

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
FACULDADE DE NUTRIÇÃO
MESTRADO EM NUTRIÇÃO**

**OCORRÊNCIA DE FUNGOS E AFLATOXINA M₁ EM
BEBIDAS LÁCTEAS COMERCIALIZADAS EM ALAGOAS**

DANIELA CRISTINA DE SOUZA ARAÚJO

**MACEIÓ
2010**

DANIELA CRISTINA DE SOUZA ARAÚJO

**OCORRÊNCIA DE FUNGOS E AFLATOXINA M₁ EM
BEBIDAS LÁCTEAS COMERCIALIZADAS EM ALAGOAS**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Nutrição da Universidade Federal de
Alagoas como requisito parcial à obtenção
do título de Mestre em Nutrição.

Prof. Dr. Cyro Rêgo Cabral Júnior – Orientador - FANUT
Profa. Dr^a. Edna Peixoto da Rocha Amorim – Co-Orientadora - CECA

MACEIÓ

2010



MESTRADO EM NUTRIÇÃO
FACULDADE DE NUTRIÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS

Campus A. C. Simões
BR 104, Km 14, Tabuleiro dos Martins
Maceió-AL 57072-970
Fone/ fax: 81 3214-1160



PARECER DA BANCA EXAMINADORA DE DEFESA DE
DISSERTAÇÃO

**OCORRÊNCIA DE FUNGOS E AFLATOXINA M₁ EM
BEBIDAS LÁCTEAS COMERCIALIZADAS EM ALAGOAS**
por

Daniela Cristina de Souza Araújo

A Banca Examinadora, reunida aos ____ dias do mês de _____ do ano de 2010,
considera a candidata **APROVADA**.

Prof. Dr. Cyro Rêgo Cabral Júnior - Orientador
Faculdade de Nutrição - FANUT
Universidade Federal de Alagoas

Profa. Dr^a. Denise Maria Pinheiro
Instituto de Química e Biotecnologia - IQB
Universidade Federal de Alagoas

Profa. Dr^a. Edma Carvalho de Miranda
Instituto de Química e Biotecnologia - IQB
Universidade Federal de Alagoas

Dedico a Ti Senhor que me ampara,
me conduz, me ilumina e me fortalece.
Obrigada Deus!

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Cyro Rego Cabral Júnior, pela indicação do apoio técnico e bibliográfico, além da paciência e compreensão durante todo o processo de execução deste trabalho.

À Prof^a. Edna Peixoto da Rocha Amorim do Centro de Ciências Agrárias, UFAL, pelos ensinamentos, como também por me permitir vivenciar momentos inesquecíveis de companherismo no Laboratório de Fitopatologia.

À Prof^a. Maria Denise Pinheiro e à Prof^a. Edma Carvalho de Miranda do Instituto de Química e Biotecnologia, UFAL, pela valiosa orientação.

Ao Prof^o. Antônio Euzébio Goulart Sant'ana do Laboratório de Produtos Naturais, Instituto de Química e Biotecnologia, Universidade Federal de Alagoas pelo apoio na injeção das amostras no Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência daquele setor, como também pela orientação e presteza.

Aos Bolsistas de Iniciação Científica Isis Torres, Adeildo Oliveira, Felipe Tenório e Orlando Pelo apoio durante a execução das análises laboratoriais.

Aos amigos do Laboratório de Fitopatologia, CECA, Leonardo Fonseca, Laís Peixoto, Wagner Soriano, David Santos, Inaura Patrícia Santos, Júlio César e pelo apoio, incentivo e ensinamentos, durante a identificação dos fungos.

Aos meus pais, Ana Cristina de Souza Araújo e Mario Araújo os mais profundos agradecimentos, as suas sábias lições de esperança, amor, crença e compreensão, infundiram-me a confiança necessária para realizar esse sonho. Desculpe-me principalmente pelas horas ausentes.

A minha irmãzinha Graziela, pelo carinho, paciência e força.

A tia Ceça e a amiga Marineide pela força nos momentos difíceis e pela admiração que tenho a vocês.

A amiga Luciene Moura, pela paciência e disponibilidade de me ajudar durante todas as etapas deste trabalho.

As amigas do Centro Universitário CESMAC pelo incentivo e ajuda em especial a Jadna Cilene Pascoal.

Aos companheiros de trabalho da Vigilância Sanitária Municipal, Ednaldo Balbino, Maria Lucia e Maria Luna, pela cobertura, direta ou indireta, que me deram nessa longa travessia, assim como pela confiança e compreensão.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a execução desta dissertação.

RESUMO GERAL

Um dos gêneros de fungos de grande importância agrícola é o *Aspergillus*, por contaminar várias culturas e produzir aflatoxinas. A aflatoxina M₁ é um metabólito tóxico resultante da biotransformação da aflatoxina B₁ (AFB₁) secretado no leite de animais que ingerem alimentos contaminados, assumindo destacada relevância em saúde pública devido aos seus efeitos carcinogênicos e mutagênicos. O consumo de bebida láctea UHT vem se destacando no mercado como substituto do leite, devido as suas características organolépticas e praticidade. Existem pelo menos 16 marcas de bebidas lácteas UHT disponíveis a venda, a maior parte no sabor chocolate. Sendo assim, o objetivo do trabalho foi avaliar a contaminação fúngica e quantificar os níveis de aflatoxina M₁ de 10 marcas comercializadas em Maceió - AL. A identificação fungos foi realizada de acordo com o método descrito no *Compendium of methods for the microbiological examination of foods* (1992). Para quantificação de aflatoxina M₁ por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) o método utilizado foi do IAL (2008) adaptado. Foram isolados 14 gêneros de fungos, onde se destacam *Aspergillus flavus* e *Penicillium sp*, e níveis de aflatoxinas M₁ com uma variação de 0,02 a 0,48 ± 0,17 µg/L o que evidenciam a necessidade de boas práticas de fabricação no campo e de armazenamento, afim de controlar o crescimento fúngico e a conseqüente contaminação com seu metabólito tóxico.

Palavras-chave: micotoxina, *Aspergillus flavus*, CLAE.

GENERAL ABSTRACT

The *Aspergillus flavus* is one of the main kinds of fungus, among those that demand attention in the agricultural area, because it contaminates many cultivation and produces aflatoxin. The aflatoxin M₁ is a toxic metabolite resultant from the biotransformation of the aflatoxin B₁ (AFB₁) co-secreted with milk from animals that ingested food contaminated by AFB₁. This fact is a relevant public health issue due to the carcinogenic e mutagenic effects of the aflatoxin. The increasing consume of UHT milky beverages, as a substitute for the milk, is a result of their organoleptic characteristics. There are, at least, 16 non-fermented milky beverages brands available for sale. Most of them are chocolate flavored. Considering that, this essay's objective is to analyze and quantify, in 10 UHT milky beverages sold in Maceió-AL, the contamination levels by aflatoxin M₁. The fungus identification process was made according to the method described in the *Compendium of methods for the microbiological examination of foods* (1992). For the aflatoxin M₁ quantification, using the high performance liquid chromatography (HPLC), the method used was the one of IAL (2008) adapted. 14 kinds of fungus were isolated, it must be mentioned that the *Aspergillus flavus* and *Penicillium sp.* were among the findings. The levels of aflatoxin M₁ ranged from 0,02 to 0,48 ± 0,17 µg/L that suggests the necessity of better practices for production and storing. These "better practices" should control the fungus grownth and the consequent contamination by their toxic metabolite.

Keywords: mycotoxin, *Aspergillus flavus*, HPLC

LISTA DE TABELAS

| | Página | |
|----------|---|----|
| Tabela 1 | Legislação para aflatoxina M ₁ em leite e derivados. | 28 |
| Tabela 2 | Ocorrência de aflatoxina M ₁ (AFM ₁), em leite, registradas no Brasil. | 31 |
| Tabela 3 | Valores médios em unidades formadoras de colônias (UFC) de fungos nas marcas de bebida láctea UHT. | 62 |
| Tabela 4 | Teores médios de aflatoxina M ₁ nas marcas analisadas de bebida láctea UHT comercializada na cidade de Maceió-AL | 63 |
| Tabela 5 | Resultados de pesquisas sobre a ocorrência de AFM ₁ , em leite, registrados no Brasil. | 64 |

LISTA DE FIGURAS

| | | Página |
|-----------|---|--------|
| Figura 01 | Estrutura do furano e da cumarina | 22 |
| Figura 02 | Estrutura das aflatoxinas | 22 |
| Figura 03 | Esquema do processo de quantificação de fungos em superfície | 85 |
| Figura 04 | Microcultura de <i>Aspergillus</i> sp. em meio BDA | 86 |
| Figura 05 | Placa de Petri contendo colônias de <i>Penicillium</i> sp. em Agar Batata Dextrose (BDA) com amoxicilina | 87 |
| Figura 06 | Placa de Petri contendo colônias de <i>Aspergillus</i> sp. em Agar Batata Dextrose (BDA) com amoxicilina | 88 |
| Figura 07 | Características microscópicas de <i>Aspergillus flavus</i> . | 89 |
| Figura 08 | Cromatograma da bebida láctea UHT contaminada com aflatoxina M ₁ com concentração de 0,1 µg/L. | 90 |
| Figura 09 | Cromatograma da bebida láctea UHT contaminada com aflatoxina M ₁ com concentração de 0,13 µg/L | 91 |

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|------------------|--|
| AFM ₁ | Aflatoxina M ₁ |
| AFB ₁ | Aflatoxina B ₁ |
| AFB ₂ | Aflatoxina B ₂ |
| AFG ₁ | Aflatoxina G ₁ |
| AFG ₂ | Aflatoxina G ₂ |
| ANVISA | Agência Nacional de Saúde |
| BDA | Ágar Batata Dextrose |
| CCD | Cromatografia em Camada Delgada |
| CLAE | Cromatografia Líquida de Alta Eficiência |
| DNA | Ácido Desoxirribonucléico |
| FAO | <i>Food Agriculture Organization</i> |
| GSH | Gama-L-glutamil-L-cisteinil-glicina |
| HACCP | Hazard Analysis Critical Control Point |
| RNA | Ácido ribonucléico |
| UFC | Unidades formadoras de colônias |
| UHT | Ultra High Temperature |
| UR | Umidade Relativa |
| UV | Ultravioleta |
| % | Porcentagem |
| °C | Graus Celsius |
| µg | Micrograma |
| kg | Quilograma |
| L | Litro |
| ng | Nanograma |
| g | Gramma |
| mg | Miligrama |
| mL | Mililitro |
| sp. | Espécie |
| spp. | Espécies |
| R ² | Coeficiente de determinação |

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| INTRODUÇÃO GERAL | 14 |
| REVISÃO DE LITERATURA - Fungos e aflatoxinas – revisão sobre ocorrência, aspectos toxicológicos, métodos analíticos e controle | 18 |
| Fungos | 18 |
| Aflatoxinas | 20 |
| Aspectos toxicológicos e biotransformação da aflatoxina B ₁ em M ₁ | 24 |
| Métodos de análise para aflatoxina M ₁ | 28 |
| Controle da aflatoxina M ₁ | 29 |
| Pesquisas realizadas no Brasil | 30 |
| REFERÊNCIAS | 32 |
| ARTIGO DE RESULTADOS: Ocorrência de fungos e aflatoxina M ₁ em bebida láctea UHT comercializada na cidade de Maceió-AL. | 39 |
| Resumo | 40 |
| Abstract | 41 |
| Introdução..... | 42 |
| Material e métodos | 44 |
| Resultados e discussão | 49 |
| Conclusão | 55 |
| REFERÊNCIAS | 56 |

| | |
|--|----|
| ANEXO | 74 |
| Anexo A – Normas para publicação na Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos | 75 |
| APÊNDICE | 84 |
| Apêndice 01 – Esquema do processo de quantificação de fungos em superfície. | 85 |
| Apêndice 02 – Microcultura de <i>Aspergillus</i> sp. em meio BDA. | 86 |
| Apêndice 03 – Placa de Petri contendo colônias de <i>Penicillium</i> sp. em Agar Batata Dextrose (BDA) com amoxicilina. | 87 |
| Apêndice 04 – Placa de Petri contendo colônias de <i>Aspergillus flavus</i> em Agar Batata Dextrose (BDA) com amoxicilina. | 88 |
| Apêndice 05 – Características microscópicas de <i>Aspergillus flavus</i> | 89 |
| Apêndice 06 – Cromatograma da bebida láctea UHT contaminada com aflatoxina M ₁ com concentração de 0,10 µg/L do padrão | 90 |
| Apêndice 07 – Cromatograma da bebida láctea contaminada com aflatoxina M ₁ com concentração de 0,13 µg/L..... | 91 |

1 . INTRODUÇÃO GERAL

INTRODUÇÃO GERAL

As alterações provocadas pelos fungos nos ingredientes e alimentos são conhecidas há muitos anos. Algumas dessas transformações são desejáveis e até mesmo necessárias e têm o intuito de melhorar a qualidade nutricional ou o sabor dos alimentos. Entretanto, alguns fungos podem provocar deterioração ou produzir metabólitos tóxicos denominados micotoxinas (CABRAL, 2003; FRANCO & LANDGRAF, 2004).

O Brasil apresenta condições ideais para o desenvolvimento de fungos devido à prevalência do clima tropical, além da utilização de práticas agrícolas inadequadas de colheita, plantio, secagem, transporte e armazenamento dos grãos (SABINO, 1984).

A contaminação de rações e alimentos por fungos deve-se principalmente à utilização de grãos já contaminados por toxinas ou rações estocadas em condições inadequadas, bem como pela ingestão de forragens contendo fungos endofíticos (CAVALCANTE, 1998).

Um dos gêneros de fungos de grande importância agrícola é o *Aspergillus*, por contaminar várias culturas e produzir aflatoxinas após a fase de crescimento exponencial. *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus*, e *Aspergillus nomius*, se desenvolvem naturalmente em produtos alimentícios como amendoim, milho, feijão, arroz, cacau, cevada, leite, carnes, sementes de algodão, castanha, trigo e outros (ARAÚJO, 2004). No entanto, em rações, os principais produtos alimentícios susceptíveis ao desenvolvimento destes fungos incluem: amendoim, milho e trigo (ROSAMARINHO et al., 2006).

São conhecidos, atualmente, 18 compostos similares designados pelo termo como aflatoxina, porém os principais tipos de interesse médico-sanitário são identificados como B₁, B₂, G₁ e G₂ (OLIVEIRA, 2006). *Aspergillus flavus* produz somente aflatoxina B enquanto as outras espécies produzem as aflatoxina B e G, sendo a aflatoxina B₁ de maior toxicidade. Estas toxinas são geralmente encontradas em muitos alimentos e rações (BAKIRCI, 2001).

A aflatoxina M₁ é um potente hepatocarcinógeno excretado no leite de vacas alimentadas com rações contaminadas com aflatoxina B₁. A concentração no leite pode variar amplamente de um animal para outro, e até de uma fase de lactação para outra, podendo ser detectada no leite 12 - 24 horas após a ingestão inicial de aflatoxina B₁, atingindo o equilíbrio com máxima concentração após 3 - 6 dias de ingestão constante e diária (OLIVEIRA & GERMANO, 2003)

A Resolução nº 274 da Agência Nacional de Saúde – ANVISA de 15 de outubro de 2002 (BRASIL, 2002), estabelece os limites máximos aceitáveis de aflatoxina M₁ 0,5 µg/L (ppb) em leite fluído e 5,0 µg/kg (ppb) para leite em pó, não foi estabelecido limites aceitáveis para bebida láctea UHT.

A Bebida Láctea UHT (Ultra High Temperature) é o produto submetido, durante 2 a 4 segundos, a uma temperatura entre 130°C a 150°C, mediante um processo térmico de fluxo contínuo, imediatamente resfriado a uma temperatura inferior a 32°C e envasado sob condições assépticas em embalagens estéreis e hermeticamente fechadas (BRASIL, 2005).

A Instrução Normativa nº16 de 23 de agosto de 2005 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2005), define bebida láctea UHT com adição como o produto lácteo resultante da mistura do leite (in natura, pasteurizado, esterilizado, UHT, reconstituído, concentrado, em pó, integral,

semidesnatado ou parcialmente desnatado e desnatado) e soro de leite (líquido, concentrado e em pó), adicionado de produto(s) ou substância (s) alimentícia(s), gordura vegetal e outros produtos lácteos. A base láctea representa pelo menos 51% (cinquenta e um por cento).

