



**PESQUISA DE FUNGOS PRODUTORES DE
MICOTOXINAS E AFLATOXINAS EM
ALIMENTO ANIMAL E AFLATOXINA M₁
EM LEITE**

MARIA MARLUCIA GOMES PEREIRA

2003

55628

MFN04-7389

MARIA MARLUCIA GOMES PEREIRA

**PESQUISA DE FUNGOS PRODUTORES DE MICOTOXINAS E
AFLATOXINAS EM ALIMENTO ANIMAL E AFLATOXINA M₁ EM
LEITE**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação "Stricto Sensu" em Ciência dos Alimentos, para obtenção do título de "Doutor".

Orientadora

Profa. Dra. Eliana Pinheiro de Carvalho

**LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL
2003**

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da UFLA**

Pereira, Maria Marlucia Gomes

Pesquisa de fungos produtores de micotoxinas e aflatoxinas em
alimento animal e aflatoxina M₁ em leite. / Maria Marlucia Gomes
Pereira. – Lavras: UFLA, 2003.

86 p. : il.

Orientadora: Eliana Pinheiro de Carvalho.

Tese (Doutorado) - UFLA.

Bibliografia.

[REDACTED] 1. Alimento animal. 2. Leite. 3. Fungos e micotoxinas. I

[REDACTED] Federal de Lavras. II. Título.

[REDACTED]
[REDACTED]
CDD-576.163

MARIA MARLUCIA GOMES PEREIRA

**PESQUISA DE FUNGOS PRODUTORES DE MICOTOXINAS E DE
AFLATOXINAS EM ALIMENTO ANIMAL E AFLATOXINA M₁ EM
LEITE**

Tese apresentada à Universidade Federal de
Lavras, como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação "Stricto Sensu"
em Ciência dos Alimentos, para obtenção do
título de "Doutor".

APROVADA em 04 de Fevereiro de 2003

Prof. Dr. Carlos Alberto da Rocha Rosa

UFRRJ

Prof. Dr. Célio Mauro Viana

UFF

Prof. Dr. Luiz Ronaldo de Abreu

UFLA

Dra. Sara Maria Chalfoun de Souza

EPAMIG



Profa. Dra. Eliana R. de Carvalho
UFLA
(Orientadora)

**LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL**

Dedicatória

A Deus, por me fazer compreender, a cada dia, o quanto está presente em minha vida.

A meus pais Manoel e Joaquina pela dedicação, carinho, amor e paciência.

Aos meus irmãos Antonio, Vera, Valdemar, Leuda, Ana, Bel e Osmar pelo amor, compreensão e amizade.

Aos meus sobrinhos, Goretti, Ana Marta, José Filho, Clarinha, Lara, Luís Henrique, Pádua, Bruna e Amanda pelo amor e carinho.

A todos aqueles que sabem que são especiais em minha vida.

A duas pessoas muito queridas que resolveram partir sem despedida, meu avó Agostinho e o amigo Santilho, muita paz.

Senhor, tendes me oferecido muitas dádivas. Peço-vos mais uma: Um coração agradecido!

Agradecimentos

À profa. Dra. Eliana Pinheiro de Carvalho, da Universidade Federal de Lavras, MG, pela orientação, estímulo, carinho e amizade demonstrados durante a realização deste trabalho.

Ao Dr. Guilherme Prado, pesquisador da Fundação Ezequiel Dias (FUNED, MG), pela orientação, paciência, apoio e amizade.

Ao prof. Dr. Carlos Alberto da Rocha Rosa, da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ- RJ), pela orientação e apoio.

Aos profs. Drs. Célio Mauro Viana, da Universidade Federal Fluminense (UFF- RJ) e Francisco José Siqueira Telles da Universidade Federal do Ceará, pela amizade e atenção.

Ao prof. Dr. Luís Ronaldo de Abreu, da Universidade Federal de Lavras, MG, pelo apoio e orientação.

À Dra. Sara Maria Shalfoun de Souza, da Empresa EPAMIG pela atenção e apoio.

Aos profs. Roberta Hilsdorf Piccoli do Valle, Maria de Fátima Piccolo Barcelos, Maria Cristina Bressan, Fabiana Queiroz Ferrua e José Eduardo B. P. Pinto, da Universidade Federal de Lavras, pelo apoio e amizade.

À profa. Vânia Déa de Carvalho e sua família pela amizade e pela oportunidade de conhecer alguém de um coração tão iluminado.

Aos Laboratórios de Microbiologia de Alimentos da UFLA, MG, ao Laboratório de Micologia e Micotoxinas da FUNED, MG, e ao Laboratório de Micologia da UFRRJ, RJ, que tiveram fundamental participação e importância na realização deste trabalho.

Aos amigos do laboratório de Micologia e Micotoxinas da FUNED, Guilherme, Thaís, Leo, Aninha, Vanessa, Jovita, Tita e Ana, pelo apoio incondicional e pela convivência tão harmoniosa e agradável.

Aos amigos Elayne, Claudinha, Márcio e Carol, cujo auxílio foi de fundamental importância.

Ao Laticínio Serra Bela pelas informações e cooperação, principalmente a Paulinho, Gustavo e João Marques.

Aos produtores da região que nos atenderam prontamente, em especial ao Sr. José Peixotinho, D. Conceição e seus filhos Edílson, Éder e Eliene, que nos receberam sempre com muita atenção.

Ao Dr. Marcelo, funcionário da EPAMIG, e ao Luís Batista, aluno de doutorado e bolsista da EPAMIG, pelo apoio.

Aos amigos Cláudia, João, Marta, Antonio, Adenilde, Mônica, Renata, Celeste, Angelita, Patrícia, Eduardo, Liege, Regina, Leimi, Renil, Cleube, Simone, Regiane, Ana Cristina, Cleusa, Sr. Piano, Sílvio, Conça, Odívia, Pedro, Rogerinho, Alexandre e Cristiane pela convivência harmoniosa durante todo o curso.

Aos queridos amigos que tiveram uma participação fundamental com seu carinho, atenção e apoio: Fátima, Ana Maria, Flávia, Paula, Marcelo, Simone, Jairo, Alberto e Beto. Muito obrigada.

Aos amigos da UFPI-PI, que mesmo distantes sempre nos apoiaram com seu carinho e amizade: Chris, Amilton, Lucília, Manoel Henrique, Roseli, Carminha, Silvéria, Júlia, Pedro, Silvana, Alberto, Juracir e Celso.

Aos queridos primos Ivelci, Madalena, Ívini e Ivelto pelo carinho, amizade e apoio.

Aos tios e primos José, Maria do Carmo, Antônio, Francisca, Evaristo e Raimundo, Bruno, Dani e Maria pelo carinho e amizade.

Aos amigos sempre próximos: Fátima, Benedito, Zé Filho, Auxiliadora, Jose Bonifácio, Rabelo, Rosa, Vilma, Auro, Dadá, Alfredo, Damásio, Lair, Assis, Talita, Nena e Selene, por seu apoio, carinho e amizade.

Aos amigos de Lavras D. Romilda, Sr. Geraldo, Marcos, Ritoca, Paula, Walton, Monalisa, D. Livia, Hilda, Alda, Sérgio e Deyse . Muito obrigada pelo carinho e amizade!

Aos meus amiguinhos queridos: Beatriz, Gabriel, Henrique, Thiago, Leo e Alexandre.

Aos amigos da terapia alternativa Maritz, Dra. Marília e Dr. Eduardo pela amizade e atenção.

Muito obrigada, a Nilma e Natalina pela colaboração.

Aos amigos Ricardo e Rita pela amizade e as aulas tão agradáveis e aos amigos Luciano e Débora pela companhia.

A todas as pessoas que direta ou indiretamente nos ajudaram na realização deste trabalho, muito obrigada.

A Universidade Federal de Lavras, MG, a Fundação Ezequiel Dias, MG, e a Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, RJ pelo apoio.

À CAPES- Comissão de Aperfeiçoamento Pessoal de Ensino Superior pelo suporte financeiro através da bolsa concedida durante nosso curso.

