

JOSUÉ FONTES ROSMANINHO

**DETERMINAÇÃO DE AFLATOXINA M₁ E ÁCIDO CICLOPIAZÔNICO
EM LEITES DE CONSUMO COMERCIALIZADOS
NO MUNICÍPIO DE SÃO PAULO-SP, BRASIL**

Dissertação de Mestrado 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. JOSÉ CEZAR PANETTA**

**SÃO PAULO
Fevereiro, 2004**



**À Daniela e Gabriel,
esposa e filho.
E aos meus pais e
irmãos.**

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. José Cezar Panetta, pela orientação, apoio e amizade.

Ao Prof. Dr. Carlos Augusto F. de Oliveira, da Faculdade de Engenharia de Alimentos da USP/ Pirassununga, pela co-orientação, apoio e amizade, imprescindíveis para a realização desse trabalho.

Ao Prof. Dr. Benedito Correa, do Departamento de Microbiologia do ICB da USP, pelo apoio e amizade, além da inestimável colaboração na utilização dos equipamentos necessários às análises.

A todos os amigos do Laboratório de Microbiologia e Micotoxicologia de Alimentos (LMMA), principalmente a Royce, Otaviano, Paulinha e Rony, pela grande colaboração e paciência.

A Tatiane do Reis pelo auxílio, apoio e amizade demonstrada durante as análises no Departamento de Microbiologia do ICB da USP.

A todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização desse trabalho.

RESUMO

Determinação de aflatoxina M₁ e ácido ciclopiazônico em leites de consumo comercializados no Município de São Paulo-SP, Brasil

A co-ocorrência de aflatoxina M₁ (AFM₁) e ácido ciclopiazônico (CPA) foi pesquisada em 40 amostras de leite de consumo comercializados no município de São Paulo e, complementarmente, foi estimado o grau de exposição da população, através do cálculo da ingestão diária das toxinas, a partir dos resultados das amostras positivas e do consumo médio dos diversos tipos de leite. Para isto, foram utilizadas amostras de tipos de leites A, B, C e Longa Vida, pertencentes a 2 marcas diferentes, encontradas em lojas de hipermercados e padarias do Município de São Paulo. A unidade amostral foi constituída por 1 embalagem original fechada de 1 L, sendo que cada amostra foi proveniente de um lote de fabricação. A colheita das amostras foi realizada no período de janeiro a maio de 2002. A determinação da AFM₁ foi efetuada através da técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), usando coluna de imunoafinidade como técnica de purificação. A pesquisa do CPA foi realizada através do método de extração com solventes polares, purificação por passagem em coluna de sílica gel e quantificação por cromatografia em camada delgada (CCD). Os métodos utilizados nas pesquisas de AFM₁ e CPA foram avaliados através da execução de análises repetidas, em amostras de leite experimentalmente contaminadas, com ambas toxinas. Os resultados revelaram 23 amostras (57,5%) positivas para AFM₁, em níveis que variaram de 10,6 a 121,2 ng/L de leite. Os níveis médios de AFM₁ nos leites tipos A, B, C e Longa Vida foram de 5,9; 26,6; 19,8 e 22,2 ng/L, respectivamente. Não foi observada amostra positiva para CPA, tendo como limite de quantificação 3 µg de CPA/L de leite. Adotando-se o consumo diário de leite de 720 ml, para crianças de 4 meses de idade e utilizando o peso médio de 7 Kg, estimou-se a ingestão diária média de AFM₁ de 0,18; 1,64; 1,22 e 1,82 ng de AFM₁/ Kg de peso corpóreo/ dia, para os leites tipos A, B, C e Longa Vida, respectivamente. Discute-se a importância destes dados para a Saúde Pública e o estabelecimento de limites de tolerância para a AFM₁ em leite e derivados.

SUMMARY

Determination of aflatoxin M₁ and cyclopiazonic acid in fluid milk commercialized in São Paulo-SP, Brazil

The co-occurrence of aflatoxin M₁ (AFM₁) and cyclopiazonic acid (CPA) was surveyed in 40 samples of fluid milk commercialized in São Paulo and complementary was estimated the level of population exposition, by using estimated of daily intake of toxins from analytical results of positives samples and by mean consumption of varied types of milk. To this end, were collected samples of pasteurized milk types A, B, C and ultra-high temperature, from two different brands, in markets and bakeries in São Paulo. Each milk sample was constituted by one original pack of 1 L, representative of one production batch. Samples were collected during January to May 2002. The AFM₁ analysis were done by high performance liquid chromatography (HPLC), using immunoaffinity columns to purification. The CPA analysis were done by extraction with polar solvents, followed by clean-up in a silica gel column and quantitative determination by thin layer chromatography (TLC). The analytical methods used to determine AFM₁ e CPA were evaluated experimentally through repeated analysis of milk samples spiked with both toxins. Results showed 23 (57,5%) positive samples for AFM₁ at levels of 10,6 - 121,2 ng/L of milk. The mean levels of AFM₁ in milk type A, B, C and ultra-high temperature were 5,9; 26,6; 19,8 e 22,2 ng/L, respectively. CPA was not detected in milk samples; the detection limit was 3 µg CPA/L of milk. By using data on milk consumption of 720 ml for children aging 4 months and using mean weight of 7 Kg, was estimated the mean daily intake of 0,18; 1,64; 1,22 e 1,82 ng of AFM₁/Kg body weight/ day, for milk types A, B, C and ultra-high temperature, respectively. Are discussed the implications of these data on Public Health and the approaches for the establishment of regulations for AFM₁ in milk and milk products.

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS.....	vi
LISTA DE GRÁFICOS.....	vi
LISTA DE TABELAS.....	vii
1 – INTRODUÇÃO.....	01
1.1 – Micotoxinas.....	01
1.2 – Aflatoxinas.....	01
1.2.1 – Ocorrência de aflatoxinas em produtos alimentícios e rações animais.....	04
1.3 – Aflatoxina M ₁	07
1.3.1 – Toxicidade das aflatoxinas.....	10
1.3.2 – Ocorrência de aflatoxina M ₁ em leite e derivados.....	13
1.4 – Ácido Ciclopiazônico (CPA).....	18
1.4.1- Ocorrência do CPA em produtos alimentícios e rações animais....	19
1.4.2 – Ocorrência do CPA em produtos de origem animal.....	21
1.4.3 - Toxicidade do CPA.....	22
1.4.4 – Toxicidade conjunta do CPA e das aflatoxinas.....	24
1.5 – Estimativa da ingestão diária média (IDM) de micotoxinas e sua importância.....	25
2 – OBJETIVOS.....	28
3 – MATERIAL E MÉTODOS.....	29
3.1 - Avaliação do desempenho dos métodos em condições experimentais...29	

3.1.1 – Determinação das concentrações dos padrões de AFM ₁ e do CPA.....	29
3.1.2 – Ensaio de recuperação da AFM ₁ em amostras de leite.....	32
3.1.3 – Ensaio de recuperação do CPA em amostras de leite.....	32
3.2 – Análises laboratoriais.....	33
3.2.1 – Determinação de AFM ₁ em leite.....	33
3.2.2 - Determinação de CPA em leite.....	37
3.3 – Amostras.....	42
3.4 – Estimativa da ingestão diária média (IDM) das micotoxinas.....	43
3.5 – Procedimentos estatísticos.....	43
4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	44
4.1 - Avaliação do desempenho dos métodos em condições experimentais...44	
4.1.1 – Resultados dos ensaios de recuperação da AFM ₁ em amostras de leite.....	44
4.1.2 – Resultados dos ensaios de recuperação do CPA em amostras de leite.....	48
4.2 – Resultados das análises nas amostras em leite de consumo.....	51
4.3 – Estimativa da ingestão diária média.....	56
5- CONCLUSÕES.....	59
6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	60

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estruturas químicas das principais aflatoxinas.....	03
Figura 2: Biotransformação da aflatoxina M ₁	09
Figura 3: Estrutura química do ácido ciclopiazônico.....	18
Figura 4: Cromatograma em CLAE do pico do padrão de AFM ₁ (5 ng/ ml).....	48

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Gráfico da curva de calibração dos padrões de AFM ₁ contendo 0,5; 1,0 e 2,0; 5,0 e 10,0 ng AFM ₁ /ml, em aparelho CLAE.....	47
---	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Níveis de aflatoxinas detectados em amostras de rações animais e matérias-prima comercializadas no Brasil.....	06
Tabela 2. Resultados das recuperações médias e coeficientes de variação obtidos em leite não contaminado e contaminado experimentalmente com 50 e 500 ng/L de AFM ₁	45
Tabela 3. Resultados das recuperações médias e coeficientes de variação obtidos em leite não contaminado e contaminado experimentalmente com 5 e 20 ng/L de CPA.....	50
Tabela 4. Incidência de aflatoxina M ₁ em leite de consumo tipos A, B, C e Longa Vida, comercializados no Município de São Paulo-SP, durante o período de janeiro a maio de 2002.....	51
Tabela 5. Valores de estatística “Z” e sua significância ao teste das médias referentes às concentrações de AFM ₁ , obtidas nas amostras dos tipos de leite A, B, C e Longa Vida, comercializados no município de São Paulo, no período de janeiro a maio de 2002.....	54
Tabela 6. Estimativa da ingestão diária média (IDM) de AFM ₁ , através dos leites tipos A, B, C e Longa Vida, colhidos no Município de São Paulo, entre os meses de janeiro a maio de 2002, adotando-se para tal, parâmetros de crianças do sexo masculino de 4 meses de idade.....	58

1 – INTRODUÇÃO:

1.1 – Micotoxinas:

As micotoxinas constituem um grupo de metabólitos secundários tóxicos produzidos por linhagens fúngicas que crescem, sob condições favoráveis, em uma grande variedade de substratos, principalmente grãos. A exposição às toxinas ocorre, predominantemente, através da ingestão de alimentos contaminados, sendo capazes de originar uma ampla variedade de efeitos tóxicos em animais vertebrados, incluindo o homem (FITZPATRICK 1990). Os produtos de biotransformação destes compostos pelo organismo humano e animal também são denominados micotoxinas (APPLEBAUM *et al.* 1982).

As micotoxicoses, síndromes tóxicas causadas pela ingestão de alimentos contaminados com micotoxinas, têm ocorrido desde a antiguidade. Porém, somente em 1711, associaram o ergotismo, doença caracterizada por necrose e gangrena dos membros, ao crescimento do fungo *Claviceps purpurea*. Em 1875, foram identificados seus componentes tóxicos (WILSON 1978).

O conhecimento científico sobre as micotoxinas e seus efeitos deletérios aumentou, consideravelmente, a partir da descoberta das aflatoxinas (LEESON *et al.* 1995).

1.2 – Aflatoxinas:

As aflatoxinas pertencem ao grupo de metabólitos secundários derivados do bis-furano-isocumarina, produzidas por fungos do gênero *Aspergillus*, espécies *A. flavus* e *A. parasiticus*, descobertas em 1960, após provocarem um surto tóxico em perus na Inglaterra, conhecido como “*Turkey – X – disease*”. Neste surto, milhares

de aves morreram, após consumirem torta de amendoim, proveniente do Brasil (LEESON *et al.* 1995).

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 M₂ (RUSTOM 1997).

As aflatoxinas B (do inglês “blue”) e G (do inglês “green”) receberam essa denominação devido às fluorescências azul e verde, respectivamente, que emitem quando expostas à luz ultravioleta, sendo essa fluorescência a base dos métodos cromatográficos para análise de aflatoxinas (COULOMBE 1991). As aflatoxinas M₁ e M₂ (do inglês “milk”) também apresentam propriedades fluorescentes, sendo encontradas principalmente no leite de vacas alimentadas com ração contaminada com aflatoxinas B₁ e B₂, respectivamente (PATTERSON *et al.* 1980).

Alguns pesquisadores têm detectado a presença da AFM₄, isômero da AFM₁, em leite de vacas alimentadas com rações contendo AFB₁. Experimentos indicam que a AFM₄ é mais mutagênica que a AFB₁ e AFM₁ e que a potência carcinogênica em trutas arco-íris foi similar a observada com a AFB₁ e maior que a da AFM₁ (LAFONT & LAFONT 1987).

As aflatoxinas são compostos altamente termoestáveis e de difícil detoxificação em alimentos e ração animal, porém, relativamente instáveis quando expostas à luz, principalmente à radiação ultravioleta, à solução fortemente alcalina e aos raios gama (RUSTOM 1997).

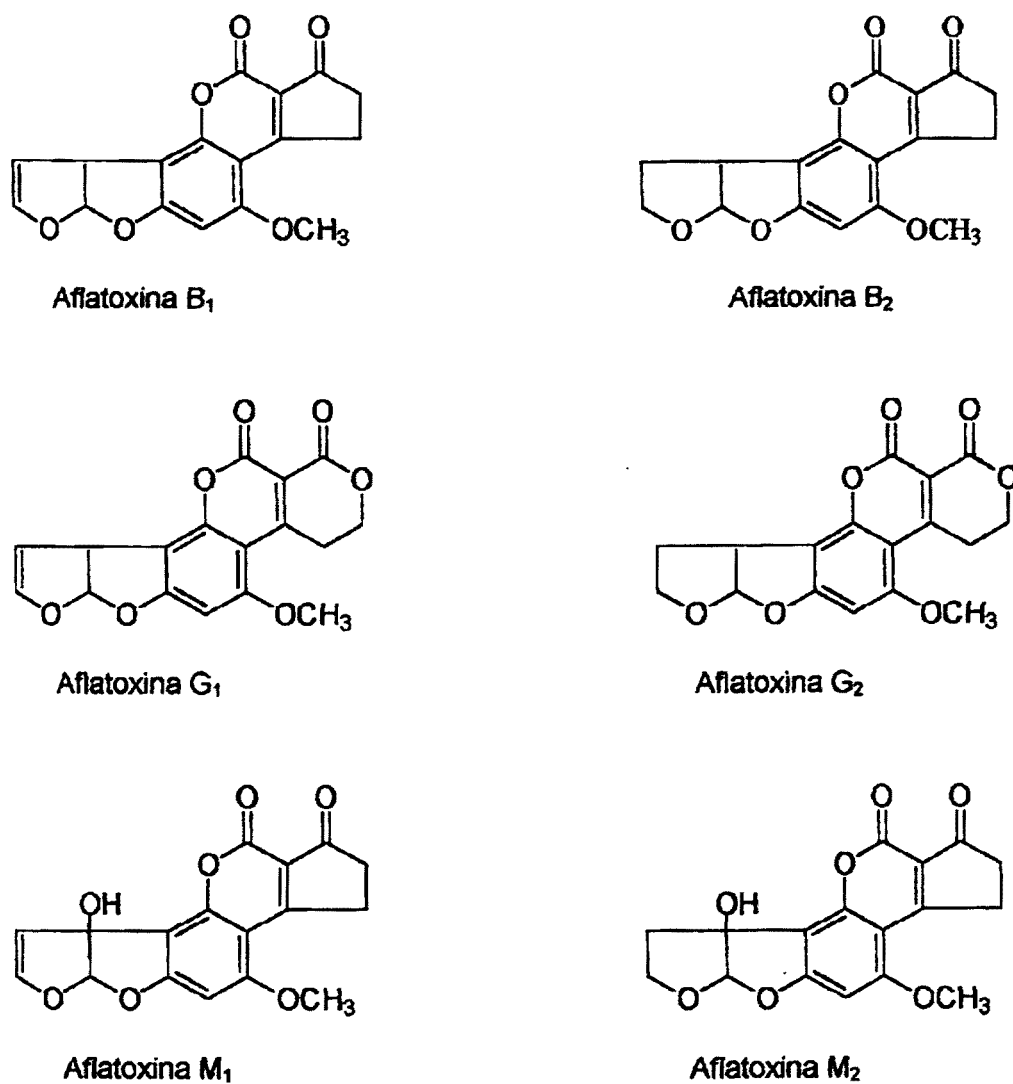


Figura 1 - Estruturas químicas das principais aflatoxinas

A **Figura 1** apresenta as estruturas químicas das principais aflatoxinas que contaminam os alimentos. Observa-se que todas apresentam um núcleo central cumarínico ligado a uma estrutura bifuranóide. As aflatoxinas B e M apresentam anel ciclopentanona na molécula, enquanto que as da série G possuem anel lactona. As aflatoxinas B₂ e G₂ são dihidroderivados de B₁ e G₁, respectivamente (COULOMBE 1991).