Em Maceió existem pelo menos 16 marcas de bebidas UHT com adição disponíveis à venda, em diversos estabelecimentos comerciais, de pequeno e de grande porte, sendo a maior parte delas oferecidas no sabor chocolate e uma pequena parte em outros sabores como de morango, em embalagens de 200 mL e 1L.

O consumo de bebida láctea UHT vem se destacando no mercado como um substituto do leite, sendo um alimento consumido por todas as faixas etárias, devido as suas características organolépticas e praticidade.

2. REVISÃO DA LITERATURA
FUNGOS E AFLATOXINAS – REVISÃO SOBRE OCORRÊNCIA,
ASPECTOS TOXICOLÓGICOS, MÉTODOS ANALÍTICOS E
CONTROLE

FUNGOS E AFLATOXINAS – REVISÃO SOBRE OCORRÊNCIA, ASPECTOS TOXICOLÓGICOS, MÉTODOS ANALÍTICOS E CONTROLE

FUNGOS

Fungos são seres dispersos no meio ambiente, em vegetais, ar atmosférico, solo, água, animais, etc. e, embora sejam estimados em 250 mil espécies, menos de 150 foram descritos como patógenos aos seres humanos. São organismos eucariotas, aclorofilados, heterotróficos, com reprodução assexuada e sexuada, capazes de utilizar uma grande parte de substratos como fonte de carbono, nitrogênio e energia (TANIWAKI et al., 1999; RAVEN et al., 2001).

Os alimentos em geral são muito sensíveis à contaminação e proliferação por fungos, especialmente os de origem vegetal que apresentam uma contaminação natural vinculada ao ar atmosférico, água ou ao solo onde são cultivados. Sendo assim, tanto os ingredientes quanto as rações prontas estão sujeitas a apresentar contaminação por fungos (FRISVAD & SAMSON, 1991)

Christensen & Kaufman (1969) dividiram os fungos que invadem os grãos, vagens e sementes conforme suas necessidades de água em dois grupos ecológicos: fungos de campo e de armazenamento.

Os fungos do campo invadem os produtos antes da colheita, quando as plantas estão em crescimento ou depois de estarem cortadas e requerem um teor de umidade em equilíbrio com uma umidade relativa de 90 a 100 % para crescerem. Os principais gêneros são *Cephalosporium*, *Fusarium*, *Gibberella*,

Nigrospora, *Helminthosporium*, *Alternaria* e *Cladosporium*. (LAZZARI et al., 1998). Já os gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*, são considerados fungos de armazenamento, pois necessitam de teores de umidade mais baixos, entre 13 e 18%, e são considerados os principais agentes de deterioração das sementes (CHRISTENSEN & KAUFMAN, 1969)

No entanto, esta classificação não é apropriada aos trópicos úmidos, uma vez que determinadas espécies pertencentes aos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*, anteriormente consideradas como fungos de armazenamento, podem ocorrer antes da colheita (HILL et al., 1985).

Além das alterações na composição química dos alimentos, o desenvolvimento de fungos pode ser prejudicial à saúde dos animais e dos seres humanos. Neste sentido, Sabino (1996), destaca *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium* capazes de crescerem em diversos substratos com condições ambientais variáveis e produzirem micotoxinas. As micotoxinas provêm do metabolismo secundário de fungos, cujas principais características são: amplo espectro de toxicidade, baixo peso molecular, não-imunogenicidade, termoestáveis e atuam em baixas concentrações (DINIZ, 2002).

A presença de fungos no leite pode estar associada à ocorrência de casos de mastite infecciosa no rebanho, ou pode estar relacionada ao nível de higiene da ordenha e do ambiente (COUSINS & BRAMLEY, 1981).

Os problemas do leite UHT decorrem, principalmente, da interpretação de que o processo corrigiria todos os defeitos anteriores da matéria-prima, principalmente os de ordem microbiológica, uma vez que promoveria a “esterilização” do produto.

Segundo Martins et al. (1999), o leite que passa pelo processo de ultrapasteurização não sofre esterilização absoluta, uma vez que, bactérias termorresistentes podem permanecer viáveis nos produtos. Todavia, os consumidores têm se deparado com embalagens estufadas ou leites geleificados, dentro do prazo de validade. Isso se deve à qualidade do leite cru, pois o processo de ultrapasteurização (130 a 150°C), quando aplicado à matéria-prima adequada, possui elevada eficiência (BIZARI et al., 2003).

AFLATOXINAS

Todas as espécies de *Aspergillus* formam colônias filamentosas de diferentes características que microscopicamente apresentam hifas septadas de aproximadamente 4 µm de diâmetro e estruturas de frutificação típica formada por célula-pé, conidióforo, vesícula, métula e/ou fiálide que promovem a reprodução assexuada do fungo através da produção de fialoconídios. Algumas espécies de *Aspergillus* apresentam a forma sexuada caracterizada pela presença de cleistotécios, ascos e ascósporos (ABARCA, 2000)

Apenas quatro espécies de *Aspergillus* podem produzir aflatoxinas, sendo elas: *A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. pseudotamarii* e raramente por *A. nominus* durante seu crescimento em alimentos e rações (SHUNDO et al., 2003).

Conhecidas desde a década de 60, quando foram descobertas após serem responsáveis pela morte de 100.000 perus na Inglaterra. Por estarem presentes na maioria das rações, a aflatoxina é uma das substâncias mutagênicas e carcinogênicas mais potentes produzidas por fungos na natureza (PUTZKER, 2002).

Em 1974, na Índia, ocorreu um dos maiores surtos de aflatoxicose em humanos. Foram afetadas 397 pessoas, onde apresentaram sintomatologia febril, icterícia, dores, vômitos e hepatomegalia, tendo registrado a morte de 100 pessoas deste grupo. O milho teria sido a principal fonte de intoxicação (PITT et al., 1999).

A ocorrência de aflatoxinas em alimentos é inevitável e influenciada por diversos fatores ambientais. Portanto, a extensão de sua contaminação não é previsível e pode variar com a localização geográfica, as práticas agrônômicas e a suscetibilidade do produto à invasão do fungo durante as fases de pré-colheita, armazenamento e processamento (ARAÚJO, 2004).

A disseminação fúngica ocorre facilmente através de esporos assexuados muito resistentes a condições adversas, sendo esta propagação difícil de controlar (AGRIOS, 2004).

Em cereais estocados, os fatores mais importantes para o crescimento de fungos toxigênicos do gênero *Aspergillus* e a produção de aflatoxinas são a umidade relativa do ar e do substrato e temperatura de armazenamento. Umidade relativa de 80% a 85% com 17% de umidade dos cereais e temperatura de 24 a 35°C são consideradas condições ótimas. Já em rações a umidade deve estar entre 10% a 13% do substrato, 79% a 89% de umidade relativa do ar e temperaturas de 19 a 27°C (DILKIN et al., 2000).

As aflatoxinas pertencem à classe de compostos denominados furanocumarinas, apresentando um núcleo cumarina associado ao furano e a lactona (Figura 01). As aflatoxinas do grupo B possuem um anel ciclopentenona,

as do grupo G uma lactona insaturada de 6 membros, e as do grupo M são derivadas hidroxiladas no carbono quatro de B₁ e B₂ (ARAÚJO, 2004) (Figura 02).

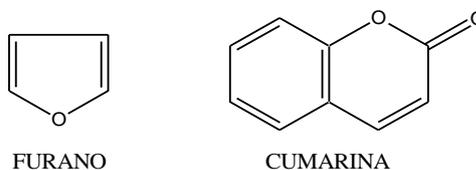
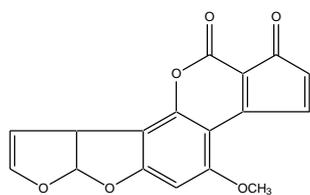
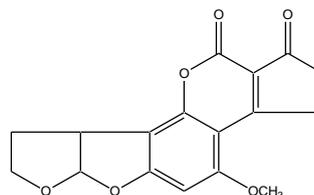


Figura 01. Estrutura do furano e da cumarina

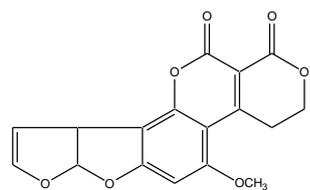
As aflatoxinas receberam essas denominações, B e G, devido às suas características fluorescentes "Blue" (azul) e "Green" (verde), quando expostas à luz ultravioleta de ondas longas. A designação "M" origina-se de "milk toxin" por ser uma toxina excretada no leite (BAGGIO, 2006).



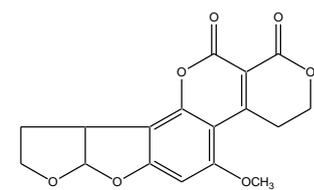
Aflatoxina B1



Aflatoxina B2



Aflatoxina G1



Aflatoxina G2



Figura 02. Estrutura das aflatoxinas

Estas toxinas apresentam baixo peso molecular (**AFB1**: 312, 2782; **AFB2**: 314,294; **AFG1**:328,2776; **AFG2**: 330,2934 e **AFM1**: 328,2776 g/mol), e reduzida hidrossolubilidade, sendo bastante solúveis em solventes de polaridade intermediária como clorofórmio, metanol e dimetilsulfóxido. Seus pontos de fusão são de 168-269 °C, 286-289 °C, 244-246 °C, 237- 240 °C e 299°C, respectivamente para as aflatoxinas B₁, B₂, G₁, G₂ e M₁ (MERCK, 1996).

Em estado puro, são extremamente estáveis a altas temperaturas, enquanto que, quando se encontram em solventes polares, são relativamente sensíveis à luz, particularmente à radiação ultravioleta. São degradadas por autoclavação em presença de amônia e por tratamento com hipoclorito e álcalis fortes (WHO, 1979). São incolores, inodoras e não alteram o sabor dos alimentos (MARTINS, 2002).

Segundo Araújo (2004), as aflatoxinas são inativadas desde que alcancem o ponto de fusão 237-289°C. Tal aquecimento é inaceitável para processamento de alimentos. Sendo assim, leites e produtos lácteos, mesmo após o processamento, pasteurização ou UHT, podem encontrar-se contaminados por aflatoxina M₁.

ASPECTOS TOXICOLÓGICOS E BIOTRANSFORMAÇÃO DA AFLATOXINA B₁ EM AFLATOXINA M₁

As aflatoxinas B₁ estão classificadas na Classe 1 dos carcinógenos humanos pela “International Agency for Research on Cancer” – IARC (2003), já as aflatoxinas M₁ estão classificadas, como no grupo 2B, sendo possível carcinogênicos para humanos.

Devido a sua lipossolubilidade as aflatoxinas são rapidamente absorvidas no trato gastrointestinal, sendo distribuídas aos diferentes órgãos, como músculos, rins, tecido adiposo, e principalmente fígado, onde maiores concentrações podem ser encontradas (TONG et al.,2006).

De acordo com Amaral (2006) citado por Kwiatkowski & Alves (2007), a aflatoxina B₁ quando é biotransformada primariamente no fígado, por enzimas microsômicas relacionadas ao citocromo P450 do sistema de funções oxidase mista, dá origem a um produto reativo, o 8-9-epóxido (anteriormente denominado AFB₁-2,3 epóxido), originado através da epoxidação da dupla ligação do éter vinílico, presente na estrutura bifuranoíde da molécula de aflatoxina B₁.

A aflatoxina-epóxido é altamente reativa e instável, ligando-se através de ligações covalentes a vários locais nucleofílicos da célula, como ácido desoxirribonucléico (DNA), ácido ribonucléico (RNA) e proteínas (metionina, cisteína e histidina). A interferência na síntese de ácidos nucleicos pode ocorrer através dos processos de transcrição, pela interação direta da aflatoxina-epóxido com o DNA, ou na interação com o RNA polimerase (enzima que catalisa a síntese do RNA a partir do DNA) (ARAÚJO, 2004).

O produto conjugado formado pela interação aflatoxina-DNA é identificado como aflatoxina-N7-guanina, que ocorre ao nível do códon 249, do gene supressor de tumores p53, sendo considerado o primeiro estágio da carcinogênese. A aflatoxina-N7-guanina é transformada espontaneamente pela hidrólise do anel imidazol em aflatoxina-FAPI (N⁵-formil-2, 5,6-triamino-4-oxo-N⁵-primidil)-9-hidroxi-aflatoxina-B₁), que é a forma persistente do DNA conjugado que se acumula no fígado (ARAUJO, 2004; TONG et al., 2006).

Os adutos formados pela ligação entre o RNA e proteínas à aflatoxina-epóxido provocam a morte celular pela inativação de macromoléculas essenciais às células. A formação destes adutos inicia-se com a hidrólise da aflatoxina-epóxido para produzir aflatoxina-B₁-2,3 deidrodiol, o qual reage com amino-grupos primários de proteínas, originando bases de Schiff, imobilizando enzimas vitais ao funcionamento celular (HSIEH & ATKINSON, 1991; ARAUJO, 2004).

Secundariamente, ocorre redução do metabolismo das gorduras no fígado, causando necrose e degeneração gordurosa, diminuição do fluxo de bile e comprometimento na absorção de nutrientes, especialmente vitaminas e aminoácidos essenciais (CURCOVA et al, 1991).

De acordo com Araújo (2004), a inativação e a posterior eliminação da aflatoxina-epóxido, podem ocorrer com a interação entre a glutatona (gama-L-glutamil-L-cisteinil-glicina; GSH), pois este é o principal mecanismo de defesa celular, sendo responsável pela diminuição da mutagenicidade das aflatoxinas, tornando-as mais solúveis em água, o que facilita a excreção através da urina, ou bile, em seguida, nas fezes.

Segundo Biehl & Buck, (1987) citado por Ferreira et al. (2006), além da epoxidação, a biotransformação primária da AFB₁ inclui a hidroxilação, para formar as aflatoxinas M₁, Q₁ e B_{2a}; e, O-demetilação, para formar aflatoxina P₁, permitindo a sua conjugação com o ácido glucurônico ou sulfatos, aumentando sua solubilidade em água.

Após ser biotransformada a aflatoxina M₁, pode permanecer em diversos tecidos, especialmente no hepático e renal, ou ser excretado através da urina ou do leite. Assim, a aflatoxina M₁ é considerada o principal metabólito hidroxilado presente em leite de animais, que ingeriram alimentos contaminados por AFB₁ (APPLEBAUM et al.,1982).

De 1,0 a 3,0% da aflatoxina B₁ ingerida por animais em lactação é transformada em algumas horas em aflatoxina M₁, encontrada no leite ligada à caseína (ARAÚJO, 2004).

A AFM₁ também pode sofrer epoxidação e ser ativada para formar derivados mutagênicos, o que explica sua toxicidade apreciável em modelos experimentais, pois mesmo em baixas doses (>0,5 µg/mL) a AFM₁ apresenta citotoxicidade para células linfoblastóides na ausência de ativação metabólica (BAILEY et al., 1994; NEAL et al., 1998).

Neste contexto, crianças expostas à AFM₁ são consideradas mais susceptíveis a seus efeitos adversos, pois sua capacidade de biotransformação de carcinógenos é geralmente mais lenta que em adultos e o efeito cumulativo de exposições repetidas, por longos períodos, a pequenas doses, é um fator preocupante (LÓPEZ et al., 2003).

A identificação e a mensuração dos biomarcadores para a avaliação da exposição humana às micotoxinas podem ajudar a prevenir ou minimizar os agravos à saúde, decorrentes da exposição do organismo humano a essas substâncias. Para avaliar a exposição humana às aflatoxinas, os principais biomarcadores são metabólitos urinários de aflatoxina B₁, como aflatoxina M₁, aflatoxina P₁, aflatoxina Q₁, aflatoxina livre em soro ou plasma, os adutos de AFB-N⁷-guanina, os adutos de albumina ou mutação no gene supressor de tumor p53, presentes em fluidos biológicos (BANDO et al., 2007)

Alguns compostos podem reduzir o efeito carcinogênico das aflatoxinas, o licopeno e o beta-caroteno, protegem as células da ação tóxica, assim como o consumo de cisteína, este aumenta a concentração de glutatona, reduzindo os efeitos maléficos dos componentes tóxicos (ARAÚJO, 2004; REDDY et al., 2006).

Sendo assim, cada país tem tentado definir regulamentações (Tabela 01) a fim de estabelecer limites de tolerância máximos. No Brasil, o regulamento técnico se encontra em harmonia com o do MERCOSUL, englobando a Argentina, Paraguai, e o Uruguai.

