estabilização completa destas soluções é alcançada, somente, uma hora após a sua preparação;
- Substrato: O substrato foi preparado misturando-se 8 partes de TMB com uma parte de solução de H_2O_2 . Para isto, acrescentou-se 4 gotas da solução de H_2O_2 a cada um dos tubos contendo 1,5 ml de solução de TMB. É importante ressaltar que o substrato deve ser armazenado em local protegido da luz até o momento de utilização, sendo que sua durabilidade é de 4 - 8 horas.

- Execução do ensaio:

Em cada sequência analítica, removeu-se uma microcubeta de mistura para cada amostra, bem como 5 microcubetas para os padrões, colocando-as no suporte. Removeu-se um número igual de microcubetas cobertas com anticorpos.

Como a leitora tem capacidade para 12 microcubetas, foi possível executar a análise simultânea das 5 amostras em cada sequência analítica, repetindo-a 10 vezes, de maneira a completar 10 análises para cada amostra.

É importante constituir um sistema de referência para as microcubetas, para que cada uma delas represente uma amostra ou padrão. Assim, as 5 primeiras, da esquerda para a direita, foram marcadas com um "p", as quais foram utilizadas para os respectivos padrões; as demais microcubetas foram reservadas para as amostras (A_1 a A_5), como representado a seguir:

Os ensaios foram conduzidos mediante a execução das seguintes etapas:

- a- em cada uma das microcubetas de mistura, colocou-se 50 μ l do conjugado;
- b- pipetou-se 200 μ l dos padrões e das amostras, nas microcubetas respectivas;
- c- depois de homogeneizar bem todas as soluções, transferiu-se 100 μ l do conteúdo da cada microcubeta de mistura para a correspondente microcubeta coberta com anticorpos. Este procedimento foi realizado o mais rapidamente possível, com o auxílio de pipeta multicanal;
- d- em seguida, as microcubetas foram deixadas em repouso por 30 minutos, à temperatura ambiente. As microcubetas de

mistura foram descartadas;

- e- após o período de repouso, as microcubetas foram lavadas delicadamente com água destilada e colocadas, na posição invertida, sobre papel absorvente, para a secagem;
- f- pipetou-se 100 μ l do substrato em cada microcubeta; após nova homogeneização, as microcubetas foram deixadas em repouso adicional por 10 minutos, à temperatura ambiente;
- g- pipetou-se 100 μ l da solução estabilizadora em cada microcubeta, seguido de nova homogeneização.

- Leitura espectrofotométrica e interpretação dos resultados:

Procedeu-se à mensuração da absorbância do conteúdo das microcubetas, em leitora própria para ensaios pelo método de ELISA, utilizando filtro de 650 nm, considerando o ar como branco.

A absorbância obtida na leitura é inversamente proporcional à concentração de AFM_1 , uma vez que o desenvolvimento de cor é menos acentuado quanto mais toxina houver. Esta relação, entretanto, não é linear, o que torna necessário a utilização de um artifício matemático para a construção da curva de calibração. Para isto, adotou-se o método preconizado pelo fabricante dos conjuntos, e descrito por PARK et al.⁹²(1989), como se segue:

- a- os valores de absorbância dos padrões de 0,25; 0,50; 1,00 e 2,00 ng/ml foram divididos pelo valor de absorbância do padrão zero, e multiplicados individualmente por 100;
- b- os valores, assim obtidos, denominados "percentuais de inibição do desenvolvimento de cor", foram plotados graficamente em papel LOGISTIC-LOG, no eixo Y, juntamente com as respectivas concentrações, no eixo X; e,
- c- em seguida, traçou-se a curva de calibração através da união dos pontos obtidos.

Os valores de absorbância das amostras foram igual

mente divididos pela absorbância do padrão zero, multiplicando-se o resultado por 100. Os percentuais obtidos foram, em seguida, plotados sobre a curva de calibração, de maneira a indicar, no eixo X do gráfico, as concentrações de AFM_1 nas amostras, as quais foram expressas em ng/ml de leite reconstituído.

3.1.5- Procedimentos Estatísticos:

Os resultados obtidos nas análises foram submetidos a tratamento estatístico para o cálculo da média, desvio padrão e desvio padrão relativo (coeficiente de variação), de acordo com DUX³⁶ (1986), com a finalidade de verificar a precisão do método de análise frente a cada um dos níveis de contaminação utilizados nas amostras.

Em seguida, aplicou-se a distribuição "t" de Student, com aproximação normal, no sentido de verificar a ocorrência de possíveis diferenças estatisticamente significantes entre os resultados obtidos e as concentrações reais de AFM_1 nas amostras.

Adotou-se, como nível de rejeição, alfa igual a 0,01 e o valor crítico de "t" de alfa igual a 3,25, para 9 graus de liberdade.

Estabeleceram-se, complementarmente, os limites de confiança, para 99%, das médias obtidas nas análises. Os procedimentos estatísticos para o cálculo de "t" foram efetuados de acordo com os critérios estabelecidos por BERQUÓ et al.⁸ (1981).

A relação entre as concentrações médias obtidas nas análises e as concentrações verdadeiras das amostras, foi estabelecida mediante o cálculo do coeficiente de correlação de Pearson, tendo a equação da reta sido determinada através da regressão linear simples, de acordo com JOHNSON & BHATTACHARYYA⁶⁹ (1987).

3.2- Pesquisa de Aflatoxina M_1 no Leite em Pó Distribuído pelo Programa de Alimentação Escolar do Município de São Paulo:

3.2.1- Amostras:

Foram analisadas 300 amostras de leite em pó integral distribuído em creches mantidas pelo Programa de Alimentação Escolar do Município de São Paulo.

Para o estabelecimento do número mínimo de amostras necessárias à realização do estudo, utilizou-se o modelo da distribuição de Poisson¹²⁵, adotando-se, como nível de rejeição, alfa igual a 0,01 ($\lambda = 4,7$) e o valor de p igual a 0,018. Adotou-se este critério com base nas baixas frequências de AFM₁ no leite para consumo humano no Estado de São Paulo (iguais ou abaixo de 1,8%), relatadas por outros autores em nosso meio^{82,109}.

A unidade amostral foi constituída por aproximadamente 100 gramas de leite em pó, sendo que cada amostra era proveniente de uma embalagem original contendo 1 kg do produto.

3.2.2- Colheita de Amostras:

A colheita de amostras foi realizada, diretamente, nas creches mantidas pelo Programa. Para isto, estabeleceu-se em 30 o número de creches, escolhidas aleatoriamente entre as 310 unidades que compõem a rede.

Para o sorteio das creches, utilizou-se a "tábua de números aleatórios ou equiprováveis", através do agrupamento das unidades por Administração Regional de Saúde do Município de São Paulo, numerando-as de 1 a 310, de acordo com os procedimentos recomendados por SOUNIS¹²⁵ (1985) para a extração de amostragem aleatória simples e sem reposição.

Foram colhidas 10 amostras em cada uma das creches sorteadas, sendo que cada amostra foi retirada, ao acaso, de

uma caixa contendo 10 pacotes de 1 kg de leite em pó. Deste modo, as 10 amostras representaram o conteúdo de 10 caixas disponíveis no estoque das creches.

A colheita foi efetuada, mensalmente, na primeira semana de cada mês, uma vez que o recebimento dos produtos que fazem parte do Programa ocorre, normalmente, nesta época. O período de colheita compreendeu os meses de outubro, novembro e dezembro de 1992, e janeiro de 1993.

As amostras foram acondicionadas em sacos de polipropileno estéreis, lacradas e enviadas ao laboratório, para a execução das análises.

3.2.3- Análise das Amostras:

Após a reconstituição do leite em pó em água destilada, previamente aquecida a 40°C, na proporção de 12,5 g do produto em 100 ml de água (1:8), as amostras foram submetidas à análise de AFM₁, através do método de ELISA, mediante o emprego dos mesmos procedimentos descritos no item 3.1.4.

Os resultados das análises foram expressos em ng de AFM₁/ml de leite reconstituído.

3.2.4- Análise dos Resultados:

3.2.4.1- Procedimentos Estatísticos:

Foram determinadas as medidas de posição e dispersão (média, variância e desvio padrão) dos resultados concernentes às amostras consideradas acima do limite de detecção do método de análise.

3.2.4.2- Estimativa da Ingestão Diária Média de Aflatoxina M₁:

A estimativa da ingestão diária média de AFM₁ foi realizada de acordo com os critérios recomendados pela ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE¹⁵³ (1983), baseando-se nos níveis médios de AFM₁ nas amostras de leite em pó reconstituído. Para

isto, adotou-se o valor de consumo diário de leite reconstituído (720 ml), para crianças de 4 meses de idade, as quais apresentam o maior consumo deste produto, de acordo com dados da Coordenadoria de Alimentação e Suprimentos, responsável pela administração do Programa.

Adotou-se o peso médio de 7,0 kg, estimado pela FUNDAÇÃO IBGE⁴⁴ (1977), para crianças do sexo masculino, de 4 meses, residentes na Área Metropolitana de São Paulo.

O valor de ingestão diária média, por unidade de peso corpóreo, foi expresso em ng/kg p.c./dia.

4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1- Avaliação do Desempenho do Método de ELISA em Condições Experimentais:

A Figura 6 reproduz a curva de calibração típica, obtida nos ensaios ELISA para a determinação de AFM_1 . Os percentuais de inibição do desenvolvimento de cor, calculados de acordo com os procedimentos descritos no item 3.1.4, encontram-se representados no eixo Y, em escala LOGISTIC. As concentrações dos padrões de AFM_1 estão relacionadas no eixo X, em escala logarítmica (LOG_{10}).

Percentual de in-
ibição de desen-
volvimento de cor

Figura 6: Curva de calibração típica, obtida no método de ELISA quantitativo para a determinação de AFM_1 .

Os anticorpos anti-AFM₁ utilizados nos conjuntos VERATOXTM® são policlonais, produzidos em coelhos imunizados com AFM₁ conjugada à albumina sérica bovina, pelo método CMO. Deste modo, os anticorpos reagem especificamente com o grupo hidroxibifurânico da molécula de AFM₁. Entretanto, podem ocorrer reações cruzadas com outras aflatoxinas, como AFB₁, AFB₂ e AFG₁. Para estas toxinas, a empresa fabricante dos conjuntos estimou os percentuais de reação cruzada relativa de 73%, 18% e 39%, respectivamente. Estes valores expressam a relação entre a concentração de AFM₁ necessária para reagir com 50% dos anticorpos, e a concentração de outras aflatoxinas necessária para manifestar este mesmo efeito⁴³. Contudo, é remota a possibilidade de transferência de resíduos significativos destas aflatoxinas para o leite, com conseqüente interferência nos resultados.