A estrutura química das aflatoxinas é muito semelhante, no entanto, apresentam diferentes graus de atividade biológica, sendo a aflatoxina B₁ (AFB₁) a que apresenta a maior capacidade toxigênica, seguida pelas aflatoxinas G₁, B₂ e G₂ (RUSTOM 1997).

As aflatoxinas são poderosos agentes hepatotóxicos, carcinogênicos e mutagênicos, sendo o fígado o principal órgão atingido. De modo análogo, em Saúde Pública, as aflatoxinas são identificadas como fatores envolvidos na etilologia do câncer hepático no homem, conseqüente à ingestão de alimentos contaminados (McLEAN & DUTTON 1995).

Para muitas espécies, os machos são mais susceptíveis do que as fêmeas, ao passo que, em geral, a sensibilidade é acentuadamente maior nos jovens do que nos adultos (CHU 1991).

1.2.1 – Ocorrência de aflatoxinas em produtos alimentícios e rações animais:

A ocorrência de fungos do gênero *Aspergillus*, bem como de suas toxinas em alimentos e rações animais, apresentam distribuição mundial, com predomínio nas regiões de clima tropical e subtropical. A contaminação dos produtos vegetais ocorre

através do contato com os esporos do fungo, presentes no ambiente, sobretudo no solo, principalmente durante os procedimentos de colheita e secagem (SABINO *et al.* 1988).

A utilização de práticas agrícolas incorretas, que prolongam o contato dos produtos com o solo, as lesões na superfície dos grãos, provocadas por insetos, e o armazenamento inadequado, em locais úmidos e sem ventilação, são apontados como as principais causas que favorecem a contaminação e o desenvolvimento de fungos toxigênicos (CHU 1991).

O Brasil, devido à prevalência de clima tropical, apresenta condições ideais para o desenvolvimento desses fungos. Além disso, observa-se ainda, no país, a utilização de práticas agrícolas inadequadas de plantio, colheita, secagem, transporte e armazenagem de cereais e grãos, que favorecem a contaminação e o desenvolvimento de fungos toxigênicos (SABINO *et al.* 1988).

BALDISSERA *et al.* (1993) observaram 24,85% de amostras positivas para aflatoxinas, em alimentos para consumo animal, no sul do Brasil. Esse resultado é superior à contaminação observada nos EUA, onde a contaminação média foi de 5–10%, em rações para consumo animal (WOOD 1989).

Considerando a toxicidade das aflatoxinas, o Ministério da Agricultura do Brasil estabeleceu, em 1996, o limite máximo de 20 µg/Kg, dado pela somatória das aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂, aos alimentos destinados ao consumo humano (BRASIL 1996). Complementarmente, em 2002, o Ministério da Saúde do Brasil estabeleceu os limites máximos para a aflatoxina M₁ de 0,5 µg/L e 5,0 µg/L, para leite fluido e leite em pó, respectivamente, além de confirmar o limite máximo de 20 µg/Kg, dado

pela somatória das aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂, nos alimentos destinados ao consumo humano (BRASIL 2002).

Para o consumo animal, o Ministério da Agricultura do Brasil estabeleceu, em 1988, o limite máximo de 50 µg/ Kg, dada pela somatória de B₁, B₂, G₁ e G₂, sendo válido para qualquer matéria prima a ser utilizada diretamente ou como ingrediente para rações destinadas ao consumo animal (BRASIL 1988).

Na **Tabela 1**, podem ser observados os níveis de aflatoxinas encontrados em matérias prima e rações, obtidos em levantamentos realizados no Brasil.

Tabela 1 – Níveis de aflatoxinas detectados em amostras de rações animais e matérias-prima comercializadas no Brasil.

Tipo de Produto	Origem das Amostras	Frequência^a (%)	Nível Médio (µg/ Kg)^b	Referência
Rações	Diversos estados	25,5	50 – 7800 ^c	SABINO 1980
Milho	Minas Gerais	18,1	83	SABINO <i>et al.</i> 1986
Rações	Diversos estados	10,4	241	SABINO <i>et al.</i> 1988
Milho	Região Sul	18,2	79	SABINO <i>et al.</i> 1989
Milho	Região Sudeste	8,6	35	SABINO <i>et al.</i> 1989
Rações e milho	Rio Grande do Sul	24,9	4 – 1906 ^c	BALDISSERA <i>et al.</i> 1993
Rações	São Paulo	14,6	11,5 – 287 ^c	CORREA <i>et al.</i> 1997
Sorgo	Diversos estados	12,8	7 – 33 ^c	SILVA <i>et al.</i> 2000
Rações	Rio de Janeiro	56,9	1 – 32 ^c	RIBEIRO <i>et al.</i> 2000
Rações	Minas Gerais	12	131	MAIA <i>et al.</i> 2002

^a Número de amostras positivas/ total de amostras analisadas;

^b Soma das 4 frações (B₁ + B₂ + G₁ + G₂);

^c Valores se referem às concentrações mínima e máxima.

Os resultados indicam um elevado percentual de amostras positivas, com concentrações acima do permitido pela legislação brasileira vigente.

1.3 – Aflatoxina M₁:

As aflatoxinas, depois de ingeridas, são absorvidas no trato gastrointestinal e biotransformadas primariamente no fígado, por enzimas microsossomais do sistema de funções oxidases mistas, constituindo parte do processo de detoxicação (BIEHL & BUCK 1987).

A aflatoxina M₁ (AFM₁) é originada, principalmente, a partir da biotransformação hepática da AFB₁. Após ser biotransformada, pode permanecer em diversos tecidos, especialmente no hepático e no renal, ou ser excretado através da urina e do leite. É o principal metabólito hidroxilado presente em leite de animais que ingeriram ração contaminada por AFB₁ (APPLEBAUM *et al.* 1982).

A **Figura 2** apresenta as principais vias de biotransformação da AFM₁.

Vários pesquisadores calcularam a quantidade de AFM₁ excretada no leite como uma porcentagem da AFB₁ ingerida na ração. FROBISH *et al.* (1986) observaram AFM₁ no leite de vacas lactantes, 12 horas após o consumo de ração contaminada, com uma transferência média de 1,74% do total de AFB₁ ingerida na ração. PATTERSON *et al.* (1980) e PRICE *et al.* (1985) encontraram resultados semelhantes em vacas leiteiras, observando taxas de transferência de 2,2% e 1,6%, respectivamente.

CORBETT *et al.* (1988) realizaram um estudo epidemiológico sobre a AFM₁, em propriedades leiteiras, e observaram a presença de AFM₁ em grande porcentagem do leite analisado, porem, não detectaram, na mesma proporção, AFB₁ nas rações

fornecidas a esses animais. Os autores atribuíram os resultados observados ao fato das aflatoxinas não estarem uniformemente distribuídas nas rações animais, diferentemente da presença uniforme da AFM₁ no leite. Em estudo similar, no estado de São Paulo, CORREA *et al.* (1997) não detectaram AFM₁ nas amostras de leite analisadas, porém, observaram contaminação por aflatoxinas B₁ e B₂, em 14,6% das amostras de rações analisadas. Os autores atribuíram a ausência de AFM₁, nas amostras de leite, a diluição das amostras, em tanques de recepção, e ao limite de detecção do método empregado (0,5 µg/ L), além da baixa taxa de transferência da AFB₁ ingerida para o leite.

Vários pesquisadores notaram uma tendência sazonal na contaminação do leite por AFM₁. Os índices menores ocorreram durante os meses de verão, quando os animais são comumente alimentados em pastagens, ao invés de rações concentradas, utilizadas durante o inverno (GALVANO *et al.* 1996).

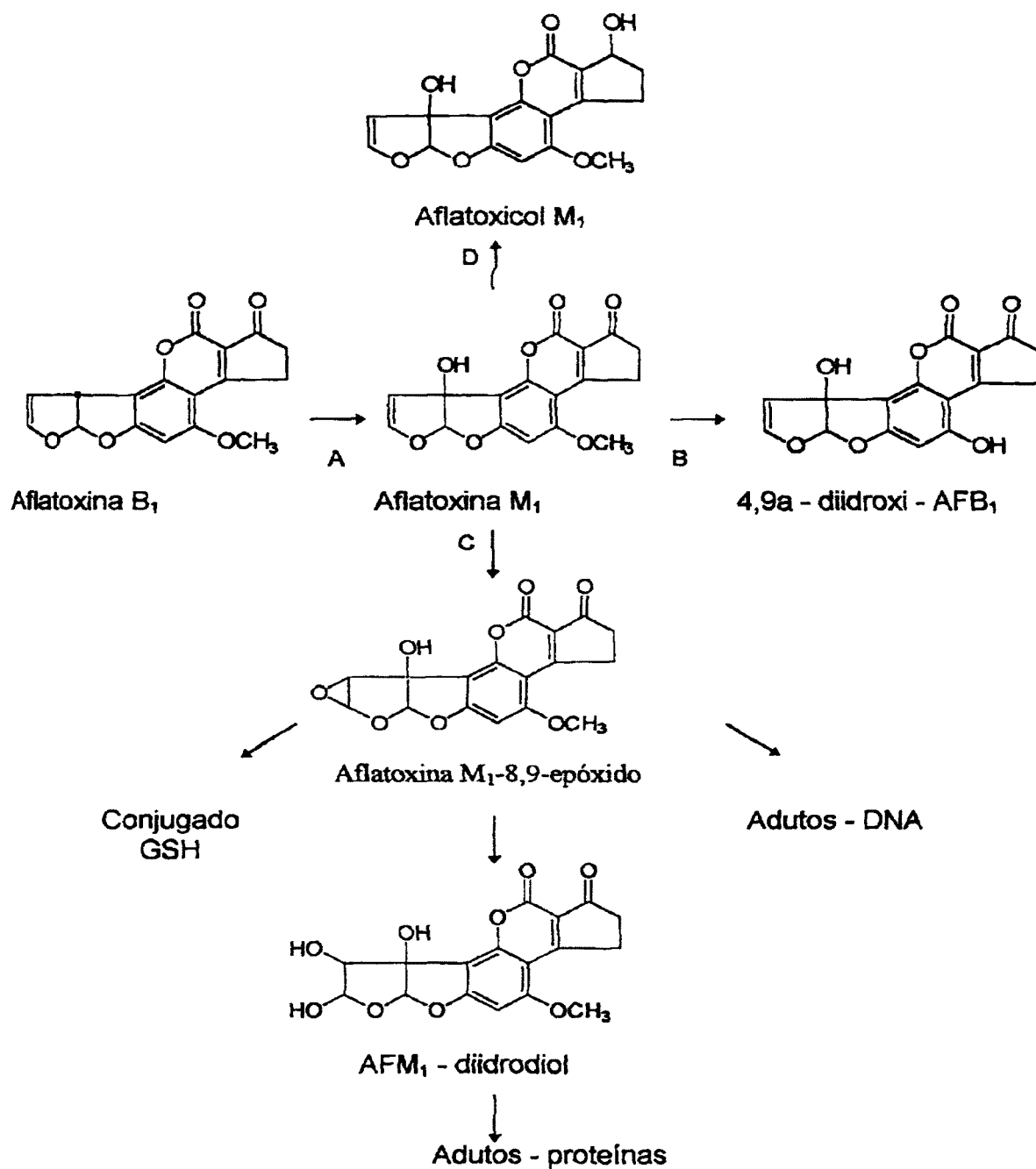


Figura 2 - Biotransformação da aflatoxina M₁

1.3.1 – Toxicidade das aflatoxinas:

Os efeitos tóxicos das aflatoxinas são dependentes da dose e do tempo de exposição, acarretando, desse modo, intoxicações agudas ou crônicas.

A síndrome tóxica aguda ocorre pela ingestão de alimento com alta concentração de aflatoxina, sendo seus efeitos observados em curto espaço de tempo. Caracteriza-se, principalmente, pela rápida deterioração do estado geral do animal, perda de apetite, hepatite aguda, icterícia, hemorragias e morte (OSWEILER 1990). As intoxicações agudas estão restritas aos esporádicos casos de ocorrência natural, e aos experimentos laboratoriais, onde são utilizadas altas concentrações de aflatoxinas, de modo a exacerbar seus efeitos deletérios nos animais (ROSMANINHO *et al.* 2001).

Os relatos sobre a ocorrência de aflatoxicose aguda no homem são raros, contudo, quadros clínicos desta natureza foram descritos na Índia, em 1974, numa epidemia de hepatite tóxica associada ao consumo de milho altamente contaminado (COULOMBE 1991).

Na aflatoxicose crônica ou de longa duração, o sinal clínico mais evidente é a diminuição da taxa de crescimento dos animais jovens e imunossupressão, podendo, ainda, ocasionar câncer hepático, defeitos congênitos e alterações genéticas (LEESON *et al.* 1995). Ocorre através da ingestão de alimentos contaminados com baixos níveis de aflatoxinas, por um longo período de tempo, podendo a exposição ao contaminante ser contínua ou intermitente. Esta patologia é de difícil diagnóstico, apesar de constituir a principal forma de intoxicação em condições naturais (PIER 1992).

A carcinogênese hepática é o mais importante efeito da toxicidade crônica das aflatoxinas. Inicia-se por alterações mutagênicas permanentes nas moléculas de DNA das células hepáticas, possibilitando a iniciação de processo cancerígeno através da expressão fenotípica das modificações ocorridas no DNA celular (HSIEH *et al.* 1984).

As aflatoxinas também apresentam efeitos sobre o sistema imunitário, destacando-se a aplasia do timo, redução do número e da atividade das células T, diminuição da resposta de anticorpos, supressão da atividade fagocitária e redução do complemento (PESTKA *et al.* 1990).

As aflatoxinas também têm sido consideradas como fatores envolvidos na etiologia da síndrome de Reye, doença grave caracterizada por encefalopatia aguda e degeneração adiposa das vísceras e na etiologia do kwashiorkor, considerado uma das principais formas de desnutrição protéico-calórica em humanos (HENDRICKSE 1991).

Recentemente, diversas pesquisas foram realizadas no intuito de estabelecer os efeitos causados pela exposição crônica as aflatoxinas, em seres humanos.

Na África Ocidental, GONG *et al.* (2003) avaliaram a exposição de 479 crianças as aflatoxinas e detectaram a presença de adutos aflatoxina- albumina no sangue de 475 crianças (99%). Através do monitoramento de diversos parâmetros, os autores associaram a ingestão de aflatoxinas com o retardo no crescimento das crianças expostas.

Na Gâmbia, TURNER *et al.* (2003) estabeleceram uma relação estatisticamente significativa em crianças expostas às aflatoxinas com baixa

imunidade humoral. Os autores detectaram a presença de adutos aflatoxina – albumina no sangue de 93% das crianças pesquisadas.

A toxicidade da AFM₁ é muito semelhante à da AFB₁, manifestando seus efeitos tóxicos também em doses baixas. PURCHASE (1967) observou que os valores da dose letal média (DL₅₀) para AFB₁ e AFM₁ em patos de 1 dia, foram, respectivamente, de 0,24 e 0,32 mg/kg de peso corpóreo.

NEAL *et al.* (1998), em estudo “*in vitro*” com células de linhagem humana, propuseram que a elevada citotoxicidade da AFM₁ estaria relacionada ao fato da mesma não necessitar de ativação metabólica para se ligar às proteínas microssomais, diferentemente da AFB₁.

HSIEH *et al.* (1984) e CULLEN *et al.* (1987) realizaram estudo em ratos Fischer e observaram que a AFM₁ é um carcinógeno hepático, embora menos potente que sua precursora, a AFB₁. Essa conclusão baseou-se na observação de tumores hepáticos em 95% dos animais que receberam ração contaminada com 50 ppb de AFB₁, enquanto que o grupo alimentado com 50 ppb de AFM₁ não apresentou lesões hepáticas, durante o mesmo período de intoxicação, necessitando de quatro meses adicionais de exposição à AFM₁ (50 ppb) para observar o desenvolvimento de carcinoma hepatocelular. Baseados nessas observações, os autores concluíram que a potência hepatocarcinogênica da AFM₁ foi cerca de 2-10% da apresentada pela AFB₁. BAILEY *et al.* (1994) também confirmaram ser a AFM₁ um hepatocarcinógeno, porém menos ativo que sua precursora.

Em 1992, a *International Agency for Research on Cancer*, IARC, classificou a AFB₁ e a AFM₁ como pertencentes às classes 1 (carcinógeno humano) e 2B (provável carcinógeno humano), respectivamente (ROTHSCHILD 1992).