Tabela 01 – Legislação para aflatoxina M₁ em leite e derivados.

| Pais | Leite “in natura” (µg/L) | Derivados do Leite (µg/kg) |
|---------|-----------------------------|----------------------------------|
| França | 0,05 | |
| | 0,03 (para crianças <3anos) | |
| Brasil | 0,5 | 5,0 para leite em pó |
| Egito | 0,0 | 0,0 |
| Turquia | 0,05 | 0,25 |
| | | 0,025 (soro de leite e produtos) |
| Suíça | 0,05 | 0,25 (queijos) |
| | | 0,2 (manteiga) |
| | | 0,10 (leite em pó) |

Fonte: FAO, 2003.

MÉTODOS DE ANÁLISE PARA AFLATOXINA M₁

Por se tratar de importante problema de saúde pública, torna-se indispensável à adoção de técnicas analíticas que proporcionem credibilidade e confiabilidade para a detecção e controle desta toxina no leite (IAL, 2008). Tanto a cromatografia em camada delgada (CCD) como a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), constituem técnicas adequadas para separação, detecção e quantificação de aflatoxina M₁ em extratos de leite (SYLOS et al., 1996).

A CCD constitui uma técnica tradicional e possui grande importância histórica, pois permitiu que as micotoxinas fossem detectadas, isoladas e caracterizadas. O baixo custo e a simplicidade da técnica são as principais vantagens dessa técnica, fazendo com que tenha se tornado a referência para muitos laboratórios brasileiros. A quantificação é realizada através da técnica visual sob luz ultravioleta (UV) ou a densitometria (AMARAL et al., 2006).

Outras técnicas têm sido utilizadas, principalmente em triagens para determinações de aflatoxinas, que constituem imunoenaios, os quais envolvem interações entre micotoxinas e anticorpos específicos contra homólogos de micotoxinas. Os dois tipos de imunoenaios mais utilizados são ELISA (*enzyme-linked-immunosorbent assay*) e radioimunoenaios (SOUZA et al., 1999).

De qualquer forma, independente da técnica analítica empregada, procedimentos de validação devem ser adotados, permitindo avaliar a eficiência de cada metodologia, conhecendo seu potencial aplicativo e possíveis limitações (SOUZA et al., 1999).

CONTROLE DA AFLATOXINA M₁

Como a aflatoxina M₁ é estável à temperatura de processamento de bebidas lácteas UHT (130 a 150°C) é necessário que sejam adotadas medidas preventivas como secagem rápida dos grãos logo após a colheita e seu posterior armazenamento; retirada de grãos danificados, mofados ou de aspecto estranho; controle de temperatura inferior a 25°C e umidade relativa do ar inferior a 70%; disponibilidade de oxigênio menor que 0,5%; utilização de inibidores fúngicos afim de controlar o crescimento de *Aspergillus* principalmente nas rações de gado leiteiro, evitando assim a formação da toxina precursora (ALDRED, 2004; ARAÚJO, 2004).

Segundo PUTZER (2002), o tratamento de alimentos com amônia anídrica destrói a aflatoxina, tal como tratamentos com gás clorino, raios gama e ozônio, deixando o alimento em condições de consumo; porém o ideal ainda é a prevenção no campo.

Neste sentido as boas práticas de cultivo no campo e de armazenamento, assim como a implementação de protocolos de HACCP (Hazard Analysis Critical Control Point) (WHO, 1997), podem diminuir o risco de contaminação fúngica e, conseqüentemente, a contaminação de leite e de seus derivados (CREPPY, 2002).

PESQUISAS REALIZADAS NO BRASIL

Inexistem dados referentes à ocorrência de aflatoxina M₁ em bebida láctea não fermentada no Brasil. O maior número de pesquisas encontradas na literatura concentra-se em São Paulo e Minas Gerais, e em leite de vaca cru e em leite industrializado (Tabela 02), apresentando em sua maioria níveis inferiores aos estabelecidos pela legislação brasileira (0,5 µg/L).

Oliveira et al. (1997) avaliaram a contaminação por AFM₁ em leite em pó fornecido às crianças em escolas e berçários municipais de São Paulo (SP), e verificaram que 11% do total de 300 amostras investigadas foram positivas, embora com baixos níveis de contaminação (0,1 a 1 µg/kg).

Os processos de produção de leite em pó, leite condensado, requeijão e queijos podem aumentar a proporção de AFM₁ no produto final, em função da diminuição do teor de água (YOUSEF & MARTH, 1989).

Tabela 02 – Ocorrência de aflatoxina M₁ (AFM₁), em leite, registradas no Brasil.

| Leite | Local | Nº de amostras | Incidência (%) | Níveis de aflatoxina M ₁ (µg/mL) | Autores |
|-------------------------------|----------------|----------------|----------------|---|--------------------------|
| Leite tipo “B” | São Paulo | 224 | 1,8 | 0,025 | MARTINS & MARTINS, 1986. |
| “in natura” | Minas Gerais | 50 | 18,0 | 0,1-1,68 | PRADO et al., 1994. |
| Pasteurizado | São Paulo | 52 | 8,0 | 0,073-0,37 | SYLOS et al., 1996. |
| Pasteurizado, vitaminado, UHT | Minas Gerais | 110 | 25,0 | 0,038-0,07 | SOUZA et al., 1999. |
| Pasteurizado, UHT, em pó | Minas Gerais | 61 | 82,0 | 0,06-0,077 | PRADO et al., 1999. |
| Pasteurizado, UHT | Ribeirão Preto | 139 | 80,0 | 0,015-0,5 | GARRIDO et al., 2003. |
| “in natura”, pasteurizado | Minas Gerais | 70 | 45,0 | 0,0-0,074 | PEREIRA et al., 2005. |
| “in natura” Pasteurizado, UHT | São Paulo | 107 | 74,0 | 0,02-0,26 | SHUNDO & SABINO, 2006 |
| Pasteurizado | Paraná | 40 | 42,5 | 0,01-0,17 | BAGGIO, 2006. |
| Leite “in natura” e UHT | Porto Alegre | 128 | 0,00 | 0,0 | WEIGEL, 2007. |

REFERÊNCIAS

Abarca ML. Taxonomía e identificación de especies implicadas en la Aspergilosis nosocomial. *Rev Iberoam Micol.* 2000; (17):79-84.

Agrios GN. *Plant pathology.* 5ª ed. United States of America: Elsevier Academic Press; 2004.

Aldred D, Magan N, Olsen M. *Micotoxins in Food: detection and control.* "In": Aldred D, Magan N, Olsen M. *The use of HACCP in the control of mycotoxins: the case of cereals.* Sweden: Woodhead Publishing; 2004.

Amaral KAS, Machinski JM. Métodos analíticos para determinação de aflatoxinas em milho e seus derivados: uma revisão. *Rev Analítica.* 2006. Ago/Set; 56-58.

Applebaum RS, Brackett RE, Wiseman DW, Marth EH. Aflatoxin: toxicity to dairy cattle and occurrence in milk and milk products-a review. *J Food Protection.* 1982; (45):752-777.

Araújo, JMA. Aflatoxinas. "In:." *Química de alimentos.* Viçosa: UFV; 2004.

Baggio, ECR. Determinação de aflatoxina M₁ em leite pasteurizado pelos métodos de CCD e CLAE utilizando coluna de imunoafinidade. [Dissertação de Mestrado]. Curitiba, Paraná: Universidade Federal do Paraná, 2006.

Bailey GS et al. Effect of ammoniation of aflatoxin B₁-contaminated cottonseed feedstock on the aflatoxin M₁ content of cows' milk and hepatocarcinogenicity in the trout bioassay. *Food Chem Toxicol.* 1994; (32): 707-715.

Bakirci I. A study on the occurrence of aflatoxin M₁ in milk and milk products produced in Van province of Turkey. *Food Control.* 2001; (12): 47-51.

Bando É, Goncales LN, Tamura NK, Machinski JM. Biomarcadores para avaliação da exposição humana às micotoxinas. *J Bras Patol Med.* 2007; (43): 175-180.

Bizari PA, Prata LF, Rabelo RN. Eficiência da contagem microscópica a partir do leite UAT processado na retroavaliação da qualidade da matéria-prima. UNESP, 2003.

Brasil. Resolução RDC nº 274, de 15 de outubro de 2002 da ANVISA. Aprova o Regulamento Técnico Sobre Limites Máximos de Aflatoxinas Admissíveis no Leite, no Amendoim, no Milho. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. 2002; out (1):45.

Brasil. Instrução Normativa nº16 de 23 de agosto de 2005 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Bebidas Lácteas. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. 2005; ago (1):7.

Cabral Junior CR. Influência do tempo de desidratação e armazenamento sobre a ocorrência de fungos e destes na composição químico-bromatológica das vagens da algarobeira [*Prosopis juliflora* (SW) D.C.] em Alagoas. [Dissertação de Mestrado]. Rio Largo, Alagoas: Universidade Federal de Alagoas, 2003.

Cavalcante MPC. Ocorrência de fungos e identificação de espécies toxigênicas em vagens de algarroba (*Prosopis juliflora* (SW) D.C.).[Dissertação de Mestrado].Recife, Pernambuco: Universidade Federal Rural de Pernambuco, 1998.

Christensen CM, Kaufmann HH. Grain storage the role of fungi in quality loss. Minneapolis. University of Minesota Press. 1969; 470.

Creppy EE. Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins. Toxicol Lett. 2002; Jan (1/2):1-10.

Cousins CM, Bramley AJ. The microbiology of raw milk. "In" Robinson, RK. Dairy microbiology, 1981(1):119-163.

Dilkin P, Mallmann CA, Santurio JM, Hickmann JL. Classificação macroscópica, identificação da microbiota fúngica e produção de alfa toxinas em híbridos de milho. *Ciência Rural*. 2000; 1 (30):137-141.

Diniz SPSS. *Micotoxinas*. Rio de Janeiro: Editora Rural; 2002.

Franco DBG, Lanngraf M. *Microrganismos patogênicos de importância em alimentos* "In" Franco DBG, Lanngraf M. *Microbiologia de alimentos*. São Paulo: Atheneu; 2004.

Frisvad JC, SAMSON RA. Filamentous fungi and ecology spoilage and micotoxins production. *Handbook of Applied Mycology*. New York: Ed Dilip; 1991.

Garrido NS. et al. Occurrence of aflatoxins M₁ and M₂ in milk commercialized in Ribeirão Preto – SP, Brazil. *Food Additives and Contaminants*. 2003; 1 (20): 70-73.

Hill RA, Wilson DM, McMillian WW, Widstrom NW, Cole RJ, Sanders TH, Blankenship PD. Ecology of the *Aspergillus flavus* group and aflatoxin formation in corn and groundnut. "In" Lacey J ed. *Trichotecenes and other mycotoxins*. Chichester: Wiley J, Publisher; 1985.

International Agency on Research on Cancer [IARC]. Some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. IARC. *Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans*. Lyon: IARC; 1993.

Instituto Adolfo Lutz (São Paulo). *Métodos físico-químicos para análise de alimentos* coordenadores Odair Zenebon, Neus Sadocco Pascuet e Paulo Tiglea. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz; 2008.

Lazzari FA, Marcia BA. Monitoramento de fungos em milho em grão, grits e fubá. Ciênc Tecnol Aliment. 1998; 18(4): 363-7.

López CE et al. Presence of aflatoxin M₁ in milk for human consumption in Argentina. Food Control. 2003; 1 (14):31-34.

Kwiatkowski A, Alves APF. Importância da detecção e controle de aflatoxinas em alimentos. Rev. Saúde e Biol. 2007; 2 (2):44-53.

Martins JLS, Martins IS. Aflatoxina M₁ no leite tipo “B” comercializado no Município de São Paulo, SP (Brasil). Rev Saude Publica. 1986; 20(4):303-308.

Martins RS, Santos CV, Teixeira SR. Alterações da rede logística e expansão do mercado de leite longa vida no Brasil. Organizações rurais e agroindustriais. Lavras. 1999; 2 (1): 55-69.

MERCK. The Merck Index – 12nd ed. Editora: Susan Budavari. New Jersey: Merck & Co; 1996.

Neal GE et al. Metabolism and toxicity of aflatoxins M₁ and B₁ in human-derived *in vitro* systems. Toxicology and Applied Pharmacology. 1998; 1(151):152-158.

Oliveira MAB, Mesquita AJ, Sabino M, Café MB. Ocorrência aflatoxinas B₁ e G₁ em rações para frangos de corte em granja do Estado de Goiás. Arq Bras Med Vet Zootec 1997; 49 (6): 701-708.

Oliveira CAF, Germano PML. Aflatoxina M₁ em leite e derivados. “In” Germano, PML. Higiene e vigilância sanitária de alimentos. 2.ed. São Paulo: Varela, 2003;103-109.

Oliveira CAF, Sebastião LS, Rosim RE, Fagundes H, Fernandes AM. Ocorrência simultânea de aflatoxina e ácido ciclopiazônico em rações para vacas leiteiras. *Rev Analytica*. 2006; 5 (24):56-58.

Pereira MMG, Carvalho EP, Prado G, Rosa CAR, Souza LAF, Ribeiro JMM. Aflatoxinas em alimentos destinados a bovinos e em amostras de leite da região de lavras, Minas Gerais. *Rev Ciênc Agrotec*. 2005; 29 (1):106-112.

Prado G et al. Ocorrência de aflatoxina M₁ em leite consumido na cidade de Belo Horizonte – Minas Gerais / Brasil – agosto/98 a abril/99. *Ciênc Tecnol Aliment*. 1998.3(19):420-423.

Prado G, Nicácio MAS, LARA MA. Incidência de aflatoxina M₁ em leite cru e em pó no estado de Minas Gerais. *Higiene Alimentar*. 1994; 32 (8):34-36.

Pitt J, Hocking A. *Fungi and food spoilage*. An Aspen publication. 2nd ed. 1999;387-383.

Putzker J. Os reinos dos fungos. Santa Cruz do Sul:EDUNISC. 2002; (2):683-685.

Raven PH, Evert RF, Eichhorn SE. *Biologia Vegetal*. 6 ed. Rio de Janeiro: GUANABARA KOOGAN S.A; 2001.

Reddy L, Odhav B, Bhoola K. Aflatoxin B₁-induced toxicity in HepG2 cells inhibited by carotenoids: morphology, apoptosis and DNA damage, *Biol Chem*, Jan 2006; 387 (1): 87-93.

Rosamarinho JF, Oliveira CAF, Reis TR, Corrêa B. Aflatoxina M₁ e Ácido Ciclopiazônico em Leites de Consumo Comercializados no Município de São Paulo, SP, Brasil. *Braz J Food Technol*. 2006; janeiro:56-58.

Sabino M. Micotoxinas. "In" OGA, S. Fundamentos da Toxicologia, São Paulo: Atheneu; 1996.

Sylos CM, Rodriguez-Amaya DB, Carvalho PRN. Occurrence of aflatoxin M₁ in milk and dairy products commercialized in Campinas, Brazil. Food Additives and Contaminants. 1996; 2 (13):169-172.

Shundo L, Sabino M. Aflatoxin M₁ in milk by immunoaffinity column cleanup with TLC/HPLC determination. Braz J Microbiol. 2006; 2 (37):164-167.

Shundo L, Silva RA, Sabino M. Ocorrência de Aflatoxinas em amendoim e produtos de amendoim comercializados na região de Marília-SP, Brasil no período de 1999-2001. Rev. Inst. Adolfo Lutz, 2003; 62(3): 177-181.

Souza, SVC, Vargas EA, JUNQUEIRA RG. Eficiência de um *kit* de ELISA na detecção e quantificação de aflatoxina M₁ em leite e investigação da ocorrência no estado de Minas Gerais. Ciênc Tecnol Aliment. 1999; 3(19):401-405.

Weigel , M. Avaliação da contaminação por aflatoxina M₁ em leite cru e Leite UHT. Porto Alegre; 2007. Mestrado [Dissertação de Ciência e Tecnologia de Alimentos]. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos; 2007.

WHO (World Health Organization). Environmental Health Criteria 11, Geneva: WHO;1979.

World Health Organization (WHO) – Food Safety Issues. "HACCP: Introducing the Hazard Analysis and Critical Control Point System." WHO/FSF/FOS/97.2, 1997.

Taniwaki MH, Lamanaka BT, Banhe AA. Comparison of culture media to recover fungi from flour and tropical fruit pulp. J Food Mycol. 1999; 2: 291-302.