O tempo médio para a execução de cada sequência analítica (5 padrões e 5 amostras) foi de aproximadamente 55 minutos.

Os resultados obtidos nas análises das amostras experimentalmente contaminadas com AFM₁ encontram-se listados na Tabela 7.

As análises efetuadas com a amostra número 1 revelaram-se todas negativas para AFM₁, o que confirma a ausência desta toxina ou de outros interferentes detectáveis pelo método, no leite em pó utilizado no preparo das amostras.

A Tabela 8 relaciona os parâmetros estatísticos adotados para a avaliação intralaboratorial do desempenho do método de ELISA, calculados em relação aos valores da Tabela 7.

As concentrações médias obtidas nas análises, quando comparadas às concentrações reais das amostras, indicaram percentuais de recuperação entre 83,0% (amostra 2, contendo 0,10 ng/ml) e 111,8% (amostra 5, contendo 1,00 ng/ml). Estes valores encontram-se dentro do esperado, segundo HORWITZ⁵⁹

Tabela 7: Resultados obtidos nas análises realizadas em amostras de leite em pó reconstituído, contaminadas com diferentes concentrações de AFM₁ (ng/ml). São Paulo, 1994.

Análise	Concentração de AFM ₁ (ng/ml)				
	amostra 1 (0,00) ^a	amostra 2 (0,10)	amostra 3 (0,20)	amostra 4 (0,50)	amostra 5 (1,00)
1	0,00	0,08	0,20	0,45	0,90
2	0,00	0,06	0,15	0,49	0,98
3	0,00	0,08	0,23	0,46	0,98
4	0,00	0,09	0,16	0,54	1,20
5	0,00	0,21	0,11	0,54	1,07
6	0,00	0,05	0,18	0,43	1,40
7	0,00	0,13	0,10	0,52	1,15
8	0,00	0,01	0,17	0,58	1,10
9	0,00	0,07	0,29	0,60	1,30
10	-b	0,05	0,16	0,54	1,10

a- Os números entre parênteses indicam as concentrações reais de AFM₁ nas amostras, em ng/ml;

b- A análise 10 da amostra 1 não foi realizada.

(1982), para análises ao nível de partes por bilhão (ng/ml), ou seja, entre 60 - 110%.

Considerando-se os valores de "t" de Student, para $\alpha = 0,01$, não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes entre as concentrações médias e as concentrações reais das amostras, para todos os níveis de contaminação. Este fato atesta, ao nível de significância adotado, a inexistência de erros sistemáticos nos resultados obtidos.

A Figura 7 demonstra a relação entre as concentrações médias obtidas e as concentrações reais das amostras, bem como a dispersão dos resultados individuais em torno das médias. Mediante o emprego da regressão linear simples, observou-se uma reta regida pela equação $Y = -0,049 + 1,16.X$, onde Y representa a concentração obtida na análise, e X, a

Tabela 8: Resultados estatísticos, obtidos durante a avaliação do desempenho do método de ELISA em condições experimentais, em amostras de leite em pó contaminadas com diferentes concentrações de AFM₁ (ng/ml). São Paulo, 1994.

Parâmetro estatístico	Amostras				
	1 (0,00) ^a	2 (0,10)	3 (0,20)	4 (0,50)	5 (1,00)
Concentração média (ng/ml)	0,000	0,083	0,175	0,515	1,118
Desvio padrão (ng/ml)	0,000	0,054	0,056	0,056	0,152
Recuperação média (%)	-	83,0	87,5	103,0	111,8
Desvio padrão relativo (%)	-	65,5	31,8	10,9	13,6
Valor de "t" ^b	0,000	-0,989	-1,421	0,844	2,449
LC mínimo ^c (ng/ml)	0,000	0,027	0,118	0,457	0,961
LC máximo ^c (ng/ml)	0,000	0,139	0,232	0,573	1,275

^a Os números entre parênteses indicam as concentrações reais de AFM₁ nas amostras, em ng/ml;

^b Todos os valores de "t" foram não significantes ($P > 0,01$);

^c Limite de confiança para 99%.

concentração real de AFM₁ na amostra. O coeficiente de correlação de Pearson (r), entre estas duas variáveis, foi de 0,9995, o que permite considerar satisfatória a exatidão do método.

O desvio padrão relativo (DPR), ou coeficiente de variação, é uma medida de variabilidade que reflete, de maneira inversamente proporcional, a precisão do método³⁶. A precisão, por outro lado, varia de acordo com a concentração da substância pesquisada. Deste modo, quanto menor a concentração, maior a variabilidade dos resultados analíticos e, portanto, maior o valor do DPR³⁶. Este fato foi observado no presente trabalho, uma vez que o DPR apresentou valores entre 10,9% (amostra 4, contendo 0,50 ng/ml) e 65,5% (amostra 2, com 0,10 ng/ml).

Concentração obtida (ng/ml)

Figura 7: Relação entre as concentrações médias obtidas nas análises e as concentrações reais das amostras contaminadas experimentalmente com AFM₁.

A maioria dos métodos químicos apresenta uma faixa de concentração na qual a precisão é maior. Nesta faixa, o desvio padrão varia proporcionalmente à média, ou seja, à concentração da substância nas amostras³⁶. Assim, o DPR mantém-se relativamente constante dentro da faixa de trabalho³⁶. Com relação ao método de ELISA, os resultados demonstraram esta característica na faixa de 0,50 - 1,00 ng/ml.

É importante destacar que os conjuntos de reativos utilizados foram desenvolvidos para a análise de AFM₁ no leite, considerando-se o limite de tolerância adotado nos Estados Unidos da América (0,5 ng/ml). De fato, o método revelou melhor precisão nas análises efetuadas com a amostra 4, contendo AFM₁ neste nível, cuja recuperação média foi de 103,0% e o DPR igual a 10,9%.

A precisão de resultados intralaboratoriais é, também, denominada repetibilidade. A ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC), a respeito da repetibilidade do método de ELISA qualitativo para a análise de AFB₁, ao nível de 15 µg/kg, recomenda que o valor do DPR não deva exceder a 20,0%¹¹⁹. Dentro deste critério, o método avaliado mostrou-se satisfatório, também, para o nível de 1,00 ng/ml (amostra 5), cujo DPR foi de 13,6%, porém, não nos níveis de 0,10 e 0,20 ng/ml.

HORWITZ⁵⁹⁻(1982), por outro lado, afirmou que, em análises ao nível de 1 ng/ml, é possível esperar que os resultados gerados em um mesmo laboratório apresentem, normalmente, valores de DPR entre 15,0 - 40,0%. Com base neste critério, o qual revela-se mais adequado para a avaliação de métodos para a análise de AFM₁ em leite, o método de ELISA demonstrou desempenho satisfatório para concentrações entre 0,20 - 1,00 ng/ml.

Considerando que as amostras foram submetidas diretamente ao ensaio, sem qualquer tratamento prévio, além do fato das análises terem sido repetidas pelo mesmo analista, é possível concluir que a variabilidade dos resultados obtidos foi devida, basicamente, às características dos conjuntos e à execução dos ensaios. De acordo com WARD & MORGAN¹⁴⁰ (1991), os principais fatores que podem diminuir o grau de precisão dos ensaios ELISA incluem: erros no procedimento da análise, pipetagem e preparação dos reagentes imprecisas, homogeneização deficiente das soluções; diferenças entre as microcubetas por cobertura irregular dos anticorpos; e, diferenças entre os conjuntos utilizados.

De acordo com SCOTT¹¹⁸(1989), a maioria dos métodos que utilizam a CCD para a análise do leite, apresenta, para níveis de 0,10 - 1,00 ng/ml, percentuais de recuperação entre 80,0 - 120,0%, e DPR intralaboratorial entre 10,0 - 30,0%. Os métodos por CLAR são os que revelam parâmetros de

desempenho mais satisfatórios, com recuperação próxima de 100,0% e DPR, geralmente, abaixo de 10,0%¹¹⁸.

O desempenho do método de ELISA, para níveis de 0,20 - 1,00 ng/ml, portanto, pode ser comparado aos métodos tradicionais de análise por CCD. Para o nível de 0,50 ng/ml, o método avaliado apresentou parâmetros próximos aos dos métodos por CLAR.

O método de ELISA, avaliado neste estudo, mostrou desempenho semelhante ao observado nos ensaios de AFB₁ em amostras de milho^{27,92} e amendoim^{27,92,140}.

PESTKA et al.¹⁰¹ (1981) avaliaram o método de ELISA, pesquisando AFM₁ em amostras de leite artificialmente contaminadas, submetidas diretamente ao ensaio, observando, para concentrações de 0,25 - 5,00 ng/ml, percentuais de recuperação entre 80,0 - 124,0%, para o produto "in natura", e entre 94,0 - 120,0%, para o desnatado. Porém, o método não foi capaz de detectar concentrações iguais ou abaixo de 0,10 ng/ml.

A comparação dos resultados obtidos no presente estudo, com o de outros pesquisadores, é dificultada pelo fato de que, na grande maioria, os diferentes métodos imunoenzimáticos para AFM₁ mencionados, utilizam procedimentos de purificação das amostras, previamente à execução dos ensaios. Deste modo, com a retirada dos interferentes da amostra, os níveis de detecção podem ser drasticamente reduzidos, situando-se entre 0,002 - 0,10 ng/ml⁸³, ou seja, abaixo dos níveis adotados neste trabalho. Com a adoção de procedimentos de purificação, a precisão dos métodos, também, é melhorada, embora com prejuízo para uma das principais vantagens do ELISA: simplicidade de execução⁴³. Utilizando amostras de leite em pó reconstituído, artificialmente contaminadas com AFM₁, em níveis de 0,005 - 0,10 ng/ml, purificadas em cartuchos pré-fabricados C₁₈, FRÉMY & CHU⁴² (1984) observaram percentuais de recuperação de 85,7 - 116%, e DPR entre 8,0 - 24,4%.

Os parâmetros estatísticos, adotados no presente

estudo, comprovaram a confiabilidade dos resultados originados pelo método de ELISA. No entanto, os métodos analíticos são, usualmente, avaliados com base em outros atributos importantes, sobretudo a aplicabilidade e a praticabilidade⁵⁹.

A aplicabilidade corresponde à capacidade do método em gerar resultados satisfatórios em um determinado nível de interesse, e em produtos para os quais está indicado⁵⁹. A praticabilidade, por outro lado, reflete a capacidade do método em ser utilizado na análise de várias amostras em curto intervalo de tempo, e a um baixo custo⁵⁹. Tendo em vista a simplicidade de execução e, sobretudo, a possibilidade de utilização do ensaio diretamente nas amostras, o método de ELISA para AFM₁ revelou-se bastante prático, embora o custo por análise seja ligeiramente superior ao dos métodos por CCD.