SUMÁRIO

| | Página |
|--|---------------|
| RESUMO GERAL..... | i |
| GENERAL ABSTRACT | ii |
| CAPÍTULO 1: Introdução geral..... | 1 |
| 1 INTRODUÇÃO | 2 |
| 2 REFERENCIAL TEÓRICO | 5 |
| 2.1 Aspectos gerais..... | 5 |
| 2.2 Fatores importantes para o crescimento de fungos e produção de aflatoxina | 7 |
| 2.2.1 Aa (Atividade de água) | 7 |
| 2.2.2 Temperatura | 8 |
| 2.2.3 Potencial hidrogeniônico..... | 9 |
| 2.2.4 Potencial de oxirredução | 10 |
| 2.2.5 Composição dos meios de cultivo..... | 11 |
| 2.2.6 Aditivos..... | 12 |
| 2.3 Estabilidade da aflatoxina M ₁ no leite e seus derivados..... | 13 |
| 2.4 Aspectos bioquímicos e metabólicos da AFB1 | 14 |
| 2.5 Incidência em alimentos..... | 15 |
| 2.6 Importância em saúde pública..... | 19 |
| 2.7 Aspectos legais..... | 20 |
| 3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 23 |
| CAPÍTULO 2: Isolamento, identificação e determinação da capacidade toxigênica de fungos em alimento animal..... | 33 |
| 1 Resumo..... | 34 |
| 2 Abstract | 35 |
| 3 Introdução | 36 |

| | |
|---|----|
| 4 Material e Métodos..... | 38 |
| 4.1 Coleta das amostras..... | 38 |
| 4.2 Isolamento e contagem da microbiota..... | 38 |
| 4.3 Capacidade toxicógena das cepas fúngicas isoladas | 39 |
| 5 Resultados e Discussão | 41 |
| 6 Conclusões | 52 |
| 7 Referências Bibliográficas | 54 |
| CAPÍTULO 3: Pesquisa de aflatoxina em alimento animal e aflatoxina M ₁ em leite..... | 57 |
| 1 Resumo..... | 58 |
| 2 Abstract | 59 |
| 3 Introdução | 60 |
| 4 Material e Métodos..... | 62 |
| 4.1 Coleta das amostras de alimento animal | 62 |
| 4.1.2 Determinação de aflatoxinas em amostras de alimento animal..... | 62 |
| 4.1.2.1 Preparo e determinação das soluções padrões de aflatoxinas | 62 |
| 4.1.2.2 Preparo da amostra | 63 |
| 4.1.2.3 Extração das toxinas..... | 63 |
| 4.1.2.4 Purificação do extrato..... | 63 |
| 4.1.2.5 Partição líquido-líquido..... | 64 |
| 4.1.2.6 Concentração e diluição | 64 |
| 4.1.2.7 Identificação e quantificação..... | 64 |
| 4.2 Coleta das amostras de leite | 65 |
| 4.3 Tratamento das amostras de leite | 65 |
| 4.4 Teste de recuperação de aflatoxina M ₁ em leite cru..... | 66 |
| 4.5. Determinação de aflatoxina M ₁ em leite | 66 |
| 4.5.1. Preparo da solução padrão de aflatoxina M ₁ | 66 |

| | |
|--|----|
| 4.5.2 Preparo das soluções padrão de aflatoxina M ₁ | 67 |
| 4.5.3 Purificação das amostras de leite em coluna de imunoafinidade | 67 |
| 4.5.4 Condições cromatográficas | 69 |
| 4.5.5 Preparo da curva de calibração da aflatoxina M ₁ | 69 |
| 4.5.6 Determinação da aflatoxina M ₁ no extrato da amostra..... | 70 |
| 4.5.7 Cálculo | 70 |
| 4.6 Análises estatísticas..... | 70 |
| 5 Resultados e Discussão | 71 |
| 6 Conclusões | 77 |
| 7 Referências Bibliográficas | 78 |
| ANEXOS..... | 81 |

RESUMO GERAL

PEREIRA, Maria MarluCIA Gomes. **Pesquisa de fungos produtores de micotoxinas e aflatoxinas em alimento animal e aflatoxina M₁ em leite.** Lavras: UFLA, 2003. p. 86. (Tese-Doutorado em Ciência dos Alimentos).

O presente trabalho teve como objetivo isolar e identificar a microbiota fúngica e sua capacidade toxigênica, presença de aflatoxina B₁ em alimento animal e aflatoxina M₁ em leite cru e após pasteurização da região de Lavras, Sul de Minas Gerais. Foram analisadas 40 amostras de alimento animal. Estas foram avaliadas quanto à contagem de fungos (log₁₀/g) nos meios DRBC, DG18 e AFPA, onde se obtiveram contagens médias de 4,83, 3,55 e 2,28, respectivamente. Na ração foram isolados *Penicillium* (32,08%) e *Aspergillus* (28,32%), *Fusarium* (27,45%) e, com um percentual inferior, os gêneros *Alternaria*, *Eurotium* e *Cladosporium*, *Taralomyces* e *Paecilomyces*. No farelo de soja, os principais gêneros correspondiam a *Aspergillus* (31,42%) e *Penicillium* (14,28%), seguidos dos gêneros *Alternaria*, *Eurotium* e *Cladosporium*. No farelo de soja e trigo houve uma predominância de *Penicillium* (44,44%), *Fusarium* (33,33%) e *Aspergillus* (22,22%) e no caroço de algodão, *Aspergillus* (36,37%), *Penicillium* (27,27%), *Curvularia* (18,9%) e, com menor percentual, *Alternaria* e *Cladosporium*. Em relação às espécies aflatoxigênicas pesquisadas, houve maior predominância de isolados das espécies *A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. ochraceus*, *A. niger* e *A. niveus*. Em 33 amostras de alimento animal analisadas (100%) não foi detectada presença de AFB₁. Foram analisadas 36 amostras de leite cru e 34 amostras de leite após pasteurização. O leite cru (19 amostras -52,77%) e o leite pasteurizado (13 amostras -38,23%) apresentaram presença de aflatoxina e os níveis variaram de traços a 74,1 ng/L e traços a 58,9 ng/L, respectivamente. As concentrações de AFM₁ no leite cru e após pasteurização não diferiram entre si (p > 0,05). As concentrações de AFM₁ detectadas nas amostras de leite estão de acordo com os padrões regulamentares em nossa legislação (Brasil, 2002).

Orientadora: Eliana Pinheiro de Carvalho - UFLA

GENERAL ABSTRACT

PEREIRA, Maria Marluca Gomes. **Study of the presence of mycotoxin and B1 aflatoxin producing fungi in feed and M₁ aflatoxin in milk.** Lavras: UFLA, 2003. p. 86. (Thesis- Doctorate in Food Science)

The present work was designed to isolate and identify the fungal microbiota and its toxigenic capacity, presence of B1 aflatoxin in feed and M₁ aflatoxin in raw milk and pasteurization in the South region of Minas Gerais. 40 samples of feed were analyzed. These were analyzed for fungal count (log₁₀/g) in the media DRBC, DG 18 and AFBA, where average counts of 4.83, 3.55 and 2.28, respectively were obtained. In the ration were isolated *Penicillium* (32.08%) and *Aspergillus* (28.32%), *Fusarium* (27.45%) and with a lower percentage, the genera *Alternaria*, *Eurotium* and *Cladosporium*, *Taralomyces* and *Paecilomyces*. In soybean meal, the main genera corresponded to *Aspergillus* (31.42%) and *Penicillium* (14.28%) followed by the genera *Alternaria*, *Eurotium* and *Cladosporium*. In soybean and wheat meals there was a predominance of *Penicillium* (44.44%), *Fusarium* (33.33%) and *Aspergillus* (22.22%) and in cottonseed, *Aspergillus* (36.37%), *Penicillium* (27.27%), *Curvularia* (118.9%) and with a lower percent, *Alternaria* and *Cladosporium*. Concerning the aflatoxigenic species researched, there was a greater predominance of strains of the species *A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. ochraceus*, *A. niger* and *A. niveus*. In 33 samples of feed analyzed (100%), the presence of AFB1 was not detected. 36 samples of raw milk and 34 samples of milk after pasteurization were analyzed. Raw milk (19 samples – 52.77%) and pasteurized milk (13 samples – 38.23%) showed presence of aflatoxin and the levels ranged from traces to 74.1ng/ml and traces to 58.9 ng/ml, respectively. The concentrations of AFM₁ in raw milk and after pasteurization did not differ between them ($p > 0.05$). The concentrations of AFM₁ detected in the milk samples are in accord to the regulation standards in our legislation (Brasil, 2002).