Tong WM, Lee MK, Galendo D, Wang ZQ, Sabapathy K. Aflatoxin-B exposure does not lead to p53 mutations but results in enhanced liver cancer of hupki (human knock-in) mice, *Int J Câncer*. Mar 2006.

Yousef AE, Marth EH. Stability and degradation of aflatoxin M₁. "In" Van E. *Mycotoxins in dairy products*. London: Elsevier Applied Science. 1989;127-161.

3. ARTIGO DE RESULTADOS

**OCORRÊNCIA DE FUNGOS E AFLATOXINA M₁ EM BEBIDA
LÁCTEA UHT COMERCIALIZADA NA CIDADE DE MACEIÓ-AL.**

**(Submetido a Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos –
Normas Anexo A)**

1 RESUMO

2

3 A aflatoxina M₁ é resultante da biotransformação da aflatoxina B₁ (AFB₁)
4 secretado no leite de animais que ingerem alimentos contaminados com AFB₁,
5 assumindo destacada relevância em saúde pública devido aos seus efeitos
6 carcinogênicos e mutagênicos. O consumo de bebida láctea UHT vem se
7 destacando no mercado como substituto do leite, devido as suas
8 características organolépticas e a sua praticidade. O objetivo deste trabalho foi
9 avaliar a contaminação fúngica e quantificar os níveis de aflatoxina M₁ de 10
10 marcas comercializadas de bebidas lácteas, em Maceió/AL. A identificação
11 fungos foi realizada de acordo com o método descrito no *Compendium of*
12 *methods for the microbiological examination of foods* (1992). A quantificação de
13 aflatoxina M₁ foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)
14 pelo método adaptado do IAL (2008). Foram isolados 14 gêneros de fungos,
15 onde se destacam *Aspergillus flavus* e *Penicillium* sp, e níveis de aflatoxinas M₁
16 com uma variação de 0,02a 0,48±0,17 µg/L, evidenciando a necessidade de
17 boas práticas de fabricação no campo e de armazenamento, afim de controlar
18 o crescimento fúngico e a conseqüente contaminação com seu metabolito
19 tóxico.

20

21 **Palavras-chave:** micotoxina, *Aspergillus flavus*, cromatografia líquida de alta
22 eficiência

23

24

25

1 SUMMARY

2

3 The aflatoxin M₁ is a toxic metabolite resultant from the biotransformation of the
4 aflatoxin B₁ (AFB₁) co-secreted with milk from animals that ingested food
5 contaminated by AFB₁. This fact is a relevant public health issue due to the
6 carcinogenic e mutagenic effects of the aflatoxin. The increasing consume of
7 UHT milky beverages, as a substitute for the milk, is a result of their
8 organoleptic characteristics. Considering that, this essay's objective is to
9 analyze and quantify, in 10 UHT milky beverages sold in Maceió-AL, the
10 contamination levels by aflatoxin M₁. The fungus identification process was
11 made according to the method described in the *Compendium of methods for the*
12 *microbiological examination of foods* (1992). For the aflatoxin M₁ quantification,
13 using the high performance liquid chromatography (HPLC), the method used
14 was the one of IAL (2008) adapted. It were isolated 14 kinds of fungus . It must
15 be mentioned that the *Aspergillus flavus* and *Penicillium sp.* were among the
16 findings. The levels of aflatoxin M₁ ranged from 0,02 to 0,48 ± 0,17 µg/L that
17 suggests the necessity of better practices for production and storing. These
18 "better practices" should control the fungus growth and the consequent
19 contamination by their toxic metabolite.

20

21 **Keywords:** micotoxin, *Aspergillus flavus*, high performance liquid
22 chromatography

23

24

25

1 1. Introdução

2

3 O consumo de bebida láctea UHT, sabor chocolate, vem se destacando
4 no mercado como um substituto do leite, sendo um alimento consumido por
5 várias faixas etárias, devido às suas características organolépticas, nutritivas e
6 de praticidade. Segundo Viana (2007), no período 2001-2005, os produtos
7 achocolatados cresceram 48%, sinalizando um desempenho próximo dos
8 sucos de frutas, porém, apresentando uma maior rentabilidade.

9 Entende-se por bebida láctea UHT com adição, o produto lácteo
10 resultante da mistura do leite (in natura, pasteurizado, esterilizado, UHT,
11 reconstituído, concentrado, em pó, integral, semidesnatado ou parcialmente
12 desnatado e desnatado) e soro de leite (líquido, concentrado e em pó)
13 adicionado de produto(s) ou substância (s) alimentícia(s), gordura vegetal e
14 outros produtos lácteos, onde a base láctea representa pelo menos 51%
15 (BRASIL, 2005).

16 Em Maceió existem pelo menos 16 marcas de bebidas lácteas UHT
17 disponíveis à venda, em diversos estabelecimentos comerciais de pequeno e
18 até de grande porte, sendo a maior parte delas comercializadas no sabor
19 chocolate e uma pequena parte em outros sabores como de morango, em
20 embalagens de 200 mL e 1L, todas submetidas ao tratamento Ultra High
21 Temperature (UHT).

22 Os problemas de bebidas UHT decorrem, principalmente, da
23 interpretação de que o processo corrigiria todos os defeitos anteriores da
24 matéria-prima, principalmente os de ordem microbiológica, uma vez que
25 promoveria a “esterilização” do produto. Todavia, os consumidores têm se

1 deparado com embalagens estufadas ou leites geleificados, mesmo dentro do
2 prazo de validade para consumo humano. Isso se deve à qualidade do leite cru
3 ou do processamento, pois o tratamento UHT, quando aplicado à matéria-prima
4 adequada, possui elevada eficiência (BIZARI et al., 2003).

5 O tratamento térmico na forma que costuma ser utilizado (pasteurização
6 e esterilização) para processamento de alimentos, não causa a inativação
7 completa das aflatoxinas (FRANCO & LANDGRAF, 2004). Em estado puro, as
8 aflatoxinas são extremamente estáveis em elevadas temperatura superando
9 até 200 °C (PADUA et al., 2002).

10 OLIVEIRA & GERMANO (2003) afirmaram que podem ser encontradas
11 várias aflatoxinas nos produtos alimentares, sendo as mais importantes as B₁,
12 B₂, G₁, G₂. A aflatoxina M₁ (AFM₁) é um potente hepatocarcinógeno excretado
13 no leite de vacas alimentadas com rações contaminadas com aflatoxina B₁
14 (AFB₁), classificadas na Classe 1 dos carcinógenos humanos pela International
15 Agency for Research on Cancer – IARC (2003). A contaminação do leite de
16 consumo humano com AFM₁, classificadas no grupo 2B, possíveis
17 carcinógenos para humanos, assumem destacada relevância em saúde
18 pública, ao se considerar que seus efeitos tóxicos agudos e carcinogênicos têm
19 sido extensivamente demonstrados em diversas espécies.

20 Os fungos, responsáveis pela produção de aflatoxinas, podem
21 contaminar os alimentos, causando sua deterioração, reduzindo seu valor
22 nutricional e alterando suas qualidades organolépticas (TANIWAKI et al., 1999;
23 RAVEN et al., 2001), podendo ser prejudiciais à saúde dos animais e dos seres
24 humanos. Neste sentido, Sabino (1987) destaca os gêneros *Aspergillus*,

1 *Penicillium* e *Fusarium* como sendo espécies capazes de crescerem em
2 diversos substratos e de produzirem toxinas patogênicas.

3 Neste contexto, os objetivos deste trabalho foram investigar a ocorrência
4 de fungos patogênicos, bem como a possível presença de aflatoxina M₁,
5 adaptando a técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) à
6 quantificação de aflatoxina M₁ em bebida láctea UHT, sabor de chocolate.

7

8 **2. Material e métodos**

9

10 **2.1 - Local**

11

12 As amostras de bebida láctea UHT com adição, sabor chocolate, foram
13 adquiridas aleatoriamente durante o período de junho a setembro de 2008, em
14 estabelecimentos comerciais de Maceió-AL.

15

16 **2.2 - Material**

17

18 Foram coletadas 20 amostras, pertencente a 10 marcas, sendo duas
19 unidades do mesmo lote de cada fabricante, conservadas em embalagens
20 originais e invioladas de 200 mL e 1 Litro. As amostras foram identificadas e
21 transportadas para o laboratório de Laboratório de Enzimologia Aplicada e
22 Análises Bromatológicas-IQB/UFAL. Retirou-se 100 mL de cada marca da bebida
23 para determinação de Aflatoxina M₁. As amostras foram transportadas para o

1 Laboratório de Fitopatologia, Centro de Ciências Agrárias-CECA/UFAL, para a
2 identificação de fungos.

3

4 **2.3 Isolamentos dos fungos**

5

6 A identificação dos fungos foi realizada de acordo com o método descrito
7 no *Compendium of methods for the microbiological examination of foods* (1992),
8 sendo utilizado o procedimento de contagem padrão em placas de Petri. As
9 amostras foram semeadas em meio BDA (Batata-Dextrose-Ágar), com adição de
10 100mg/mL de amoxicilina , em triplicata, utilizando-se diluições de 10^{-1} até 10^{-4} . As
11 placas foram incubadas em bancada sob temperatura ambiente ($\pm 25^{\circ}\text{C}$)
12 durante sete dias.

13 A contagem de colônias foi realizada pelo processo de contagem padrão
14 (JAY, 1992). Após a contagem, multiplicou-se o resultado pelo inverso do volume
15 inoculado na placa, e os resultados foram expressos em unidades formadoras de
16 colônias por mililitro (UFC/mL).

17 Após crescimento, as colônias foram selecionadas para preparo de lâminas
18 para visualização em microscopia direta, utilizando-se água destilada e/ou azul de
19 metileno, como corante. Desta forma, pode-se observar as estruturas
20 morfológicas dos fungos. Os fragmentos também foram observados sob
21 microscopia direta e as estruturas comparadas com as descritas em publicação
22 especializada. Os fungos foram identificados em nível de gênero e espécie, com
23 base nas chaves de Barnett & Hunter (1987), Pitt (1985), Rappe & Felmei (1977).
24 As amostras que não foram identificadas foram selecionadas para a realização de

1 microculturas.

2

3 **2.4 - Características morfológicas das estruturas após microculturas**

4

5

6 A caracterização morfológica dos isolados foi realizada após microculturas
7 dos fungos não identificados no primeiro momento, consistindo de placas de Petri,
8 forradas com papel de filtro e um suporte de vidro, sobre o qual foram colocadas
9 lâminas e lamínulas, sendo o conjunto esterilizado em autoclave a 120°C durante
10 20 minutos. Com a ajuda de uma alça de platina, pequenos fragmentos de
11 crescimento fúngico foram inoculados em quatro pontos laterais de um bloco de
12 meio BDA ($\pm 1\text{cm}^2$), previamente colocado sobre a lâmina, cobrindo-se em
13 seguida com a lamínula. O papel de filtro foi umedecido com água destilada
14 esterilizada, incubando-se as microculturas em temperatura ambiente ($\pm 25^\circ\text{C}$), por
15 48–72 horas. Após este período procedeu-se a retirada da lamínula com o auxílio
16 de uma pinça, colocando-a sobre uma lâmina, contendo o corante azul de
17 metileno e/ou água destilada e as estruturas formadas, observada ao microscópio
18 óptico.

19

20 **2.5 - Determinação de aflatoxina M₁**

21

22 **2.5.1 - Extração**

1 Amostras de bebida láctea (75 mL), foram homogeneizadas com metanol
2 (CH_3OH), filtradas com celite (SiO_2) em papel filtro Whatman nº 4, com posterior
3 recolhimento dos extratos. Aos extratos foi adicionado cloreto de sódio (NaCl) a
4 4% (m/v) e realizou-se a separação das fases. À fase metanólica foi adicionado
5 hexano ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$), sob agitação por 3 minutos, em duplicata.
6 Posteriormente foi adicionado clorofórmio (CHCl_3) à fase metanólica, sob agitação
7 por 3 minutos em duplicata. Os extratos foram recolhidos e combinados em
8 frascos âmbar, onde foi adicionado sulfato de sódio anidrido (Na_2SO_4) e
9 armazenados sob congelamento.

10

11 **2.5.2 - Separação e quantificação**

12

13 Os extratos obtidos na etapa anterior foram filtrados e evaporados, até a
14 secura para a determinação de AFM_1 por cromatografia líquida de alta eficiência
15 (CLAE). Adicionou-se 2 mL de diclorometano (CH_2Cl_2) afim de transferir para um
16 frasco âmbar, e em seguida foram secos sob fluxo de nitrogênio líquido.

17 Foram utilizados 100,0 μL de acetonitrila (CH_3CN) para ressuspender a
18 amostra. Em seguida foram homogeneizadas em ultra-som por 15 minutos,
19 filtradas em membrana de 0.45 μm Millex HV filter (PVDF membrane) e recebidas
20 em frascos âmbar. O extrato foi conduzido em um sistema de cromatografia
21 Shimadzu com detector ultravioleta 365 nm, com coluna de fase reversa C18
22 (150x6mm). A coluna foi diluída isocraticamente com água ultrapurificada (Milli Q,
23 Milipore) desgaseificada em ultra-som, sendo utilizadas as seguintes condições:
24 acetonitrila (30:1) a um fluxo 0,8 mL/minuto e tempo de retenção de 10 minutos.

1 Para o preparo da curva de calibração da aflatoxina M₁ utilizou-se o padrão
2 Supelco-Sigma Aldrich, dissolvido em acetonitrila com concentração de 10,0
3 µg/mL.

4 Foram injetadas alíquotas de 10,0 µL de soluções-padrão de aflatoxina M₁
5 com concentrações na faixa de 0,1 a 6,0 µg/mL, preparadas no momento da
6 análise, nas condições cromatográficas descritas.

7 De cada ponto (0,0 a 6,0 µg/mL) foram injetadas três alíquotas, com
8 lavagem do amostrador entre as injeções, para evitar contaminação, obtendo-se a
9 média das leituras para construção da curva de calibração. De acordo com a
10 curva padrão, obteve-se a equação $\hat{y} = 6.090,1 + 34.682x$; $R^2 = 0,989$, passando
11 pela origem, incluindo a faixa de concentração das amostras.

12

13 **2.5.3 - Teste de recuperação da aflatoxina M₁**

14

15 O desempenho do método analítico por CLAE com detector UV, para
16 determinação de aflatoxina M₁ foi realizado através de recuperação de três níveis
17 de contaminação 0,13, 0,23 e 1,0 µL/mL.

18

19 **Determinação da aflatoxina M₁ no extrato da amostra**

20

21 O método utilizado para a extração de AFM₁ foi modificado a partir da
22 metodologia proposta pelo Instituto Adolfo Lutz – IAL (2008).

23 Foram injetadas alíquotas de 10 µL do extrato da amostra purificado,

1 usando as mesmas condições cromatográficas utilizadas na elaboração da curva
2 de calibração.

3 Identificou-se o pico da aflatoxina M₁ da solução da amostra por
4 comparação com o tempo de retenção obtido na injeção das soluções padrões da
5 aflatoxina M₁.

6 O cálculo da massa de AFM₁ foi realizado de acordo com (AOAC, 2000),
7 adaptado para utilização da área em substituição do pico da amostra obtendo-se
8 a concentração de AFM₁ em µg/L.

9

$$10 \quad \text{AFM}_1 \text{ µg/L de} = \frac{A \times C' \times \text{VI}' \times V}{11 \quad A' \times \text{VI} \times \text{VL}}$$

12

13 onde:

14 A = área do pico da amostra; A' = área do pico do padrão; C' = concentração do
15 padrão (ng/µL); VI' = volume injetado do padrão; VI = volume injetado da amostra;
16 V = volume final da amostra (µL); VL = volume da bebida láctea representado no
17 final do extrato (mL).

18

19 **3. Resultados e Discussão**

20

21 **3.1 - Isolamento dos Fungos**

22

23 Os dados obtidos no presente estudo permitem observar a grande
24 variedade de gêneros e espécies de fungos nas amostras analisadas, totalizando

1 14 espécies, onde se destacam *Aspergillus flavus*, *Penicillium* sp., *Curvularia* sp.,
2 *Talaromyces* sp., *Cladosporium* sp., e *Paecilomyces* sp. (Tabela 3). Observou-se
3 a presença de fungos em 70% das marcas analisadas.