Deve-se ressaltar que a importância de cada atributo depende da finalidade que se pretende para o método em questão. Nas análises de monitoramento ou nas que envolvam procedimentos de fiscalização, a praticabilidade é muito importante, porém, é secundária em relação à confiabilidade do método⁵⁹. Conseqüentemente, a exatidão e a precisão do método devem ser suficientemente elevadas de maneira a detectar a substância pesquisada em uma determinada concentração. Desse modo, o método de ELISA mostrou-se adequado para tal propósito, considerando níveis de AFM₁ a partir de 0,5 ng/ml de leite em pó reconstituído.

A praticabilidade, no entanto, é fundamental em levantamentos ao nível de campo, onde se faz necessária a análise de grande número de amostras no menor prazo possível. A utilização para esta finalidade, cada vez mais generalizada, do método de ELISA é resultado do excelente desempenho demonstrado como método de triagem analítica para AFB₁^{73,91,134}, bem como para outras aflatoxinas¹³⁴, em diversos tipos de produtos alimentícios.

No que concerne à análise quantitativa de AFM_1 em leite, os resultados do presente trabalho demonstraram bom desempenho do método de ELISA em concentrações de 0,20 - 1,00 ng/ml, o qual pode ser aplicado, sobretudo, em pesquisas de campo sobre a ocorrência de AFM_1 . É recomendável, porém, que o método em apreço seja submetido, também, a estudos interlaboratoriais, para a corroboração destes resultados.

4.2- Pesquisa de Aflatoxina M_1 no Leite em Pó Distribuído pelo Programa de Alimentação Escolar do Município de São Paulo:

Os resultados das análises efetuadas em amostras de leite em pó, distribuído através do Programa de Alimentação Escolar do Município de São Paulo, encontram-se relacionados na Tabela 9.

Tabela 9: Amostras de leite em pó distribuído através do Programa de Alimentação Escolar do Município de São Paulo, segundo a concentração de AFM_1 (ng/ml) São Paulo, 1994.

Concentração de AFM_1^*	Amostras	
	F	%
abaixo de 0,01	228	76,0
0,01 ———0,10	39	13,0
0,10 ———0,20	17	5,7
0,20 ———0,50	10	3,3
acima de 0,50	6	2,0
Total	300	100,0

*leite reconstituído a 1:8

F-freqüência; %-percentual

Deve-se destacar que as concentrações obtidas nas análises referem-se ao leite em pó reconstituído a 1:8. Desse modo, para se estimar a concentração de AFM_1 no produto em pó, deve-se multiplicar os valores encontrados pelo fator de diluição (8).

Das 300 amostras analisadas, 228 (76,0%) não apresentaram níveis detectáveis de AFM_1 (abaixo de 0,01 ng/ml) ; nas 72 amostras restantes (24,0%), constatou-se AFM_1 em níveis acima de 0,01 ng/ml, sendo a maior parte delas (39 amostras, ou 13,0%) na faixa de 0,01 - 0,10 ng/ml ; é importante ressaltar que, nesta faixa, os resultados podem apresentar elevado grau de imprecisão, uma vez que, de acordo com os dados referidos no item 4.1, em concentrações abaixo de 0,10 ng/ml, o método de ELISA deve apresentar valores de DPR acima de 65,5%.

Concentrações superiores a 0,50 ng/ml, ou seja, acima do limite de tolerância preconizado pela FDA, foram observadas em apenas 6 amostras (2,0%).

Estes resultados atestam a ocorrência relativamente freqüente de AFM_1 no leite em pó destinado ao Programa de Alimentação Escolar do Município de São Paulo . Considerando que as marcas de leite em pó amostradas também são destinadas ao comércio varejista de todo o país, os resultados obtidos refletem o risco a que todos os consumidores de leite em pó estão sujeitos.

Na Tabela 10 estão relacionados os resultados da análise estatística aplicada aos valores obtidos nas amostras positivas para AFM_1 (resultados acima de 0,01 ng/ml).

A concentração média de AFM_1 , entre as amostras positivas, apresentou o valor de 0,15 ng/ml ; a variabilidade dos resultados foi relativamente elevada, obtendo-se o desvio padrão de 0,18 ng/ml. A concentração máxima de AFM_1 , obtida nas análises, foi de 1,00 ng/ml.

Tabela 10: Resultados da análise estatística aplicada às concentrações obtidas nas amostras positivas para AFM₁ (acima de 0,01 ng/ml). São Paulo, 1994.

Parâmetro estatístico	Valores
Número de amostras analisadas	300
Número de amostras positivas	72
Percentual de amostras positivas	24
Concentração mínima obtida (ng/ml)	0,01
Concentração máxima obtida (ng/ml)	1,00
Concentração média (ng/ml)	0,15
Variância (ng/ml)	0,03
Desvio padrão (ng/ml)	0,18

O percentual observado de amostras positivas para AFM₁ (24,0%) foi muito superior aos resultados obtidos por SABINO¹⁰⁹ (1983) e MARTINS⁸² (1984), ambos em São Paulo, a partir de análises de leite pasteurizado. Este percentual, entretanto, revelou-se abaixo do observado por PARREIRAS et al.⁹⁶ (1987), em Viçosa/MG, com relação ao leite "in natura", embora a concentração média de AFM₁ referida tenha sido semelhante à obtida no presente trabalho. Analogamente, o percentual de amostras contendo AFM₁ em níveis acima de 0,10 ng/ml (11,0%, Tabela 9), mostrou-se abaixo do valor observado por SABINO¹⁰⁹ (1983), em amostras de leite "in natura" colhidas diretamente em fazendas da Região do Vale do Paraíba.

A concentração média de AFM₁, obtida no presente trabalho, revelou-se ligeiramente superior ao observado em levantamentos efetuados em países da Europa e América do

Norte, na década de 80¹³⁶. É importante ressaltar, porém, que a maioria destes países apresenta legislação para AFM₁ desde o final da década de 70¹²⁸, o que deve ter contribuído para a diminuição dos níveis da toxina no leite. Contudo, a comparação individual dos resultados obtidos neste estudo, com os apresentados em outros países, torna-se impraticável, devido à diversidade de critérios metodológicos adotados nestes trabalhos.

A análise global dos resultados apresentados nas Tabelas 9 e 10 fornece um quadro satisfatório do problema, com relação à ocorrência de AFM₁ no leite em pó. A concentração média de AFM₁ (0,15 ng/ml), inclusive, está muito abaixo dos valores utilizados em estudos sobre a carcinogenicidade da AFM₁ em animais de experimentação, para os quais foram observadas lesões tumorais^{21,31,123,149}. No entanto, considerando-se que 6 amostras (2,0%) apresentaram concentrações acima de 0,5 ng/ml (uma amostra a 1,00 ng/ml), bem como o risco que este fato representa para a saúde humana, torna-se indispensável a instituição de limites de tolerância para AFM₁ em leite e derivados, por parte da legislação brasileira.

A adoção de limites de tolerância para uma determinada substância tóxica é, normalmente, resultante da análise de uma série de dados que inclui, entre outros aspectos: o conhecimento de todos os parâmetros de toxicidade e de ocorrência da substância; a determinação do risco potencial à saúde humana oferecido pela substância quando presente em diferentes concentrações nos alimentos; e, a avaliação final do benefício das medidas em relação ao custo e ao impacto sobre o sistema de produção e distribuição dos alimentos envolvidos. Assim, estabelece-se um nível máximo de tolerância, abaixo do qual a ingestão provável da substância, através de alimentos contaminados, não produzirá, com um certo grau de confiança, efeitos

deletérios na população consumidora¹².

Segundo levantamento efetuado por STOLOFF et al.¹²⁸ (1991) , em 1987 , 50 países apresentavam legislação para aflatoxinas em produtos alimentícios . No entanto, os autores observaram que a maior parte dos países não utilizaram , aparentemente , critérios científicos para a análise de risco e posterior fixação dos limites de tolerância, apesar do grande volume de conhecimento atualmente disponível , sobretudo, em relação à AFB₁.

VAN EGMOND¹³⁶ (1989) observou que , dos 13 países que apresentavam limites de tolerância , vigentes ou propostos, para a AFM₁ em leite e/ou derivados, em 1987, 3 (Esta - dos Unidos e antigas União Soviética e Checoslováquia) estabeleceram o máximo de 0,5 ng/ml , adotando assim o valor recomendado pela FDA.

A maior parte dos países que apresentam legislação para a AFM₁ em leite , contudo , concentra-se na Europa¹³⁶. A julgar pelos níveis de tolerância estabelecidos , geralmente 0,05 ng/ml , deduz - se que muitos foram adotados com base nos limites de detecção dos métodos analíticos disponíveis¹²⁸. A Holanda constitui exceção , onde o limite de 0,05 ng/ml baseou - se nos resultados obtidos por WOGAN et al.¹⁵⁰ (1974) , sobre os efeitos carcinogênicos da AFB₁ em ratos, e posteriormente ajustado de acordo com as diferenças entre AFB₁ e AFM₁ , observadas no estudo de HSIEH et al.⁶⁵ (1984).

Alguns autores afirmam que o efeito de cada dose de uma substância cancerígena é cumulativo, independentemente de seu ritmo de detoxificação , mesmo quando as doses são fracionadas ao longo do tempo^{79,85}. Assim , existe consenso geral de que a exposição a um potencial carcinógeno humano , o qual não pode ser totalmente evitado, como as aflatoxinas, deve ser limitado a um menor nível prático^{128,136,156}. A ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE¹⁵⁶ (1987) definiu este nível

como a concentração da substância que não pode ser eliminada do alimento sem envolver o descarte do produto como um todo, o que comprometeria a sua disponibilidade como gênero alimentício.

Este critério assume maior relevância com relação à AFM_1 no leite, uma vez que este produto constitui importante fonte nutricional para crianças.

Um dos mais importantes aspectos da análise de risco de substâncias químicas é o estabelecimento do grau de exposição do organismo humano¹⁵⁵. Com relação aos contaminantes presentes nos alimentos, esta determinação é particularmente difícil, embora seja possível estimá-la, indiretamente, a partir dos dados de consumo dos alimentos contaminados, e dos respectivos níveis médios de ocorrência da substância¹⁵³. Nestas condições, o grau de exposição é medido em termos de ingestão diária por unidade de peso corpóreo, sendo geralmente expressa em ng/kg p.c./dia¹⁵³.

A estimativa da ingestão diária de aflatoxinas, de acordo com as condições mencionadas anteriormente, tem sido utilizada em estudos epidemiológicos sobre a associação do câncer hepático com o consumo de alimentos contaminados¹³. No Brasil, em particular, não existem estimativas sobre o grau de exposição da população às aflatoxinas.