1.3.2 – Ocorrência de aflatoxina M₁ em leite e derivados:

Existem relatos da ocorrência de AFM₁ no leite de diversas espécies de mamíferos, incluindo o ser humano. Em relatos recentes, ZARBA *et al.* (1992) e EL-NEZAMI *et al.* (1995) reportaram a ocorrência de AFM₁ em amostras de leite humano, algumas em níveis alarmantes, nas regiões da Gâmbia e Tailândia, respectivamente.

A excreção de AFM₁ no leite tem sido estudada, principalmente, em vacas leiteiras, uma vez que este alimento constitui uma das principais fontes de nutrientes para os seres humanos, particularmente à população infantil.

Diversos pesquisadores estudaram os efeitos do processamento do leite de vaca na redução da AFM₁. PURCHASE *et al.* (1972) observaram redução de 32% da AFM₁ no leite durante pasteurização, porém, STOLOFF *et al.* (1975), em tratamento similar, não detectaram redução significativa.

RUSTOM (1997) relatou que as diferenças observadas pelos diversos pesquisadores estão relacionadas com as diferentes metodologias analíticas empregadas.

Atualmente, há um consenso de que os métodos usuais de processamento do leite (pasteurização, esterilização e desidratação) não reduzem significativamente a AFM₁ contida no leite (VAN EGMOND 1983; SABINO *et al.* 1989; GALVANO *et al.* 1996).

Diversas pesquisas sobre a incidência de AFM₁ em leite e produtos lácteos têm sido realizadas em vários países, demonstrando elevados percentuais de ocorrência, porém, em níveis baixos de contaminação.

Na Espanha, analisando leite UHT por cromatografia em camada delgada (CCD), BLANCO *et al.* (1988) encontraram 29,8% das amostras positivas, com contaminação entre 20-100 ng/l. Na Grécia, MARKAKI & MELISSARI (1997) analisaram leite pasteurizado por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e ELISA, observando contaminação por AFM₁ em 89% das amostras, em níveis entre 5 – 177 ng/ L.

GALVANO *et al.* (1998) detectaram por CLAE, na Itália, AFM₁ em mais de 80% das amostras de leite fluido, leite em pó e iogurte, com níveis médios de 10 ng/l, 21 ng/kg e 18 ng/l, respectivamente. KIM *et al.* (2000) analisaram por CLAE e ELISA amostras de leite pasteurizado, fórmula infantil, leite em pó e iogurte, na Coreia do Sul, observando incidências de 76, 85, 75 e 83%, respectivamente.

MARTINS & MARTINS (2000) analisaram, em Portugal, 101 amostras de leite, por purificação em coluna de imunoafinidade e quantificação por CLAE, e detectaram AFM₁ em 83,2% das amostras, porém, apenas 2 estavam em níveis acima de 50 ng/L.

GALVANO *et al.* (1996), em estudo de revisão sobre a incidência de AFM₁, concluíram que, apesar dos elevados percentuais de contaminação, os níveis observados em leite e derivados, na maioria dos países pesquisados, não constitui sério risco à Saúde Pública, porém, ressalva que os países com climas tropicais e subtropicais necessitam de maior controle dos produtos lácteos.

Na Tailândia, SAITANU (1997) pesquisou AFM₁, por CLAE, em amostras de leite cru, pasteurizado, esterilizado e peletizado, e observou contaminação em mais de 90% das amostras, sendo que 18% apresentavam contaminação superior a 500 ng/L de leite.

No Brasil, existem poucos dados referentes à incidência de AFM₁ em leite e derivados.

No município de São Paulo, MARTINS & MARTINS (1986) analisaram, por fluordensitometria, 224 amostras de leite tipo “B”, pertencentes as quatro marcas de maior consumo pela população. A AFM₁ esteve presente em 4 amostras, na proporção de 1,8% do total de amostras analisadas, sendo 2 em níveis de 250 ng/ L.

SABINO *et al.* (1989) analisaram, por cromatografia em camada delgada, amostras de leite, coletadas de fazendas do Vale do Paraíba, detectando AFM₁ em 18% das amostras, com contaminação entre 100-1.680 ng/l, no entanto, em 100 amostras de leite comercial pasteurizado, coletadas no Estado de São Paulo, observaram apenas 1 amostra positiva (200 ng/l). Os autores atribuíram a baixa incidência de AFM₁, nas amostras de leite comerciais, à diluição da toxina, decorrente da mistura de leite contaminado e não contaminado, durante o beneficiamento pelas usinas de leite.

SYLOS *et al.* (1996) pesquisaram AFM₁, por CCD, em 152 amostras de leite pasteurizado, leite em pó, queijo e iogurte, comercializados no município de Campinas/ SP, entre 1989-1990. Os autores não detectaram AFM₁ em nenhuma amostra. Posteriormente, em 1992, os autores analisaram 52 amostras de leites pasteurizados tipo A, B e C, por CLAE, e encontraram 4 amostras contaminadas com níveis entre 73-370 ng/l. Os autores atribuíram os resultados positivos encontrados à técnica analítica empregada, mais sensível que a cromatografia em camada delgada, utilizada na pesquisa em 1989-1990.

OLIVEIRA *et al.* (1997), analisando, por ELISA, 300 amostras de leite em pó, distribuído pelo programa de alimentação escolar do município de São Paulo,

observaram 11% de amostras positivas, com concentrações entre 100-1000 ng/l. Tomando como base os níveis médios obtidos nas amostras positivas, os autores estimaram a ingestão diária da AFM₁, por crianças de 4 meses de idade, adotando para o cálculo o consumo médio de 720 ml de leite e calcularam a ingestão diária média de AFM₁ de aproximadamente 3,7 ng/ Kg de peso corporal por dia. A ingestão diária observada estava acima do nível máximo tolerável de 0,2 ng/ Kg de peso corporal por dia, sugerido por KUIPER-GOODMAN (1990).

JUSSARA (2000) pesquisou AFM₁, por fluorodensitometria, em 120 amostras de leite pasteurizado e esterilizado, da cidade de São Paulo, e observou 7 amostras positivas, representando 6% do total analisado. Os níveis encontrados variaram de 24,3 a 101,2 ng/L.

Recentemente, no município de Ribeirão Preto/ SP, GARRIDO *et al.* (2003) analisaram AFM₁ e AFM₂ em 60 amostras de leite comercial esterilizado e 79 pasteurizado. A AFM₂ não foi encontrada em nenhuma amostra, enquanto a AFM₁ esteve presente em 20,9% das amostras, em níveis de 50-240 ng/ L.

Os trabalhos citados indicam que a frequência de AFM₁ em nossas condições é relativamente baixa. Contudo, os resultados obtidos por PRADO *et al.* (1999) demonstram que a contaminação pode atingir níveis elevados, pois observaram 82% de amostras positivas em leite pasteurizado, no estado de Minas Gerais. Os autores atribuíram a alta frequência observada às técnicas mais sensíveis, atualmente disponíveis, utilizadas na extração, purificação e quantificação da AFM₁ em amostras de leite. Os autores utilizaram coluna de imunoafinidade na extração e purificação da AFM₁ e quantificação por CLAE.

Considerando os riscos decorrentes da AFM₁ em leite e derivados, além do fato destes produtos serem amplamente consumidos pelo homem, sobretudo como constituinte básico da alimentação infantil, diversos países estabeleceram limites máximos de tolerância. Os países membros do MERCOSUL e os Estados Unidos adotaram níveis de 500 ng/l para o leite fluido (MERCOSUL 1994; STOLOFF *et al.* 1991), enquanto que os países da União Européia adotaram o valor de 50 ng/L para leite fluido (CE 1996).

É importante ressaltar que os limites de tolerância devem ser coerentes com os limites de detecção dos métodos analíticos disponíveis, considerando ainda sua precisão e exatidão de resultados. HORWITZ *et al.* (1993) revisaram vários resultados de estudos interlaboratoriais para detecção de AFM₁ em leite e produtos lácteos e constataram que nenhuma metodologia havia sido eficaz em determinar AFM₁ em nível abaixo de 50 ng/l.

Em 1995, a International Dairy Federation (IDF) promoveu um estudo interlaboratorial, com 16 participantes de 11 países, com o objetivo de testar um método aplicável à análise de AFM₁ em leite, em concentrações entre 8-60 ng/l. O método escolhido foi baseado na extração e purificação da toxina em coluna de imunoafinidade, com quantificação por cromatografia líquida de alta eficiência (TUINSTRAN *et al.* 1993). Os resultados demonstraram que esta metodologia é particularmente apropriada para o monitoramento da AFM₁ em leite fluido, sobretudo para a detecção de baixas concentrações da toxina.

1.4 – Ácido Ciclopiazônico (CPA):

O ácido ciclopiazônico é uma micotoxina produzida por algumas espécies de fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*, incluindo *A. versicolor*, *A. oryzae*, *A. flavus*, *A. tamarii*, *P. patulum*, *P. viridicatum*, *P. cyclopium*, *P. camemberti*, entre outros (BALACHANDRAN & PARTHASARATHY, 1996; DORNER *et al.* 1984). Foi isolado pela primeira vez em cultura de *Penicillium cyclopium* Westling, em 1968 (HOLZAPFEL 1968).

O CPA é considerado um ácido tetrâmico (MOTTA & VALENTE SOARES 2000), devido a presença de β -diketona e β -hidroxi α,β -ketona não saturada em posições opostas, como pode ser visualizado em sua estrutura química, apresentada na **Figura 3**.

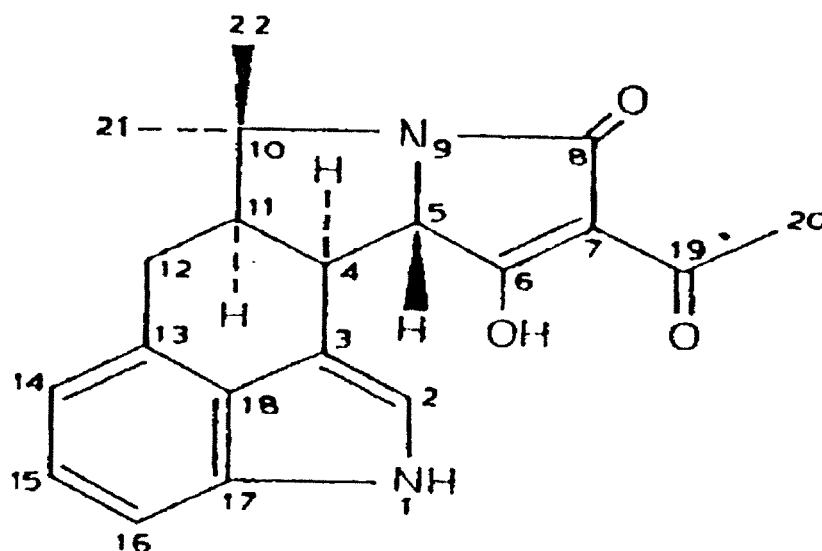


Figura 3. Estrutura química do ácido ciclopiazônico.

Pesquisas retrospectivas do episódio denominado “*Turkey – X – disease*”, ocorrido em 1960, no Reino Unido, revelaram a associação do CPA e das

aflatoxinas, com ações tóxicas aditivas nos animais (COLE 1986; BRADBURN et al. 1994).

Diversos pesquisadores têm demonstrado a produção concomitante do CPA e de aflatoxinas pelo *A. flavus* (GALLAGHER et al. 1978; GQALENI et al. 1996; VAAMONDE et al. 2003), porém DORNER et al. (1984) não observaram a produção de CPA em 47 isolados de *A. parasiticus*, enquanto 46 deles produziram aflatoxinas.

1.4.1- Ocorrência do CPA em produtos alimentícios e rações animais:

No Brasil, são raras as referências a respeito da incidência de CPA em produtos alimentícios e rações animais, apesar de existir inúmeros trabalhos científicos sobre a ocorrência de fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*, em nosso território.

POZZI et al. (1995) analisaram amostras de milho pós-colheita e estocado, e observaram a presença de fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* em mais de 40% das amostras. ONO et al. (1999) analisaram 150 amostras de milho, do estado do Paraná, e constataram contaminação por *Penicillium* spp. em 93% das amostras.

FREIRE et al. (2000) observaram que o *A. flavus* foi a espécie de fungo mais freqüentemente isolada em pimentas e castanhas do Brasil. SILVA et al. (2000) isolaram fungos de sorgo estocado e constataram a prevalência das espécies *A. flavus* e *Fusarium moniliforme*.

P. viridicatum foi isolado de mosquitos das regiões Norte e Sudeste do Brasil (COSTA & OLIVEIRA 1998).

MOTTA & VALENTE SOARES (2001) analisaram, em Campinas/ SP, 80

amostras de produtos a base de tomate e observaram a ocorrência do CPA em 8 amostras, em níveis entre 36 – 178 ng/ g. Os autores justificaram a pesquisa pela grande ocorrência de fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* em produtos alimentícios, no Brasil.

Devido à capacidade do *A. flavus* em produzir concomitantemente aflatoxinas e CPA e ao conseqüente risco de potencialização dos efeitos tóxicos de ambas toxinas para os animais e o homem, diversas pesquisas têm sido realizadas com o objetivo de estabelecer suas co-ocorrências naturais.

Na Argentina, PINTO *et al.* (2001) observaram a co-ocorrência de CPA e de aflatoxinas em amostras de amendoim.

LEE & HAGLER (1991) analisaram sete lotes diferentes de milho, nos Estados Unidos, constatando a contaminação por ácido ciclopiazônico em 4 lotes, com níveis de 25-250 µg/kg, sendo as aflatoxinas detectadas em todos os lotes (níveis de 4- 508 µg/kg), evidenciando a co-ocorrência das toxinas. As análises microbiológicas dos lotes revelaram a presença de *Aspergillus flavus*.

URANO *et al.* (1992) analisaram 45 amostras de milho e 15 de amendoim, coletadas no programa de monitoramento de micotoxinas, do Departamento de Agricultura do Estados Unidos, e observaram contaminação por CPA em 51% do milho e 90% do amendoim, enquanto as aflatoxinas estavam presentes em 87% do milho e em 100% do amendoim analisado.

Na Indonésia, WIDIASTUTI *et al.* (1988) detectaram CPA e aflatoxinas em 21 de um total de 26 lotes de milho, destinados à ração animal, sendo que metade dos lotes contaminados apresentavam CPA em níveis acima de 1 ppm. MARTINS & MARTINS (1999), BALACHANDRAN & PARTHASARATHY (1996) e

SCUDAMORE *et al.* (1998) também observaram a co-ocorrência de aflatoxinas e CPA, em rações animais, em Portugal, na Índia e no Reino Unido, respectivamente.

1.4.2 – Ocorrência do CPA em produtos de origem animal:

A presença de ácido ciclopiazônico em rações animais apresenta um risco à Saúde Pública, devido à alta taxa de transferência de CPA, não metabolizado, para os principais produtos de origem animal, consumidos pelo homem.

NORRED (1987) administrou doses orais de 10 mg CPA/ Kg de peso corporal para frangos de corte e observou a presença de 14,5% da dose de CPA nos tecidos musculares, 48 h após a administração.

BYREM *et al.* (1999) observou níveis médios de 500 ng/ g de CPA, nos tecidos musculares de suínos, após administração de ração contendo 10 ppm de CPA.

DORNER *et al.* (1994) observaram transferência de ácido ciclopiazônico (CPA), administrado oralmente, para ovos de galinhas poedeiras. O CPA foi detectado nos ovos 24h após a sua introdução e os níveis encontrados aumentaram consideravelmente, durante o período de intoxicação. No mesmo estudo, os autores administraram doses orais de 5 mg de CPA/ Kg de peso vivo, para 3 ovelhas lactantes, e observaram uma alta concentração de CPA no leite (236 ng/g), 24 horas após sua introdução; após a segunda dose, a concentração do CPA no leite dobrou (568 ng/g), mantendo-se em níveis altos por três dias, após a sua retirada da ração.

Além da AFM₁ e do CPA, outras micotoxinas também podem ser excretadas através do leite, como ocratoxina (SKAUG 1999; VALENTA & GOLL 1996), fumonisinas (SPOTTI *et al.* 2001; MARAGOS & RICHARD 1994), toxina T-2 (LEE & CHU 1981; COLLINS & ROSEN 1979), deoxinivalenol (PRELUSKY *et al.*

1987; COTE *et al.* 1986) e zearalenona (PRELUSKY *et al.* 1990; SCOTT & LAWRENCE 1988). Porém, as pesquisas realizadas têm demonstrado uma baixa taxa de transferência dessas micotoxinas, presentes em rações contaminadas, para o leite (GALVANO *et al.* 1996).