4 Quanto à observação de fungos filamentosos, foi verificada a presença de
5 *Penicillium* sp. e *Aspergillus flavus*. Estes microrganismos também foram
6 encontrados por Poiatti et al. (2007), em amostras de leite cru proveniente da
7 região de Dracena–SP .

8 Jordano et al. (1989) e Li & Li (1998) também isolaram fungos filamentosos
9 em derivados de leites como queijos e iogurtes, isolando inclusive algumas
10 espécies de *Aspergillus*.

11 *Penicillium* sp. são contaminantes naturais da alimentação humana e
12 animal, encontrados em milho, cereais, trigo, nozes, frutas secas, vinhos e leites,
13 que quando armazenados em condições favoráveis de umidade e temperatura,
14 podem provocar uma doença ocasional denominada peniciliose. Algumas
15 espécies podem produzir Ocratoxina-A, nefrotóxica e também carcinogênica
16 (LACAZ et al., 1998; CHIAVARO et al., 2002).

17

18 Tabela 01 – Valores médios em unidades formadoras de colônias (UFC) de
19 fungos encontrados nas amostras de bebida láctea UHT. Maceió-Alagoas, 2010

20

21 Os gêneros *Cylindrocladium* sp., *Rosellinia* sp., *Curvularia* sp., *Botrytis*
22 sp., *Cladosporium* sp. e *Nigrospora* sp. apresentam importância fitossanitária e
23 são responsáveis por doenças no campo antes da colheita, sendo a *Rosellinia* sp.
24 um agente etiológico de doenças radiculares, responsável pela podridão negra,

1 vermelha, castanha e branca em cacauero (*Theobroma cacao*), não sendo
2 patogênica ao homem (OLIVEIRA & LUZ, 2004).

3 A presença de fungos do gênero *Curvularia*, identificado em apenas uma
4 amostra, pode ser explicada, pelo fato de que esse grupo de fungos é encontrado
5 no solo e no ar, principalmente em regiões de clima tropical e subtropical
6 (SIVANESAN, 1987). Apenas um pequeno número destas espécies pode
7 raramente originar doenças em animais ou humanos, surgindo como agentes de
8 onicomioses, sinusite alérgica, pneumonia, endocardite e alergia
9 broncopulmonar (CARTER & BOUDREAUX, 2004).

10 De acordo com Lacaz et al. (2002), dentre os principais gêneros de fungos
11 anemófilos amplamente distribuídos no ambiente, o gênero *Cladosporium*
12 apresenta maior incidência que os demais. São considerados importantes
13 alérgenos em todo mundo, sendo responsáveis por processos alérgicos como
14 rinite, asma, alveolite, sinusite e micoses pulmonares.

15 Em 20% das amostras foram isolados *Aspergillus flavus*, sendo este
16 gênero também responsável pelo maior índice de contaminação das amostras.
17 Esta espécie pode causar doenças denominadas por aspergiloses, que podem
18 manifestar-se como infecções oportunistas, alergias ou toxicoses (TRABULSI et
19 al. 1999).

20 De acordo com Edds (1983), após um período prolongado da ingestão de
21 doses sub-agudas, as micotoxinas podem ocasionar lesões hepáticas graves,
22 como necrose do parênquima ou produzir lesões progressivas como severa
23 depressão no crescimento corporal, alterações histológicas e hepatomas.

1 Além disso, estes microrganismos estão associados a quadros patológicos
2 como otomicoses, ceratomicoses, lesões do palato duro, meningites,
3 endocardites, doenças sistêmicas, gastro-intestinais, pulmonares, geniturinárias,
4 cutâneas, subcutâneas e ósseas (KERN & BLEVINS, 1999).

5 Portanto, fica evidenciado que a presença de fungos fitopatogênicos e
6 anemófilos nas bebidas lácteas UHT, sabor chocolate, analisadas neste estudo,
7 traduzem má qualidade da matéria prima ou falhas higiênico-sanitárias ao longo
8 do processamento, além de tratamento térmico inadequado ou insuficiente,
9 ratificando PEREDA et al. (2005) que ressalta o objetivo de qualquer tratamento
10 esterilizante na destruição dos microrganismos presentes, esporulados ou não,
11 ou, pelo menos, de todos aqueles que possam proliferar-se no produto final,
12 obtendo assim, um produto microbiologicamente estável para que seja possível
13 armazená-lo à temperatura ambiente por um longo período.

14

15 **Determinação da Aflatoxina M₁**

16

17 O desempenho do método analítico por CLAE com detector UV, para
18 determinação de aflatoxina M₁ foi realizado através de recuperação de três níveis
19 de contaminação 0,13, 0,23 e 1,0 µL/mL, obtendo resultados de 83,6 a 95%.
20 Confrontando esses resultados com o coeficiente de variação, observa-se uma
21 alta eficiência do método proposto, apresentando resultado semelhante aos
22 ensaios de recuperação realizados por PEREIRA (2005) e SHUNDO et al. (2004)
23 em leite.

1 Na Tabela 02 observa-se os valores de aflatoxina M₁ das 10 marcas de
2 bebida láctea UHT, onde houve uma variação de 0,02 a 0,48 ± 0,17 µg/L.

3 O Brasil não estabelece limites máximos de aflatoxina M₁ em derivados
4 do leite. Comparando-se os resultados encontrados neste estudo com a
5 Legislação Brasileira para leite, que é de 0,5 µg/L (BRASIL, 2002), todas as
6 marcas encontram-se aprovadas. Entretanto, apenas as amostras 1 e 6 estão
7 dentro dos padrões estabelecidos pela Comunidade Européia (CAST, 2003)
8 iguais a 0,05 µg/L para leites e derivados.

9 Para exportação, muitos países como a Suíça, apresentam legislação
10 específica adotando-se limites máximos tolerados de AFM1 em derivados de leite,
11 obtidos a partir do soro, não superiores a 0,025 µg/L (FAO, 2003). Desta forma,
12 apenas a marca 6 aqui avaliada, estaria aprovada para comercialização e
13 consumo humano nestes países.

14

15 Tabela 02 – Teores médios de aflatoxina M₁ nas marcas analisadas de bebida
16 láctea UHT comercializada na cidade de Maceió-AL

17

18 Como inexistem pesquisas e levantamentos sobre a ocorrência de
19 aflatoxina M₁ em bebida láctea UHT, os trabalhos disponíveis no Brasil destacam
20 a ocorrência de aflatoxina M₁ em leite UHT e leite pasteurizado (Tabela 03) os
21 resultados apresentaram-se semelhantes aos de Sylos et al. (1996) que
22 analisaram leite pasteurizado na cidade de São Paulo e encontraram níveis de
23 contaminação entre 0,07 e 0,3 µg/mL, e aos de Garrido et al. (2005), que

1 encontraram uma variação de 0,01 a 0,5 µg/mL em 80% das 139 amostras de
2 leite pasteurizado e UHT da cidade de Ribeirão Preto-SP.

3 Shundo & Sabino (2006) analisaram 107 amostras de leite “in natura”,
4 pasteurizado e UHT, na cidade de São Paulo e obtiveram 74% das amostras
5 contaminadas com níveis (<0,26 µg/mL) inferiores aos encontrados na presente
6 pesquisa. Resultados com níveis menores também foram relatados por Baggio
7 (2006), quando analisou 40 amostras de leite pasteurizado no Estado do Paraná,
8 onde 42,5% encontravam-se contaminadas com valores de 0,01 a 0,17 µg/L.

9 Prado (1999) analisou leite pasteurizado, UHT e em pó onde encontrou
10 níveis superiores aos da pesquisa com valores entre 0,06 - 0,7 µg/L
11 correspondendo-se a 82% de contaminação nas 61 amostras analisadas.
12 Segundo PITTET (1998), leite em pó e leite condensado podem apresentar um
13 teor elevado de aflatoxina M₁ devido à redução da atividade da água contida
14 nestes produtos.

15

16 Tabela 03 – Resultados de pesquisas sobre a ocorrência de AFM₁, em leite,
17 registrados no Brasil.

18

19 Tendo em vista que a AFM₁ é resistente aos processos usuais de
20 beneficiamento do leite e produção de derivados, as orientações para a
21 prevenção do problema estão condicionadas ao menor nível prático de AFB₁ na
22 ração utilizada na alimentação do gado leiteiro sendo fundamental o incentivo das
23 boas práticas agrícolas (Gonzalez et al., 2004).

1 4. Conclusões

2

3 Tendo como base os resultados obtidos, nas condições em que os
4 experimentos foram realizados, pode-se concluir que os principais gêneros de
5 fungos encontrados foram *Aspergillus* e *Penicillium*; tendo sido encontrado em
6 70% das marcas analisadas.

7 Além disso, o método utilizado, CLAE com detector UV, para quantificação
8 de aflatoxina M₁ em bebida UHT foi eficiente; e determinou que nas 10 marcas de
9 bebida láctea UHT analisadas apresentaram-se dentro dos padrões (0,02 a 0,48 ±
10 0,17 µg/L) quando comparamos com a Legislação Brasileira para leite (0,5 µg/L).

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

1 **5. Referências bibliográficas**

2

3 APHA. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 3.
4 ed. Washington: American Public Health Association. 1992; 1219.

5

6 Baggio, ECR. Determinação de aflatoxina M₁ em leite pasteurizado pelos métodos
7 de CCD e CLAE utilizando coluna de imunoafinidade. [Dissertação de Mestrado].
8 Curitiba, Paraná: Universidade Federal do Paraná, 2006.

9

10 Barnett HL, Hunter BB. Illustrated genera of imperfect fungi. MacMillan Publishing
11 Company. 1987;

12 Brasil. Resolução RDC nº 274, de 15 de outubro de 2002 da ANVISA. Aprova o
13 Regulamento Técnico Sobre Limites Máximos de Aflatoxinas Admissíveis no
14 Leite, no Amendoim, no Milho. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil.
15 2002; out (1):45.

16 Brasil. Instrução Normativa nº16 de 23 de agosto de 2005 do Ministério da
17 Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Departamento de Inspeção de Produtos
18 de Origem Animal. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Bebidas
19 Lácteas. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. 2005; ago (1):7.

20 Bizari PA, Prata LF, Rabelo RN. Eficiência da contagem microscópica a partir do
21 leite UAT processado na retroavaliação da qualidade da matéria-prima. UNESP,
22 2003.

- 1 CAST (Council of Agricultural Science and Technology). Mycotoxins: risks in plant,
2 animal and human systems. Task Force Report. EUA: CAST; 2003 (139).
3
- 4 Carter E, Boudreaux C. Fatal cerebral phaeohyphomycosis due to *Curvularia*
5 *lunata* in an immunocompetent patient. J. Clin. Microbiol. 2004; (42): 5419-5423.
6
- 7 Chiavaro E, Lepiani A, Colla F, Betton P, Pari E, Spotti, E. Ochratoxin A
8 determination in ham by immunoaffinity clean-up and a quick fluorometric method.
9 Food Additives and Contaminants. 2002; 6(19): 575-581.
10
- 11 Edds GT et al. Aflatoxin incidence in feeds toxicology and possible residue
12 hazards in foods. Proc. Annu. Meet. US. Anim. Hlth Ass. 1980; (84): 301-9.
13
- 14 FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). Global Livestock
15 Production and Health Atlas 2003. Acessado em 22 de janeiro de 2010.
16 Disponível em <http://www.fao.org/ag/aga/glipha/index.jsp>
17
- 18 Franco DBG, Lanngraf M. Microrganismos patogênicos de importância em
19 alimentos "In" Franco DBG, Lanngraf M. Microbiologia de alimentos. São Paulo:
20 Atheneu; 2004.
21
- 22 Garrido NS et al. Occurrence of aflatoxins M₁ and M₂ in milk commercialized in
23 Ribeirão Preto - SP, Brazil. Food Additives and Contaminants. 2003; 1 (20):70-73.

- 1 Gonçalez E, Pinto MM, Manginelli S, Felício JD. Intoxicação de vacas leiteiras por
2 farelo de algodão naturalmente contaminado com aflatoxinas. Ciênc. Rural. 2004;
3 34 (1):171-174.
4
- 5 International Agency on Research on Cancer [IARC]. Some naturally occurring
6 substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and
7 mycotoxins. IARC. Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans.
8 Lyon: IARC; 1993.
9
- 10 Instituto Adolfo Lutz (São Paulo). Métodos físico-químicos para análise de
11 alimentos coordenadores Odair Zenebon, Neus Sadocco Pascuet e Paulo Tiglia.
12 São Paulo: Instituto Adolfo Lutz; 2008.
13
- 14 Jay JM. Microbiologia Moderna de los Alimentos. Espanha:Ed. Acribia;1992.
15 804p.
- 16 Jordano R, Jodral M, Martines P, Salmeron J, Pozo R. Aflatoxin producing Strains
17 of *Aspergillus flavus* in yogurt. J Food Prot. 1989; (52):823-824.
18
- 19 Lacaz CS, Porto E, HEINS-VACCARI MLT. Fungos actinomicetos, algas de
20 interesse médico. São Paulo: Savier: 1998; 87p.
- 21 Li F, Li Y. Study on the contamination level and the tolerable limit of mould and
22 yeast in yoghurt. Wei Sheng Yan Jiu. 1998; 4(27):257-258.

- 1 Kern ME, Blevins KS. Micologia médica. 2. ed. SãoPaulo: Premier. 1999; 256 p.
2
- 3 Oliveira ML, Luz EDM. Identificação e manejo das principais doenças do
4 cacaueteiro no Brasil. Ilhéus, CEPLAC/CEPEC/SEFI7; 2004; 132p.
5
- 6 Pádua IPM, SILVEIRA IA, MARTINS CECB. Aflatoxinas e risco de contaminação
7 do leite humano. Pro Homine. 2002;1(1).
8
- 9 Pereda JA. Tecnologia de los alimentos – volumen II: alimentos de origen animal.
10 Espanha: Editorial Síntesis. 2005;75-78.
11
- 12 Pereira MMG, Carvalho EP, Prado G, Rosa CAR, Souza LAF, Ribeiro JMM.
13 Aflatoxinas em alimentos destinados a bovinos e em amostras de leite da região
14 de lavras, Minas Gerais. Rev Ciênc Agrotec. 2005; 29 (1):106-112.
15
- 16 Pitt J, Hocking A. Fungi and food spoilage. An Aspen publication. 2nd
17 ed.1999;387-383.
18
- 19 Pittet, A. Natural occurrence of mycotoxins in foods and feeds – an updated
20 review. Revue Médecine Vétérinaire. 1998; 6(149):479-492.
21
- 22 Poiatti, M. L.; KOLYAMA, N.T.G.; HIDALGO, G.R.; LOPES, J.; SANTOS, A. B.;
23 SCHOCKEN-ITURRINO,R.P. Fungos isolados de leite cru da região de Dracena-
24 SP."In" 1º Congresso Catarinense do leite. Pinhalzinho-SC; 2007.