Considerando que o leite em pó distribuído através do Programa de Alimentação Escolar do Município de São Paulo destina-se a uma população definida, com padrões fixos de consumo deste produto, e tomando-se como base os resultados obtidos no presente trabalho, foi possível estimar, com razoável precisão, a ingestão diária média de AFM_1 através do leite, pelas crianças atendidas pelo Programa.

Adotando-se o consumo diário de leite em pó reconstituído, para crianças de 4 meses de idade (720 ml), as quais apresentam o maior consumo, bem como o fato de que 24% das amostras apresentaram concentração média de 0,15 ng de

AFM₁/ml, calculou-se a ingestão diária total de 25,9 ng. Utilizando-se o peso médio de 7,0 kg, estimado pela FUNDAÇÃO IBGE, para crianças do sexo masculino, de 4 meses de idade, calculou-se a ingestão diária média de aproximadamente 3,7 ng/kg p.c./dia. Com o rápido crescimento da criança, sobretudo no primeiro ano de vida, aliado à diminuição do consumo de leite, este valor tende a diminuir sensivelmente para as faixas etárias subsequentes.

A ingestão diária de uma toxina pode ser avaliada mediante a comparação com um valor teórico de ingestão tolerável, calculado a partir de dados experimentais ou epidemiológicos¹⁵⁵. Com relação às aflatoxinas, contudo, o Comitê Misto de Especialistas da ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS PARA A ALIMENTAÇÃO E A AGRICULTURA/ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE considerou que ainda não existem dados suficientes para estabelecer níveis toleráveis de exposição¹⁵⁶.

Alguns pesquisadores, no entanto, têm preconizado a utilização de fatores de segurança para estimar valores de ingestão diária tolerável (IDT) para as aflatoxinas, com base em experimentos com animais. Neste tipo de estimativa, um fator de 1.000 a 5.000 é aplicado à maior dose administrada aos animais, para a qual não foram observados efeitos tóxicos¹². O fator de segurança reflete diferenças inter e intra espécies, bem como o significado biológico dos tumores induzidos e o conceito de que doses muito baixas da substância podem iniciar o processo cancerígeno⁷⁶. A IDT para a AFM₁, baseada neste critério, e calculada em relação aos resultados do experimento de CULLEN et al.³¹(1987), foi de 0,5 ng/kg p.c./dia (fator de segurança de 5.000)⁷⁵. Para a AFB₁, a IDT assim calculada, foi de 0,15 ng/kg p.c./dia⁷⁵.

KUIPER-GOODMAN⁷⁵(1990) propôs o cálculo da IDT através da extrapolação da DT₅₀ observada em animais, mediante o emprego de um fator de segurança de 50.000. Deste modo, a IDT para a AFM₁, calculada em relação aos resultados obti-

dos por CULLEN et al.³¹(1987), foi de 0,2 ng/kg p.c./dia; para a AFB₁, o valor obtido foi de 0,023 ng/kg p.c./dia.

A ingestão diária média, estimada no presente trabalho, revelou-se muito acima dos valores de IDT mencionados para a AFB₁. Contudo, existem controvérsias a respeito da validade destes valores, devido, sobretudo, aos problemas de - correntes da extrapolação de dados obtidos em animais para a espécie humana, bem como dos resultados relativos à exposição dos animais a altas doses das toxinas, para estimar efeitos a baixas doses^{75,76}. Assim, o cálculo da IDT para as aflatoxinas não pode ser, plenamente, confiável. Além disso, a potência carcinogênica da AFB₁ no organismo humano é considerada cerca de 10 vezes menor do que a observada em ratos da cepa Fisher¹⁴⁸, realçando diferenças interespecies.

Alguns pesquisadores afirmam que a IDT para as aflatoxinas pode ser estimada, com maior confiabilidade, a partir dos resultados obtidos em estudos epidemiológicos^{16,48,157}. Neste caso, a IDT reflete a menor dose capaz de contribuir para o aumento significativo do risco de câncer hepático¹⁶. CARLBORG²²(1978) estimou este risco em 10 mortes/100.000 pessoas expostas a 1 ng/kg p.c./dia de AFB₁, com base em estudos epidemiológicos efetuados no sudoeste asiático e na África. Este cálculo, porém, refere-se a populações com elevada prevalência de HBV e, portanto, não pode ser aplicado em países onde a frequência de indivíduos portadores do vírus é menor.

O estudo efetuado por YEH et al.¹⁵⁹(1989), em Guangxi, República Popular da China, é considerado o mais apropriado para a derivação da relação dose-resposta para a carcinogênese humana induzida por AFB₁^{60,157}. Utilizando os resultados deste estudo, adaptados para a população dos Estados Unidos, e considerando uma prevalência de portadores de HBV igual a 1%, HOSEYNI⁶⁰(1992) estimou o excesso de risco de 1/100.000, para a ingestão de 3,6 ng/kg p.c./dia.

A estimativa da IDT para a AFM_1 , a partir de dados epidemiológicos, não é possível, devido à ausência de pesquisas desta natureza com a toxina. No entanto, conforme demonstrado experimentalmente por CULLEN et al.³¹ (1987), a potência carcinogênica da AFM_1 é cerca de 10% a da AFB_1 . Assim, a ingestão tolerável de AFM_1 , segundo o cálculo de HOSEYNI⁶⁰ (1992), seria de 36 ng/kg p.c./dia, para um risco de 1/100.000 ou seja, muito acima do valor de ingestão diária obtida no presente estudo.

KUIPER-GOODMAN⁷⁶ (1991) estimou a ingestão diária de AFM_1 pela população canadense, considerando que a concentração média da toxina no leite correspondesse ao limite de tolerância estabelecido pela FDA (0,5 ng/ml). O valor encontrado foi de 23 ng/kg p.c./dia, o que corresponde à ingestão de 2,3 ng de AFB_1 /kg p.c./dia. O limite de 0,5 ng/ml foi determinado, em 1977, a partir dos níveis de ocorrência da AFM_1 no leite, observados em levantamentos efetuados nos Estados Unidos, após um período de extrema contaminação do milho utilizado na alimentação do gado leiteiro¹²⁸. Apesar da ausência de critérios toxicológicos na sua elaboração, este limite revela-se adequado, sobretudo em relação aos resultados obtidos por HOSEYNI⁶⁰ (1992), e extrapolados para a AFM_1 , uma vez que a ingestão diária está abaixo do valor de IDT estimado para um risco de 1/100.000.

A ingestão diária obtida no presente trabalho, 3,7 ng/kg p.c./dia, está próxima da estimativa de HSIEH et al.⁶² (1986) para os Estados Unidos, cujo valor, calculado a partir dos níveis médios de ocorrência de AFM_1 no leite, foi de 4,4 ng/kg p.c./dia. Os autores consideraram o risco representado por este valor de ingestão como desprezível, com base nas evidências que sugerem ser o homem mais resistente à hepatocarcinogenicidade induzida por AFM_1 do que o rato, similarmente ao que ocorre em relação à AFB_1 . É importante notar que esta conclusão foi baseada em dados obtidos em animais adultos, extrapolados para seres humanos adultos¹³⁶. Entretanto

to, o risco atribuível à ingestão de AFM_1 para populações infantis necessita avaliação mais criteriosa.

As crianças, assim como os animais jovens, de maneira geral, são consideravelmente mais sensíveis aos efeitos tóxicos de compostos químicos¹⁵⁴. Entre as características que contribuem para esta maior vulnerabilidade, destacam-se¹⁵⁴:

- maior grau de absorção de substâncias tóxicas nos jovens do que nos adultos, enquanto que a capacidade de detoxificação é menor, pois os rins ainda não estão suficientemente aptos a excretar os produtos de biotransformação;
- baixos níveis de proteínas plasmáticas, capazes de formar ligações com substâncias tóxicas; e,
- grande superfície corporal em relação ao peso: as células são menores do que nos adultos, o que aumenta a superfície de exposição aos agentes químicos.

Existem poucos estudos sobre os efeitos da exposição crônica à AFM_1 , em animais de tenra idade. Dentre os trabalhos disponíveis, destaca-se o efetuado por WAKHISI¹³⁹ (1989), no qual ratas Wistar, em fase de lactação, receberam por via oral 250 $\mu\text{g/ml/kg p.c.}$, em três doses consecutivas a intervalos de 7 dias. Os filhotes foram mantidos durante 30 dias sob aleitamento materno. Após o desmame, os animais passaram a receber alimentação isenta de aflatoxinas. Observou-se, 22 meses depois, que a incidência de tumores hepáticos atingiu 34% dos machos e 13% das fêmeas. No grupo controle, constituído por filhotes de mães alimentadas com ração isenta de aflatoxinas, nenhum dos animais desenvolveu tumor hepático.

Estas evidências parecem ter contribuído para que alguns países europeus adotassem maior rigor em relação aos limites de tolerância para AFM_1 no leite destinado à alimentação de recém-nascidos e bebês, cujos valores foram estabelecidos entre 0 - 0,02 ng/ml ¹³⁶. De maneira análoga, a adoção

de regulamentos para estes produtos, especialmente aqueles utilizados em programas de suplementação alimentar, no Brasil, deveria ser mais criteriosa.

Com relação ao organismo adulto, bem como crianças maiores, uma das principais consequências da contaminação do leite por AFM_1 é a sua contribuição para o aumento da ingestão total de aflatoxinas, incluindo a possibilidade de um efeito aditivo à AFB_1 ¹⁵². Este fato reforça a necessidade do controle desta toxina, não apenas no leite, mas também nos derivados lácteos em geral. Para isto, é fundamental a realização de levantamentos que caracterizem os níveis de ocorrência da AFM_1 em nossas condições, sobretudo nos produtos derivados do leite.

É importante ressaltar que a instituição de limites de tolerância para a AFM_1 deve levar em consideração, também, aspectos da aplicabilidade das normas. Deste modo, os limites a serem definidos devem ser realistas e condizentes com os meios tecnológicos atualmente disponíveis para diminuir a contaminação, uma vez que a produção de alimentos vegetais totalmente isentos de aflatoxinas não é viável⁸⁸.

A redução da ocorrência de AFM_1 no leite, entretanto, está condicionada ao menor nível prático de AFB_1 na ração utilizada na alimentação do gado leiteiro^{88,128}. Por este motivo, considera-se fundamental a instituição de limites, também, para estes produtos, a exemplo do que ocorre em outros países. No Estado de São Paulo, esta necessidade já havia sido evidenciada por SABINO et al.¹¹² (1988), cujos resultados, referentes à análise de 308 amostras de rações animais, revelaram AFB_1 em 10,4% delas, com níveis médios de 241,2 µg/kg.

É importante salientar que os limites para rações devem levar em consideração as taxas mais prováveis de conversão de AFB_1 em AFM_1 ¹²⁸.