Adviser: Eliana Pinheiro de Carvalho - UFLA

CAPÍTULO 1

1 INTRODUÇÃO GERAL

1 INTRODUÇÃO

A pesquisa de micotoxina assume um papel importante na área de alimentos, tendo em vista o risco potencial que pode ocasionar aos consumidores, bem como as perdas econômicas provocadas, que representam um percentual bastante elevado no cenário mundial.

A contaminação de alimentos humanos e animais com aflatoxina é de interesse atual e tem recebido uma grande atenção durante as últimas três décadas (Rustom, 1997).

A ração animal contaminada é considerada a principal fonte de micotoxinas em fazendas. A ingestão de tais metabólitos resulta em um impacto negativo de relevante importância na produção animal (Gareis & Wolff, 2000).

O isolamento e a confirmação de espécies fúngicas toxigênicas em alimento não indica, obrigatoriamente, a presença de micotoxina (Hussein & Brasel, 2001).

O levantamento feito por Rodrigues-Amaya (2000) sobre micotoxinas na América Latina demonstra que de 100 trabalhos publicados, 36% revelam a ocorrência de micotoxinas em alimentos humanos e animais.

A aflatoxina B1 é o mais potente hepatotóxico de origem biológica e promove uma variedade de efeitos biológicos, dentre os quais a carcinogênese, a teratogênese, e a mutagênese nos animais (Applebaum et al., 1982).

A aflatoxina, uma vez ingerida pelo homem ou animais, é ativada por enzimas, formando um epóxido, o qual é um metabólito altamente reativo. O provável mecanismo de toxidez e carcinogenicidade da aflatoxina é a ligação covalente do epóxido com macromoléculas, inclusive com o DNA (Norred, 2000).

A biotransformação da AFB1 ocorre através de um complexo processo com múltiplas vias, entre as quais temos a epoxidação e hidroxilação. No processo de epoxidação há formação de um composto responsável pela atividade tóxica da AFB1. A hidroxilação forma derivados menos tóxicos e hidrossolúveis como a AFM₁, o que possibilita a sua excreção através dos fluidos corporais (Taveira & Mídio, 1999; Biehl & Buck, 1987).

A microbiota fúngica natural que coexiste com a produção de alimentos é composta principalmente pelos gêneros *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium*. Muitas das espécies de *Fusarium* são patógenos que destroem os cereais e outros produtos e a produção de micotoxinas ocorre antes ou logo após a colheita. Algumas espécies de *Aspergillus* e *Penicillium* também são patógenos vegetais ou saprófitas, estes relacionados mais habitualmente com os produtos e com os alimentos durante a secagem e principalmente no período de armazenamento (ICMSF, 1996).

Os efeitos nocivos da contaminação de alimentos e ração animal podem ser evitados através da prevenção, descontaminação e inibição da absorção de micotoxinas no trato intestinal (Bata & Lasztity, 1999).

Na história recente, está perfeitamente comprovada a relevância dos metabólitos fúngicos em epidemias de grande importância, tanto para o homem como para os animais. As micotoxinas apresentam quatro classes básicas de toxicidade: aguda, crônica, mutagênica e teratogênica (ICMSF, 1996).

As aflatoxinas são metabólitos secundários produzidos na natureza pelas espécies de *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus* e *A. nomius*, este último descrito mais recentemente. As principais aflatoxinas produzidas de forma natural são as B₁, B₂, G₁ e G₂. Os principais efeitos distintos produzidos pelas aflatoxinas são: lesão hepática, indução de tumores e efeito teratogênico (ICMSF, 1996; Stoloff et al., 1975).

A pesquisa de aflatoxina teve início quando em 1960, na Inglaterra, ocorreu uma intoxicação de aves tratadas com rações à base de amendoim proveniente do Brasil e África, a qual ficou conhecida como "Doença X"; e na época, milhares de animais morreram (Lancaster et al., 1961).

A qualidade do leite destaca-se, tendo em vista o perfil do consumidor e a grande dificuldade em se obter uma matéria-prima de qualidade. Vários são os fatores que contribuem para esta perda de qualidade, o que representa um grande desafio para os que atuam diretamente na cadeia produtiva do leite e derivados. O leite contaminado com AFM₁, pode torna-se um alimento potencialmente patogênico, principalmente para os lactentes. Diante disso, as pesquisas nesta área assumem um papel de extrema relevância.

A obtenção de dados a respeito da presença de aflatoxina nos alimentos no Brasil, se faz necessário, uma vez que a aflatoxicose é uma enfermidade de grande importância. Características do clima quente e úmido existente no país são fatores favoráveis ao desenvolvimento de fungos (Sabino et al., 1988).

O presente trabalho teve como objetivo isolar e identificar a microbiota fúngica e sua capacidade toxígena e presença de aflatoxina B₁ em alimento animal e aflatoxina M₁ em leite produzido na região de Lavras, Sul de Minas Gerais.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Aspectos gerais

Durante muito tempo os fungos foram considerados vegetais, mas a partir de 1969 ocorreu uma nova classificação, através da qual passaram a ser classificados em um reino à parte, o Fungi. Os fungos são seres vivos eucarióticos que apresentam apenas um núcleo, como as leveduras, ou multinucleares, como os fungos filamentosos ou bolores e os cogumelos. Os fungos não sintetizam clorofila nem qualquer pigmento fotossintético (Trabulsi et al., 1999).

Os esporos dos fungos são abundantes e amplamente encontrados na natureza, crescem rapidamente no solo, em plantas, em alimentos, em papel e até em vidros. Alimentos armazenados representam um excelente campo para a proliferação dos fungos, principalmente onde os princípios básicos adequados de secagem e armazenamento ainda são desconhecidos ou desprezados (Fonseca, 2000).

As micotoxinas estão caracterizadas como substâncias não protéicas resultantes do metabolismo de fungos. São moléculas relativamente pequenas, geralmente não são detectáveis pelo sistema imune do homem e animais e o principal perigo potencial da presença das micotoxinas na dieta humana reside na incapacidade de serem detectadas biologicamente (ICMSF, 1996).

As espécies fúngicas do gênero *Aspergillus* produzem substâncias denominadas de aflatoxinas que são produzidas essencialmente por *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*. No momento existem 18 tipos de aflatoxinas, entre as quais temos a aflatoxina M₁, um derivado metabólico da aflatoxina B₁, resultante da ativação metabólica no fígado, encontrada no leite e urina de muitas espécies (Gimeno, 2000).

As aflatoxinas são furocumarinas complexas contendo intensa fluorescência quando expostas à luz ultravioleta em ondas longas. Esta propriedade é altamente aproveitável para sua identificação e quantificação, quando presente em diversos tipos de alimentos (Midio & Martins, 2000)

O metabólito produzido pelo fígado de um animal ou ser humano que ingeriu alimento contaminado por aflatoxina tem grande importância clínica, pois é acumulado no leite e em ovos 24 horas após a ingestão do alimento contaminado. Estudos têm demonstrado que até 90% da aflatoxina acumulada no organismo podem ser eliminados se o alimento contaminado não for mais fornecido ao animal. No entanto, a pequena quantidade residual liga-se às proteínas celulares, mantendo-se por períodos prolongados, principalmente no fígado (Miller, 1999).

Geograficamente, os trópicos estão situados na parte do globo entre as latitudes de aproximadamente 23° norte e 23° sul. Nem todas as áreas aí compreendidas são quentes e úmidas, mas na maioria delas as condições atmosféricas são muito favoráveis tais como: a umidade relativa do ar de 70 a 100% e temperatura média superior a 25°C, as quais favorecem a rápida proliferação de fungos (Fonseca, 2000).

Em estudo realizado por Gelli et al. (1990) os autores sugerem a necessidade de mais avaliações das condições de armazenamento/conservação, bem como das características intrínsecas do produto que favoreçam o crescimento dos fungos e a produção de micotoxinas para que seja determinada em quais etapas podem ocorrer a multiplicação de fungos e a produção de micotoxinas.

A aflatoxicose resulta em uma grande variedade de sintomas, dependendo da espécie animal afetada. As diferentes espécies animais variam em susceptibilidade para a aflatoxicose aguda, com dose letal média em valores que variam de 0,3 a 17,9 mg/kg de peso corporal (Patterson, 1973).

Algumas substâncias como o carvão ativado, bentonita de sódio e alumínio silicato de sódio hidratado têm sido testadas; tais substâncias agem inibindo a absorção da aflatoxina e, com isso, ocorre uma redução significativa (Miarro et al., 2000; Rosa et al., 2001).