PRASONGSIDH *et al.* (1997; 1998b) analisaram a estabilidade do CPA em leite e observaram que as técnicas usuais de processamento, entre elas, a pasteurização, a esterilização e a desidratação, não apresentaram eficiência para destruir o CPA no leite contaminado, similarmente ao que ocorre em relação a AFM₁.

Recentemente, LOSITO *et al.* (2002) analisaram 20 amostras de leite comercial, na Itália, e encontraram 3 amostras positivas para CPA, em níveis de 4,5–8,3 ng/ml.

Além da contaminação dos produtos de origem animal pela transferência do CPA, presente na ração, pode ocorrer contaminação pelo crescimento de fungos nos produtos acabados, como é o caso do queijo tipo camembert, no qual é usado na produção *P. camembertii*, produtor de ácido ciclopiazônico (ZOVICO *et al.* 1997).

1.4.3 - Toxicidade do CPA:

Os dados relativos à toxicidade do CPA têm aumentado nas últimas duas décadas, devido, principalmente, aos relatos de sua ocorrência natural, em diversos produtos agrícolas, destinados ao consumo humano e animal (BALACHANDRAN & PARTHASARATHY 1996).

RAO & HUSAIN (1985) relataram a ocorrência de intoxicação aguda por CPA, em seres humanos, na Índia. A análise microbiológica do cereal, conhecido

localmente como “kodo” (utilizado como arroz ou na manufatura de pães), revelou alta contaminação por *Aspergillus flavus* e *A. tamarii*. Os principais sintomas agudos observados, na população intoxicada, foram náuseas e vertigens.

Estudos toxicológicos, efetuados em frangos de corte, revelaram maior predisposição à ação tóxica do CPA em órgãos como fígado, pró-ventrículo (GENTLES *et al.* 1999), pâncreas (BALACHANDRAN & PARTHASARATHY 1995), baço (DORNER *et al.* 1983), sistema neurológico (PORTER *et al.* 1988), e fibras musculares, com conseqüente perda de peso e alterações motoras (CULLEN *et al.* 1988).

LOMAX *et al.* (1984) administraram a porcos 1,0 mg de CPA/ Kg de peso vivo (p.v), por 14 dias, e observaram ulcerações gástricas, durante a necropsia. Porcos que receberam 10 mg de CPA / Kg p.v. apresentaram, além de úlceras gástrica e intestinais, lesões severas no fígado e rins.

MORRISSEY *et al.* (1985) administraram 4 mg de CPA/ Kg de p.v., a ratos Sprague-Dawley, por 4 dias, e observaram severas lesões no fígado e baço dos animais. Contudo, VOSS *et al.* (1990), utilizando ratos Sprague-Dawley, administraram 4 mg de CPA/ Kg de p.v., em tratamento por 13 semanas, e não observaram severas lesões hepáticas.

HILL *et al.* (1986) observaram prejuízo da atividade imunológica, com redução do título de anticorpos, em ratos que receberam 0,1 mg de CPA/ Kg de p.v.

Em relação aos efeitos teratogênicos do CPA, MORRISSEY *et al.* (1984) administraram 10 mg de CPA/ Kg de p.v., a ratas Fischer prenhas, e observaram retardamento no desenvolvimento dos embriões, principalmente em relação a parte óssea. Os autores concluíram que o potencial teratogênico do CPA é baixo.

ANTONY *et al.* (2003) observaram aumento significativo da gama glutamil transpeptidase (GGT), indicativo de alterações pré-neoplásicas no fígado, em ratos expostos ao CPA.

NORRED *et al.* (1985), utilizando ratos Sprague-Dawley, observaram a eliminação do CPA, principalmente pela via biliar, 72 h. após a administração de 8 mg de CPA/ Kg de p.v.

1.4.4 – Toxicidade conjunta do CPA e das aflatoxinas:

Devido a co-ocorrência das aflatoxinas e do CPA, em diversos produtos alimentícios e rações animais, vários pesquisadores estudaram os possíveis efeitos tóxicos sinérgicos e/ou aditivos, de ambas toxinas.

SORENSEN *et al.* (1984) demonstraram significante atividade mutagênica do CPA e da AFB₁, isoladamente ou em combinação, em estudos com *Salmonella typhimurium*. Os autores concluíram que a atividade mutagênica das toxinas, em combinação, parece ser mais aditiva do que sinérgica.

PIER *et al.* (1989), em estudo com porcos e SMITH *et al.* (1992), em estudo com frangos, administraram aflatoxina e CPA, isoladamente e em combinação, observando a potencialização dos efeitos das duas toxinas, demonstrada pela redução no ganho de peso, aumento da mortalidade e alterações hepáticas nos animais intoxicados, entre outros parâmetros analisados. Contudo, MORRISSEY *et al.* (1987) não observaram potencialização dos efeitos tóxicos da AFB₁ e do CPA, em ratos Sprague-Dawley.

YATES *et al.* (1987) observaram que a AFB₁ e o CPA apresentam diferentes atividades citotóxicas, com modos de ação independentes. Os autores monitoraram

os efeitos tóxicos, de ambas toxinas, em bactérias marinhas *Photobacterium phosphoreum* e concluíram que o CPA é mais citotóxico que a AFB₁.

Através do estudo de intoxicações agudas e crônicas, utilizando AFB₁ e CPA, isoladamente e em combinação, em primatas Vervet, JASKIEWICZ *et al.* (1988) observaram efeito sinérgico cumulativo, de ambas toxinas.

1.5 – Estimativa da ingestão diária média (IDM) de micotoxinas e sua importância:

Um dos mais importantes aspectos da análise de risco de substâncias químicas é o estabelecimento do grau de exposição do organismo humano. Em 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 e dos respectivos níveis médios de ocorrência da substância tóxica. 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./dia (WHO 1983).

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 epidemiológicos. Com relação às aflatoxinas, contudo, ainda não existem dados suficientes para estabelecer níveis toleráveis de exposição (RUSTOM 1997).

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 1000

a 5000 é aplicado à maior dose administrada aos animais, para a qual não foram observados efeitos tóxicos (BOISSEAU 1990).

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 podem iniciar o processo cancerígeno (KUIPER-GOODMAN, 1991). A IDT para a AFB₁, baseada nestes critérios, e calculada em relação aos resultados do experimento de CULLEN *et al.*(1987), foi de 0,5 ng/Kg p.c. /dia (fator de segurança de 5000). Para a AFB₁, a IDT assim calculada, foi de 0,15 ng/ Kg p.c./dia (KUIPER-GOODMAN, 1990).

KUIPER-GOODMAN (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 AFB₁, calculada em relação aos resultados obtidos por CULLEN *et al.*, (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.

As crianças, assim como os animais jovens, de maneira geral, são consideravelmente mais sensíveis aos efeitos tóxicos de compostos químicos (WHO, 1986). Entre as características que contribuem para esta maior vulnerabilidade, destacam-se:

- ◆ maior grau de absorção de substâncias tóxicas nos jovens do que nos adultos, enquanto que a capacidade de detoxicação é menor, devido aos rins ainda não estarem 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).

Em relação ao organismo adulto, bem como crianças maiores, uma das principais conseqüências 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 .

2 - OBJETIVOS:

Considerando os riscos decorrentes do consumo de leite contaminado por micotoxinas, principalmente pela população infantil, além da importância do conhecimento de seus níveis de contaminação, constituem objetivos do presente trabalho:

- a) Avaliar o desempenho dos métodos analíticos em condições experimentais, através de ensaios de recuperação em leite artificialmente contaminado com AFM₁ e CPA;
- b) Pesquisar, quantitativamente, no período de 5 meses, a ocorrência de AFM₁ e CPA, isolados e conjuntamente, em amostras de leite de consumo (tipos A, B, C e Longa Vida), comercializados no Município de São Paulo; e,
- c) Calcular a ingestão diária média das toxinas, a partir dos níveis médios obtidos nas amostras positivas e do consumo médio *per capita* dos diferentes tipos de leite.

3 – MATERIAL E MÉTODOS:

3.1 - Avaliação do desempenho dos métodos em condições experimentais:

3.1.1 – Determinação das concentrações dos padrões de AFM₁ e CPA:

Material:

- espectrofotômetro marca Perkin Elmer, modelo UV/VIS;
- K₂Cr₂O₇ (dicromato de potássio) p.a., Merck[®];
- H₂SO₄ (ácido sulfúrico) p.a., Merck[®];
- padrão de AFM₁, Sigma Chemical[®];
- padrão de CPA, Sigma Chemical[®];
- benzeno p.a., Merck[®];
- acetonitrila grau HPLC, Merck[®];
- clorofórmio grau HPLC, Merck[®];
- metanol grau HPLC, Merck[®];
- micropipetas de vidro de 10, 50, 100 e 500 µl.

Cálculo do fator de correção do espectrofotômetro:

Inicialmente, foi verificada a calibração do espectrofotômetro, através da leitura das absorbâncias das soluções de dicromato de potássio a 0,25mM, 0,125 mM e 0,0625 mM, em comprimento de onda de 350 nm, usando como branco solução de H₂SO₄ a 0,018 N, para a determinação de seu fator de correção (SCOTT, 1990), através da seguinte fórmula:

$E = A \times 1000 / \text{concentração em mM}$, onde:

E = absortividade molar de cada solução de $K_2Cr_2O_7$;

A = absorbância de cada solução de $K_2Cr_2O_7$.

Após calcular a absortividade molar de cada solução de $K_2Cr_2O_7$ (0,25mM, 0,125 mM e 0,0625 mM), foi realizada a média dos 3 valores de E, para determinar o fator de correção, através da seguinte fórmula:

$FC = 3.160 / E \text{ médio}$, onde:

FC = fator de correção do espectrofotômetro;

E médio = média dos 3 valores de E, obtidos de cada solução de $K_2Cr_2O_7$ (0,25mM, 0,125 mM e 0,0625 mM).

O valor do fator de correção do espectrofotômetro não pode ser inferior a 0,95 e nem superior a 1,05.

Aflatoxina M_1 :

Após a determinação do fator de correção do espectrofotômetro, o padrão de AFM_1 , mantido a $-5^\circ C$, foi dissolvido em benzeno-acetonitrila (9+1), e calibrado espectrofotometricamente, em comprimento de onda de 350 nm, através da técnica preconizada por SCOTT (1990), que estabelece:

$AFM_1 \mu g / ml = A \times MW \times FC \times 1000 / E$, onde:

A = absorbância do padrão

MW = 328 (peso molecular da AFM_1)

FC = fator de correção do espectrofotômetro

E = 18815 (absortividade molar da AFM_1)

Após a determinação da concentração do padrão de AFM₁, as soluções de uso foram preparadas pela transferência de 1ml da solução estoque, para um tubo cônico âmbar de 20 ml, e concentrado em atmosfera de nitrogênio. O resíduo foi dissolvido em metanol grau HPLC, e agitado em “vortex” por 3 minutos. Esta solução intermediária (SI) foi utilizada na preparação das soluções, para elaboração da curva de calibração do aparelho de cromatografia líquida, e na contaminação das amostras de leite, para os ensaios de recuperação.

Ácido ciclopiazônico:

Foi utilizado padrão de CPA puro, adquirido da Sigma Chemical, sendo posteriormente dissolvido em metanol, de maneira a obter, aproximadamente, 1 mg CPA/ ml. Essa solução estoque foi calibrada espectrofotometricamente, em comprimento de onda de 282 nm, através da técnica preconizada por NORRED (1987), que estabelece:

CPA $\mu\text{g}/\text{ml} = A \times \text{MW} \times \text{FC} \times 1000/ E$, onde:

A = absorvância do padrão de CPA

MW = 336,4 (peso molecular do CPA)

FC = fator de correção do espectrofotômetro

E = 20400 (absortividade molar do CPA)

Após a determinação da concentração do CPA, a solução foi mantida a 0°C e protegida da luz, para posteriores diluições com metanol, para formar as soluções utilizadas na contaminação das amostras de leite, para os ensaios de recuperação, e

na aplicação em cromatofolhas, na técnica de cromatografia em camada delgada (CCD), por comparação visual, descrita no **item 3.2.2**.

3.1.2 – Ensaios de recuperação da AFM₁ em leite:

Para avaliar a eficiência da metodologia utilizada, na pesquisa de AFM₁ em leite, foram realizados ensaios de recuperação, em amostras artificialmente contaminadas.

As amostras de leite foram artificialmente contaminadas, de maneira a obter níveis de contaminação de 50 e 500 ng/ L de leite. As amostras fortificadas foram preparadas em triplicata, para cada nível de contaminação, e submetidas ao método descrito no **item 3.2.1**, com vistas à obtenção dos percentuais de recuperação e coeficientes de variação dos resultados das análises.

O limite de detecção da técnica foi determinado através da injeção de 20 µl de padrões, progressivamente diluídos, considerando-se, como tal, a massa de toxina capaz de originar uma resposta 3 vezes superior ao desvio padrão da linha de base, nas condições descritas no **item 3.2.1**.

3.1.3 – Ensaios de recuperação do CPA em leite:

Para avaliar a eficiência da metodologia utilizada na determinação de CPA em leite, foram realizados vários ensaios de recuperação, em amostras artificialmente contaminadas, de acordo com PRASONGSIDH *et al.* (1998a).

As amostras de leite foram artificialmente contaminadas, de maneira a obter níveis de contaminação de 5 e 20 ng CPA/ L de leite. Os percentuais de recuperação e coeficiente de variação foram obtidos a partir da fortificação, em triplicata, das

amostras de leite com padrão de CPA, para cada nível de contaminação, submetendo-as ao método descrito no **item 3.2.2.**

O limite de detecção da técnica foi determinado através da aplicação de alíquotas progressivamente menores do padrão, contendo 50 ng CPA/ ml, em placa cromatográfica (cromatofolhas) de sílica gel, submetidas ao método descrito no **item 3.2.2.**

3.2 – Análises laboratoriais:

3.2.1 – Determinação de AFM₁ em leite:

Material:

- cromatógrafo líquido de alta eficiência, Shimadzu[®], equipado com detector de fluorescência (excitação: 360 nm e emissão: 450 nm), coluna Shim-pack 5 µm 6 x 150 mm, precedida de pré-coluna Shin-pack 5 µm 4 x 10 mm;
- colunas de imunoafinidade AflaTest – P, Vicam[®];
- suporte de bomba de duas posições;
- centrífuga de tubos de ensaio;
- água ultra-purificada, Sistema Milli-Q;
- metanol grau HPLC, Merck[®];
- ácido trifluoracético (TFA) p.a., Merck[®];
- frasco âmbar de 2ml;

Análise das amostras:

A determinação de AFM₁, nas amostras de leite, foi efetuada mediante a extração e purificação em coluna de imunoafinidade e quantificação por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), descritas a seguir:

O leite (25 ml), previamente aquecido a 37°C, foi submetido à centrifugação (1.250 x g, 15 min.), em tubos de ensaio, para a retirada da gordura, localizada no sobrenadante.

Posteriormente, o leite foi passado diretamente através de coluna de imunoafinidade (fluxo de 2-3 ml/ min.), sendo a mesma adaptada a uma seringa de vidro e conectada a um sistema de pressão positiva (suporte de bomba). Após a passagem da amostra pela coluna, com a conseqüente fixação das moléculas de AFM₁ pelos anticorpos, passou-se 20 ml de solução de água deionizada-metanol (9+1), de modo a eluir os demais componentes do leite, não necessários à análise.

A AFM₁ foi eluída do conjugado antígeno-anticorpo pela passagem de 1 ml de metanol grau HPLC, sendo o eluato recolhido em frasco âmbar.

O eluato foi diluído com água ultra-purificada, formando uma solução de metanol-água (7+3), semelhante a fase móvel utilizada no cromatógrafo líquido, para obtenção de melhor separação e quantificação dos picos de AFM₁.

A separação e quantificação da AFM₁ foi conduzida em um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência, usando como fase móvel solução de metanol-água (7+3). A partir do cálculo da área do pico da AFM₁, das soluções padrões e do extrato das amostras, foi calculado a massa de AFM₁ presente na amostra, conforme a equação abaixo.