Os Estados Unidos e o Canadá fixaram o limite de 20 $\mu\text{g/kg}$, relativo à soma das quatro frações ($B_1 + G_1 + B_2 + G_2$), para rações destinadas ao gado leiteiro¹³⁶. Os 12 países da comunidade econômica européia adotam legislação menos tolerante, fixando o limite máximo em 10 $\mu\text{g/kg}$ apenas para AFB_1 . Este limite foi estabelecido com base nos resultados obtidos por LAFONT et al.⁷⁷ (1980) e por PATTERSON et al.⁹⁷ (1980), segundo os quais cerca de 0,78 - 2,2% da AFB_1 ingerida é excretada sob a forma de AFM_1 no leite. Deste modo, é possível admitir que, vacas alimentadas com 6 kg diários de ração contaminada com 10 $\mu\text{g/kg}$ de AFB_1 , e com uma produção média de 20 litros/dia, podem excretar AFM_1 no leite em níveis que variam de 0,02 - 0,07 ng/ml¹³⁶.

A legislação brasileira contempla apenas a exportação de torta de amendoim, e estabelece o limite de tolerância para este produto em 50 $\mu\text{g/kg}$, relativo à soma das quatro frações¹³⁶.

De acordo com SCOTT¹¹⁸ (1989), por outro lado, a imprecisão dos valores de conversão reforça a importância da realização de análises rotineiras no leite e em seus derivados, como fator imprescindível para o controle da ocorrência da AFM_1 .

Tendo em vista que a AFM_1 é, aparentemente, resistente aos processos usuais de beneficiamento do leite e produção de derivados^{3,143,144,145,146,160}, as ações para o controle do problema devem ser orientadas no sentido de prevenir a contaminação das rações. Deve-se destacar que o incentivo às boas práticas agrícolas, no que concerne à produção e armazenagem de grãos e cereais, destinados à alimentação animal, é fundamental para minimizar a contaminação e o desenvolvimento dos fungos^{2,28,133}.

A descontaminação das rações com AFB_1 , destinadas ao gado leiteiro, não está definitivamente comprovada como meio eficaz e economicamente viável para prevenir o aparecimento

da AFM₁ no leite^{26,156}, embora a utilização das técnicas de amoniação⁹⁴ e de adsorção com aluminossilicato de sódio e de cálcio hidratado⁵⁶ apresente resultados promissores.

5 - CONCLUSÕES

Face aos resultados obtidos durante os procedimentos de avaliação do desempenho do método de ELISA quantitativo, em amostras de leite em pó reconstituído, contaminadas experimentalmente com concentrações conhecidas de AFM_1 , pode-se concluir que:

- diante de amostras com concentrações de 0,10 - 1,00 ng/ml de AFM_1 , o método apresentou percentuais de recuperação variando de 83,0% - 111,8% e desvio padrão relativo entre 10,9% - 65,5%; e,
- é apropriado para pesquisas e levantamentos sobre a ocorrência de AFM_1 em leite, sobretudo, nas faixas de concentração entre 0,20 - 1,00 ng/ml.

Complementarmente, com base nos resultados da pesquisa de AFM_1 em amostras de leite em pó distribuído pelo Programa de Alimentação Escolar do Município de São Paulo, empregando o método de ELISA quantitativo, pode-se inferir que:

- o percentual de amostras de leite em pó positivas para AFM_1 atingiu 24,0%, sendo que 2,0% apresentaram concentrações acima de 0,5 ng/ml;
- a concentração de AFM_1 , referente ao produto reconstituído a 1:8, entre as amostras positivas, variou de 0,01 - 1,00 ng/ml, com média de 0,15 ng/ml; e,
- a estimativa de ingestão diária média de AFM_1 , em crianças com 4 meses de idade, foi de 3,7 ng/kg p.c./dia.

6 - RECOMENDAÇÕES

Considerando-se a importância dos resultados obtidos neste estudo, torna-se indispensável a formulação das seguintes recomendações:

- a- Avaliação toxicológica abrangente, com base nos conhecimentos disponíveis sobre a AFM_1 e suas consequências sobre a saúde humana, para posterior adoção de limites legais de tolerância para o leite e derivados, de acordo com a faixa da população a que se destinam os alimentos;
- b- Realização de pesquisas sobre a ocorrência de AFM_1 em produtos lácteos de modo geral, no sentido de estabelecer valores de ingestão diária, ao nível da população, bem como monitorar os níveis da toxina em relação aos limites de tolerância fixados;
- c- O método de ELISA está particularmente indicado para este propósito, em relação ao leite "in natura" e em pó reconstituído, embora seja recomendável a realização de estudos interlaboratoriais para confirmar a boa qualidade de seu desempenho. Para outros derivados de leite, como iogurte, manteiga e queijos, é importante o desenvolvimento de técnicas simplificadas de extração da AFM_1 , previamente à execução dos ensaios;
- d- Instituição de limites de tolerância para rações destinadas ao gado leiteiro, com base nas taxas de conversão de AFB_1 em AFM_1 excretada no leite; e,
- e- Incentivo às práticas agrícolas que contribuam para minimizar a contaminação dos produtos vegetais, com ênfase nos destinados à formulação de rações para animais.

7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Redigidas de acordo com:

FACULDADE DE SAÚDE PÚBLICA DA USP. Nor-
mas de referências bibliográficas apli-
das à saúde pública. São Paulo, 1988 .
(Série Orientação Bibliográfica, 2).

- 1- ABOUZIED, M.M.; AZCONA, J.I.; BRASELTON, W.E.; PESTKA , J.J. Immunochemical assessment of mycotoxins in 1989 grain foods: evidence for deoxinivalenol (vomitoxin) contamination. Appl. Environ. Microbiol., 57: 672-7, 1991.
- 2- APPLEBAUM, R.S.; BRACKETT, R.E.; WISEMAN, D.W.; MARTH , E.H. Aflatoxin: toxicity to dairy cattle and occurrence in milk and milk products - a review. J. Food Protec., 45: 752-77, 1982.
- 3- APPLEBAUM, R.S. & MARTH, E.H. Fate of aflatoxin M₁ in cottage cheese. J. Food Protec., 45: 903-4, 1982.
- 4- BAUTISTA, A.R.P.L.; OLIVEIRA, M.Z.A.; MIRANDA , M. S. ; SALES, L.A. Aflatoxinas em grãos de milho armazenado no Estado da Bahia. Rev. Soc. Bras. Toxicol., 2: 24-5, 1989.
- 5- BEASLEY, R.P. Hepatitis B virus. The major etiology of hepatocellular carcinoma. Cancer, 61: 1942-56, 1988.
- 6- BEASLEY, R.P.; HWANG, L.Y.; LIN, C.C.; CHIEN, C.S. Hepatocellular carcinoma and hepatitis B virus. A prospective study of 22.707 men in Taiwan . Lancet , 2: 1129-33, 1981.
- 7- BEHMER, M.L.A. Tecnologia do leite : leite , manteiga , queijo, caseína, sorvetes e instalações ; produção , industrialização e análise. 7ª ed. São Paulo, Nobel, 1977.
- 8- BERQUÓ, E.S.; SOUZA, J.M.P.; GOTLIEB, S.L.D. Bioestatística. São Paulo, EPU, 1981.
- 9- BESSARD, G.M.; SOUBEYRAND, J.; CHAUVIER, C.; POLLET, A. Contamination alimentaire et présence hépatique d'aflatoxines chez un individu porteur de cancer primitif du foie (CPF) en Côte d'Ivoire. J. Toxicol. Clin. Exp., 10: 41-4, 1990.

- 10- BIBRIESCA, L.B. Carcinogénesis hepática: etiología y patogenicia. Rev. Gastroenterol. Mex., 48: 39-55, 1983.
- 11- BIEHL, M.L. & BUCK, W.B. Chemical contaminants : their metabolism and their residues. J. Food Protec. , 50: 1058-73, 1987.
- 12- BOISSEAU, J. Relay toxicity . Drug Metabol. Rev. , 22: 685-97, 1990.
- 13- BOSCH, F.X. & PEERS, F. Aflatoxins: data on human carcinogenic risk. In: O'Neill, I.K.; Chen, J.; Bartsch, H., eds. Relevance to human cancer of N-nitroso compounds, tobacco smoke and mycotoxins . Lyon , IARC , 1991. p.48-53. (IARC Scientific Publications, 105).
- 14- BRASIL. Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos. Resolução nº 34/76. Fixa limites de tolerância para as aflatoxinas em alimentos. Diário Oficial da União, Brasília, 19 jan. 1977. Seção I, p.710.
- 15- BRESSAC, B.; KEW, M.; WANDS, J.; OZTURK, M. Selective G to T mutations of p53 gene in hepatocellular carcinoma from southern Africa. Nature, 350: 429-31, 1991.
- 16- BRUCE, R.D. Risk assessment for aflatoxin. II. Implications of human epidemiology data. Risk Anal., 10: 561-9, 1990.
- 17- BUSBY, W.F. & WOGAN, G.N. Aflatoxins. In: Searle, C.E., ed. Chemical carcinogens. 2nd ed. Washington, American Chemical Society, 1984. v.2, p.945-1136.
- 18- BUSS, P.; CAVIEZEL, M.; LUTZ, W.K. Linear dose-response relationship for DNA adducts in rat liver from chronic exposure to aflatoxin B₁. Carcinogenesis, 11: 2133-5, 1990.
- 19- BUTLER, W.H. & BARNES, J.M. Toxic effects of groundnut meal containing aflatoxin to rats and guinea pigs . Br. J. Cancer, 17: 699-710, 1963.

- 20- CAMPBELL, T.C.; CHEN, J.; LIU, C.; LI, J.; PARPIA, B .
Nonassociation of aflatoxin with primary liver cancer
in a cross-sectional ecological survey in the Peo-
ple's Republic of China. Cancer Res., 50: 6882- 93 ,
1990.
- 21- CANTON, J.H.; KROES, R.; VAN LOGTEN, M.J.; VAN SCHOTHORST,
M.; STAVENUITER, J.F.C.; VERHULSDONK, C.A.H. The car-
cinogenicity of aflatoxin M₁ in rainbow trout. Food
Cosmet. Toxicol., 13: 441-3, 1975.
- 22- CARLBORG, F.W. Cancer, mathematical models and aflatox-
in . Food Cosmet. Toxicol., 17: 159-66, 1979.
- 23- CASSAND, P.; LEVEQUE, F.; DECOUDU, S.; NARBONNE , J. F.
Relationship between vitamin A dietary intake and mu-
tagenic activity of some chemical carcinogens . Food
Addit. Contam., 7(Suppl.1): S58-9, 1990.
- 24- CHOY, W.N. A review of the dose-response induction of
DNA adducts by aflatoxin B₁ and its implications to
quantitative cancer-risk assessment. Mutat. Res., 296:
181-98, 1993.
- 25- CHU, F.S. Immunoassays for analysis of mycotoxins . J.
Food Protec., 47: 562-9, 1984.
- 26- CHU, F.S. Mycotoxins: food contamination, mechanism, car-
cinogenic potential and preventive measures. Mutat.
Res., 259: 291-306, 1991.
- 27- CHU, F.S.; LEE, R.C.; TRUCKSESS, M.W.; PARK, D.L. Eval-
uation by enzyme-linked immunosorbent assay of clean-
up for thin-layer chromatography of aflatoxin B₁ in
corn, peanuts and peanut butter. J. Assoc. Off. Anal.
Chem., 71: 953-6, 1988.
- 28- COULOMBE, R.A. Aflatoxins. In: Sharma, R.P. & Salunkhe,
D.K., eds. Mycotoxins and phytoalexins. Boca Raton ,
CRC Press, 1991. p.103-43.