Alguns pesquisadores fazem restrições a esse tipo de procedimento, pois alegam que alguns nutrientes podem também ser carregados, o que pode representar um sério problema nutricional (Rosa et al., 2001). Convém citar que alguns Estados do USA têm permitido a utilização desse tratamento mesmo diante do FDA - Administration Drug and Food, que não tem se apresentado a favor desses métodos (Norred, 2000; Bata & Lasitsy, 1999).

2.2 Fatores importantes para o crescimento de fungos e produção de aflatoxina

2.2.1 Aa (Atividade de água)

A produção de aflatoxina resulta da tripla combinação: espécie fúngica, substrato e meio ambiente. Os fatores que afetam a produção de aflatoxina podem ser divididos em 3 categorias: física, nutricional e biológica (Gourama & Bullerman, 1995b; Pitt & Hocking, 1997).

A Aa (Atividade de água) e a umidade relativa do ar constituem pontos críticos na produção da aflatoxina. De acordo com observações de Diener & Davis (1966), a produção máxima de aflatoxina, em grão de cereal, ocorre em teor de umidade de 25% a 30 °C. Os valores mínimos exigidos de umidade relativa do ar estão entre 83 a 88%. Tais autores observaram também que quando a umidade relativa do ar atingiu valor de 99% houve aumento na produção de aflatoxina.

A influência da atividade de água foi analisada no amendoim da variedade "Tatu vermelho", quanto ao crescimento de fungos e a produção de aflatoxina. Observou-se ainda que, nos primeiros 15 dias em atividade de água

de 0,75 a 0,86, o crescimento do fungo foi lento, sendo mantido o mesmo nível em 60 dias, em todas as atividades de água testadas (0,75, 0,83, 0,86, 0,93, 0,97). A produção ótima de aflatoxina ocorreu em atividade de água de 0,93; em 0,86 não houve formação de aflatoxina por 120 dias (Prado et al., 1991).

2.2.2 Temperatura

Em alimentos refrigerados e não refrigerados, estocados em residências, foi observado que a microbiota fúngica era representada por *Penicillium* (49%) e por *Aspergillus* (38%). Destes, 10,7% foram capazes de produzir micotoxinas, dentre as quais aflatoxinas, ácido cójico, ocratoxina A, ácido penicílico e patulina. Observou-se ainda que a produção de aflatoxina foi mais comum nos alimentos não refrigerados (Torrey & Math, 1977).

A temperatura ótima para a produção de aflatoxina é influenciada pelo tipo de substrato. No amendoim, em solução nutriente, a temperatura ótima para a produção de aflatoxina por *Aspergillus flavus* foi 25 °C em período de incubação de 7 a 9 dias. Verificou-se que elevados índices de aflatoxina foram produzidos em amendoim a 25 e 30 °C, durante 7 e 15 dias de incubação, ocorrendo o mesmo no meio líquido. A produção de aflatoxina por *Aspergillus parasiticus* atingiu o maior nível nas temperaturas de 20, 25 e 30 °C, no período de 5 a 21 dias. Os níveis mais elevados foram observados aos 25 e 30 °C, com 7 e 15 dias de incubação (Diener & Davis, 1966).

Para Sorenson et al. (1967), a temperatura ótima para a produção de aflatoxina em arroz foi de 28 °C, não sendo detectada a toxina em temperatura abaixo de 8 °C ou a partir de 37 °C. A temperatura ótima para a produção de aflatoxina geralmente encontra-se entre 25 a 28 °C (Gourama & Bullerman, 1995a).

Torrey & Marth (1977) avaliaram o crescimento de uma cepa de *Aspergillus* produtor de aflatoxina na temperatura de 8 °C, durante 504 horas e

não observaram crescimento durante este período.

A produção de aflatoxina foi analisada em várias temperaturas pelo período de 5 dias em meio Wort. A produção máxima de aflatoxina foi observada na temperatura de 24 °C e o crescimento máximo do *A. flavus* ocorreu nas temperaturas de 29 e 35 °C. Durante 5 dias não houve produção de aflatoxina em temperatura abaixo de 18 °C e acima de 35 °C (Sanders et al., 1968).

A influência da temperatura e da atividade de água foram avaliadas quanto à produção de aflatoxina por *A. flavus*, em feijão cowpea, farinha e farinha com cebola. Temperaturas de 21 e 30 °C produziram elevada quantidade de aflatoxina, sendo a maior quantidade obtida em farinha contendo cebola, com atividade de água de 0,98 e incubação à temperatura de 21 °C, após 20 dias (Koehler et al., 1985).

Amostras de arroz inoculadas com cepas de *A. flavus* toxigênicas foram incubadas a 15 °C, em umidade relativa (UR) de 61%, 86,5% e 99% a 25 °C, em UR de 64%, 85% e 98%; e a 40 °C, em UR de 61,5%, 85,5% e 96%, pelo período de 10, 20 e 30 dias. A melhor produção de aflatoxina foi obtida a 25 °C, em UR de 85% e 98%, após 10 dias de incubação (Asevedo et al., 1993).

2.2.3 Potencial hidrogeniônico

Para Buchanan & Ayres (1975), o efeito do pH depende da composição do meio. O pH inicial ótimo para a produção de aflatoxina deve ser determinado em função do meio que será empregado para o crescimento do fungo. Ainda em relação ao potencial hidrogeniônico (pH), a maior produção de aflatoxina foi observada em pH com valores de 4 a 6 (Jarvis, 1971). Sabe-se que pH menor que 6 favorece a produção da AFB1 e AFB2 e pH maior que 6, a produção de AFG1 e AFG2.

O pH ótimo para o desenvolvimento de *A. flavus* e *A. parasiticus* situa-se na faixa de 5 a 8, mas os mesmos podem crescer em uma ampla faixa de pH (2 a > 11). O pH para produção de aflatoxina por *A. parasiticus* varia de 2 a >8, sendo 6 o pH mais favorável (ICMSF, 1996).

2.2.4 Potencial de oxirredução

O grau de oxigenação assume importante papel no crescimento dos fungos e na produção da aflatoxina, pois ambos são processos aeróbicos (Jarvis, 1971). A produção de aflatoxina é inibida mediante aumento gradual da concentração de dióxido de carbono de 20 para 100% (Landers et al, 1967). O crescimento de fungos e a produção de aflatoxinas são inibidos em concentração de CO₂ de 40 a 60%, a 25 °C e 86% de UR. Em concentração de 20% de CO₂ ocorre o crescimento do fungo, não havendo, porém, formação da micotoxina. Em concentrações de 100% de CO₂ ocorre total inibição do crescimento do fungo, bem como da formação da micotoxina (Scussel, 1998).

O crescimento de *A. flavus* e a produção de aflatoxina e ácidos graxos livres foram avaliados mediante a presença de dióxido de carbono em combinação com a umidade relativa e temperatura. O fungo desenvolveu-se nas seguintes condições: umidade relativa 86%; atmosfera com 20% de CO₂ e temperatura de 27 °C e/ou umidade relativa 60%, atmosfera com 40% de CO₂ e temperatura de 25 °C, mas a produção de aflatoxina e ácidos graxos livres foi inibida. Foi observado ainda que os níveis de aflatoxinas e ácidos graxos livres diminuíram com a redução da umidade relativa de 99% para 92% e 86% (Sanders et al., 1968).

O requerimento de oxigênio e as condições antioxidantes de cepas de *A. parasiticus* toxígenas e não toxígenas para a produção de aflatoxinas foram estudados. As exigências de oxigênio das cepas não toxígenas permaneceram praticamente inalteradas durante as várias fases de crescimento. As cepas

toxigênicas apresentaram acentuada demanda de oxigênio na fase relativa à produção de aflatoxina (Jayashree & Subrsmanyam, 2000).

2.2.5 Composição dos meios de cultivo

O meio de cultura *Aspergillus flavus parasiticus* Agar (AFPA) para rápida detecção das espécies aflatoxigênicas de *Aspergillus flavus* e *A. parasiticus* foi descrito por Bothast & Fennell (1974). O componente essencial deste meio é o citrato férrico, o qual promove intensa coloração amarelo-laranja na parte inversa da colônia.