$AFM_1(\mu g) = (G \times S) / H$, onde:

G = área do pico originado pelo extrato da amostra;

S = Massa do padrão de AFM_1 injetado (μg);

H = área do pico originado pelo padrão.

Após a determinação da massa de AFM_1 , presente nas amostras, foi calculada a concentração de AFM_1 no leite, através da equação abaixo, proposta por TUINSTRA *et al.*, (1993).

$AFM_1 \mu g/ L = a \times V_{ext} / V_m \times M$, onde:

a = massa de AFM_1 em nanogramas (ng), correspondente a área do pico de AFM_1 , do extrato da amostra

V_{ext} = volume em que o extrato da amostra foi dissolvido, em microlitros (μl)

V_m = volume da amostra injetada, em microlitros (μl)

M = volume de leite utilizado na análise.

Elaboração da curva de calibração da AFM_1 no aparelho de cromatografia

líquida:

A curva de calibração foi realizada de acordo com os procedimentos preconizados por TUINSTRA *et al.*, (1993).

Os padrões utilizados na elaboração da curva de calibração foram preparados pela diluição de alíquotas convenientes da solução intermediária, contendo 0,2 μg

AFM₁/ml de metanol, de modo a apresentar padrões contendo 0,5; 1,0 e 2,0; 5,0 e 10,0 ng AFM₁/ml de metanol.

Os 5 padrões e os extratos das amostras foram injetados no cromatógrafo líquido de alta eficiência, utilizando os seguintes parâmetros:

- ◆ fase móvel: metanol grau HPLC – água ultra-purificada (7+3);
- ◆ fluxo: 0,5 ml/ minuto;
- ◆ temperatura do forno: 25° C
- ◆ alíquota injetada: 20 µl.

Durante as análises, foi borbulhado gás hélio na fase móvel.

Confirmação da identidade da AFM₁:

A presença de AFM₁, nas amostras de leite positivas, foi confirmada por cromatografia em camada delgada, de acordo com SCOTT (1989), através da derivatização da AFM₁ para AFM_{2a}, por ácido trifluoracético, nas cromatoplasmas de alumínio.

3.2.2 - Determinação de CPA em leite:

Material:

- bicarbonato de sódio p.a., Synth[®];
- metanol p.a., Synth[®];
- hexano p.a., Synth[®];
- ácido clorídrico fumegante 37% p.a., Merck[®];
- clorofórmio p.a., Synth[®];
- éter de petróleo p.a., Merck[®];
- álcool etílico p.a., Synth[®];
- ácido acético p.a., Synth[®];
- 4- dimetilaminobenzaldeído p.a., Merck[®];
- acetato de etila p.a., Merck[®];
- 2-propanol p.a., Merck[®];
- hidróxido de amônio p.a., Merck[®];
- sulfato de sódio anidro p.a., Merck[®];
- sílica gel (70 – 230 mesh ASTM), Merck[®];
- cromatoplasmas de alumínio G 60 (20 x 20 cm);

- becker de vidro, 100, 250 e 500 ml;
- micropipeta de vidro, 10 μ l;
- funil de separação de vidro, 500 ml;
- pipeta volumétrica de vidro, 1, 5, 10 e 25 ml;
- coluna de vidro com válvula, 100 ml;
- evaporador rotativo;
- estufa.

Análise das amostras:

A determinação de CPA, nas amostras de leite, foi efetuada de acordo com a técnica descrita por URANO *et al.* (1992), incluindo as modificações propostas por PRASONGSIDH *et al.* (1998b), e as adaptações necessárias às condições das análises, estando sumarizados a seguir:

A amostra de leite (25 ml) foi adicionada a 25 ml de solução de bicarbonato de sódio a 2% em metanol, em funil de separação e agitada, manualmente, por 5 minutos, sendo essa a primeira partição da toxina (meio básico). Em seguida, foi acrescentado 100 ml de hexano, sendo a solução agitada, manualmente, por 3 minutos, para desgordurar a amostra.

Após a separação das duas fases, a fase hexânica foi descartada, e a fase inferior (metanólica) drenada para outro funil de separação, sendo acrescentado 0,4 ml de ácido clorídrico fumegante 37%, de maneira a obter um pH = 2,0 - 3,0.

À solução acidificada, no funil de separação, foi acrescentado 50 ml de clorofórmio, e agitado, manualmente, por 10 minutos; sendo essa a segunda partição da toxina (meio ácido). A solução resultante foi transferida para tubos de ensaio e centrifugada por 15 minutos a 1250 rpm, de modo a separar a fase clorofórmica da fase metanólica.

A fase clorofórmica, extraída com o auxílio de pipeta volumétrica, foi filtrada em funil analítico, acrescido de sulfato de sódio anidro, e reservada para a próxima etapa.

A fase metanólica retornou ao funil de separação, sendo acrescentado 50 ml de clorofórmio, e agitada a solução, manualmente, por 10 minutos. A solução resultante foi transferida para tubos de ensaio e centrifugada, por 15 minutos, a 1250 rpm, de modo a separar, novamente, a fase clorofórmica da fase metanólica.

A fase metanólica foi descartada e a fase clorofórmica filtrada em funil analítico, acrescido de sulfato de sódio anidro.

Os dois extratos de clorofórmio foram combinados e evaporados, em evaporador rotativo, a 35° C, até próximo a secura.

O resíduo foi ressuspenso em 5 ml de clorofórmio e passado em coluna de sílica gel, de acordo com NORRED (1987).

A coluna foi preparada pela colocação de uma camada de, no máximo, 4 cm de sílica gel, em coluna de vidro, previamente preenchida com clorofórmio. A formação do gel na coluna foi auxiliada pela agitação contínua com bastão de vidro.

O clorofórmio excedente foi drenado, até o nível do gel.

O condicionamento da coluna foi obtido através da passagem de 5 ml de metanol, seguido por 5 ml de clorofórmio e 5 ml de éter de petróleo.

O resíduo de clorofórmio foi transferido, quantitativamente, para a coluna, sendo, posteriormente, lavada com 5 ml de éter de petróleo, 5 ml de clorofórmio e, finalmente, eluída com 20 ml de solução metanol- ácido acético (99+1).

O eluato foi evaporado, até próximo a secura, em evaporador rotativo, a 35°C.

O resíduo foi transferido, quantitativamente, para um frasco de 4 ml, e secado sob atmosfera de nitrogênio. O resíduo final foi ressuspendido, em 200 µl de metanol, para posterior identificação e quantificação por cromatografia em camada delgada (CCD).

A técnica de CCD foi realizada em cromatoplacas de alumínio (20 x 20 cm), divididas em 4 partes iguais (10 x 10cm).

Os padrões e as amostras foram aplicados, com o auxílio de micropipeta de 10 µl, a 1cm da base inferior da cromatoplaca, com espaçamento de 1 cm entre eles.

Os padrões foram aplicados em 3 níveis diferentes (2,5; 5 e 10 ng de CPA) e as amostras em alíquotas de 10 µl.

A fase móvel escolhida foi a solução de acetato de etila – 2-propanol – hidróxido de amônio (50:15:10), em corrida unidimensional, descrita por LANSDEN (1986), em cuba cromatográfica saturada.

Após a corrida cromatográfica, a cromatoplaça foi retirada da cuba, e secada em estufa a 35° C, por 3 minutos.

Em seguida, foi realizada a aspensão de reativo de Erlich (LANSDEN 1986), sobre toda a placa, para a observação de mancha de coloração púrpura, após cerca de 4 minutos. Nestas condições, a mancha permaneceu evidente, por aproximadamente, 7 minutos.

Nas amostras artificialmente contaminadas com CPA, durante os ensaios de recuperação, a quantificação foi realizada pela comparação visual da mancha da amostra, com alíquotas convenientes do padrão.

Confirmação da identidade do CPA:

O ácido ciclopiazônico não apresenta característica fluorescente, como a AFM₁. A olho nu, o CPA se apresenta incolor, devendo ser realizada uma reação com reativo de Erlich (GALLAGHER *et al.* 1978; LANSDEN 1986; DORNER *et al.* 1994; GQALENI *et al.* 1996), para o desenvolvimento de coloração púrpura, utilizada na identificação e confirmação do CPA.

O reativo de Erlich escolhido, na identificação e confirmação do CPA, foi desenvolvido por LANSDEN (1986), através da dissolução de 1 g de 4-dimetilaminobenzaldeído em 75 ml de etanol, sendo, posteriormente, acrescido 25 ml de ácido clorídrico.

O reativo de Erlich foi aspergido em cima da cromatoplaça, após a ocorrida cromatográfica e secagem em estufa.

3.3 – Amostras:

Foram colhidas 40 amostras de leite, sendo 10 amostras para cada tipo de leite (A, B, C e Longa Vida), pertencentes a 2 marcas diferentes, para cada tipo de leite, em hipermercados e padarias, localizados no Município de São Paulo.

O período de colheita iniciou no mês de janeiro de 2002, estendendo até maio de 2002, tomando o cuidado de evitar a repetição dos lotes de amostras já colhidas.

A unidade amostral foi constituída por 1 embalagem original de 1 litro, fechada. Foram colhidas 8 amostras de leite/ mês, retirando-as, ao acaso, das unidades disponíveis nas gôndolas. A colheita foi efetuada na primeira semana de cada mês.

As amostras colhidas foram identificadas e armazenadas em caixa isotérmica contendo gelo, e enviadas ao Laboratório de Tecnologia de Produtos de Origem Animal, da FMVZ/USP, em Pirassununga/SP, para a realização das análises.

As amostras foram congeladas, após a chegada ao Laboratório, para evitar possíveis perdas das toxinas, durante a armazenagem. As amostras foram analisadas, no máximo, 20 dias, após a chegada ao laboratório.

GALVANO *et al.* (1996) sugeriram haver pouca perda de aflatoxina M₁ em leite mantido congelado a -18°C por até 53 dias, e PRASONGSIDH *et al.* (1997) observaram que amostras de leite mantidas congeladas a -18°C, por até 140 dias, apresentaram perda de ácido ciclopiazônico inferior a 12%.

3.4 – Estimativa da ingestão diária média (IDM) das micotoxinas:

A estimativa da ingestão diária média de AFM₁ foi baseada nos níveis obtidos nos diferentes tipos de leite analisados. Para isto, adotou-se o valor de consumo diário de leite de 720 ml, para crianças de 4 meses de idade, as quais apresentam o maior consumo deste produto, de acordo com OLIVEIRA *et al.* (1997).

O valor da ingestão diária média de AFM₁, por unidade de peso corpóreo, expresso em ng/ Kg p.c./ dia, foi baseado no peso de 7 Kg, estimado pela Fundação IBGE (1977), para crianças do sexo masculino, de 4 meses de idade, residentes no Município de São Paulo.

3.5 – Procedimentos estatísticos:

Os resultados obtidos nos ensaios de recuperação da AFM₁ e do CPA, em amostras de leite artificialmente contaminadas, foram submetidos a tratamento estatístico para o cálculo da média, desvio padrão e desvio padrão relativo (coeficiente de variação), de acordo com DUX (1986), com a finalidade de verificar a precisão do método de análise, frente a cada um dos níveis de contaminação utilizados nas amostras.

Os resultados obtidos nas análises em leite de consumo foram submetidos às medidas de posição e dispersão (média, variância e desvio padrão). Às amostras que apresentaram níveis detectáveis de AFM₁ foram aplicadas a distribuição normal com o teste “Z”, para as duas médias independentes ($\alpha = 0,05$ e “Z _{α} ” = 1,96), determinando a existência de diferenças significantes entre as concentrações de AFM₁, presentes nos diferentes tipos de leite, de acordo com BERQUÑO *et al.* (1981).

4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO:

4.1 - Avaliação do desempenho dos métodos em condições experimentais:

O fator de correção do espectrofotômetro apresentou valor de 0,98, estando apto para determinar as concentrações dos padrões de AFM₁ e CPA, de acordo com SCOTT (1990), que preconiza valor não inferior a 0,95 e nem superior a 1,05.

4.1.1 – Resultados dos ensaios de recuperação da AFM₁ em amostras de leite:

Os percentuais de recuperação e coeficientes de variação obtidos a partir da fortificação, em triplicata, do leite com padrão de AFM₁, estão apresentados na **Tabela 2**.

A **Tabela 2** mostra que houve melhor recuperação média nas amostras contaminadas experimentalmente com 50 ng/L de AFM₁ (93,6%), quando comparada às 500 ng/L (67,5%).

As análises efetuadas com a amostra controle, não contaminada experimentalmente, revelaram-se negativas para AFM₁, confirmando a ausência dessa toxina em níveis acima de 10,6 ng/L, limite mínimo de quantificação do método exposto, no leite utilizado no preparo das amostras para os ensaios de recuperação.

Tabela 2. Resultados das recuperações médias e coeficientes de variação obtidos em leite não contaminado e contaminado experimentalmente com 50 e 500 ng/L de AFM₁.

AFM ₁ Quantidade Adicionada (ng/L)	AFM ₁ Quantidade Encontrada (ng/L)	Média (ng/L)	Recuperação Média (%)	Coefficiente de Variação (%)
0	0	0	-	-
50	45,2 46,4 48,8	46,8	93,6	3,9
500	417,6 255 340,4	337,7	67,5	24,1

Os valores médios de recuperação e coeficiente de variação obtidos nas amostras contaminadas com 50 ng/ L, 93,6% e 3,9%, respectivamente, demonstraram uma alta eficiência do método para baixos níveis de contaminação. Esses resultados estão coerentes com os observados por outros pesquisadores em ensaios de

recuperação em níveis de até 200 ng AFM₁/ L de leite (TUINSTRA *et al.* 1993; GALVANO *et al.* 1998; PRADO *et al.* 1999; MARKAKI & MELISSARI 1997).

PRADO *et al.* (1999), utilizando coluna de imunoafinidade como técnica de purificação e CLAE na quantificação, obtiveram recuperação média de 88,9% e coeficiente de variação de 22,4%, em amostras contaminadas artificialmente com 45 ng/ L de leite.

Contudo, nos ensaios com amostras contaminadas com 500 ng/ L foram observados baixos valores médios de recuperação e altos coeficientes de variação, 67,5 e 24,1%, respectivamente. O limite máximo de quantificação para a coluna de imunoafinidade Aflatest-P, de acordo com o fabricante, é de 500 ng/ L de leite. Os resultados observados indicam uma baixa sensibilidade dessas colunas, para esse nível de contaminação.

Nas condições realizadas no Laboratório, o limite de detecção do método foi de 0,005 ng de AFM₁ em injeção de 20 µl do padrão, sendo esse limite estabelecido através da injeção do padrão, o qual foi diluído progressivamente, de modo a originar uma resposta 3 vezes superior ao desvio padrão da linha de base, nas condições descritas para a corrida cromatográfica.

O **Gráfico 1** exibe a curva de calibração dos padrões de AFM₁ (0,5; 1,0 e 2,0; 5,0 e 10,0 ng AFM₁/ml) em CLAE e a **Figura 4** o cromatograma em CLAE do pico do padrão com 5 ng AFM₁/ml, ambos submetidos ao método descrito no item 3.2.1.

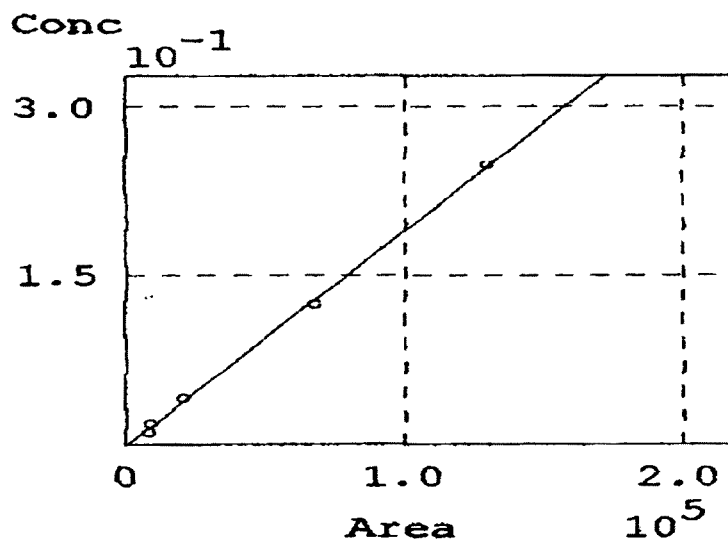


Gráfico 1. Gráfico da curva de calibração dos padrões de AFM₁ contendo 0,5; 1,0 e 2,0; 5,0 e 10,0 ng AFM₁/ml, em aparelho CLAE.