- 29- COULTER, J.B.S. Aflatoxins in liver biopsy from Sudanese children. Am. J. Trop. Med. Hyg., 35: 365-7, 1986.
- 30- COVA, L.; WILD, C.P.; MEHROTRA, R.; TURUSOV, V.; SHIRAI, T.; LAMBERT, V.; JACQUET, C.; TOMATIS, L.; TRÉPO, C.; MONTESANO, R. Contribution of aflatoxin B₁ and hepatitis B virus infection in the induction of liver tumors in ducks. Cancer Res., 50: 2156-63, 1990.
- 31- CULLEN, J.M.; RUEBNER, B.H.; HSIEH, L.S.; HYDE, D. M. ; HSIEH, D.S.P. Carcinogenicity of dietary aflatoxin M₁ in male Fisher rats compared to aflatoxin B₁. Cancer Res., 47: 1913-7, 1987.
- 32- DELLA ROSA, H.V. Determinação de resíduos de aflatoxina M₁ em leite por fluordensitometria. São Paulo, 1979. [Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP].
- 33- DENNING, D.W.; ONWUBALILI, J.K.; WILKINSON, A.P.; MORGAN, M.R.A. Measurement of aflatoxin in Nigerian sera by enzyme-linked immunosorbent assay. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., 82: 169-71, 1988.
- 34- DE VRIES, H.R.; MAXWELL, S.M.; HENDRICKSE, R.G. Aflatoxin in excretion in children with kwashiorkor or marasmic kwashiorkor - a clinical investigation. Mycopathologia, 110: 1-9, 1990.
- 35- DOLL, R. An overview of the epidemiological evidence linking diet and cancer. Proc. Nutr. Soc., 49: 119 - 31, 1990.
- 36- DUX, J.P. Handbook of quality assurance for the analytical chemistry laboratory. New York , Van Nostrand Reinhold, 1986.
- 37- FALETTI, M.B. & GURTOO, H.L. The effect of inducers of mixed-function oxidases on hepatic microsome-mediated aflatoxin B₁ transformation in C3 H/10T 1/2 cells. Toxicol. Appl. Pharmacol., 98: 252-62, 1989.

- 38- FITZPATRICK, D.W. Mycotoxins in the food chain: nutritional and toxicological considerations. Can.J.Physiol. Pharmacol., 68: 979-81, 1990.
- 39- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. Manuals of food quality control: the food control laboratory. Rome, 1986. (FAO Food and Nutrition Paper, 14/1).
- 40- FORRESTER, L.M.; NEAL, G.E.; JUDAH, D.J.; GLANCEY, M.J.; WOLF, C.R. Evidence for involvement of multiple forms of cytochrome P-450 in aflatoxin B₁ metabolism in human liver. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87: 8306-10 , 1990.
- 41- FOSTER, P.L.; EISENSTADT, E.; MILLER, J.H. Base substitution mutations induced by metabolically activated AFB₁. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80: 2695-8, 1983.
- 42- FRÉMY, J.M. & CHU, F.S. Direct enzyme-linked immunosorbent assay for determining aflatoxin M₁ at picogram levels in dairy products. J. Assoc. Off. Anal. Chem., 67: 1098-101, 1984.
- 43- FRÉMY, J.M. & CHU, F.S. Immunochemical methods of analysis for aflatoxin M₁. In: Van Egmond, H.P., ed. Mycotoxins in dairy products. London , Elsevier Applied Science, 1989. p.97-125.
- 44- FUNDAÇÃO IBGE. Estudo Nacional de Despesa Familiar. Consumo alimentar - antropometria. Região II: São Paulo. Rio de Janeiro, 1977. v.1.
- 45- GARNER, R.C.; DVORACKOVA, I.; TURSI, F. Immunoassay procedures to detect exposure to aflatoxin B₁ and benzo(a)pyrene in animals and man at the DNA level. Int. Arch. Occup. Environ. Health, 60: 145-50, 1988.
- 46- GIFFORD, L.A.; WRIGHT, C.; GILBERT, J. Robotic analysis of aflatoxin M₁ in milk. Food Addit. Contam., 7:829-36, 1990.

- 47- GOLD, L.S.; SAWYER, C.B.; MAGAW, R.; BLACKMAN, G.M.; DE VECIANA, M.; LEVINSON, R.; HOOPER, N.K.; HAVENDER, W.R.; BERNSTEIN, L.; PETO, R.; PIKE, M.C.; AMES, B.N. A carcinogenic potency database of the standardized results of animal bioassays. Environ. Health Perspect., 58: 9-322, 1984.
- 48- GORELICK, N.J. Risk assessment for aflatoxin . I. Metabolism of aflatoxin B₁ by different species. Risk Anal., 10: 539-59, 1990.
- 49- GROOPMAN, J.D.; CAIN, L.G.; KENSLER, T.W. Aflatoxin exposure in human populations: measurements and relationship to cancer. CRC Crit. Rev. Toxicol., 19:113-45, 1988.
- 50- GROOPMAN, J.D.; HASLER, J.A.; TRUDEL, L.J.; PIKUL, A.; DONAHUE, P.R.; WOGAN, G.N. Molecular dosimetry in rat urine of aflatoxin-N⁷-guanine and other aflatoxin metabolites by multiple monoclonal antibody affinity chromatography and immunoaffinity / high performance liquid chromatography. Cancer Res., 52: 267-74, 1992.
- 51- GROOPMAN, J.D.; JIAQI, Z.; DONAHUE, P.R.; PIKUL, A.; LISHENG, Z.; JUN-SHI, C.; WOGAN, G.N. Molecular dosimetry of urinary aflatoxin-DNA adducts in people living in Guangxi Autonomous Region, People's Republic of China. Cancer Res., 52: 45-52, 1992.
- 52- HARDER, W.O. & CHU, F.S. Production and characterization of antibody against aflatoxin M₁. Experientia, 35: 1104-6, 1979.
- 53- HARRIS, C.C. Chemical and physical carcinogenesis: advances and perspectives for the 1990s. Cancer Res., 51(suppl.): 5023s-44s, 1991.
- 54- HARRIS, T.M.; STONE, M.P.; GOPALAKRISHNAN, S.; BAERTSCHI, S.W.; RANEY, K.D.; BYRD, S. Aflatoxin B₁ epoxide, the ultimate carcinogenic form of aflatoxin B₁: synthesis

- and reaction with DNA. J. Toxicol. Toxin Rev., 8:111-20, 1989.
- 55- HARRISON, J.C. & GARNER, R.C. Immunological and HPLC detection of aflatoxin adducts in human tissues after an acute poisoning incident in S.E. Asia. Carcinogenesis, 12: 741-3, 1991.
- 56- HARVEY, R.B.; PHILLIPS, T.D.; ELLIS, J.A.; KUBENA, L.F.; HUFF, W.E.; PETERSEN, H.D. Effects on aflatoxin M₁ residues in milk by addition of hydrated sodium calcium aluminosilicate to aflatoxin-contaminated diets of dairy cows. Am. J. Vet. Res., 52: 1556-9, 1991.
- 57- HAYES, J.D.; JUDAH, D.J.; MCLELLAN, L.I. ; NEAL , G. E. Contribution of the glutathione-S-transferases to the mechanisms of resistance to aflatoxin B₁. Pharmacol. Ther., 50: 443-72, 1991.
- 58- HENDRICKSE, R.G. Kwashiorkor: the hypothesis that incriminates aflatoxins. Pediatrics, 88: 376-9, 1991.
- 59- HORWITZ, W. Evaluation of analytical methods used for regulation of foods and drugs. Anal. Chem. , 54: 67A-76A, 1982.
- 60- HOSEYNI, M.S. Risk assessment for aflatoxin. III. modeling the relative risk of hepatocellular carcinoma. Risk Anal., 12: 123-8, 1992.
- 61- HOUSEHAM, K.C. & HUNDT, H.K.L. Aflatoxin exposure and its relationship to kwashiorkor in African children. J. Trop. Pediatr., 37: 300-2, 1991.
- 62- HSIEH, D.P.H. An assessment of liver cancer risk posed by aflatoxin M₁ in the Western world. In: Lacey, J., ed. Trichothecenes and other mycotoxins. New York , John Wiley & Sons, 1985. p.521-8.
- 63- HSIEH, D.P.H. & ATKINSON, D.N. Bisfuranoid mycotoxins : their genotoxicity and carcinogenicity . Adv. Exp. Med. Biol., 283: 525-32, 1991.

- 64- HSIEH, D.P.H.; BELTMAN, L.M.; FUKAYAMA, M.Y. ; PRICE , D.W.; WONG, J.J. Production and isolation of aflatox in M₁ for toxicological studies. J.Assoc.Off. Anal. Chem., 69: 510-2, 1986.
- 65- HSIEH, D.P.H.; CULLEN, J.M.; RUEBNER, B.H. Comparative hepatocarcinogenicity of aflatoxins B₁ and M₁ in the rat. Food Cosmet. Toxicol., 22: 1027-8, 1984.
- 66- HU, W.J.; WOYCHIK, N.; CHU.F.S. ELISA of picogram quantities of aflatoxin M₁ in urine and milk . J. Food Protec., 47: 126-7, 1984.
- 67- INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. Overall e- valuations of carcinogenicity: an updating of IARC monographs volumes 1 to 2. Lyon, World Health Organization , 1987. p.83-7. (IARC monographs on the eval uation of carcinogenic risks to humans, Supplement 7).
- 68- JELLIFFE, D.B. & JELLIFFE, E.F.P. Causation of kwashiorkor: toward a multifactorial consensus. Pediatrics , 90: 110-3, 1992.
- 69- JOHNSON, R. & BHATTACHARYYA, G. Statistics , principles and methods. New York, John Wiley and Sons, 1987.
- 70- KALDOR, J.M. & BOSCH, F.X. Multistage theory of carcinogenesis: the epidemiological evidence for liver cancer. Bull. Cancer, 77: 515-9, 1990.
- 71- KEEHN, D.M. & FRANK-STROMBORG, M. A worldwide perspective on the epidemiology and primary prevention of liver cancer. Cancer Nurs., 14: 163-74, 1991.
- 72- KIERMEIER, F.; REINHARDT, V.; BEHRINGER, G. Zum Vorkommen von Aflatoxinen in Rohmilch. Dtsch. Lebensm. Rdsch., 71: 35-8, 1975.
- 73- KOELTZOW, D.E. & TANNER, S.N. Comparative evaluation of commercially available aflatoxin test methods . J. Assoc. Off. Anal. Chem., 73: 584-9, 1990.