A melhor fórmula para a rápida detecção de *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus* é composta por extrato de levedura, 20 g; peptona bacteriológica, -10 g; citrato férrico amoniacal, 0,5 g; cloranfenicol, 0,1 g; dicloran - solução estoque (0,2% em etanol), 1 mL; agar, 15 g; e água destilada, 1 L. Este meio, denominado Ágar *Aspergillus flavus* e *parasiticus* (AFPA), pode ser autoclavado e a incubação deve ocorrer a 30 °C +/- 1°C por 42 h (Pitt et al., 1983).

O extrato de levedura usado como fonte de nitrogênio orgânico mostrou-se mais efetivo na produção da cor do fungo que a triptona. No entanto, a triptona pode substituir a peptona bacteriológica, pois apresenta menor custo e eficiência idêntica à da peptona (Pitt et al., 1983).

O teor de proteína e de carboidrato constitui importante fator na produção de fungos e micotoxinas. O *Aspergillus parasiticus*, mediante elevado teor de proteínas e baixo teor de carboidratos, não produz altos níveis de aflatoxina embora possa intenso crescimento fúngico e conidiogênese. Já o *Aspergillus flavus*, submetido a baixos teores de carboidratos, é capaz de produzir quantidade substancial de aflatoxina (Park & Bullerman, 1983).

Elevado rendimento na produção de aflatoxina por *A. parasiticus*, em meio extrato de levedura, aconteceu quando a sacarose foi usada como

carboidrato. Moderada produção foi verificada diante dos carboidratos glicose, maltose e frutose. No entanto, a lactose foi incapaz de promover a formação da aflatoxina (Engel, 1975). A produção máxima de aflatoxina ocorreu no meio com 30% de glicose e o crescimento máximo, em 10% de glicose (Shih & Marth, 1972). Para Luchese & Harrizan (1993), glicose e frutose são excelentes fontes de crescimento, conidiogênese e produção de aflatoxina tanto para *A. flavus* quanto para *A. parasiticus*.

O catabolismo dos carboidratos mostra-se valioso na regulação da síntese de aflatoxina. O *Aspergillus* no meio PMS (peptona, sal mineral) não produz aflatoxina; no entanto, pode-se observar síntese de aflatoxina ao transferi-lo para o meio GMS (glicose, sal mineral), ou ainda, se o meio PMS for acrescido de glicose (Buchanan & Lewis, 1984).

A interação entre microrganismos demonstra que a presença de outros microrganismos, seja bactéria ou outro fungo, altera o crescimento dos fungos e a produção de micotoxinas. Assim, os fungos, como as bactérias, competem entre si por nutrientes disponíveis, fato que pode influenciar a produção de micotoxinas (Ominsk, 1994).

2.2.6 Aditivos

Os efeitos de diferentes concentrações de ácido acético e propiônico, em meio extrato de levedura-glicose e sal, em pH 4,5 e 5,5, foram avaliados por Rusul et al. (1987) quanto ao crescimento de *Aspergillus flavus* NRRL 2999 e à produção de aflatoxina. A concentração máxima de ácido acético e ácido propiônico que permitiu crescimento em pH inicial de 5,5 foi 1%, após 7 dias de incubação, e 0,25% depois de 3 dias de incubação, respectivamente. No mesmo meio com pH inicial de 4,5, a concentração máxima de ácido acético ou propiônico que permitiu o crescimento do fungo foi 0,25% e 0,1%, respectivamente. Em relação à quantidade de micélio (peso seco), não houve

diferença significativa ($p > 0,05$) quanto as concentrações de 0,0, 0,25, 0,50 e 0,75% de ácido acético. A produção de aflatoxina B1 e G1 diminuiu com o aumento da concentração dos ácidos acético e propiônico.

O crescimento de *Aspergillus flavus* em meio líquido SMKY, com diferentes concentrações de cloreto de sódio e pH 4,5, mostrou que o aumento da salinidade exerceu efeito sobre o crescimento e pronunciado efeito inibitório em relação à produção de aflatoxina (Sing et al., 1987).

Previdi (1987) avaliou o crescimento do *Aspergillus flavus* e a síntese de aflatoxina em meio contendo sacarose e meio extrato de carne acrescidos de cloreto de sódio (de 0 a 12%) e incubação de 5, 15, 25 °C. No meio de cultura com sacarose, a quantidade de aflatoxina produzida a 25 °C foi significativa em todas as concentrações de sal. Na temperatura de 15 °C, houve crescimento do fungo em todas as concentrações de sal. A produção da aflatoxina ocorreu em até 8% de sal, sendo a maior produção a 2%. Na temperatura de 5 °C o fungo cresceu; no entanto, não houve produção de aflatoxina. No meio extrato de carne, a quantidade de aflatoxina a 25 °C foi mil vezes menor que no meio com sacarose. Em temperatura de 15 °C, tanto a redução do crescimento do fungo quanto à síntese da aflatoxina foram consideráveis. Em temperatura de 5 °C não houve crescimento do fungo em nenhuma concentração salina.

2.3 Estabilidade da aflatoxina M₁ no leite e seus derivados

A estabilidade da aflatoxina no leite (AFM₁) e seus derivados tem sido estudada e os resultados têm causado discordância entre os pesquisadores. Egmond (1983) estudou leite naturalmente contaminado, submetido à esterilização e pasteurização, não observando redução na concentração de AFM₁. Resultado idêntico foi obtido por Stoloff et al. (1975), que não encontraram redução da AFM₁, em amostras de leite artificialmente contaminadas e pasteurizadas a 62 °C por 30 minutos, bem como em amostras

de leite naturalmente contaminadas submetidas à pasteurização, à temperatura de 77 °C por 16 s.

Os resultados encontrados por Purchase et al. (1972) demonstraram que, no leite pasteurizado a 62 °C por 30 minutos, houve redução de 32% na concentração da AFM₁. A redução foi de 45 e 64% quando o leite foi submetido a temperaturas de 72 e 80 °C por 45 segundos, respectivamente. A estabilidade da aflatoxina em condições de resfriamento e congelamento também variou.

Em amostras de leite cru, naturalmente contaminadas e armazenadas a 0 °C por 4 e 6 dias, a redução na concentração mostra-se rápida, com perdas de 40% e 80%, respectivamente. Em amostras armazenadas a -18 °C por 120 dias, a diminuição na concentração ocorreu mais lentamente, com perdas de 14% aos 30 dias e 86% aos 120 dias (Mckinney et al., 1973).

O efeito do congelamento, em amostras naturalmente contaminadas com AFM₁ e armazenadas a -18°C, apresentou baixa degradação e o processo ocorreu lentamente. Os resultados demonstraram que aos 53 dias não houve redução, sendo verificada pequena variação aos 68 dias. Aos 120 dias houve perda de 45% da AFM₁ (Stoloff et al., 1975).

2.4 Aspectos bioquímicos e metabólicos da AFB1

A absorção gastrointestinal é considerada a primeira etapa de entrada da aflatoxina M₁ na corrente sanguínea, e daí a outros tecidos extradigestivos. A capacidade da molécula passar através das membranas celulares depende de sua propriedade lipofílica. Após absorção gastrointestinal, as aflatoxinas são transportadas para o sangue e podem ligar-se às suas células ou proteínas plasmáticas. Em função da absorção intestinal, as aflatoxinas são distribuídas, inicialmente, para o fígado, através do sistema hepático, onde sofrerão os primeiros processos de biotransformação (Taveira & Mídio, 1999).

Na circulação sistêmica, as aflatoxinas são distribuídas para o organismo

ligadas a componentes sanguíneos, tais como eritrócitos e proteínas plasmáticas. Para a aflatoxina B₁, e provavelmente a M₁, 90% das micotoxinas circulantes estão ligadas às proteínas, mais especificamente à albumina, podendo haver, em virtude da própria característica do processo, uma competição e interação com outros contaminantes do alimento e demais xenobióticos de caráter ácido circulantes (Galtier, 1998).

As aflatoxinas, à medida que são absorvidas, seguem diretamente para o fígado, onde ocorre o processo de detoxificação, processo executado no hepatócito com atuação do citocromo p450 e do ácido glicurônico. Assim a molécula de aflatoxina B₁ sofre a ativação metabólica, modificada em outros compostos tão tóxicos quanto o original. A alta concentração do composto pode ser explicada pela alta permeabilidade da membrana do hepatócito, pela possibilidade de sofrer os primeiros processos de biotransformação, requisito para sua carcinogenicidade, e pela ligação covalente com macromoléculas hepáticas (Mídio & Martins, 2000).