A curva de calibração com 5 padrões apresentou lineariedade com $r^2 = 0,998$, estando apta a determinar as concentrações AFM₁, presentes nas amostras de leite.

Nas condições realizadas, o tempo de retenção do pico de AFM₁ foi de 3,9 minutos. Nota-se, na **Figura 4**, a presença do pico de metanol antes do padrão. Apesar da proximidade de ambos, não houve comprometimento dos resultados das análises.

O limite de quantificação do método, nessas condições, foi de 10,6 ng AFM₁ / L de leite, sendo estimado como o menor nível detectado nas amostras (MOTTA & VALENTE SOARES 2000).

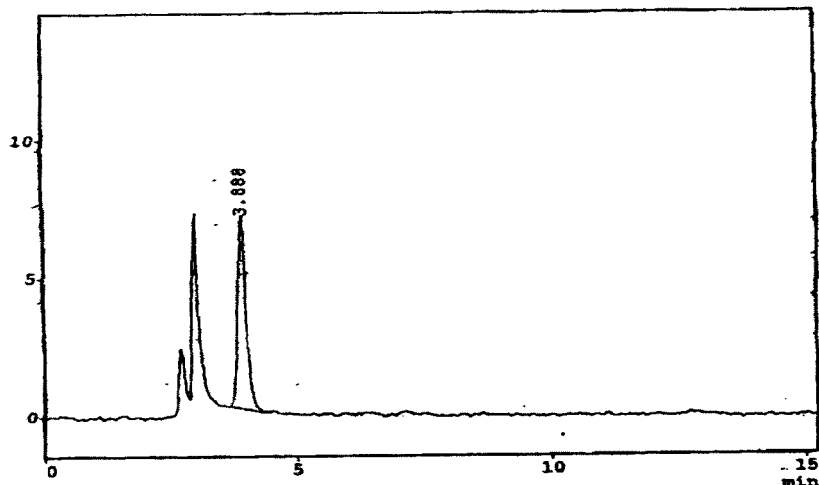


Figura 4. Cromatograma em CLAE do pico do padrão de AFM₁ (5 ng/ ml)

4.1.2 – Resultados dos ensaios de recuperação do CPA em amostras de leite:

Os ensaios de recuperação foram realizados em 2 níveis de contaminação (5 e 20 µl de CPA/ L de leite). As amostras fortificadas foram preparadas em triplicata, para cada nível de contaminação, e submetidas ao método descrito no **item 3.2.2**, com vistas à obtenção dos percentuais de recuperação e coeficientes de variação dos resultados das análises.

Percentuais de recuperação e coeficientes de variação obtidos da fortificação, em triplicata, de leite com padrão de CPA, estão apresentados na **Tabela 3**.

As análises efetuadas com a amostra controle, não contaminada experimentalmente, revelaram-se negativas para CPA, confirmando a ausência desta toxina em níveis abaixo de 3 µg/ L, no leite utilizado no preparo das amostras para os ensaios de recuperação.

Nas amostras contaminadas com 5 e 20 μg de CPA/ L de leite foram observados valores de recuperações médios de 74,6% e 82%, e de coeficientes de variação médios de 10,8% e 18,2%, respectivamente.

Os resultados observados estão coerentes com os encontrados por pesquisadores analisando outros substratos, como amendoim (LANSDEN, 1986), carne de frango (NORRED, 1987), milho e amendoim (URANO *et al.*, 1992) e produtos a base de tomate (MOTTA & SOARES, 2000).

Os limites de detecção e quantificação do método em CCD, nas condições realizadas, foram de 2,5 ng de CPA e de 3,0 μg / L, respectivamente. Deve-se salientar que esses resultados foram expressivos, uma vez que os limites de detecção e de quantificação observados por outros pesquisadores situaram-se entre 20-26 ng e 25-100 μg / Kg, respectivamente (URANO *et al.*, 1992a; URANO *et al.*, 1992 b; LANSDEN & DAVIDSON, 1983 e LANSDEN, 1986).

TABELA 3. Resultados das recuperações médias e coeficientes de variação obtidos em leite não contaminado e contaminado experimentalmente com 5 e 20 ng/L de CPA.

CPA Quantidade Adicionada (ng/L)	CPA Quantidade Encontrada (ng/L)	Média (ng/L)	Recuperação Média (%)	Coefficiente de Variação (%)
0	0	0	-	-
5	0			
	3,7			
	4,1	3,7	74,6	10,8
	3,3			
20	17,6			
	18,6	16,4	82	18,2
	13			

4.2 – Resultados das análises nas amostras em leite de consumo:

Aflatoxina M₁:

Os níveis de AFM₁ encontrados nas amostras de leite estão apresentados na

Tabela 4.

Tabela 4. Incidência de aflatoxina M₁ em leite de consumo tipos A, B, C e Longa Vida, comercializados no Município de São Paulo-SP, durante o período de janeiro a maio de 2002.

Tipo de leite	Nº amostras analisadas	Amostras positivas ^a n (%)	Faixa ^b (ng/L)	Média (ng/L)	>50 ng/L ^c n (%)	>500 ng/L ^d n (%)
A	10	3 (30%)	14,4 – 26,6	5,9	0	0
B	10	6 (60%)	10,6 – 121,2	26,6	2 (20%)	0
C	10	6 (60%)	11,4 – 51,4	19,8	1 (10%)	0
Longa Vida	10	8 (80%)	11,4 – 45,4	22,2	0	0
Total	40	23 (57,5%)	10,6 – 121,2	18,6	3 (7,5%)	0

^a Amostras positivas >10,6 ng AFM₁/L

^b Níveis mínimos e máximos detectados nas amostras analisadas

^c Limite máximo de AFM₁ em leite aceito pela Comunidade Européia (C.E. 1998)

^d Limite máximo de AFM₁ em leite aceito pelo Brasil (BRASIL 2002)

Observa-se que das 40 amostras analisadas, 23 (57,5%) apresentaram AFM₁ em níveis que variaram de 10,6 a 121,2 ng/L de leite. No entanto, todas as amostras positivas encontraram-se dentro do limite aceito pelo Brasil e E.U.A. (GALVANO *et al.* 1996), enquanto 3 amostras estavam com níveis acima de 50 ng/L, que é a tolerância máxima aceita pela Comunidade Européia (C.E. 1998). A julgar pelo baixo nível de tolerância estabelecido pela Comunidade Européia, deduz-se que foi adotado com base nos limites de detecção dos métodos analíticos disponíveis (STOLOFF *et al.* 1991).

GALVANO *et al.* (1996) observaram que a incidência de AFM₁, em leite e produtos lácteos, realizadas em vários países, demonstraram elevados percentuais de contaminação, principalmente utilizando técnicas analíticas sensíveis a baixos níveis de contaminação.

MARKAKI & MELISSARI (1997), GALVANO *et al.* (1998), KIM *et al.* (2000), MARTINS & MARTINS (2000) e SAITANU (1997) observaram, em seus respectivos países, contaminações em mais de 75% das amostras de leite analisadas, utilizando CLAE como método de quantificação das amostras. Os autores obtiveram um limite de quantificação entre 1–15 ng AFM₁/ L de leite.

No Brasil, MARTINS & MARTINS (1986), SABINO *et al.* (1989), OLIVEIRA *et al.* (1997) e JUSSARA (2000) detectaram percentuais de contaminação entre 1,8-18% nas amostras de leite analisadas. Os limites de quantificação observados pelos autores, obtidos através de diferentes técnicas analíticas, variaram de 100-250 ng/L de leite.

Os trabalhos citados acima, realizados no Brasil, indicam que a frequência de AFM₁ em nossas condições é relativamente baixa, quando comparada com as recentes pesquisas realizadas no exterior. Porém, os resultados encontrados no presente estudo, utilizando uma técnica analítica mais sensível, demonstrou uma alta porcentagem de amostras positivas no Município de São Paulo, bem como os resultados encontrados por PRADO *et al.*, (1999) que demonstraram altos percentuais de contaminação, observando 82% de amostras positivas, em leite pasteurizado, coletadas no estado de Minas Gerais, em níveis entre 6-77 ng/ L. Os autores atribuíram a alta frequência observada às técnicas analíticas mais sensíveis, atualmente disponíveis, utilizadas na extração, purificação e quantificação da AFM₁ em amostras de leite.

Observando a **Tabela 4** nota-se uma ocorrência de AFM₁ nas amostras de leite tipo A de 30% e uma contaminação média de 5,9 ng/ L, enquanto os outros tipos de leite apresentaram ocorrência igual ou superior a 60%, com níveis médios acima de 19 ng/L.

Dessa forma, foram determinadas as medidas de posição e dispersão dos resultados, aplicando a distribuição normal com o teste “Z” para as duas médias independentes ($\alpha= 0,05$ e “Z”= 1,96), e observou-se a existência de diferenças significativas entre as concentrações de AFM₁ no leite tipo A, quando comparado com os tipos C e Longa Vida, de acordo com BERQUO *et al.*, (1981), podendo os resultados serem observados na **Tabela 5**.

De acordo com o ANUALPEC (2001), os diferentes tipos de leite estudados, na presente pesquisa, tiveram uma participação no mercado consumidor de 0,83%,

7,5%, 33,3% e 58,3%, para os tipos de leite A, B, C e Longa Vida, respectivamente. Portanto, o tipo de leite que, na presente pesquisa, apresentou uma menor incidência e média de contaminação por AFM₁, representa menos de 1% do consumo total de leite fluido pela população.

Tabela 5. Valores de estatística “Z” e sua significância ao teste das médias referentes às concentrações de AFM₁, obtidas nas amostras dos tipos de leite A, B, C e Longa Vida, comercializados no município de São Paulo, no período de janeiro a maio de 2002.

Tipos de Leite	Valor de “Z”
A e B	1,65
A e C	1,97*
A e Longa Vida	2,57*
B e C	0,49
B e Longa Vida	0,33
C e Longa Vida	0,29

*Significante para $\alpha = 0,05$ e “Z” = 1,96

É extremamente importante confirmar a identidade das micotoxinas, devido a presença de substâncias interferentes que podem acarretar resultados falso positivo (SABINO *et al.* 1989). Porém, a confirmação da identidade da AFM₁ foi realizada

apenas na amostra que apresentou nível de contaminação de 121 ng/L, devido ao baixo limite de quantificação observado na técnica.

Ácido Ciclopiazônico:

A pesquisa de CPA, realizada nas 40 amostras de leite, colhidas no Município de São Paulo, não revelou nível detectável. O limite de quantificação do método em apreço, nas condições de execução descritas, foi de 3 µg/ L de leite.

DORNER *et al.* (1994) observaram um alto nível de ácido ciclopiazônico, não metabolizado, no leite de ovelhas lactantes. Os autores administraram doses orais de CPA para 3 ovelhas lactantes e observaram uma alta concentração de CPA no leite (236 ng/g), 24 horas após sua introdução; após a segunda dose, a concentração do CPA no leite dobrou (568 ng/g), mantendo-se em níveis altos por três dias, após a sua retirada da ração. Infelizmente, os dados fornecidos pelos autores não permitem uma estimativa da taxa de transferência do CPA, fornecidos às ovelhas, para o leite. O nível de CPA observado no leite foi muito acima do que o encontrado por outros autores em experimentos com AFB₁ no leite, como uma porcentagem da AFB₁ ingerida na ração (FROBISH *et al.*, 1986; PATTERSON *et al.*, 1980; PRICE *et al.*, 1985).

Pelo exposto acima, esperava-se observar amostras de leite positivas para CPA, principalmente naquelas com níveis de AFB₁ acima de 100 ng/ L, devido a produção concomitante de CPA e AFB₁ pelo *A. flavus* (GQALENI *et al.*, 1996).

Portanto, devido a boa eficiência da metodologia de análise de CPA em leite, desenvolvida na presente pesquisa, e comprovada através de ensaios de recuperação,

como exposto na **Tabela 3**, pode-se inferir que o leite de vaca analisado, consumido no Município de São Paulo, de janeiro a maio de 2002, não apresentou CPA em nível superior a 3 µg/L de leite.

Porem, deve-se ressaltar que LOSITO *et al.* (2002) encontraram 3 amostras positivas para CPA, utilizando o método CLAE, em níveis de 4,5– 8,3 µg/ L, analisando 20 amostras de leite comercial , na Itália.

4.3 –Estimativa da ingestão diária média (IDM) de AFM₁:

Os resultados da IDM de AFM₁, através dos diferentes tipos de leite, estão apresentados na **Tabela 6**.

Nota-se, na **Tabela 6**, que apenas o leite tipo A apresentou valor de IDM dentro dos valores para a ingestão diária tolerável (IDT) de AFM₁ proposto por CULLEN *et al.* (1987) e por KUIPER-GOODMAN (1990) de 0,5 e 0,2 ng/Kg p.c./dia, respectivamente. Nota-se, também, que o leite tipo Longa Vida apresentou valor de IDM 10 vezes acima do observado no leite tipo A. Esses resultados podem ser devido a alimentação dos animais com rações contendo diferentes níveis de aflatoxina, variedade genética dos animais e/ ou resistência, além de outros fatores que podem estar envolvidos (PATTERSON *et al.* 1980; PRICE *et al.* 1985; FROBISH *et al.* 1986).

A ingestão diária média de AFM₁ de 1,64; 1,22 e 1,82 para os leites tipo B, C e Longa Vida, estimada no presente trabalho, revelou-se muito acima dos valores de IDT mencionados para a AFM₁. Contudo, existem controvérsias a respeito da validade desses valores, devido, sobretudo, aos problemas decorrentes 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 doses baixas (KUIPER-GOODMAN, 1990). Além disso, a potência carcinogênica da AFB₁ no organismo humano é considerada 10 vezes menor do que a observada em ratos da cepa Fischer (WOGAN, 1992), realçando as diferenças interespecies.

Apesar das dificuldades no estabelecimento de níveis seguros para o consumo de micotoxinas, é importante ressaltar que o consumo diário de alimentos contaminados, ainda que em níveis baixos, por longo período de tempo, posa como a principal forma de intoxicação por micotoxinas, a micotoxicose crônica, responsável por carcinomas, imunossupressão, lesões hepáticas e renais e perda de peso. Somado a possível interação com outras micotoxinas, presentes em vários tipos de alimentos, podem acarretar danos irreversíveis à população exposta, principalmente a infantil (KUIPER-GOODMAN, 1990).

Tabela 6. Estimativa da ingestão diária média (IDM) de AFM₁, através dos leites tipos A, B, C e Longa Vida, colhidos no Município de São Paulo, entre os meses de janeiro a maio de 2002, adotando-se para tal, parâmetros de crianças do sexo masculino de 4 meses de idade.

Tipos de leite	Nível médio de contaminação por AFM ₁ (ng/L)	Amostras positivas para AFM ₁ (%)	Estimativa da ingestão diária de AFM ₁ por unidade de peso corpóreo* (ng/Kg p.c./dia)
A	5,9	30%	0,18
B	26,6	60%	1,64
C	19,8	60%	1,22
Longa Vida	22,2	80%	1,82

*Adotando-se consumo de 720 ml de leite e peso médio de 7 Kg (OLIVEIRA *et al.*, 1997)

5 - CONCLUSÕES:

- ◆ Os resultados obtidos, durante os procedimentos de avaliação do desempenho dos métodos analíticos, em amostras de leite contaminadas artificialmente com AFM₁ e CPA, pode-se concluir que ambos são apropriados para pesquisas e levantamentos sobre a ocorrência destas micotoxinas, em amostras de leite;

- ◆ Não foi observada nenhuma amostra positiva para CPA, em níveis acima de 3 µg/L de leite;

- ◆ O percentual de amostras de leite de consumo positivas para AFM₁ foi de 30, 60, 60 e 80% para os leites tipo A, B, C e Longa Vida, respectivamente, com valores médios de 5,9; 26,6; 19,8 e 22,2 ng/L para os leites tipo A, B, C e Longa Vida, respectivamente;

- ◆ Não foi observada amostra com nível de contaminação por AFM₁ acima do permitido pela legislação brasileira vigente;

- ◆ A estimativa de ingestão diária média (IDM) de AFM₁, em crianças de 4 meses, com 7 Kg de peso e com consumo médio de 720 ml de leite, foi de 0,18; 1,64; 1,22 e 1,82 ng/Kg p.c./dia, para os tipos de leite A, B, C e Longa Vida, respectivamente.