- 74- KON, S.K. La leche y los productos lacteos en la nutrición humana. 2ª ed. Roma, Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, 1972. (FAO: Estudios sobre Nutrición, 27).
- 75- KUIPER-GOODMAN, T. Uncertainties in the risk assessment of three mycotoxins: aflatoxin, ochratoxin, and zearalenone. Can. J. Physiol. Pharmacol., 68: 1017-24, 1990.
- 76- KUIPER-GOODMAN, T. Risk assessment to humans of mycotoxins in animal-derived food products. Vet.Hum.Toxicol., 33: 325-33, 1991.
- 77- LAFONT, P.; LAFONT, J.; MOUSSET, S.; FRAYSSINET, C. Étude de la contamination du lait de vache lors de l'ingestion de faibles quantités d'aflatoxine. Ann. Nutr. Alim., 34: 699-708, 1980.
- 78- LAPA, M.A.G.; ZUCAS, S.M.; BION, F.M.; BARROS, S.R.A.; LAGO, E.S.; VARELA, R.M. Influência de aflatoxina B₁ sobre o crescimento de ratos submetidos a diferentes condições nutricionais. Arch. Latinoamer. Nutr., 38: 323-9, 1988.
- 79- LEDERER, J. Alimentação e câncer. 3ª ed. São Paulo, Manole Dois, 1990.
- 80- LINSELL, C.A. & PEERS, F.G. Aflatoxin and liver cell cancer. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., 71: 471-3, 1977.
- 81- LUTZ, W.K. In vivo covalent binding of organic chemicals to DNA as a quantitative indicator in the process of chemical carcinogenesis. Mutat. Res., 65: 289 - 356, 1979.
- 82- MARTINS, J.L.S. Aflatoxina e inibidores bacterianos no leite tipo "B" comercializado em São Paulo. Levantamento das quatro marcas de maior consumo. São Paulo, 1984. [Tese de Doutorado - Faculdade de Saúde Pú-

blica da USP].

- 83- MARTLBAUER, E.; DIETRICH, R.; TERPLAN, G. Erfahrungen bei der Anwendung von Immunoassay zum Nachweis von Mykotoxinen in Lebensmitteln. Arch. Lebensm. Hyg., 42: 3-6, 1991.
- 84- NELSON, D.B.; KIMBROUEH, R.; LANDRIGAN, P.S.; HAYES, A.W.; YANG, G.C.; BENANIDES, J. Aflatoxin and Reye's syndrome: a case control study. Pediatrics, 66: 865-9, 1980.
- 85- NEWELL, G.R. General mechanisms of carcinogenesis. In : Newell, G.R. & Ellinson, N.M., eds. Nutrition and cancer: etiology and treatment. New York, Raven Press, 1981. p.49-58.
- 86- OKOYE, Z.S.C.; RILEY, J.; JUDAH, D.J.; NEAL, G.E. The in vivo site formation of a carcinogen-serum albumin adduct. Biochem. Pharmacol., 40: 2560-2, 1990.
- 87- OLUBUYIDE, I.O. The natural history of primary liver cell carcinoma: a study of 89 untreated adult Nigerians. Cent. Afr. J. Med., 38: 25-30, 1992.
- 88- ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD. Micotoxinas. Washington, 1983. (Críterios de Salud Ambiental, 11).
- 89- OSWEILER, G.D. Mycotoxins and livestock: what role do fungal toxins play in illness and production losses? Vet. Med., 85: 89-94, 1990.
- 90- OZTURK, M. p53 mutation in hepatocellular carcinoma after aflatoxin exposure. Lancet, 338: 1356-9, 1991.
- 91- PARK, D.L.; MILLER, B.M.; HART, L.P.; YANG, G.; MCVEY, J.; PAGE, S.W.; PESTKA, J.; BROWN, L.H. Enzyme-linked immunosorbent assay for screening aflatoxin B₁ in cottonseed products and mixed feed: collaborative study. J. Assoc. Off. Anal. Chem., 72: 326-32, 1989.
- 92- PARK, D.L.; MILLER, B.M.; TRUCKSESS, M.W.; NESHEIM, S.;

- VEKICH, A.; BIDIGARE, B.; MCVEY, J.L.; BROWN, L. H. Visual and semiquantitative spectrophotometric ELISA screening method for aflatoxin B₁ in corn and peanut products: follow-up collaborative study . J. Assoc. Off. Anal. Chem., 72: 638-43, 1989.
- 93- PARK, D.L. & POHLAND, A.E. A rationale for the control of aflatoxin in animal feeds . In : Steyn, P. S. & Vleggaar, R. , eds. Mycotoxins and phycotoxins . Amsterdam, Elsevier Applied Science, 1986. p.473-82.
- 94- PARK, D.L. & RUA, S.M. Biological evaluation of aflatoxins and metabolites in animal tissues . Drug Metab. Rev., 22: 871-90, 1990.
- 95- PARKIN, D.M.; STJERNWARD, J.; MUIR, C.S. Estimates of the worldwide frequency of twelve major cancers. Bull. World Health Organ., 62: 163-82, 1984.
- 96- PARREIRAS, J.F.M.; GOMES, J.C.; BRANDÃO, S.C.C. Ocorrência de aflatoxinas M₁ e B₁ em leite e forragens na microrregião de Viçosa/MG. Arq. Biol. Tecnol. , 30: 253-65, 1987.
- 97- PATTERSON, D.S.P.; GLANCY, E.M.; ROBERTS, B.A. The carry-over of aflatoxin M₁ into milk of cows fed rations containing a low concentration of aflatoxin B₁. Food Cosmet. Toxicol., 18: 35-7, 1980.
- 98- PEERS, F.G. ; BOSCH, F.X. ; KALDOR, J. ; LINSELL, A. ; PLUIJMEN, M. Aflatoxin exposure, hepatitis B virus infection and liver cancer in Swaziland. Int.J.Cancer, 39: 545-53, 1987.
- 99- PESTKA, J.J. High performance thin layer chromatography ELISAGRAM. Application of a multi-hapten immunoassay to analysis of the zearalenone and aflatoxin mycotoxins in families. J. Immunol. Methods, 136: 177-83, 1991.
- 100- PESTKA, J.J. & BONDY, G.S. Alteration of immune function

- following dietary mycotoxin exposure. Can.J.Physiol. Pharmacol., 68: 1009-16, 1990.
- 101- PESTKA, J.J.; LI, Y.; HARDER, W.O.; CHU, F.S. Comparison of radioimmunoassay and enzyme-linked immunosorbent assay for determining aflatoxin M₁ in milk. J. Assoc. Off. Anal. Chem., 64: 294-301, 1981.
- 102- PONG, R.S. & WOGAN, G.N. Toxicity and biochemical and fine structural effects of synthetic aflatoxin M₁ and B₁ in rat liver. J. Natl. Cancer Inst., 47: 585-90, 1971.
- 103- PUISIEUX, A.; LIM, S.; GROOPMAN, J.; OZTURK, M. Selective targeting of p53 gene mutational hotspots in human cancers by etiologically defined carcinogens. Cancer Res., 51: 6185-9, 1991.
- 104- PURCHIO, A.; GAMBALE, W.; PAULA, C.R.; BARBIERI, W.; SABINO, M.; MEIRELLES, M.C.A.; IIDA, S. Micotoxinas (aflatoxinas, patulina, ochratoxina A e esterigmatocistina) e correspondentes fungos micotoxigênicos em rações destinadas ao gado leiteiro. Rev. Microbiol., S.Paulo, 19: 172-6, 1988.
- 105- RAMSDELL, H.S. & EATON, D.L. Species susceptibility to aflatoxin B₁ carcinogenesis: comparative kinetics of microsomal biotransformation. Cancer Res., 50: 615 - 20, 1990.
- 106- REED, J.D & KASALI, O.B. Hazards to livestock of consuming aflatoxin - contaminated groundnut meal in Africa. In: International Workshop on Aflatoxin Contamination of Groundnut, Patancheru, India, 1987. Summary and recommendations. Patancheru, India, International Crops Research Institute for the Semi-arid Tropics (ICRISAT), 1988. p.7.
- 107- RICCIARDI, A.J. & FERREIRA, J.F. Dosagem de aflatoxina B₁ em amendoim e doces de amendoim. Rev. Bras. Farm.,

67: 111-7, 1986.

- 108- ROSS, R.K.; YUAN, J.M.; YU, M.C.; WOGAN, G.N.; QUIAN, G.S.; TU, J.T.; GROOPMAN, J.D.; GAO, Y.T.; HENDERSON, B.E. Urinary aflatoxin biomarkers and risk of hepatocellular carcinoma. Lancet, 339:943-6, 1992.
- 109- SABINO, M. Inquérito sobre aflatoxina "M" no leite de vaca comercializado no Estado de São Paulo. Padronização de método analítico por HPLC. São Paulo, 1983. [Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP].
- 110- SABINO, M. Aflatoxinas B₁, M₁ e aflatoxicol: extração, caracterização em tecidos e urina. São Paulo, 1990. [Tese de Doutorado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP].
- 111- SABINO, M. & CORRÊA, M.J.S. Aflatoxina B₁ em feijão. Rev. Inst. Adolfo Lutz, 41: 83-7, 1981.
- 112- SABINO, M.; LAMARDO, L.C.A.; INOMATA, E.I.; ICHIKAWA, A.H.; GIANNATTASIO, C.M.P. Ocorrência de aflatoxina B₁ em produtos alimentícios e rações animais, consumidos no Estado de São Paulo e em várias regiões do Brasil, no período de 1980 a 1987. Rev. Inst. Adolfo Lutz, 48: 81-5, 1988.
- 113- SABINO, M.; PRADO, G.; COLEN, G. Ocorrência de aflatoxinas, ocratoxina A e zearalenona em milho de Minas Gerais. Parte 1. Rev. Inst. Adolfo Lutz, 46: 65 - 71, 1986.
- 114- SABINO, M.; PRADO, G.; INOMATA, E.I.; PEDROSO, M.O.; GARCIA, R.V. Natural occurrence of aflatoxins in maize in Brasil. Part II. Food Addit. Contam., 6: 327-31, 1989.
- 115- SABINO, M.; ZORZETTO, M.A.; PEDROSO, M.O.; MILANEZ, T.V. Incidência de aflatoxinas em amendoim e produtos derivados consumidos na cidade de São Paulo, no período