Através de reações de oxidação, AFB₁ é biotransformada, sendo esta reação mediada por oxigenases de função mista, a qual resulta principalmente em três derivados monoidroxilados: aflatoxina M₁ (9a-hidroxiaflatoxina, AFM₁); aflatoxina P₁ (4-hidroxiaflatoxina, AFP₁) e aflatoxina Q₁ (3-hidroxiaflatoxina, AFQ₁).

2.5 Incidência em alimentos

A presença de micotoxinas na cadeia alimentar pode ocorrer de forma direta ou indireta. Na forma direta, o substrato do alimento serve como meio para o desenvolvimento do fungo e a produção da toxina, podendo ocorrer em qualquer estágio, seja durante a produção, beneficiamento, transporte e armazenamento. Na forma indireta, os ingredientes do alimento podem estar contaminados com a micotoxina, ou ainda, como no caso de produtos de origem

animal, em que animais consumiram ração contaminada (Carvalho, 1995).

As aflatoxinas têm sido descritas como as micotoxinas com mais incidência de resultados positivos relatados no mundo inteiro, em alimentos como amendoim, milho, semente de algodão, centeio, sorgo, trigo, cevada, nozes pecans, nozes, ervilha, semente de girassol, aveia, arroz, painço, castanha do Pará, leite e derivados, entre outros. Em menor quantidade estão presentes em fígado de ovinos, de suínos, e de aves de corte (Scussel, 1998).

Na região Nordeste, no Estado do Ceará, em 70 amostras analisadas por Vale (1992), constatou-se um nível máximo de 130 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de aflatoxinas em 32,9% das amostras; no Estado da Paraíba, o nível máximo de B1 foi de 2,08 $\mu\text{g}/\text{kg}$, B2-3,04 $\mu\text{g}/\text{kg}$ e G2-0,84 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Das 32 amostras analisadas, 34% apresentaram B1, 31% B2 e 94% G2 (Cardoso & Braga, 1997).

Na região Sudeste, no Estado de São Paulo foram avaliadas 654 amostras de cereais e produtos de cereais e verificou-se um nível máximo de 1.600 $\mu\text{g}/\text{kg}$, que representavam 11,5% (Salay & Mercadante, 2002). De um total de 90 amostras de grãos de cereais analisadas no Estado do Paraná, Molin et al. (2000) detectaram de 1 a 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ em 2 amostras analisadas. Segundo Sylos & Rodrigues-Amaya (1994), 25 amostras analisadas de milho e derivados oriundos da região de Campinas, SP, em 100% das amostras não foi detectada presença de aflatoxina. Já em 1996, Sylos et al. pesquisaram amostras de cereais nos Estados de Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná, num total de 48 amostras, das quais 28 amostras apresentaram aflatoxina B1, com uma média de 2.152 $\mu\text{g}/\text{kg}$. No ano de 1998, Sylos et al. avaliaram amostras de milho para pipoca e fubá do Estado de São Paulo e encontraram uma baixa incidência de aflatoxina B1, com concentrações de 8 a 6 $\mu\text{g}/\text{kg}$, respectivamente. No Rio de Janeiro, em 50 amostras analisadas foi detectada presença de aflatoxina em 56,9% das amostras, com uma taxa de 1 a 32 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (Ribeiro et al., 2000).

Nas regiões Sul e Centro Oeste nos Estados do Paraná, Santa Catarina, Rio Grande do Sul e Goiás foi analisado um total de 1.927 amostras de cereais e derivados, nos quais o nível máximo de aflatoxina foi de 7.400 µg/kg, representando 33,4% das amostras (Salay & Mercadante, 2002). De 192 amostras de milho avaliadas da região Sudoeste do Paraná, 7,1% apresentaram níveis acima do estabelecido (Lazzari, 1994). Em amostras de derivados de milho, em um total de 213 amostras, Pich et al. (1998) encontraram 2560 µg /kg de AFB1 em 17,37% das amostras.

Um total de 1.131 amostras dos Estados do Paraná, Santa Catarina, Rio Grande do Sul, São Paulo e outros estados e países foi analisado e o nível máximo de aflatoxina detectado foi de 10.807 µg/kg. O número de amostras contaminadas com micotoxinas foi 502, das quais 451 apresentaram níveis superiores a 5 µg/kg de aflatoxinas e 104 amostras valores superiores ao limite de tolerância da legislação brasileira, que é de 30 µg/kg Baldissera et al., 1994).

Amostras de milho comercial analisadas durante o período 1992 a 1997 (Menegazzo, 1998) demonstraram um nível máximo de aflatoxina de 23,8 µg/kg. De acordo com o autor, a presença de aflatoxina teve seus níveis crescentes entre os anos de 1992 e 1995, mantendo-se estabilizados a partir de então, mas com níveis críticos em relação ao padrão estabelecido pela legislação

Siame et al. (1998) avaliaram a presença de aflatoxina em vários alimentos destinados à alimentação animal e detectaram a presença de aflatoxina em 40% das amostras analisadas; a concentração apresentou valores que variaram de 0,1 a 64 µg/kg. Já Nordin & Luchese (1998), em 115 amostras de milho analisadas, constataram a presença de aflatoxina em apenas 0,87% das amostras.

Durante um ano, Bento et al. (1989) pesquisaram a presença de aflatoxina M₁ em leite pasteurizado e em leite em pó. No leite em pó não foi detectada aflatoxina; já no leite pasteurizado, os mesmos encontraram a presença

da aflatoxina em 5% das amostras analisadas, com um valor que variou de 0,10 a 0,40 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

O comportamento das aflatoxinas B₁, B₂, G₁, G₂ e M₁ em iogurte foi avaliado. Nesse estudo, o leite utilizado para o processamento do iogurte foi contaminado com as aflatoxinas. Foi observado que as aflatoxinas permaneceram estáveis durante a fabricação e estocagem de 21 dias sob refrigeração (Blanco et al., 1993).

No Estado de São Paulo, a presença de aflatoxina M₁ em leite em pó foi detectada em 11% das amostras analisadas (300 amostras) e os níveis de toxinas encontrados foram de 0,10 a 1,00 ng/mL (Oliveira, 1997).

Em 82% das amostras de leite analisadas por Prado et al. (1999) constatou-se a presença de aflatoxina com níveis que variaram de 6-77 ng/L, no entanto, todas as amostras estavam dentro dos padrões estabelecidos.

A presença do fungo no alimento não implica na produção de micotoxina, tendo em vista que, para a produção da micotoxina, são necessárias algumas condições diferentes das exigidas para o crescimento do fungo. No entanto, pode ocorrer também a presença da toxina sem que haja a detecção do fungo, uma vez que as formas vegetativas e germinativas do fungo podem ser inativadas por processos químicos ou por alterações dos fatores ecológicos, não ocorrendo o mesmo com as toxinas, que permanecem no substrato (Gimeno, 2000).

Os fungos, através de sua ação direta, podem promover vários problemas aos produtos armazenados. Nas sementes podem provocar perdas do poder germinativo, descoloração do arroz e da manteiga de cacau, produzir aromas desagradáveis, diminuir o valor nutritivo, além de produzir, toxinas como no amendoim, arroz e muitos outros produtos (Fonseca, 2000).

Em termos de maior e menor susceptibilidade à contaminação dos alimentos, Gimeno (2000) considera a seguinte ordem, tendo em vista a

natureza, composição e uso do alimento: cereais, subprodutos de cereais (essencialmente o trigo), subprodutos de matadouros, de aves, farinhas de alfafa, mandioca, soja integral, girassol integral, algodão, farinha de soja, farinha de girassol, glúten de arroz, entre outros e, finalmente, tudo o que se refere a produtos submetidos à peletização.

2.6 Importância em saúde pública

As micotoxicoses apresentam-se de três formas: aguda primária, crônica primária e doenças micotóxicas secundárias. Na micotoxicose aguda primária, considera-se o consumo de micotoxinas em doses que variam de moderadas a altas. Já a micotoxicose crônica primária ocorre quando os níveis de micotoxinas consumidos são de moderados a baixos. E as doenças micotóxicas secundárias são resultantes da ação de baixos níveis de micotoxinas, as quais são incapazes de manifestar uma micotoxicose evidente. No entanto, podem promover imunossupressão e, assim, predispor o indivíduo a doenças infecciosas (Pier et al., 1980).

Os efeitos agudos causados pela exposição humana a altas concentrações de aflatoxinas presentes nos alimentos já foram amplamente relatados na literatura e sua ocorrência é predominante nos países tropicais (Mídio & Martins, 2000).