- ◆ Apenas o leite tipo A apresentou valor de ingestão diária média (IDM) dentro dos valores de ingestão diária tolerável (IDT) propostos para a AFM₁.

6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- 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.** 1982; 45: 752-77.
- ANTONY, M., SHUKLA, Y., JANARDHANAN, K. K. Potential risk of acute hepatotoxicity of kodo poisoning due to exposure to cyclopiazonic acid. **J. Ethnopharmacol.** 2003; 87 (2- 3): 211- 4.
- BAILEY, G. S., PRICE, R. L., PARK, D. L., HENDRICKS, J. D. Effect of ammoniation of aflatoxin B₁ contaminated cottonseed feedstock on the aflatoxin M₁ content of cow's milk and hepatocarcinogenicity in trout bioassay. **Food Chem. Toxic.** 1994; 32 (8): 707- 15.
- BALACHANDRAN, C., PARTHASARATHY, K. R. Influence of dietary rice culture material containing cyclopiazonic acid on certain serum biochemical parameters of broiler chickens. **Mycopathologia** 1995; 132 (3): 161-6.
- BALACHANDRAN, C., PARTHASARATHY, K. R. Occurrence of cyclopiazonic acid in feeds and feedstuffs in Tamil Nadu, India. **Mycopathologia** 1996; 133: 159-62.
- BALDISSERA, M. A.; SANTURIO, J. M.; CANTO, S. H.; PRANKE, P.H.; ALMEIDA, C.A.A.; SCHIMIDT, C. Aflatoxinas, ocratoxina A e zearalenona em alimentos para consumo animal no Sul do Brasil – Parte II. **Rev. Inst. Adolfo Lutz** 1993; 53 (1/2): 5-10.
- BERQUÓ, E.S.; SOUZA, J.M.P.; GOTLIEB, S.L.D. **Bioestatística.** São Paulo, 1981; EPU.

- BLANCO, J.L., DOMINGUEZ, L., GOMEZ-LUCIA, E., GARAYZABAL, J.F., GARCIA, J.A., SUAREZ, G. Presence of aflatoxin M₁ in commercial ultra-high-temperature-treated milk. **Appl. Environ. Microbiol.** 1988; 54: 1622-23.
- BOISSEAU, J. Relay toxicity. **Drug Metabol. Rev.** 1990; 22: 685- 97.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA. Portaria MA/ SNAD/ SFA nº 07 de 09/11/88. **Diário Oficial da União** , Brasília, 9 nov. 1988. Seção I, p. 21968.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA. Portaria MAARA No.183 de 21 de março de 1996. **Diário Oficial da União**, Brasília, 25 de março de 1996. Seção I, p. 4929.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Resolução RDC nº 274, da ANVISA, de 15 de outubro de 2002. **Diário Oficial da União**, Brasília, 16/10/2002.
- BYREM, T. M., PESTKA, J. J., CHU, F. S., STRASBURG, G. M. Analysis and pharmacokinetics of cyclopiazonic acid in market weight pigs. **J. Anim. Sci.** 1999; 77 (1): 173- 9.
- [CE] Comunidades Européias. **Regulamento CE n.º 1525/98**. Jornal Oficial das Comunidades Européias, 1998. (Diretiva das Comunidades Européias).
- CHU, F.S. Mycotoxins: food contamination, mechanism, carcinogenic potencial and preventive measures. **Mutat. Res.** 1991; 259: 291-306.
- COLLINS, G. J., ROSEN, J. D. Gas-liquid chromatographic/mass spectrometric screening method for T-2 toxin in milk. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.** 1979; 62 (6): 1274- 80.

- CORBETT, W. T., HAGLER, W. M. An epidemiological investigation associating aflatoxin M₁ with milk production in dairy cattle. **Vet. Hum. Toxicol.** 1988; 30 (1): 5-8.
- CORREA, B., GALHARDO, M., COSTA, E. O., SABINO, M. Distribution of molds and aflatoxins in dairy cattle feeds and raw milk. **Rev. Microbiologia** 1997; 28: 279-83.
- COSTA, G. L., OLIVEIRA, P. C. Penicillium species in mosquitoes from two Brazilian regions. **J. Basic Microbiol.** 1998; 38 (5-6): 343-7.
- COTE, L. M., DAHLEM, A. M., YOSHIKAWA, T., SWANSON, S. P., BUCK, W. B. Excretion of deoxynivalenol and its metabolite in milk, urine, and feces of lactating dairy cows. **J. Dairy Sci.** 1986; 69 (9): 2416- 23.
- COULOMBE, R. A. Aflatoxins. In: Sharma, R.P. & Salunkhe, D.K., eds. **Mycotoxins and phytoalexins.** Boca Raton, CRC Press, 1991; 103-43.
- 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.** 1987; 47: 1913-17.
- CULLEN, J. M., WILSON, M., HAGLER, W. M. JR., ORT, J. F., COLE, R. J. Histologic lesions in broiler chicks given cyclopiazonic acid orally. **Am. J. Vet. Res.** 1988; 49 (5): 728- 31.
- DORNER, J. W., COLE, R. J., LOMAX, L. G., GOSSER, H. S., DIENER, U. L. Cyclopiazonic acid production by *Aspergillus flavus* and its effects on broiler chickens. **Appl. Environ. Microbiol.** 1983; 46 (3): 698- 703.

- DORNER, J.W., COLE, R.J., DIENER, U.L. Relationship of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus* with reference to production of aflatoxins and cyclopiazonic acid. **Mycopathologia** 1984; 87: 13-15.
- DORNER, J.W., COLE, R.J., ERLINGTON, D.J., SUKSUPATH, S., MC DOWELL, G.H., BRYDEN, W.L. Cyclopiazonic acid residues in milk and eggs. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 1994; 42: 1516-8.
- DRAGACCI, S., GLEIZES, E., FREMY, J. M., CANDLISH, A. G. Use of immunoaffinity chromatography as a purification step for the determination of aflatoxin M₁ in cheeses. **Food Addit. Contam.** 1995; 12 (1): 59-65.
- DUTTON, M. F., WESTLAKE, K. Occurrence of mycotoxins in cereals and animal feedstuffs in Natal, South Africa. **Chemical Contaminants Monitoring** 1985; 68 (5): 839-842.
- DUX, J. P. Handbook of quality assurance for the analytical chemistry laboratory. New york, Van Nostrand Reinhold, 1986.
- EL-NEZAMI, H. S., NICOLETTI, G., NEAL, G. E., DONOHUE, D. C., AHOKAS, J. T. Aflatoxin M₁ in human breast milk samples from Victoria, Australia and Thailand. **Fd. Chem. Toxic.** 1995; 33 (3): 173-179.
- FITZPATRICK, D.W. Mycotoxins in the food chain: nutritional and toxicological considerations. **Can. J. Physiol. Pharmacol.** 1990; 68: 979-81.
- FREIRE, F. C., KOZAKIEWICZ, Z., PATERSON, R. R. Mycoflora and mycotoxins in Brazilian black pepper, white pepper and Brazil nuts. **Mycopathologia** 2000; 149 (1): 13- 9.

- FROBISH, R.A., BRADLEY, B.D., WAGNER, D.D., LONG-BRADLEY, P.E., HAIRSTON, H. Aflatoxin residues in milk of dairy cows after ingestion of naturally contaminated grain. **J. Food Prot.** 1986; 49: 781-5.
- FUNDAÇÃO IBGE. Estudo Nacional de Despesa Familiar. Consumo Alimentar – antropometria. Região II: São Paulo. Rio de Janeiro, 1977; v. 1.
- FURLONG, E. B.; SOARES, L. A. S.; VIEIRA, A. P.; DADALT, G. Aflatoxinas, ocratoxina A e zearalenona em alimentos da região sul do Rio Grande do Sul. **Rev. Inst. Adolfo Lutz** 1999; 58 (2): 105-111.
- GALLAGHER, R. T., RICHARD, J. L., STAHR, H. M., COLE, R. J. Cyclopiazonic acid production by aflatoxigenic and non-aflatoxigenic strains of *Aspergillus flavus*. **Mycopathologia** 1978; 66 (1-2): 31-6.
- GALVANO, F., GALOFARO, V., GALVANO, G. Occurrence and stability of aflatoxin M₁ in milk and milk products: a worldwide review. **J. Food Protection** 1996; 59: 1079-90.
- GALVANO, F., GALOFARO, V., DE ANGELIS, A., GALVANO, M., BOGNANNO, M., GALVANO, G. Survey of the occurrence of aflatoxin M₁ in dairy products marketed in Italy. **J. Food Prot.** 1998; 61: 738-41.
- GARRIDO, N. S., IHA, M. H., SANTOS, O. M. R., DUARTE, F. R. M. Occurrence of aflatoxins M (1) and M (2) in milk commercialized in Ribeirao Preto-SP, Brazil. **Food Addit. Contam.** 2003; 20 (1): 70- 3.
- GENTLES, A., SMITH, E. E., KUBENA, L. F., DUFFUS, E., JOHNSON, P., THOMPSON, J., HARVEY, R. B., EDRINGTON, T. S. Toxicological evaluations of cyclopiazonic acid and ochratoxin A in broilers. **Poult. Sci.** 1999; 78 (10): 1380- 4.

- GONG, Y. Y., EGAL, S., HOUNSA, A., TURNER, P.C., HALL, A. J., CARDWELL, K. F., WILD, C. P. Determinants of aflatoxin exposure in young children from Benin and Togo, West Africa: the critical role of weaning. **Int J Epidemiol.** 2003; 32 (4):556-62.
- GQUALENI, N., SMITH, J.E., LACEY, J. Co-production of aflatoxins and cyclopiazonic acid in isolates of *Aspergillus flavus*. **Food Addit. Contam.** 1996; 13: 677-85.
- HANSEN, T. J. Affinity column cleanup and direct fluorescence measurement of Aflatoxin M₁ in raw milk. **Journal of Food Protection** 1990; 53 (1): 75-7.
- HENDRICKSE, R. G. Kwashiorkor: the hypothesis that incriminates aflatoxins. **Pediatrics** 1991; 88: 376-9.
- HILL, J. E., LOMAX, L. G., COLE, R. J., DORNER, J. W. Toxicologic and immunologic effects of sublethal doses of cyclopiazonic acid in rats. **Am. J. Vet. Res.** 1986; 47 (5): 1174- 7.
- HIROOKA, E. Y., YAMAGUCHI, M. M., AOYAMA, S., SUGIURA, Y., UENO, Y. The natural occurrence of fumonisins in Brazilian corn kernels. **Food Addit. Contam.** 1996; 13 (2): 173-83.
- HSIEH, D. P. H., CULLEN, J. M., RUEBNER, B. H. Comparative hepatocarcinogenicity of aflatoxins B₁ and M₁ in the rat. **Food Chem. Toxic.** 1984; 22 (12): 1027-8.
- HOLZAPFEL, C. W. The isolation and structure of cyclopiazonic acid, a toxic metabolite of *Penicillium cyclopium* Westling. **Tetrahedron** 1968; 24: 2101- 19.
- HORWITZ, W., ALBERT, R., NESHEIM, S. Reliability of mycotoxin assays – an update. **J. AOAC Int.** 1993; 76 (3): 461-91.

- IOANNOU-KAKOURI, E., CHRISTODOULIDOU, M., CHRISTOU, E., CONSTANTINIDOU, E. Immunoaffinity column/HPLC determination of aflatoxin M₁ in milk. **Food and Agricultural Immunology** 1995; 7: 131-7.
- JASKIEWICZ, K., CLOSE, P. M., THIEL, P. G., COLE, R. J. Preliminary studies on toxic effects of cyclopiazonic acid alone and in combination with aflatoxin B₁ in non-human primates. **Toxicology** 1998; 52 (3): 297- 307.
- JUSSARA, A. T. Ocorrência de aflatoxina M₁ em amostras de leite comercializado na cidade de São Paulo. São Paulo; 2000. [Tese de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo].
- KIM, E. K., SHON, D. H., RYU, D., PARK, J. W., HWANG, E. K., KIM, Y. B. Occurrence of aflatoxin M₁ in Korean dairy products determined by ELISA and HPLC. **Food Addit. Contam.** 2000; 17 (1): 59-64.
- KUIPER-GOODMAN, T. Uncertainties in the risk assessment of three mycotoxins: aflatoxin, ochratoxin and zearalenone. **Can. J. Physiol. Pharmacol.** 1990; 68: 1017- 24.
- KUIPER-GOODMAN, T. Risk assessment to humans of mycotoxins in animal-derived food products. **Vet. Hum. Toxicol** 1991; 33 (4): 325-33.
- KIM, E.K., SHON, D.H., RYU, D., PARK, J.W., HWANG, H.J., KIM, Y.B. Occurrence of aflatoxin M₁ in Korean dairy products determined by ELISA and HPLC. **Food Addit. Contam.** 2000; 17: 59-64.
- LAFONT, P., LAFONT, J. Génotoxicité des hydroxyl-aflatoxines du lait. **Journées d'Études** 1987; 25-7.
- LANSDEN, J. A., DAVIDSON, J. I. Occurrence of cyclopiazonic acid in peanuts. **Applied and Environmental Microbiology** 1983; 45 (3): 766-9.

- LANSDEN, J. A. Determination of cyclopiazonic acid in peanuts and corn by thin layer chromatography. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.** 1986; 69 (6): 964-6.
- LEE, S., CHU, F. S. Radioimmunoassay of T-2 toxin in biological fluids. **J Assoc Off Anal Chem.** 1981; 64 (3): 684- 8.
- LEE, Y.J., HAGLER, W.M.JR. Aflatoxin and cyclopiazonic acid production by *Aspergillus flavus* isolated from contaminated maize. **Journal of Food Science** 1991; 56: 871-2.
- LEESON, S., DIAZ, G. J., SUMMERS, J. D. **Poultry metabolic disorders and mycotoxins.** GUELPH: UNIVERSITY BOOKS, 1995.
- LOMAX, L.G., COLE, R.J., DORNER, J.W. The toxicity of cyclopiazonic acid in weaned pigs. **Vet. Pathol.** 1984; 21: 418-24.
- LOSITO, H., MONACI, L., ARESTA, A., ZAMBONIN, C. G. LC-ion trap electrospray MS-MS for the determination of cyclopiazonic acid in milk samples. **Analyst** 2002; 127: 499-502.
- MAIA, P. P., DE SIQUEIRA, P. B. Occurrence of aflatoxins B₁, B₂, G₁ and G₂ in some Brazilian pet foods. **Food Addit Contam.** 2002; 19 (12): 1180-3.
- MALLMANN, C. A., SANJTURIO, J. M., ALMEIDA, C. A. A., DILKIN, P. Fumonisin B₁ levels in cereals and feeds from southern Brazil. **Arq. Inst. Biol.** 2001; 68 (1) : 41-5.
- MARAGOS, C. M.; RICHARD, J. L. Quantification and stability of fumonisins B₁ and B₁ in milk. **J. AOAC** 1994; 77 (5): 1162-7.
- MARKAKI, P., MELISSARI, E. Ocurrence of aflatoxin M₁ in commercial pasteurized milk determined with ELISA and HPLC. **Food Addit. Contam.** 1997; 14: 451-6.

- MARTINS, J. L. S., MARTINS, I. S. Aflatoxina M₁ no leite tipo "B" comercializado no município de São Paulo, SP (Brasil). **Rev. Saúde Pública** 1986; 20 (4): 303-8.
- MARTINS, M. L., MARTINS, H. M. Natural and in vitro coproduction of cyclopiazonic acid and aflatoxins. **Journal of Food Protection** 1999; 62 (3): 292-4.
- MARTINS, M. L., MARTINS, H. M. Aflatoxin M₁ in raw and ultra high temperature-treated milk commercialized in Portugal. **Food Addit. Contam.** 2000; 17 (10): 871-4.
- McLEAN, M. & DUTTON, M. F. Cellular interações and metabolism of aflatoxin: an update. **Pharmacol. Ther.** 1995; 65: 163-92.
- [MERCOSUL] Mercado Comum do Cone Sul. **Regulamento técnico sobre limites máximos de aflatoxinas**. Resolução nº 56/94, 1994. (Publicação avulsa MERCOSUL).
- MORRISSEY, R. E., COLE, R. J., DORNER, J. W. The effects of cyclopiazonic acid on pregnancy and fetal development of Fischer rats. **J. Toxicol. Environ. Health.** 1984; 14 (4): 585- 94.
- MORRISSEY, R. E., NORRED, W. P., COLE, R. J., DORNER, J. Toxicity of the mycotoxin, cyclopiazonic acid, to Sprague-Dawley rats. **Toxicol. Appl. Pharmacol.** 1985; 77 (1): 94- 107.
- MORRISSEY, R. E., NORRED, W. P., HILTON, D. M. Combined effects of the mycotoxins aflatoxin B₁ and cyclopiazonic acid on Sprague-Dawley rats. **Fd. Chem. Toxic.** 1987; 25 (11): 837-42.