- 1 Prado G et al. Ocorrência de aflatoxina M₁ em leite consumido na cidade de Belo
2 Horizonte – Minas Gerais / Brasil – agosto/98 a abril/99. Ciênc Tecnol Aliment.
3 1999.3(19):420-423.
4
- 5 Rappe KB, Femel DI. The genus *Aspergillus*. New York: Robert E.K. 1977; 68p.
6
- 7 Raven PH, Evert RF, Eichhorn SE. Biologia Vegetal. 6 ed. Rio de Janeiro:
8 GUANABARA KOOGAN S.A; 2001.
9
- 10 Sylos CM, Rodriguez-Amaya DB, Carvalho PRN. Occurrence of aflatoxin M₁ in
11 milk and dairy products commercialized in Campinas, Brazil. Food Additives and
12 Contaminants. 1996; 2 (13):169-172.
13
- 14 Shundo L, Ruvieri V, Navas SA, Sabino M. Otimização da determinação da
15 aflatoxina M₁ em leite, utilizando coluna de imunoafinidade e cromatografia em
16 camada delgada. Rev Inst Adolfo Lutz 2004; 63 (1): 43-48
17
- 18 Shundo L, Sabino M. Aflatoxin M₁ in milk by immunoaffinity column cleanup with
19 TLC/HPLC determination. Braz J Microbiol. 2006; 2(37):164-167.
20
- 21 Sivanesan A. Graminicolous species of *Bipolaris*, *Curvularia*, *Drechslera*,
22 *Exserohilum* and their teleomorphs. Mycological Papers 158: 1987; 1-261.
23
- 24 Souza SVC, Vargas EA, JUNQUEIRA RG. Eficiência de um *kit* de ELISA na

- 1 detecção e quantificação de aflatoxina M₁ em leite e investigação da ocorrência no
2 estado de Minas Gerais. Cienc Tecnol Aliment. 1999; 3(19):401-405.
3
- 4 Taniwaki MH, Lamanaka BT, Banhe AA. Comparision of culture media to recover
5 fungi from flour and tropical fruit pulp. J Food Mycol. 1999; 2: 291-302.
6
- 7 Trabulsi, L.R.; Althertum, F.; GOMPERTZ, O.F.; CANDEIAS, J. A. N.
8 Microbiologia. 3 ed., São Paulo:Atheneu, 1999, p. 235-285.
9
- 10 Weigel , M. Avaliação da contaminação por aflatoxina M₁ em leite cru e Leite
11 UHT. Porto Alegre; 2007. Mestrado [Dissertação de Ciência e Tecnologia de
12 Alimentos]. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de
13 Ciência e Tecnologia de Alimentos; 2007.
14
15
16
17
18
19
20
21
22

Tabela 01 – Valores médios em unidades formadoras de colônias (UFC) de fungos encontrados nas amostras de bebida láctea UHT. Maceió-Alagoas, 2010

| MARCAS | GÊNEROS DE FUNGOS | UFC/mL |
|--------|----------------------------|-----------------------|
| 1 | <i>Penicillium</i> sp. | 2,1 x 10 ³ |
| | <i>Nigrospora</i> sp. | 1,0 x 10 ² |
| | <i>Talaromyces</i> sp. | 1,0 x 10 ² |
| | <i>Torula</i> sp. | 3,0 x 10 ⁴ |
| | <i>Cylindrocladium</i> sp. | 1,0 x 10 ⁴ |
| | <i>Paecilomyces</i> sp. | 1,5 x 10 ⁴ |
| 4 | <i>Rosellinia</i> sp. | 1,0 x 10 ² |
| 5 | <i>Aspergillus flavus</i> | 3,1 x 10 ² |
| 6 | <i>Aspergillus flavus</i> | 5,2 x 10 ⁴ |
| | <i>Cylindrocladium</i> sp. | 7,0 x 10 ² |
| | <i>Amblyosporium</i> sp. | 1,0 x 10 ⁴ |
| 7 | <i>Botrytis</i> sp. | 2,1 x 10 ⁴ |
| | <i>Ascotricha</i> sp. | 2,0 x 10 ⁴ |
| | <i>Cladosporium</i> sp. | 1,0 x 10 ² |
| 8 | <i>Cladosporium</i> sp | 1,0x10 ⁴ |
| | <i>Curvularia</i> sp. | 2,0 x 10 ² |
| 9 | <i>Periconiella</i> sp. | 2,0 x 10 ² |

Tabela 02 – Teores médios de aflatoxina M₁ nas marcas analisadas de bebida láctea UHT comercializada na cidade de Maceió-AL

| Marcas analisadas | Média ± DP AFM ₁ (µg/L) |
|-------------------|--|
| 1 | 0,03 ± 0,01 |
| 2 | 0,29 ± 0,07 |
| 3 | 0,45 ± 0,02 |
| 4 | 0,04 ± 0,00 |
| 5 | 0,48 ± 0,13 |
| 6 | 0,02 ± 0,00 |
| 7 | 0,14 ± 0,01 |
| 8 | 0,22 ± 0,04 |
| 9 | 0,08 ± 0,01 |
| 10 | 0,13 ± 0,10 |

Tabela 03 – Resultados de pesquisas sobre a ocorrência de AFM₁, em leite, registrados no Brasil.

| Leite | Local | Nº de amostras | Incidência (%) | Níveis de aflatoxina M₁ (µg/mL) | Autores |
|-------------------------------|----------------|-----------------------|-----------------------|---|--------------------------|
| Leite tipo “B” | São Paulo | 224 | 1,8 | 0,025 | MARTINS & MARTINS, 1986. |
| “in natura” | Minas Gerais | 50 | 18,0 | 0,1-1,68 | PRADO et al, 1994 |
| Pasteurizado | São Paulo | 52 | 8,0 | 0,073-0,37 | SYLOS et al, 1996 |
| Pasteurizado, vitaminado, UHT | Minas Gerais | 110 | 25,0 | 0,038-0,07 | SOUZA et al, 1999. |
| Pasteurizado, UHT, em pó | Minas Gerais | 61 | 82,0 | 0,06-0,077 | PRADO et al., 1999 |
| Pasteurizado, UHT | Ribeirão Preto | 139 | 80,0 | 0,015-0,5 | GARRIDO et al 2003 |
| “in natura”, pasteurizado | Minas Gerais | 70 | 45,0 | 0,0-0,074 | PEREIRA et al., 2005. |
| “in natura” pasteurizado, UHT | São Paulo | 107 | 74,0 | 0,02-0,26 | SHUNDO & SABINO, 2006 |
| Pasteurizado | Paraná | 40 | 42,5 | 0,01-0,17 | BAGGIO, 2006 |
| Leite “in natura” e UHT | Porto Alegre | 128 | 0,00 | 0,0 | WEIGEL, 2007 |

REFERÊNCIAS

Abarca ML. Taxonomía e identificación de especies implicadas en la Aspergilosis nosocomial. Rev Iberoam Micol. 2000; (17):79-84.

Agrios GN. Plant pathology. 5ª ed. United States of America: Elsevier Academic Press; 2004.

Aldred D, Magan N, Olsen M. Micotoxins in Food: detection and control. "In": Aldred D, Magan N, Olsen M. The use of HACCP in the control of mycotoxins: the case of cereals. Sweden: Woodhead Publishing; 2004.

Amaral KAS, Machinski JM. Métodos analíticos para determinação de aflatoxinas em milho e seus derivados: uma revisão. Rev Analítica. 2006. Ago/Set; 56-58.

APHA. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 3. ed. Washington: American Public Health Association. 1992; 1219.

Applebaum RS, Brackett RE, Wiseman DW, Marth EH. Aflatoxin: toxicity to dairy cattle and occurrence in milk and milk products-a review. J Food Protection. 1982; (45):752-777.

Araújo, JMA. Aflatoxinas. "In:" Química de alimentos. Viçosa: UFV; 2004.

Baggio, ECR. Determinação de aflatoxina M₁ em leite pasteurizado pelos métodos de CCD e CLAE utilizando coluna de imunoafinidade. [Dissertação de Mestrado]. Curitiba, Paraná: Universidade Federal do Paraná, 2006.

Bailey GS et al. Effect of ammoniation of aflatoxin B₁-contaminated cottonseed feedstock on the aflatoxin M₁ content of cows' milk and hepatocarcinogenicity in the trout bioassay. Food Chem Toxicol. 1994; (32): 707-715.

Bakirci I. A study on the occurrence of a aflatoxin M₁ in milk and milk products produced in Van province of Turkey. Food Control. 2001; (12): 47-51.

Bando É, Goncales LN, Tamura NK, Machinski JM. Biomarcadores para avaliação da exposição humana às micotoxinas. J Bras Patol Med. 2007; (43): 175-180.

Barnett HL, Hunter BB. Illustrated genera of imperfect fungi. MacMillan Publishing Company. 1987;

Bizari PA, Prata LF, Rabelo RN. Eficiência da contagem microscópica a partir do leite UAT processado na retroavaliação da qualidade da matéria-prima. UNESP, 2003.

Brasil. Resolução RDC nº 274, de 15 de outubro de 2002 da ANVISA. Aprova o Regulamento Técnico Sobre Limites Máximos de Aflatoxinas Admissíveis no Leite, no Amendoim, no Milho. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. 2002; out (1):45.

Brasil. Instrução Normativa nº16 de 23 de agosto de 2005 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Bebidas Lácteas. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. 2005; ago (1):7.

Bizari PA, Prata LF, Rabelo RN. Eficiência da contagem microscópica a partir do leite UAT processado na retroavaliação da qualidade da matéria-prima. UNESP, 2003.

Cabral Junior CR. Influência do tempo de desidratação e armazenamento sobre a ocorrência de fungos e destes na composição químico-bromatológica das vagens da algarobeira [*Prosopis juliflora* (SW) D.C.] em Alagoas. [Dissertação de Mestrado]. Rio Largo, Alagoas: Universidade Federal de Alagoas, 2003.

Carter E, Boudreaux C. Fatal cerebral phaeohyphomycosis due to *Curvularia lunata* in an immunocompetent patient. *J. Clin. Microbiol.* 2004; (42): 5419-5423.

CAST (Council of Agricultural Science and Technology). *Mycotoxins: risks in plant, animal and human systems. Task Force Report.* EUA: CAST; 2003 (139).

Cavalcante MPC. Ocorrência de fungos e identificação de espécies toxigênicas em vagens de algarroba (*Prosopis juliflora* (SW) D.C.). [Dissertação de Mestrado]. Recife, Pernambuco: Universidade Federal Rural de Pernambuco, 1998.

Chiavaro E, Lepiani A, Colla F, Betton P, Pari E, Spotti, E. Ochratoxin A determination in ham by immunoaffinity clean-up and a quick fluorometric method. *Food Additives and Contaminants.* 2002; 6(19): 575-581.

Christensen CM, Kaufmann HH. *Grain storage the role of fungi in quality loss.* Minneapolis. University of Minesota Press. 1969; 470.

Creppy EE. Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins. *Toxicol Lett.* 2002; Jan (1/2):1-10.

Cousins CM, Bramley AJ. The microbiology of raw milk. "In" Robinson, RK. *Dairy microbiology,* 1981(1):119-163.

Dilkin P, Mallmann CA, Santurio JM, Hickmann JL. Classificação macroscópica, identificação da microbiota fúngica e produção de alfa toxinas em híbridos de milho. *Ciência Rural.* 2000; 1 (30):137-141.

Diniz SPSS. *Micotoxinas.* Rio de Janeiro: Editora Rural; 2002.

Edds GT et al. Aflatoxin incidence in feeds toxicology and possible residue hazards in foods. Proc. Annu. Meet. US. Anim. Hlth Ass. 1980; (84): 301-9.

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). Global Livestock Production and Health Atlas 2003. Acessado em 22 de janeiro de 2010.

Disponível em <http://www.fao.org/ag/aga/glipha/index.jsp>

Franco DBG, Lanngraf M. Microrganismos patogênicos de importância em alimentos “In” Franco DBG, Lanngraf M. Microbiologia de alimentos. São Paulo: Atheneu; 2004.

Frisvad JC, SAMSON RA. Filamentous fungi and ecology spoilage and micotoxins production. Handbook of Applied Mycology. New York: Ed Dilip; 1991.

Garrido NS. et al. Occurrence of aflatoxins M₁ and M₂ in milk commercialized in Ribeirão Preto – SP, Brazil. Food Additives and Contaminants. 2003; 1 (20): 70-73.

Gonçalez E, Pinto MM, Manginelli S, Felício JD. Intoxicação de vacas leiteiras por farelo de algodão naturalmente contaminado com aflatoxinas. Ciênc. Rural. 2004; 34 (1):171-174.

Hill RA, Wilson DM, McMillian WW, Widstrom NW, Cole RJ, Sanders TH, Blankenship PD. Ecology of the *Aspergillus flavus* group and aflatoxin formation in corn and groundnut. “In” Lacey J ed. Trichotecenes and other mycotoxins. Chichester: Wiley J, Publisher; 1985.

International Agency on Research on Cancer [IARC]. Some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and

mycotoxins. IARC. Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Lyon: IARC; 1993.

Instituto Adolfo Lutz (São Paulo). Métodos físico-químicos para análise de alimentos coordenadores Odair Zenebon, Neus Sadocco Pascuet e Paulo Tiglia. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz; 2008.

Jay JM. Microbiologia Moderna de los Alimentos. Espanha:Ed. Acribia;1992. 804p.

Jordano R, Jodral M, Martines P, Salmeron J, Pozo R. Aflatoxin producing Strains of *Aspergillus flavus* in yogurt. J Food Prot. 1989; (52):823-824.

Lacaz CS, Porto E, HEINS-VACCARI MLT. Fungos actinomicetos, algas de interesse médico. São Paulo: Savier: 1998; 87p.

Lazzari FA, Marcia BA. Monitoramento de fungos em milho em grão, grits e fubá. Ciênc Tecnol Aliment. 1998; 18(4): 363-7.

Li F, Li Y. Study on the contamination level and the tolerable limit of mould and yeast in yogurt. Wei Sheng Yan Jiu. 1998; 4(27):257-258.

López CE et al. Presence of aflatoxin M₁ in milk for human consumption in Argentina. Food Control. 2003; 1 (14):31-34.

Kern ME, Blevins KS. Micologia médica. 2. ed. São Paulo: Premier. 1999; 256 p.

Kwiatkowski A, Alves APF. Importância da detecção e controle de aflatoxinas em alimentos. Rev. Saúde e Biol. 2007; 2 (2):44-53.

Martins JLS, Martins IS. Aflatoxina M₁ no leite tipo “B” comercializado no Município de São Paulo, SP (Brasil). Rev Saude Publica. 1986; 20(4):303-308.

Martins RS, Santos CV, Teixeira SR. Alterações da rede logística e expansão do mercado de leite longa vida no Brasil. Organizações rurais e agroindustriais. Lavras. 1999; 2 (1): 55-69.

MERCK. The Merck Index – 12nd ed. Editora: Susan Budavari. New Jersey: Merck & Co; 1996.

Neal GE et al. Metabolism and toxicity of aflatoxins M₁ and B₁ in human-derived *in vitro* systems. Toxicology and Applied Pharmacology. 1998; 1(151):152-158.

Oliveira MAB, Mesquita AJ, Sabino M, Café MB. Ocorrência aflatoxinas B₁ e G₁ em rações para frangos de corte em granja do Estado de Goiás. Arq Bras Med Vet Zootec 1997; 49 (6): 701-708.

Oliveira CAF, Germano PML. Aflatoxina M₁ em leite e derivados. “In” Germano, PML. Higiene e vigilância sanitária de alimentos. 2.ed. São Paulo: Varela, 2003;103-109.

Oliveira CAF, Sebastião LS, Rosim RE, Fagundes H, Fernandes AM. Ocorrência simultânea de aflatoxina e ácido ciclopiazônico em rações para vacas leiteiras. Rev Analytica. 2006; 5 (24):56-58.

Pádua IPM, SILVEIRA IA, MARTINS CECB. Aflatoxinas e risco de contaminação do leite humano. Pro Homine. 2002;1(1).

Pereira MMG, Carvalho EP, Prado G, Rosa CAR, Souza LAF, Ribeiro JMM. Aflatoxinas em alimentos destinados a bovinos e em amostras de leite da região de lavras, Minas Gerais. Rev Ciênc Agrotec. 2005; 29 (1):106-112.

Pitt J, Hocking A. Fungi and food spoilage. An Aspen publication. 2nd ed.1999;387-383.

Pittet, A. Natural occurrence of mycotoxins in foods and feeds – an updated review. Revue Médecine Vétérinaire. 1998; 6(149):479-492.

Poiatti, M. L.; KOLYAMA, N.T.G.; HIDALGO, G.R.; LOPES, J.; SANTOS, A. B.; SCHOCKEN-ITURRINO,R.P. Fungos isolados de leite cru da região de Dracena-SP."In" 1º Congresso Catarinense do leite. Pinhalzinho-SC; 2007.

Prado G et al. Ocorrência de aflatoxina M₁ em leite consumido na cidade de Belo Horizonte – Minas Gerais / Brasil – agosto/98 a abril/99. Ciênc Tecnol Aliment. 1998.3(19):420-423.

Prado G, Nicácio MAS, LARA MA. Incidência de aflatoxina M₁ em leite cru e em pó no estado de Minas Gerais.Higiene Alimentar. 1994; 32 (8):34-36.

Putzker J. Os reinos dos fungos. Santa Cruz do Sul:EDUNISC. 2002; (2):683-685.

Rappe KB, Femel DI. The genus *Aspergillus*. New York: Robert E.K. 1977; 68p.

Raven PH, Evert RF, Eichhorn SE. Biologia Vegetal. 6 ed. Rio de Janeiro: GUANABARA KOOGAN S.A; 2001.

Reddy L, Odhav B, Bhoola K. Aflatoxin B₁-induced toxicity in HepG2 cells inhibited by carotenoids: morphology, apoptosis and DNA damage, *Biol Chem*, Jan 2006; 387 (1): 87-93.