A ingestão de alfatoxina purificada demonstrou que uma única dose não foi tão efetiva como quando da ingestão a longo prazo, sendo isso observado em um indivíduo que tentou suicídio. Em um outro caso, uma mulher ingeriu 5,5 mg por dois dias e 35 mg depois de 2 semanas; 6 semanas após a dose inicial foi observada erupção macular passageira, náusea e dor de cabeça. A mulher recuperou-se completamente e, quando examinada 14 anos depois não apresentou enfermidade significativa no fígado (Willis et al., 1980).

O relato mais importante de aflatoxicose em humanos ocorreu no Noroeste da Índia em 1974. De acordo com o relato, 400 pessoas foram afetadas e 100 pessoas morreram. O milho foi o constituinte da dieta de maior representação, estava contaminado com *A. flavus* e continha até 15 mg de aflatoxina/kg. A dose diária de aflatoxina ingerida foi estimada em pelo menos 2-6 mg/dia. Com base nesses dados, calcula-se que a dose aguda letal para pessoas adultas seja em torno de 10 mg (Krishnamachari et al., 1975).

Em áreas da África e da China, casos de aflatoxicose aguda têm sido associados com epidemias de hepatite aguda tóxica e a taxa de mortalidade gira em torno de 10 a 60% (Bhat & Krishnamachari, 1977). Casos de carcinoma hepatocelular têm sido registrados em regiões da Ásia e da África e têm ocasionado pelo menos 250.000 mortes por ano, sendo o maior fator de risco desta enfermidade a exposição de aflatoxina na dieta e infecções por HBV-vírus da hepatite B (Groopman et al., 1992).

2.7 Aspectos legais

A legislação internacional para alimentos, incluindo micotoxinas em alimentos para o homem e ração animal, foi estabelecida nos anos 1961/62 pela FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations e WHO-World Health Organization, tendo como órgão responsável para a sua elaboração o Codex Alimentarius. A legislação desenvolvida pelo Codex Alimentarius é baseada nos Padrões Gerais do GSCTF - Codex para Contaminantes e Toxinas em Alimentos (Berg, 2002).

Desde 1965, o FDA-Food and Drug Administration tem imposto limites regulamentares sobre a concentração dessas toxinas em alimentos humanos e ração animal envolvidos no comércio estadual. Este órgão monitora rotineiramente os alimentos humanos e ração animal nas indústrias através de

programas que assegurem que os níveis de exposição a essas toxinas sejam o mais baixo quanto possível (Wood, 1992).

A comissão Européia propôs um nível máximo permissível de 0,05 ng/g de AFM₁ em leite e produtos lácteos (Creppy, 2002).

Em 1980 foi criado um Programa Nacional de Monitoração e Controle de Micotoxinas pelo Instituto Adolfo Lutz e Sociedade Brasileira de Microbiologia (SBM). Os encontros nacionais são realizados a cada 2 anos sob a coordenação nacional da Dra. Mirna Sabino, do Instituto Adolfo Lutz.¹

No Brasil, em 1997 foi criado o PNCMV - Programa Nacional de Controle de Micotoxinas em produtos e subprodutos derivados de origem vegetal com o objetivo de monitorar os níveis de micotoxinas em produtos (Vargas & Souza, 1999).

O Ministério da Agricultura estabelece, para alimento de consumo animal, o padrão de até 50 ppb de aflatoxinas (Brasil, 1988) e o padrão de aflatoxinas em alimentos para consumo humano (Brasil, 1996) é de 20 ppb. Esta portaria internalizou as normas do MERCOSUL - GMS/Res. nº 56/94. O limite de aflatoxina estabelecido pela ANVISA - MS para o leite fluido é de 0,5 µg/L (Brasil, 2002). Os limites estabelecidos por alguns países estão descritos na Tabela 1.

¹ ROSA, C. A. da R. Comunicação pessoal. 2003. (Instituto de Veterinária da UFRRJ, 23890-000- Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil).

TABELA 1 Limites máximos para micotoxinas em leite e derivados em alguns países

| País | Produto | Limite aflatoxina M ₁ µg/kg ou µg/L |
|----------|-------------------|--|
| Suécia | Leite fluido | 0,050 |
| Aústria | Leite | 0,050 |
| Alemanha | Leite | 0,050 |
| Holanda | Leite | 0,050 |
| | Manteiga | 0,020 |
| | Queijo | 0,200 |
| Romênia | Leite e derivados | 0,0 |
| Suíça | Alim. infantil | 0,020 |
| | Leite e derivados | 0,050 |
| | Queijo | 0,250 |
| Bélgica | Leite | 0,050 |
| USA | Leite | 0,50 |
| Brasil | Leite fluido | 0,50 |

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

APPLEBAUM, R.; S BRACKETT, R.E.; WISEMAN, D. W.; MARTH, E.H. Responses of dairy cows to dietary aflatoxin: feed intake and yield, toxin content, and quality of milk of cows treated with pure and impure aflatoxin. **Journal of Dairy Science**, v. 65, n. 8, p. 1503-1508, Aug. 1982.

ASEVEDO, I.G.; GAMBALE, W.; CORRÊA, B.; PAULA, C. R.; ALMEIDA, R. M. A.; FRAMIL, V.M.S. Influence of temperature and relative humidity in the production of aflatoxins in samples of stored maize, artificially contaminated with *Aspergillus flavus* (link). **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 24, n. 1, p. 32-37, Jan./Mar. 1993.

BALDISSERA, M. A.; SANTURIO, J. M.; MALLMANN, C. A.; ALMEIDA, C. A. A.; KIPPER, M.; SOUZA JUNIOR., C. E.; SANTOS, X. C.; CAMARGO, B. S. Aflatoxinas, zearalenona e ocratoxina A em alimentos resultados de 1987 a 1993. In: CONGRESSO LATINO AMERICANO DE MICOTOXICOLOGIA, 1.; ENCONTRO NACIONAL DE MICOTOXINAS, 7., 1994, Rio de Janeiro. **Anais...**Rio de Janeiro: [s.n.], 1994. p. 104-

BATA, A.; LASZTITY, R. Detoxication of mycotoxin-contaminated food and feed by microorganisms. **Trends in Food Science & Tecnology**, Oxford, v. 10, n. 6/7, p. 223-228, June/july 1999.

BHAT, R. V.; KRISHNAMACHARI, K. A. V. R. Follow-up study of aflatoxic hepatitis in parts of Western India. **Indian Journal of Medical Research**, New Delhi, v. 66, n.1, p.55-58, 1977.

BENTO, H.; FERNANDES, A. M.; BARBOSA, M. Pesquisa de aflatoxina M1 em leite corrente pasteurizado e em leite em pó. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinaria**, Lisboa, v. 84, p. 163-171, 1989.

BLANCO, J. L.; CARRION, B. A.; LIRIA, N.; DIAZ, S.; GARCIA, M. E.; DOMINGUEZ, L.; SUAREZ, G. Behavior of aflatoxins during manufacture and storage of yoghurt. **Milchwissenschaft**, Munich, v.48, n. 7, p. 385-387, July 1993.

BERG, T. How to establish international limits for mycotoxins in food and feed? **Food Control**, Oxford, n. 1, p.1-6, Jan. 2002.

BOTHAST, R. J.; FENNELL, D. I. A medium for rapid identification and enumeration of *Aspergillus flavus* and related organisms. *Mycologia*, Bronx, v. 66, n. 2, p. 365-369, 1974.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Portaria MA/SNAD/SFA Nº 07, de 1988. Fixa padrões de tolerância para aflatoxinas em alimentos para consumo animal: matérias primas e rações, 1988. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, p. 21.968, 9 nov. 1988. Seção 1.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Portaria nº 183, de 1996. Fixa padrões de tolerância para aflatoxinas em alimentos para consumo humano. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, p. 4929, 25 mar. 1996.

BRASIL. Ministério da Saúde Resolução- RDC nº 274, de 2002. Agência Nacional de Vigilância Sanitária-ANVS, Regulamento técnico MERCOSUL sobre limites máximos de aflatoxinas admissíveis no leite, no amendoim, no milho **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 16 out. 2002.

BUCHANAN JUNIOR, R. L.; AYRES, J. C. Effect of initial pH on aflatoxin production. *Applied Microbiology*, Washington, v. 30, n. 6, p.1050-1051, Dec. 1975.