- de 1980 a 1987. Rev. Inst. Adolfo Lutz, 49: 41 - 4 , 1989.
- 116- SAUBOIS, A.; NEPOTE, M.C.; BASILICO, J.C. Micotoxicosis de origen alimentario en ganado vacuno. Rev. Argent. Micologia, 12: 9-11, 1989.
- 117- SCHLEMPER, B.; HARRISON, J.; GARNER, R.C. ; OESCH, F. ; STEINBERG, P. DNA binding , adduct characterization and metabolic activation of aflatoxin B₁ catalysed by isolated rat liver parenchymal, Kupffer and endothelial cell. Arch. Toxicol., 65: 633-9, 1991.
- 118- SCOTT, P.M. Methods for determination of aflatoxin M₁ in milk and milk products - a review of performance characteristics. Food Addit. Contam., 6: 283-305, 1989.
- 119- SCOTT, P.M. Natural poisons. In: Helrich, K., ed. Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 15th ed. Arlington, Association of Official Analytical Chemists (AOAC), 1990. v.2, p.1184-213.
- 120- SELL, S.; HUNT, J.M.; DUNSFORD, H.A. ; CHISARI , F. V. Synergy between hepatitis B virus expression and chemical hepatocarcinogens in transgenic mice . Cancer Res., 51: 1278-85, 1991.
- 121- SHANK, R.C.; GORDON, J.E.; WOGAN, G.N. Dietary aflatoxins and human liver cancer. III. Field survey of rural Thai families for ingested aflatoxins . Food Cosmet. Toxicol., 10: 71-84, 1972.
- 122- SIEBER, R. & BLANC, B. Zur Ausscheidung von Aflatoxin M₁ in die Milch und dessen Vorkommen in Milch und Milchprodukten - eine Literaturübersicht. Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg., 69: 477-91, 1978.
- 123- SINNHUBER, R.O.; LEE, D.J.; WALES, J.H.; LANDERS, M.K.; KEYL, A.C. Hepatic carcinogenesis of aflatoxin M₁ in rainbow trout (Salmo gairdneri). J. Natl. Cancer Inst.,

- 53: 1285-8, 1974.
- 124- SKIPPER, P.L. & TANNENBAUM, S.R. Protein adducts in the molecular dosimetry of chemical carcinogens . Carcinogenesis, 11: 507-18, 1990.
- 125- SOUNIS, E. Bioestatística. 3ª ed. Rio de Janeiro, Atheneu, 1985.
- 126- STARH, H.M.; PFEIFFER, R.L.; MACE, B. Evaluation of a commercial immunoassay system for sulfamethazine and aflatoxin detection in biological fluids and feeds . Vet. Hum. Toxicol., 33: 509-11, 1991.
- 127- STOLOFF, L. Carcinogenicity of aflatoxins. Science, 237: 1283-4, 1987.
- 128- STOLOFF, L.; VAN EGMOND, H.P.; PARK, D.L. Rationales for the establishment of limits and regulations for mycotoxins. Food Addit. Contam., 8: 213-22, 1991.
- 129- STUBBLEFIELD, R.D.; PIER, A.C.; RICHARD, J.L.; SHOTWELL, O.L. Fate of aflatoxins in tissues, fluids and excrements from cows dosed with aflatoxin B₁ . Am. J. Vet. Res., 44: 1750-2, 1983.
- 130- STUBBLEFIELD, R.D. & VAN EGMOND, H. P. Chromatographic methods of analysis for aflatoxin M₁. In: Van Egmond, H.P., ed. Mycotoxins in dairy products . London , Elsevier Applied Science, 1989. p. 57-95.
- 131- SUGIMURA, T.; KAWACHI, T.; NAGAO, M.; YAHAGI, T. Mu - tagens in food as causes of cancer. In: Newell, G.R. & Ellinson, N.M., eds. Nutrition and cancer: etiology and treatment. New York, Raven Press, 1981. p.59-71.
- 132- SWINDALE, L.D. A general overview of the problem of aflatoxin contamination of groundnut. In: International Workshop on Aflatoxin Contamination of Groundnut, Patancheru, India, 1987. Summary and recomendations. International Crops Research Institute for the Semi-arid Tropics (ICRISAT), 1988. p. 1-5.

- 133- TROPICAL DEVELOPMENT AND RESEARCH INSTITUTE . Mycotoxin training manual. London, TDRI, 1984.
- 134- TRUCKSESS, M.W.; STACK, M.E.; NESHEIM, S.; PARK, D.L. ; POHLAND, A.E. Enzyme-linked immunosorbent assay of aflatoxins B₁, B₂ and G₁ in corn, cottonseed, peanut butter and poultry feed: collaborative study. J.Assoc. Off. Anal. Chem., 72: 957-62, 1989.
- 135- TUINSTRA, L.G.M.T.; KIENHUIS, P.G.M.; DOLS,P. Automated liquid chromatographic determination of aflatoxin M₁ in milk using on-line dialysis for sample preparation. J. Assoc. Off. Anal. Chem., 73: 969-73, 1990.
- 136- VAN EGMOND, H.P. Aflatoxin M₁: occurrence, toxicity, regulation. In: Van Egmond, H.P., ed. Mycotoxins in dairy products. London, Elsevier Applied Science, 1989. p.11-55.
- 137- VAN RENSBURG, S.J.; COOK-MOZAFFARI, P.; VAN SCHALKWIK , D.J.; VAN DER WATT, J.J.; VINCENT, T.J. ; PURCHASE , I.F. Hepatocellular carcinoma and dietary aflatoxin in Mozambique and Transkei. Br. J. Cancer, 51: 713 - 26, 1985.
- 138- VAN RENSBURG, S.J.; VAN SCHALKWIK, G.C.; VAN SCHALKWIK, D.J. Primary liver cancer and aflatoxin intake in Transkei. J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol. , 10: 11-6, 1990.
- 139- WAKHISI, J. Exposure of rat offsprings to aflatoxin risks through suckling mothers dosed with aflatoxin B₁. J. Toxicol. Toxin Rev., 8: 275-80, 1989.
- 140- WARD, C.M. & MORGAN, M.R.A. Reproducibility of a commercially available kit utilizing enzyme-linked immunosorbent assay for determination of aflatoxin in peanut butter. Food Addit. Contam., 8: 9-15, 1991.
- 141- WILD, C.P.; JIANG, Y.-Z.; ALLEN, S.J.; JANSSEN, L.A.M. ; HALL, A.J.; MONTESANO, R. Aflatoxin-albumin adducts

- in sera from different regions of the world. Carcinogenesis, 11: 2271-4, 1990.
- 142- WILD, C.P. & MONTESANO, R. Correspondence re : T. Colin Campbell et al., Nonassociation of aflatoxin with primary liver cancer in a cross-sectional ecological survey in the People's Republic of China. Cancer Res., 50: 6882-6893, 1990. Cancer Res., 51: 3825-7, 1991.
- 143- WISEMAN, D.W.; APPLEBAUM, R.S.; BRACKETT, R.E.; MARTH, E.H. Distribution and resistance to pasteurization of aflatoxin M₁ in naturally contaminated whole milk, cream and skim milk. J. Food Protec., 46:530-2, 1983.
- 144- WISEMAN, D.W. & MARTH, E.H. Behavior of aflatoxin M₁ in yogurt, buttermilk and kefir. J. Food Protec., 46: 115-8, 1983.
- 145- WISEMAN, D.W. & MARTH, E.H. Stability of aflatoxin M₁ during manufacture and storage of a butter-like spread, nonfat dried milk and dried buttermilk. J. Food Protec., 46: 633-6, 1983.
- 146- WISEMAN, D.W. & MARTH, E.H. Behavior of aflatoxin during manufacture and storage of Queso Blanco and baker's cheese. J. Food Protec., 46: 910-3, 1983.
- 147- WOGAN, G.N. Aflatoxins as risk factors for hepatocellular carcinoma in humans. Cancer Res., 52(Suppl.): 2114S-8S, 1992.
- 148- WOGAN, G.N. Aflatoxin carcinogenesis: interspecies potency differences and relevance for human risk assessment. Prog. Clin. Biol. Res., 374: 123-37, 1992.
- 149- WOGAN, G.N. & PAGLIALUNGA, S. Carcinogenicity of synthetic aflatoxin M₁ in rats. Food Cosmet. Toxicol., 12: 381-4, 1974.
- 150- WOGAN, G.N.; PAGLIALUNGA, S.; NEWBERNE, P.M. Carcinogenic effects of low dietary levels of aflatoxin B₁

- in rats. Food Cosmet. Toxicol., 12: 681-5, 1974.
- 151- WONG, J.J. & HSIEH, D.P.H. Mutagenicity of aflatoxins related to their metabolism and carcinogenic potential. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 73: 2241-4, 1976.
- 152- WOOD, G.E. Aflatoxin M₁. In: Sharma, R.P. & Salunkhe, D.K., eds. Mycotoxins and phytoalexins. Boca Raton, CRC Press, 1991. p.145-64.
- 153- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Guidelines on studies in environmental epidemiology. Geneva, 1983. (Environmental Health Criteria, 27).
- 154- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Principles for evaluating health risks from chemicals during infancy and early childhood: the need for a special approach. Geneva, 1986. (Environmental Health Criteria, 59).
- 155- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Principles for the safety assessment of food additives and contaminants in food. Geneva, 1987. (Environmental Health Criteria, 70).
- 156- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Evaluation of certain food additives and contaminants. Geneva, 1987. (WHO Technical Report Series, 759).
- 157- WU-WILLIAMS, A.H.; ZEISE, L.; THOMAS, D. Risk assessment for aflatoxin B₁: a modeling approach. Risk Anal., 12: 559-67, 1992.
- 158- YEH, F.S.; MO, C.C.; YEN, R.C. Risk factors for hepatocellular carcinoma in Guangxi, People's Republic of China. Natl. Cancer Inst. Monogr., 69: 47-8, 1985.
- 159- YEH, F.S.; YU, M.C.; MO, C.C.; CHI-CHUN; LUO, S.; TONG, M.J.; HENDERSON, B.E. Hepatitis B virus, aflatoxins, and hepatocellular carcinoma in Southern Guangxi, China. Cancer Res., 49: 2506-9, 1989.
- 160- YOUSEF, A.E. & MARTH, E.H. Stability and degradation of aflatoxin M₁. In: Van Egmond, H.P., ed. Mycotoxins

in dairy products. London, Elsevier Applied Science, 1989. p.127-61.

- 161- 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 monoclonal antibody immunoaffinity chromatography and HPLC. Carcinogenesis, 13: 891-4, 1992.