Rosamarinho JF, Oliveira CAF, Reis TR, Corrêa B. Aflatoxina M₁ e Ácido Ciclopiazônico em Leites de Consumo Comercializados no Município de São Paulo, SP, Brasil. *Braz J Food Technol*. 2006; janeiro:56-58.

Sabino M. Micotoxinas. "In" OGA, S. Fundamentos da Toxicologia, São Paulo: Atheneu; 1996.

Sylos CM, Rodriguez-Amaya DB, Carvalho PRN. Occurrence of aflatoxin M₁ in milk and dairy products commercialized in Campinas, Brazil. *Food Additives and Contaminants*. 1996; 2 (13):169-172.

Shundo L, Sabino M. Aflatoxin M₁ in milk by immunoaffinity column cleanup with TLC/HPLC determination. *Braz J Microbiol*. 2006; 2 (37):164-167.

Shundo L, Silva RA, Sabino M. Ocorrência de Aflatoxinas em amendoim e produtos de amendoim comercializados na região de Marília-SP, Brasil no período de 1999-2001. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 2003; 62(3): 177-181.

Sivanesan A. Graminicolous species of *Bipolaris*, *Curvularia*, *Drechslera*, *Exserohilum* and their teleomorphs. *Mycological Papers* 158: 1987; 1-261.

Souza, SVC, Vargas EA, JUNQUEIRA RG. Eficiência de um *kit* de ELISA na detecção e quantificação de aflatoxina M₁ em leite e investigação da ocorrência no estado de Minas Gerais. *Ciênc Tecnol Aliment*. 1999; 3(19):401-405.

Taniwaki MH, Lamanaka BT, Banhe AA. Comparison of culture media to recover fungi from flour and tropical fruit pulp. *J Food Mycol*. 1999; 2: 291-302.

Trabulsi, L.R.; Althertum, F.; GOMPERTZ, O.F.; CANDEIAS, J. A. N.

Microbiologia. 3 ed., São Paulo:Atheneu, 1999, p. 235-285.

Weigel , M. Avaliação da contaminação por aflatoxina M₁ em leite cru e Leite UHT. Porto Alegre; 2007. Mestrado [Dissertação de Ciência e Tecnologia de Alimentos]. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos; 2007.

WHO (World Health Organization). Environmental Health Criteria 11, Geneva: WHO;1979.

World Health Organization (WHO) – Food Safety Issues. “HACCP: Introducing the Hazard Analysis and Critical Control Point System.” WHO/FSF/FOS/97.2, 1997.

Taniwaki MH, Lamanaka BT, Banhe AA. Comparision of culture media to recover fungi from flour and tropical fruit pulp. J Food Mycol.1999; 2: 291-302.

Tong WM, Lee MK, Galendo D, Wang ZQ, Sabapathy K. Aflatoxin-B exposure does not lead to p53 mutations but results in enhanced liver cencer of hupki (human knock-in) mice, Int J Câncer. Mar 2006.

Yousef AE, Marth EH. Stability and degradation of aflatoxin M₁. “In” Van E. Mycotoxins in dairy products. London: Elsevier Applied Science. 1989;127-161.

ANEXO

ANEXO A – Normas para publicação na Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos

Ciência e Tecnologia de Alimentos publica artigos e comunicações científicas na área. Os trabalhos podem ser apresentados em inglês, devendo observar as disposições normativas relacionadas neste documento.

POLÍTICA EDITORIAL

Ciência e Tecnologia de Alimentos aceita submissões de artigos e comunicações que contenham resultados de pesquisa original. Os trabalhos podem ser escritos em inglês, com texto claro e conciso. A Revista engloba aspectos relacionados a:

- caracterização de novas matérias-primas e ingredientes;
- identificação de novos componentes ou contaminantes;
- avaliação de produtos típicos;
- desenvolvimento, melhoria ou avaliação de processos e equipamentos para obtenção de alimentos tradicionais ou novos produtos.

Ciência e Tecnologia de Alimentos adota política de avaliação anônima. O aceite dos trabalhos depende do parecer fornecido por dois relatores indicados pela Comissão Editorial. Em caso de discordância entre os pareceres, um terceiro relator será consultado, e os três pareceres serão analisados pela Diretoria de Publicações da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia – sbCTA, que tomará a decisão final.

Os pareceres dos relatores serão encaminhados aos autores para que verifiquem as sugestões e procedam às modificações que se fizerem necessárias.

Trabalhos aceitos serão publicados na versão impressa da Revista e on-line no SciELO, dentro um prazo médio de oito meses. O fornecimento de separatas deverá ser previamente encomendado à sbCTA.

AUTORIA

A autoria deve ser limitada a aqueles que participaram e contribuíram substancialmente para o desenvolvimento do trabalho. O Autor para Correspondência deve ter obtido permissão de todos os autores para realizar a submissão do artigo e para realizar qualquer alteração na autoria do mesmo. Adicionalmente o Autor para Correspondência deverá assinar e encaminhar à Diretoria de Publicações da sbCTA o Termo de Concordância e Cessão de Direitos de Reprodução Gráfica.

DOCUMENTAÇÃO EXIGIDA

Termo de Concordância e Cessão de Direitos de Reprodução Gráfica

Autor para Correspondência deverá assinar e encaminhar à Diretoria de Publicações da sbCTA o Termo de Concordância e Cessão de Direitos de Reprodução Gráfica em nome de todos os autores.

Assinando o Termo de Concordância e Cessão de Direitos de Reprodução Gráfica, os autores concordam com o seguinte, exposto no formulário:

- o trabalho não foi submetido para avaliação de outra publicação de mesma finalidade;
- os autores concordam em submeter o trabalho e nomear o Autor para Correspondência indicado;

os autores cedem o direito de reprodução gráfica para a sbCTA caso o trabalho seja aceito para publicação.

CONTEÚDO DA PUBLICAÇÃO

Artigos Originais

Trabalhos que descrevam descobertas originais e de maior importância e devem ser escritos de maneira clara e sucinta. **Artigos originais não podem exceder 5.000 palavras (excluindo resumo, abstract, tabelas, figuras, legendas e referências) e preferencialmente não devem ultrapassar o limite conjunto de 7 figuras e tabelas.** Cada manuscrito deve fornecer palavras-chave, resumo de 200 palavras ou menos que delineie as principais descobertas da pesquisa, e ser acompanhado por uma folha de rosto e página de autoria.

Comunicações

Comunicações sobre tópicos de amplo interesse dentro da área de tecnologia de alimentos serão aceitas para avaliação desde que escritas de maneira clara e sucinta. **Comunicações não podem exceder 5.000 palavras (excluindo resumo, abstract, tabelas, figuras, legendas e referências) e preferencialmente não devem ultrapassar o limite conjunto de 7 figuras e tabelas.** Cada manuscrito deve fornecer palavras-chave, resumo de 200 palavras ou menos que delineie claramente os tópicos de amplo interesse abordados na comunicação, e ser acompanhado por uma folha de rosto e página de autoria.

FORMATAÇÃO DOS MANUSCRITOS

Primeira página

A primeira página de manuscritos submetidos deve conter obrigatoriamente as seguintes informações nesta ordem:

- **relevância do trabalho:** breve texto de no máximo 100 palavras que descreva sucintamente a relevância do trabalho;
- **títulos do trabalho:** em inglês e português, e título para cabeçalho;
- título para cabeçalho de página, com no máximo 15 palavras.

Página de autoria

A página de autoria do manuscrito deverá conter as seguintes informações:

- informação para correspondência do Autor para correspondência (endereço postal completo, números de telefone e FAX, e endereço de e-mail).
- nomes completos de todos os autores;
- nomes das instituições onde o trabalho foi desenvolvido.

Página do Resumo e palavras-chave

Todos os artigos e comunicações precisam obrigatoriamente vir acompanhados de um resumo. **Trabalhos devem incluir também o resumo em português. O resumo deve sempre:**

- estar em um único parágrafo de no máximo 200 palavras;
- explicitar claramente o objetivo principal do trabalho;
- se aplicável, descrever materiais, métodos e resultados;
- discutir possíveis implicações do trabalho;
- sumarizar as conclusões;
- ser legível também por não-especialistas da área;
- definir abreviações e siglas utilizadas;
- incluir de três a seis palavras-chave, evitando-se a utilização de termos já utilizados no título e resumo.

O resumo não deve conter:

- notas de rodapé;
- dados e valores estatísticos significativos;
- referências bibliográficas.

Texto

O trabalho deverá ser dividido nas seguintes partes, quando apropriado, numeradas nessa ordem:

- 1. Introdução;
- 2. Material e métodos;
- 3. Resultados e discussão (podendo ser separados, se necessário);
- 4. Conclusões;
- 5. Referências bibliográficas;
- Agradecimentos;

- Tabelas;
- Figuras;
- Quadros.

No texto:

- abreviações, siglas e símbolos devem ser claramente definidos na primeira ocorrência;
- notas de rodapé não são permitidas;
- tabelas, figuras e quadros devem ser numerados com numerais arábicos seguindo a ordem em que são citados;
- títulos e subtítulos são recomendados, sempre que necessários, mas devem ser utilizados com critério, sem prejudicar a clareza do texto;
- equações devem ser geradas por programas apropriados e identificadas no texto com algarismos arábicos entre parêntesis na ordem que aparecem;
- as referências devem ser numeradas em ordem alfabética;
- as legendas das figuras e quadros devem estar em ordem numérica no final do texto.

Todo material submetido deve estar digitado em espaçamento duplo, em uma coluna somente e alinhado à esquerda, deixando as margens esquerda e direita de pelo menos 2,5 cm. As linhas devem estar numeradas sequencialmente, sendo esta numeração iniciada em cada página. As páginas devem ser numeradas sequencialmente.

Nomes proprietários

Matérias-primas, equipamentos especializados e programas de computador utilizados deverão ter sua origem (marca, modelo, cidade, país) especificada.

Unidades de medida

- todas as unidades devem estar de acordo com o Sistema Internacional de Unidades (SI);
- temperaturas devem ser descritas em graus Celsius.

Símbolos e abreviações

Defina símbolos, abreviações e siglas em sua primeira ocorrência, tanto no resumo quanto no texto. Abreviações criadas pelos autores devem ser evitadas, mas se utilizadas devem estar claramente definidas na primeira ocorrência, tanto no resumo quanto no texto.

Notas de rodapé

Notas de rodapé não devem ser utilizadas.

Referências Bibliográficas

Citações no texto

As citações bibliográficas inseridas no texto devem ser indicadas pelo(s) sobrenome(s) do(s) autor(es) em letra maiúscula, seguido(s) pelo ano da publicação (ex.: SILVA et al, 2005), sendo que:

- artigos com um ou dois autores, citam-se os sobrenomes de ambos;
- artigos com três ou mais autores, cita-se o sobrenome do primeiro autor, seguido da expressão “et al.”;
- se o nome do autor não é conhecido, cita-se a primeira palavra do título.

Lista de referências

Toda a literatura citada ou indicada no texto deverá ser listada em ordem alfabética. Artigos em preparação ou submetidos a avaliação não devem ser incluídos nas referências. A formatação das referências deve seguir o padrão estabelecido pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) em “Regras Gerais de Apresentação” - NBR-6023, de agosto, 2002.

Segundo determinação da diretoria de publicações da SBCTA artigos aceitos cujas referências bibliográficas estejam fora do padrão determinado ou com informações incompletas NÃO SERÃO PUBLICADOS até que os autores tenham as referências totalmente adequadas às normas.

Exemplos de referências:

Livros

BACCAN, N.; ALEIXO, L. M.; STEIN, E.; GODINHO, O. E. S. **Introdução à semimicroanálise qualitativa**, 6ª. edição. Campinas: EDUCAMP, 1995.

Capítulos de livro

SGARBIERI, V. C. Composição e valor nutritivo do feijão *Phaseolus vulgaris* L. In: BULISANI, E. A (Ed.) **Feijão: fatores de produção e qualidade**. Campinas: Fundação Cargill, 1987. Cap. 5, p. 257-326.

Artigos em periódicos e anais

KINTER, P. K.; van BUREN, J. P. Carbohydrate interference and its correction in pectin analysis using the m-hydroxydiphenyl method. **Journal Food Science**, v. 47, n. 3, p. 756-764, 1982.

Artigos apresentados em encontros científicos

JENSEN, G. K.; STAPELFELDT, H. Incorporation of whey proteins in cheese. Including the use of ultrafiltration. In: INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. **Factors Affecting the Yield of Cheese**. 1993, Brussels: International Dairy Federation Special Issue, n. 9301, chap. 9, p. 88-105.

Dissertações, teses e relatórios

CAMPOS, A C. **Efeito do uso combinado de ácido láctico com diferentes proporções de fermento láctico mesófilo no rendimento, proteólise, qualidade microbiológica e propriedades mecânicas do queijo minas frescal**. Campinas, 2000, 80p. Dissertação (Mestre em Tecnologia de Alimentos), Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

Trabalhos em meio-eletrônico

SÃO PAULO (Estado). Secretaria do Meio Ambiente. Tratados e organizações ambientais em matéria de meio ambiente. In: _____. **Entendendo o meio ambiente**. São Paulo, 1999. v. 1. Disponível em: <<http://www.bdt.org.br/sma/entendendo/atual.htm>>. Acesso em: 8 mar. 1999.

Legislação

BRASIL. Portaria n. 451, de 19 de setembro de 1997. Regulamento técnico princípios gerais para o estabelecimento de critérios e padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 22 set. 1997, Seção 1, n. 182, p. 21005-21011.

Tabelas

As tabelas devem ser intituladas e citadas com numerais Arábicos e estar inseridas diretamente no corpo do texto no local de preferência. Caso o autor precise enviar a tabela em arquivo separado este deve ser nomeado de maneira clara (ex. tabela1.doc etc). As tabelas devem ser elaboradas utilizando-se o recurso de tabelas do programa Microsoft® Word, e devem:

- ter o número de algarismos significativos definidos com critério;
- ser em número reduzido para criar um texto consistente, de leitura fácil e contínua;
- não apresentar os mesmos dados na forma de gráfico e tabela;
- utilizar o formato mais simples possível, evitando sombreamento, cores ou linhas verticais e diagonais;
- utilizar somente letras minúsculas sobrescritas para denotar notas de rodapé que informem abreviações, unidades etc. **Demarcar primeiramente as colunas e depois as linhas e seguir esta mesma ordem no rodapé;**

Figuras e quadros

Devem ser citados e numerados em ordem numérica utilizando-se numerais Arábicos. Enviar obrigatoriamente em arquivos separados, com a máxima qualidade possível. Enviar os arquivos preferencialmente no formato original em que foram gerados (TIF, XLS, EPS, BMP, JPG ou DOC). Os arquivos devem ser adequadamente identificados com o número citado na legenda (ex.: figura1.tif, figura2.eps, figura3.doc etc). Ao enviar figuras com fotos ou micrografias certifique-se que estas sejam escaneadas em alta resolução para que cada foto fique com no mínimo 1.000 *pixels* de largura. Para representar fichas, esquemas ou fluxogramas utilize quadros.

Trabalhos envolvendo humanos

Quando houver apresentação de resultados de pesquisas envolvendo seres humanos, citar o número do processo de aprovação do projeto no Comitê de Ética em Pesquisa da instituição, conforme Resolução nº 196/96, de 10 de outubro de 1996 do Conselho Nacional de Saúde.

INSTRUÇÕES GERAIS PARA SUBMISSÃO ON-LINE

Taxa de submissão

Ciência e Tecnologia de Alimentos, embora receba uma média de 35 submissões mensais, exigindo grande demanda de trabalho da diretoria de publicações, **não cobra taxa de submissão**. Espera-se em troca, que os colaboradores aceitem eventualmente, realizar o trabalho de avaliação de artigos, atuando assim como relatores da revista.

Formatos de arquivo

Durante a submissão são aceitos os arquivos do tipo DOC, TIF, XLS, EPS, BMP ou JPG, independente da plataforma Windows® ou Macintosh®, onde forem gerados. O texto principal dos manuscritos deve ser submetido em duas (02) versões e arquivos separados:

manuscrito.doc: versão final para publicação na revista

- formato Microsoft® Word (.doc) ;
- texto completo do manuscrito incluindo as tabelas mas sem as figuras;
- figuras devem ser submetidas em arquivos separados;
- não deve ter as linhas numeradas;
- deve ser nomeado manuscrito.doc.

manuscrito.doc versão para avaliação pelos relatores

- formato Microsoft® Word (.doc);
- deve ter a folha de rosto excluída;
- deve ter os nomes dos autores e instituições removidos da página de título;
- deve ter as linhas numeradas a partir do início de cada página;

- deve ser nomeado manuscrito.doc.