- MOTTA, S., SOARES, L. M. V. Simultaneous determination of tenuazonic and cyclopiazonic acids in tomato products. **Food Chemistry** 2000; 71: 111-6.
- MOTTA, S., SOARES, L. M. V. Survey of Brazilian tomato products for alternariol, alternariol monomethyl ether, tenuazonic acid and cyclopiazonic acid. **Food Addit. Cont.** 2001; 18 (7): 630-4.
- NEAL, G.E., EATON, D.L., JUDAH, D.J., VERMA, A. Metabolism and toxicity of aflatoxins M₁ and B₁ in human-derived in vitro systems. **Toxicol. Appl. Pharmacol.** 1998; 151: 152-8.
- NISHIE, K., COLE, R.J., DORNER, J.W. Neurological and cardiac effects of cyclopiazonic acid (CPA). **Pharmacologist** 1984; 26: 231-8.
- NISHIE, K., COLE, R. J., DORNER, J. W. Toxic effects of cyclopiazonic acid in the early phase of pregnancy in mice. **Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.** 1987; 55 (3): 303- 15.
- NORRED, W. P., MORRISSEY, R. E., RILEY, R. T., COLE, R. J., DORNER, J. W. Distribution, excretion and skeletal muscle effects of the mycotoxin [14C] cyclopiazonic acid in rats. **Fd. Chem. Toxic.** 1985; 23 (12): 1069-76.
- NORRED, W. P. Liquid chromatographic determination of cyclopiazonic acid in poultry meat. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.** 1987; 70: 121-3.
- OLIVEIRA, C.A.F., GERMANO, P.M., BIRD, C., PINTO, C.A. Immunochemical assessment of aflatoxin M₁ in milk powder consumed by infants in São Paulo, Brazil. **Food Addit. Contam.** 1997; 14: 7-10.
- OLIVEIRA, C.A.F., GERMANO, P.M. Aflatoxina M₁ em leite e derivados: ocorrência no Brasil e aspectos relativos à legislação. **Higiene Alimentar** 1997; 11 (48): 22-5.

- ONO, E. Y., SUGIURA, Y., HOMECHIN, M., KAMOGAE, M., VIZZONI, E., UENO, Y., HIROOKA, E.Y. Effect of climatic conditions on natural mycoflora and fumonisins in freshly harvested corn of the State of Parana, Brazil. **Mycopathologia** 1999; 147 (3): 139- 48.
- OSWEILER, G. D. Mycotoxins and livestock: What role do fungal toxins play in illness and production losses? **Vet. Med.** 1990; 85: 89-94.
- 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.** 1980; 18: 35-7.
- PESTKA, J. J., BONDY, G. S. Alteration of immune function following dietary mycotoxin exposure. **Can. J. Physiol. Pharmacol.** 1990; 68: 1009-16.
- PIER, A.C., BELDEN, E.L., ELLIS, J.A., NELSON, E.W., MAKI, L.R. Effects of cyclopiazonic acid and aflatoxin singly and in combination on selected clinical pathological and immunological responses of guinea pigs. **Mycopathologia** 1989; 105: 135-42.
- PIER, A. C. Major biological consequences of aflatoxicosis in animal production. **J. Anim. Sci.** 1992; 70: 3964-7.
- PINTO, F. V., PATRIARCA, A., LOCANI, O., VAAMONDE, G. Natural co-occurrence of aflatoxin and cyclopiazonic acid in peanuts grown in Argentina. **Food Addit Contam.** 2001; 18 (11): 1017-20.
- PIVA, G.; PIETRI, A.; GALAZZI, L.; CURTO, O. Aflatoxin M₁ occurrence in dairy products marketed in Italy. **Food Addit. Contam.** 1987; 5 (2): 133-9.

- POZZI, C. R., CORREA, B., GAMBALE, W., PAULA, C. R., CHACON-RECHE, N. O., MEIRELLES, M. C. Postharvest and stored corn in Brazil: mycoflora interaction, abiotic factors and mycotoxin occurrence. **Food Addit Contam.** 1995; 12 (3): 313- 9.
- PRADO, G., OLIVEIRA, M.S., ABRANTES, F.M., SANTOS, L.G., SOARES, C.R., VELOSO, T. Ocorrência de aflatoxina M₁ em leite consumido na cidade de Belo Horizonte – Minas gerais/Brasil – agosto/98 à abril/99. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, 1999; 19.
- PRASONGSIDH, B.C., KAILASAPATHY, K., SKURRAY, G.R., BRYDEN, W.L. Stability of cyclopiazonic acid during storage and processing of milk. **Food Research International** 1997; 30: 793-8.
- PRASONGSIDH, B.C., KAILASAPATHY, K., SKURRAY, G.R., BRYDEN, W.L. Analysis of cyclopiazonic acid in milk by capillary electrophoresis. **Food Chemistry** 1998a; 61: 515-9.
- PRASONGSIDH, B.C., KAILASAPATHY, K., SKURRAY, G.R., BRYDEN, W.L. Kinetic study of cyclopiazonic acid during the heat-processing of milk. **Food Chemistry** 1998b; 62: 467-72.
- PRELUSKY, D. B., VEIRA, D. M., TRENHOLM, H. L., FOSTER, B. C. Metabolic fate and elimination in milk, urine and bile of deoxynivalenol following administration to lactating sheep. **J. Environ. Sci. Health B.** 1987; 22 (2): 125-48.
- PRELUSKY, D. B., SCOTT, P. M., TRENHOLM, H. L., LAWRENCE, G. A. Minimal transmission of zearalenone to milk of dairy cows. **J. Environ. Sci. Health B.** 1990; 25 (1): 87- 103.

- PRICE, R.L., PAULSON, J.H., LOUCH, O.G., GINGG, C., KURTZ, A.G. Aflatoxin conversion by dairy cattle consuming naturally contaminated whole cottonseed. **J. Food Prot.** 1985; 48: 11-5.
- PURCHASE, I.F.H. Acute toxicity of aflatoxins M₁ e M₂ in one-day-old ducklings. **Food Cosmet. Toxicol.** 1967; 5: 339-42.
- PURCHASE, I.F.H., STEYN, M., RINSMA, R., TUSTIN, R.C. Reduction of aflatoxin M₁ content of milk by processing. **Food Cosmet. Toxicol.** 1972; 10: 383-7.
- RAO, B.L., HUSAIN, A. Presence of cyclopiazonic acid in kodo millet (*Paspalum scrobiculatum*) causing kodua poisoning in man and its production by associated fungi. **Mycopathologia** 1985; 89: 177-80.
- RIBEIRO, J. M. M., ROSA, C. A. R., CURVELLO, F. A., FRAGA, M. E. Toxigenic mycoflora and mycotoxins (aflatoxins and ochratoxin A) in poultry feed in Rio de Janeiro, Brasil. In: INTERNATIONAL IUPAC SYMPOSIUM ON MYCOTOXINS AND PHYCOTOXINS, 10., 2000, Guarujá, SP. *Abstract Book*. Guarujá, SP: 2000. p. 133.
- ROSMANINHO, J. F., OLIVEIRA, C. A. F., BITTENCOURT, A. B. F. Efeitos das micotoxicoses crônicas na produção avícola. **Arq. Inst. Biol.** 2001; 68 (2): 107-14.
- ROTHSCHILD, L.J. IARC classes AFB₁ as class 1 human carcinogen. **Food Chem. News** 1992; 34: 62-6.
- RUSTOM, I.Y.S. Aflatoxin in food and feed: occurrence, legislation and inactivation by physical methods. **Food Chemistry** 1997; 59: 57-67.

- SABINO, M. Variações de níveis de aflatoxina B₁ em alimentos e rações animais no período de 1971 a 1979. **Rev. Inst. Adolfo Lutz** 1980; 40 (2): 153-8.
- SABINO, M.; PRADO, G.; COLEN, G. Ocorrência de aflatoxinas, ocratoxina A e zearalenona em milho de Minas Gerais. Parte 1. **Rev. Inst. Adolfo Lutz** 1986; 46 (1/2): 65-71.
- 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** 1988; 48 (1/2): 81-5.
- SABINO, M.; PRADO, G.; INOMATA, E. I.; PEDROSO, M. O.; GARCIA, R. V. Natural occurrence of aflatoxins and zearalenone in maize in Brazil. Part II. **Food Addit. and Contam.** 1989; 6 (3): 327-31.
- SABINO, M., PURCHIO, A., ZORZETTO, A.P. Variations in the level of aflatoxin in cows milk consumed in the city of São Paulo, Brazil. **Food Addit. and Contam.** 1989; 6: 321-6.
- SAITANU, K. Incidence of aflatoxin M₁ in Thai milk products. **J. Food Protection** 1997; 60 (8): 1010-2.
- SCOTT, P.M. Methods for determination of aflatoxin M₁ in milk and milk products – a review of performance characteristics. **Food Addit. Cont.** 1989; 6 (3): 283-305.
- SCOTT, P. M., LAWRENCE, G. A. Liquid chromatographic determination of zearalenone and alpha- and beta-zearalenols in milk. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.** 1988; 71 (6):1176- 9.

- 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; 2: 1184-213.
- SORENSEN, W. G., TUCKER, J. D., SIMPSON, J. P. Mutagenicity of tetramic mycotoxin cyclopiazonic acid. **Appl. Environ. Microbiol.** 1984; 47 (6): 1355-7.
- SCUDAMORE, K. A., NAWAZ, S., HETMANSKI, M. T., RAINBIRD, S. C. Mycotoxins in ingredients of animal feeding stuffs: III. Determination of mycotoxins in rice bran. **Food Addit. Contam.** 1998; 15 (2): 185- 94.
- SILVA, J. B., POZZI, C. R., MALLOZZI, M. A. B., ORTEGA, E. M., CORREA, B. Mycoflora and occurrence of aflatoxin B1 and fumonisin B1 during storage of Brazilian sorghum. **J. Agric. Food Chem.** 2000; 48: 4352-4356.
- SKAUG, M. A. Analysis of Norwegian milk and infant formulas for ochratoxin A. **Food Addit Contam.** 1999; 16 (2): 75- 8.
- SMITH, E. E., KUBENA, L. F., BRAITHWAITE, C. E., HARVEY, R. B., PHILLIPS, T. D., REINE, A. H. Toxicological evaluation of aflatoxin and cyclopiazonic acid in broiler chickens. **Poult. Sci.** 1992; 71 (7): 1136- 44.
- SOUZA, S. V. C., VARGAS, E. A., JUNQUEIRA, R. G. Eficiência de um kit de ELISA na detecção e quantificação de aflatoxina M₁ em leite e investigação da ocorrência no estado de Minas Gerais. **Ciência e Tecnologia de Alimentos** 1999; 19 (3): 13.
- SPOTTI, M., CALONI, F., FRACCHIOLLA, L., POMPA, G., VIGO, D., MAFFEO, G. Fumonisin B1 carry-over into milk in the isolated perfused bovine udder. **Vet Hum Toxicol.** 2001; 43 (2): 109- 11.

- STOLOFF, L.M., TRUCKSESS, M., HARDIN, N., FRANCIS, O.J., CAMPBELL, T.C. Stability of aflatoxin M₁ in milk. **J. Dairy Sci.** 1975; 58: 1789-93.
- STOLOFF, L., PARK, D.L., VAN EGMOND, H.P. Rationales for the establishments of limits and regulations for mycotoxins. **Food Addit. Contam.** 1991; 8: 213-21.
- SYLOS, C.M., RODRIGUEZ-AMAYA, D.B., CARVALHO, P.R. Ocurrence of aflatoxin M₁ in milk and dairy products commercialized in Campinas, Brazil. **Food Addit. Contam.** 1996; 13: 169-72.
- SYLOS, C.M., RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Estudo comparativo de métodos para determinação de aflatoxina M₁. **Rev. Inst. Adolfo Lutz** 1996; 56 (1): 87-97.
- TAVEIRA, J. A., MÍDIO, A. F. Aflatoxina M₁ – A micotoxina do leite. **Bol. SBCTA** 1999; 33 (1): 115-26.
- TOYODA, M., SAISHO, K., AOKI, G., KOBAYASHI, A., SAITO, Y. Repeated use of a single immunoaffinity column for sample clean-up in the HPLC determination of aflatoxin M₁ in powdered milk. **Int. Dairy Journal** 1994; 4: 369-75.
- TUINSTRAN, L.G., ROOS, A.H., VAN TRIJP, J.M. Liquid chromatographic determination of aflatoxin M₁ in milk powder using immunoaffinity columns for clean-up: interlaboratory study. **Food Biol. Contam.** 1993; 76: 1248-54.
- TURNER, P. C., MOORE, S. E., HALL, A. J., PRENTICE, A. M., WILD, C. P. Modification of immune function through exposure to dietary aflatoxin in Gambian children. **Environ Health Perspect.** 2003; 111 (2): 217-20.

- URANO, T.; TRUCKSESS, M.W. Co-occurrence of cyclopiazonic acid and aflatoxins in corn and peanuts. **Journal of AOAC International** 1992; 75 (5): 838-41.
- URANO, T.; TRUCKSESS, M.W.; MATUSIK, J. Liquid chromatographic determination of cyclopiazonic acid in corn and peanuts. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.** 1992; 75: 319-22.
- VAAMONDE, G., PATRIARCA, A., FERNANDEZ, P. V., COMERIO, R., DEGROSSI, C. Variability of aflatoxin and cyclopiazonic acid production by *Aspergillus section flavi* from different substrates in Argentina. **Int. J. Food Microbiol.** 2003; 88 (1): 79- 84.
- VAID, J., DAWRA, R. K., SHARMA, O. P., NEGI, S. S. Chronic aflatoxicosis in cattle. **Vet. Hum. Toxicol.** 1981; 23 (6): 436-38.
- VALENTA, H., GOLL, M. Determination of ochratoxin A in regional samples of cow's milk from Germany. **Food Addit Contam.** 1996; 13 (6): 669- 76.
- VAN EGMOND, H.P. Mycotoxins in dairy products. **Food Chem.** 1983; 11: 289-307.
- VAN EGMOND, H.P. Mycotoxins: regulations, quality assurance and reference materials. **Food Addit. Contam.** 1995; 12 (3): 321-30.
- VOSS, K. A., NORRED, W. P., HINTON, D. M., COLE, R. J., DORNER, J. W. Subchronic oral toxicity of cyclopiazonic acid (CPA) in male Sprague-Dawley rats. **Mycopathologia** 1990; 110 (1): 11- 8.
- WIDIASTUTI, R., MARYAM, R., BLANEY, B. J., STOLTZ, D. R. Cyclopiazonic acid in combination with aflatoxins, zearalenone and ochratoxin A in Indonesian corn. **Mycopathologia** 1988; 104: 153-6.

- WILSON, B. J. Hazards of mycotoxins to public health. **J. Food Protec.** 1978; 375-384.
- WOOD, G. E. Aflatoxins in domestic and imported foods and feeds. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.** 1989; 71 (4): 543-8.
- YATES, I. E., COLE, R. J., GILES, J. L., DORNER, J. W. Interaction of aflatoxin B1 and cyclopiazonic acid toxicities. **Mol. Toxicol.** 1987; 1 (1): 95- 106.
- ZARBA, A., WILD, C. P., HALL, A. J., MONTESANO, R., HUDSON, G. J., GROOPMAN, J. D. Aflatoxin M₁ in human breast milk from The Gambia, West Africa, quantified by combined monoclonal antibody immunoaffinity chromatography and HPLC. **Carcinogenesis** 1992; 13 (5): 891-4.
- ZOVICO, C., FONSECA, H., OETTERER, M. Ácido ciclopiazônico em queijo. **Bol. SBCTA** 1997; 31 (2): 172-5.