Fontes

Devem ser utilizadas preferencialmente as fontes Times New Roman, Arial, Helvetica ou Courier.

SUBMETENDO UM TRABALHO ON-LINE NO SUBMITCENTRAL

<http://cta.submitcentral.com.br/login.php>

Antes de realizar a submissão on-line o Autor para Correspondência deverá preencher e assinar o Termo de Concordância e Cessão de Direitos de Reprodução Gráfica. Esse formulário pode ser abaixado on-line no endereço http://cta.submitcentral.com.br/terms_sbcta_br.pdf. Encaminhar o formulário por e-mail ou FAX à Diretoria de Publicações da sbCTA para +55 19 32410527 ou revista@sbcta.org.br. O processo de avaliação não será iniciado até que o Termo de Concordância e Cessão de Direitos de Reprodução Gráfica seja recebido.

O programa Submitcentral para submissão dos artigos está otimizado para os seguintes navegadores e versões: Internet Explorer 6, Internet Explorer 7, Firefox 1.5+, Opera 9.2+, Safari 3+

Os Autores devem acessar o programa Submitcentral no endereço <http://cta.submitcentral.com.br> e no “Painel do Autor” clicar em “Iniciar uma nova submissão >>”.

Passo 1: Título, Resumo e Palavras-chave

Preencha o campo ‘Título’.

Cole ou digite o Resumo no campo ‘Resumo’.

Adicione no mínimo três palavras-chave preenchendo o campo ‘Palavras-chave’ e clicando no botão ‘adicionar’.

Clique no botão ‘continuar’.

Passo 2: Autores e Instituições

Preencha as informações de cada Autor do trabalho. É necessário preencher todos os campos e clicar em ‘adicionar’, antes de passar ao próximo Autor. Para acertar a ordem utilize as setas na coluna ‘Ordem’.

Marque o Autor para Correspondência clicando no botão ‘Autor para Correspondência (troca)’.

Informe pelo menos uma (01) instituição para cada Autor. Se necessário clique no botão ‘Editar Instituições’.

Clique no botão ‘continuar’.

Passo 3: Referees

Informe Revisores ‘preferidos’ e ‘não-preferidos’ para avaliar seu trabalho. Esta

etapa pode ajudar muito a agilizar o início do processo de avaliação.

Clique no botão 'Mudar Preferência' para alternar entre 'preferido' e 'não-preferido'.

Clique no botão 'continuar'.

Passo 4: Envio de Arquivos

Envie todos os arquivos do seu trabalho utilizando o botão 'procurar' ou 'browse'.

Escolha o tipo de arquivo: Manuscrito em DOC sem os autores (para revisores), Manuscrito em DOC completo (para produção), Folha de Rosto, Figura, Tabela ou Arquivo Suplementar.

Clique no botão 'enviar'. Repita a operação até ter enviado todos os arquivos.

Clique no botão 'continuar'.

Passo 5: Informações Gerais

Informe se o manuscrito é convidado e caso afirmativo quem fez o convite.

Escolha o Tipo de Contribuição da caixa de seleção.

Escolha a Área do Trabalho da caixa de seleção.

Confirme que assinou e enviou o Termo de Concordância e respostas às outras perguntas.

Escreva sua Carta ao Editor.

Clique no botão 'continuar'.

Passo 6: Checar e Submeter

Verifique todas as informações e corrija se necessário clicando no botão 'editar'.

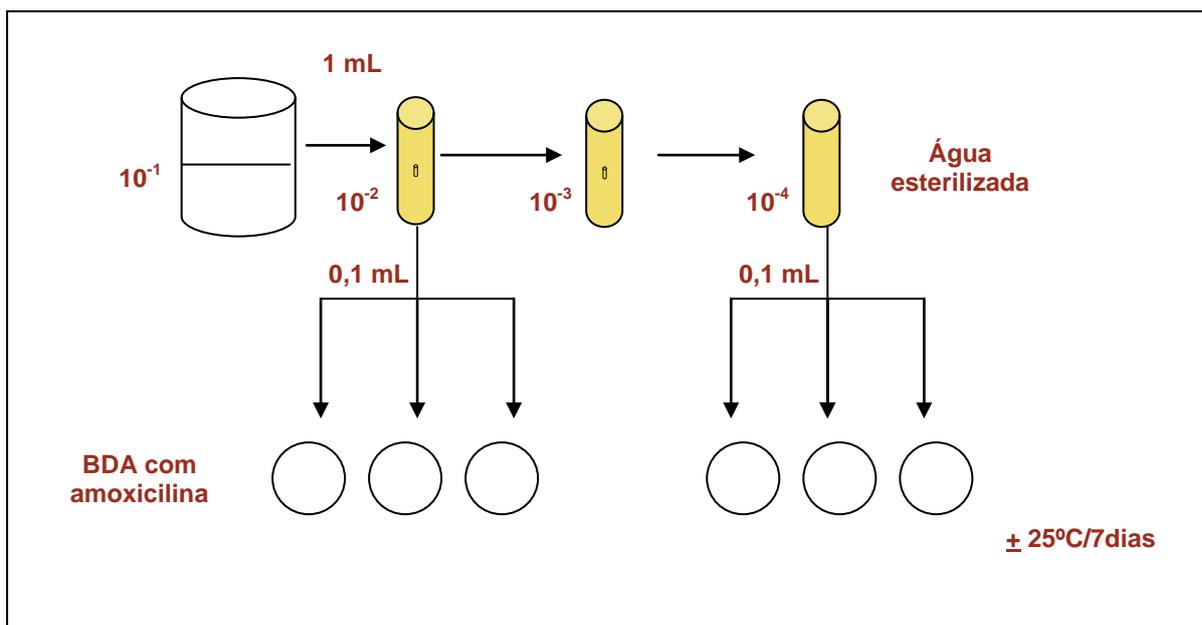
Abaixe todos os arquivos e abra-os para certificar-se de que não estejam corrompidos.

Marque a caixa informando que abaixou e abriu todos os arquivos.

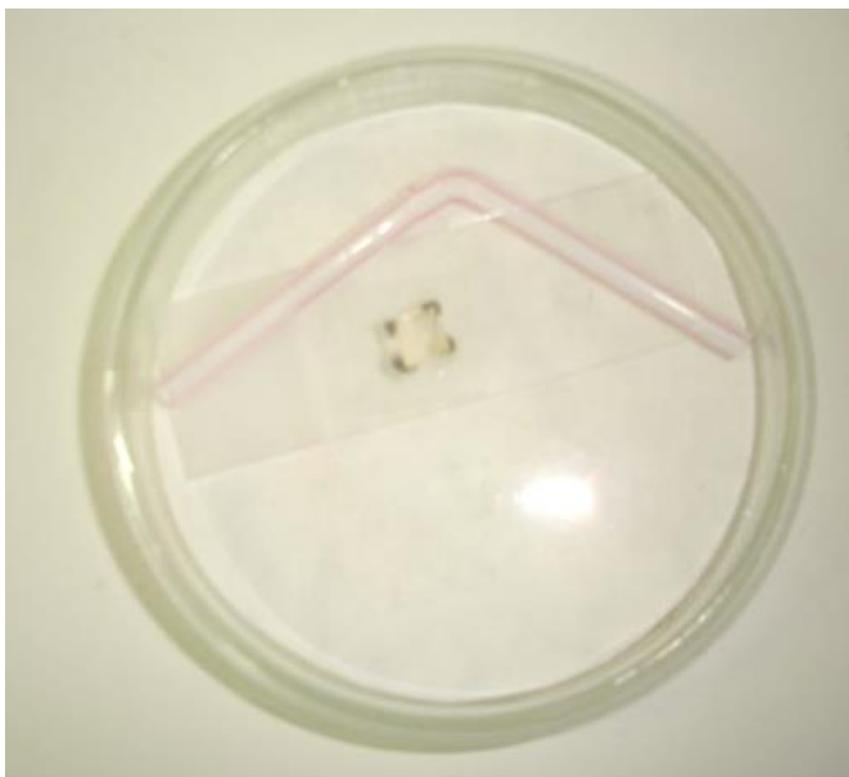
Clique no botão 'Finalizar Submissão' para concluir o processo de submissão.

Uma confirmação será exibida para ser impressa, e você também receberá uma confirmação por e-mail.

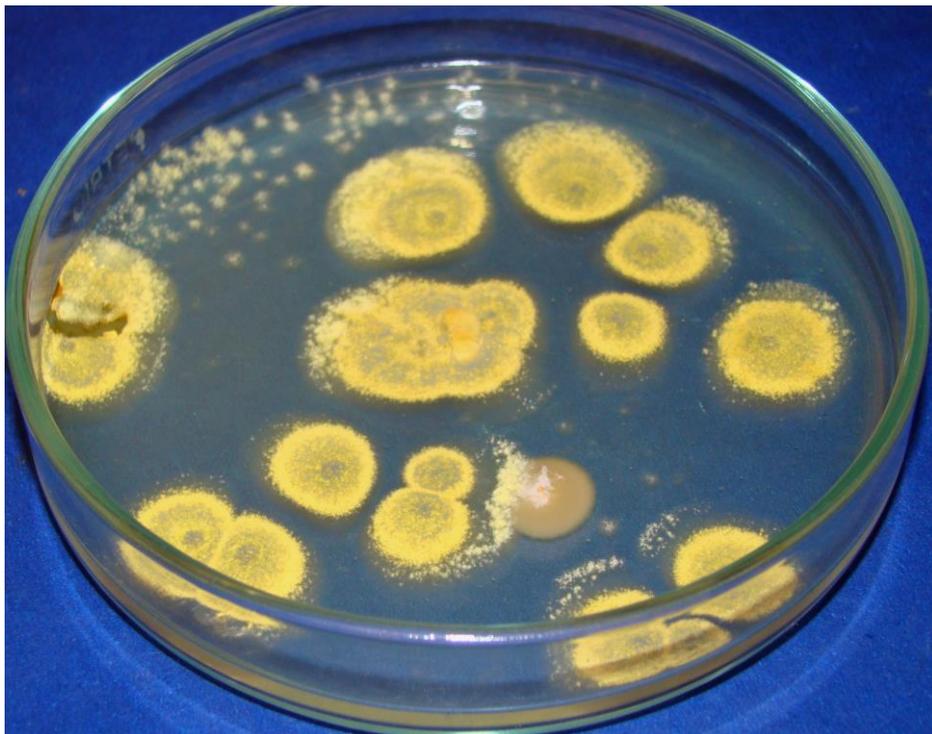
APÊNDICES

Apêndice 01 – Esquema do processo de quantificação de fungos em superfície.

Apêndice 02– Microcultura de *Aspergillus* sp. em meio BDA.



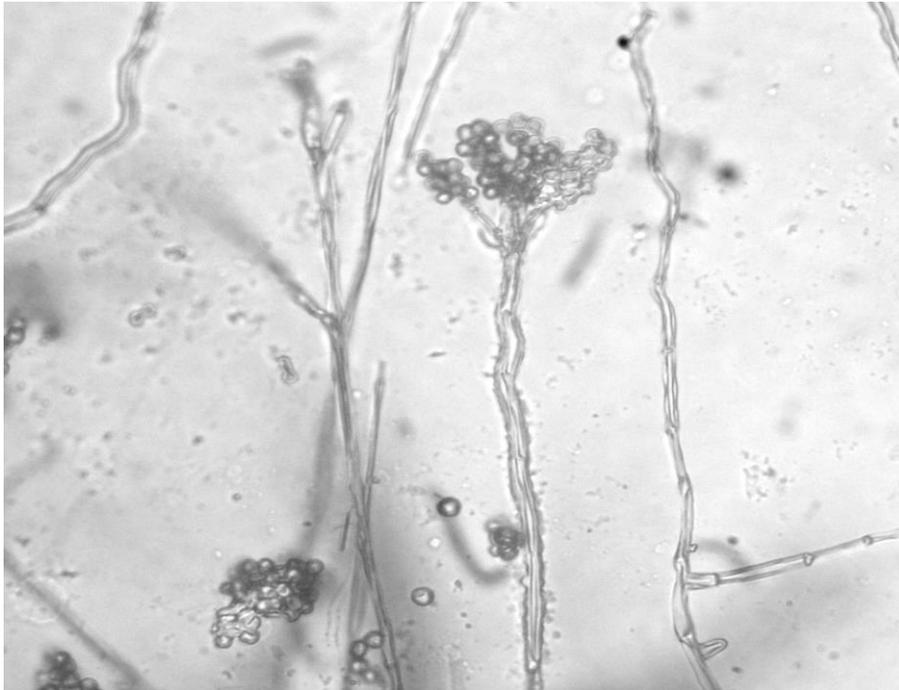
Apêndice 03 – Placa de Petri contendo colônias de *Penicillium* sp. em Agar Batata Dextrose (BDA) com amoxicilina.



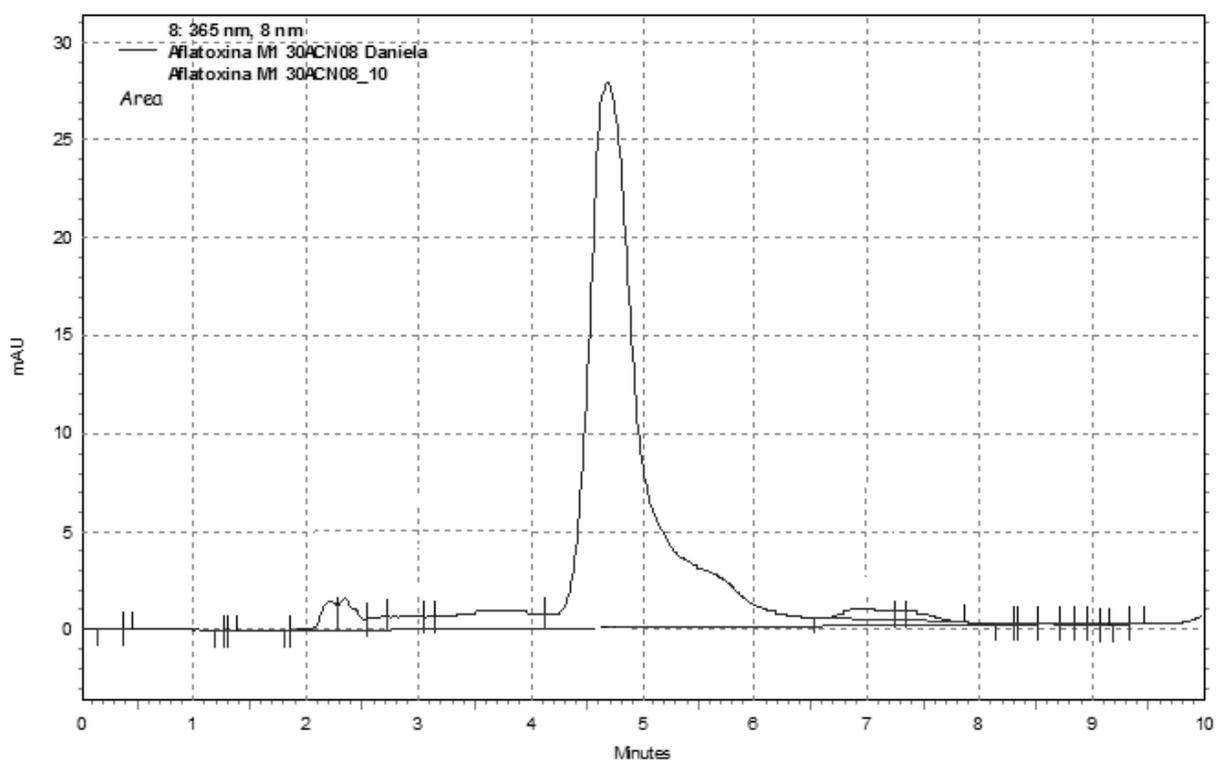
Apêndice 04 – Placa de Petri contendo colônias de *Aspergillus flavus* em Agar Batata Dextrose (BDA) com amoxicilina.



Apêndice 05 – Características microscópicas de *Aspergillus flavus*.



Apêndice 06 – Cromatograma do padrão de aflatoxina M₁ com concentração de 0,10 µg/L.



Apêndice 07 – Cromatograma da bebida láctea contaminada com aflatoxina M₁ com concentração de 0,13 µg/L do padrão.