BUCHANAN, R. L.; LEWIS, D. F. Regulation of aflatoxin biosynthesis: effect of glucose on activities of various glycolytic enzymes. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 48, n. 2, p. 306-310, Aug. 1984.

CARDOSO, M. A. A; BRAGA, S. M. L. F. Ocorrência de aflatoxinas em grãos de milho em uma indústria do Estado da Paraíba. In: SIMPÓSIO LATINO AMERICANO DE CIÊNCIAS DE ALIMENTO, 2., 1997, Campinas. **Anais...Campinas: [s.n.]**, 1997.

CARVALHO, E. C. Q. Micotoxinas e alimentos: implicações na saúde humana e animal. **Revista Brasileira de Ciências Veterinárias**, Niteroi, v.2, p. 27-31, 1995.

CREPPY, E. E. Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe. **Toxicology Letters**, Amsterdam, v. 000, n 1/2, p.1-10, Jan. 2002.

DIENER, U.H.; DAVIS, N.D. Aflatoxin production by isolates of *Aspergillus flavus*. **Phytopathology**, St.Paul, v. 56, n. 12, p. 1390-1393, Dec.1966.

EGMOND, H. P. Van. Mycotoxins in dairy products. **Food Chemistry**, Barking, v. 11, p. 289-307, 1983.

ENGEL, G. Production of mycotoxins and their quantitative determination.4. Extent of aflatoxin synthesis by *Aspergillus flavus* in dependence on the quality and quantity of carbohydrates available. **Milchwissenschaft**, Berlin, v. 30, n.9, p. 588-591, 1975.

FONSECA, H. Os fungos e a deterioração de alimentos. Disponível em: <<http://www.micotoxinas.com.br/boletim4.htm>> Acesso em: 05 maio 2000.

GALTIER, P. Biological fate of mycotoxins animals. **Revue de Medicine Veterinaire**, Toulouse, v. 149, n.6, p. 549-554, June 1998.

GAREIS, M.; WOLFF, J. Relevance of mycotoxin contaminated feed for farm animals and carryover of mycotoxins to food of animal origin. **Mycoses**, Berlin, v. 43, p. 79-83, 2000. Suplemento 1.

GELLI, D. S.; JAKABI, M.; PORTO, E. Isolamento de *Aspergillus* spp, aflatoxigênicos de produtos alimentícios- São Paulo, capital. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 50, n. 1/2, p. 319-323, jan./fev. 1990.

GIMENO, A. Revision generica del problema de los hongos y de las micotoxinas en la alimentacion animal. Disponível em: <http://www.micotoxinas.com.br/boletim4.htm>> Acesso em: 2 abr. 2000.

GOURAMA, H.; BULLERMAN, L. B. *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*: Aflatoxigenic fungi of concern in foods and feeds: A review. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 58, n.12, p. 1395-1404, Dec. 1995a.

GOURAMA, H.; BULLERMAN, L. B. Detection of molds in foods and feeds: potential rapid and selective methods. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 58, n.12, p. 1389-1394, Dec. 1995b.

GROOPMAN, J. D.; JIAQI, Z.; DONAHUE, P. R.; PIKUL, A.; LISHENG, Z.; JUN-SHI, WOGAN, G. N. Molecular dosimetry of urinary aflatoxin-DNA adducts in people living in *Guangxi autonomous region*, People's Republic of China. **Cancer Research**, Philadelphia, v. 52, p. 45-52, 1992.

HUSSEIN, H. H.; BRASEL, J.M. Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. **Toxicology**, Clare, v. 167, n. 2, p. 101-134, Oct. 2001.

INTERNATIONAL COMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS. **Microorganismos de los alimentos: características de los patógenos microbiano**. Zaragoza: Acribia, 1996. p. 403-428.

JAYASHREE, T.; SUBRSMANYAM, C. Oxidative stress as a prerequisite for aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*. **Free Radical Biology & Medicine**, Oxford, v. 29, n. 10, p. 981-985, Nov. 2000.

JARVIS, B. Factors affecting the production of mycotoxins. **Jounal Applied Bacteriology**, Oxford, v. 34, n.1, p.199-213, 1971.

KOEHLER, P. E.; BEUCHAT, L. R.; CHHINNAN, M. S. Influence of temperature and water activity on aflatoxin production by *Aspergillus flavus* in cowpea (*Vigna unguiculata*) seeds and meal. **Journal of Food Protection**. Des Moines, v 48, n. 12, p. 1040-1043, Dec.1985.

KRISHNAMACHARI, K. A. V. R.; NAGARAJAN, V.; TILAK, T. B. G. Invetigation into a outbreak of hepatitis in parts of Western India. **Indian Journal of Medical Research**, New Delhi, v. 63, n. 7, p. 1036-1048, 1975.

LANCASTER, M. C.; JENKINS, F. P.; PHILP, J. M. Toxicity associated with certain samples of groundnuts. **Nature**, London, v.192, n. 480, p. 1095-1097, 1961.

LANDERS, K. E.; DAVIS, N. D., DIENER, U. L. Influence of atmospheric gases on aflatoxin production by *Aspergillus flavus* in peanuts. **Phytopathology**, St. Paul, v. 57, n.10, p. 1086-1090, Oct. 1967.

LAZZARI, F. A. Ocorrência de toxinas de *Fusarium* em milho no Paraná. In: CONGRESSO LATINO AAAMERICANO DE MICOTOXICOLOGIA, 1.; ENCONTRO NACIONAL DE MICOTOXINAS, 8., 1994, Rio de Janeiro. **Anais...**Rio de Janeiro: [s.n], 1994. p. 109-

LUCHESE, R. H.; HARRIGAN, W. F. Biosynthesis of aflatoxin- the role of nutritional factors. **Journal Applied Bacteriology**, Oxford, v. 74, n.1, p. 5-14, Jan. 1993.

MCKINNEY, J. D.; CAVANAGH, R. C. O.; BELL, J. T.; HOVERSLAND, A. S.; NELSON, D. M.; PEARSON, J.; SELKIRK, R. J. Effects of ammoniation on aflatoxins in rations fed lactating cows. **Journal of American Oil Chemistry Society**, Champaign, v. 50, n. 3, p. 79-84, 1973.

MENEGAZZO, R. Micotoxinas em milho para rações na região Sul do Brasil (1992 a 1997). In: ENCONTRO NACIONAL DE MICOTOXINAS, 9., 1998, Florianópolis. **Anais...** Florianópolis: [s.n.], 1998. p. 22-

MIAZZO, R.; ROSA, C. A. R.; CARVALHO, E. C. Q.; MAGNOLI, C.; CHIACCHIERA, S. M.; PALACIOS, G.; SAENZ, M. KIKOT, A.; BASADELLA, E.; DALCERO, A. M. Efficacy of syntetic zeolite to reduce the toxicity of aflatoxin in broiler chicks. *Poultry Science*. Baltimore, v. 79, n. 1, p. 1-6, 2000.

MIDIO, A. F.; MARTINS, D. I. **Toxicologia de alimentos**. São Paulo: Varela, 2000. p.62-77.

MILLER, B. Afatoxina M₁. <http://www.altech.com.br/texto11.htm>. Disponível em: Acesso em: 11 nov.1999.

MOLIN, R.; FRANCELLI, A.,L.; FONSECA, H. Occurrence of aflatoxins, ochratoxin A and zearalenone in corn kernels at three stages of development. In: INTERNATIONAL IUPAC SYMPOSIUM ON MYCOTOXINS AND PHYCOTOXINS, 10., 2000, Guarujá. **Proceedings...** Guarujá: UNICAMP, 2000. p. 147.

NORDIN, N.; LUCHESE, R. H. Detecção de aflatoxina e zearalenona em milho (*Zea Mays*), destinado à alimentação animal. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia dos Alimentos**, Campinas, v. 32, n. 1, p. 35-39, jan./ago. 1998.

NORRED, W. P. Agriculturally important fungal toxins. **Chemical Health & Safety**, p. 22-25, July/Aug 2000.

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

OMINSKI, K. H.; MARQUARDT, R. R., SINHA, R. N., ABRAMSON, D. **Mycotoxin in grain: compounds other than aflatoxin**. In: Ecological aspects

of growth and mycotoxin production by storage fungi. Miller e Trenholm, 1994. cap. 4, p. 287-312.

PARK, K-Y.; BULLERMAN, L. Effects of substrate and temperature on aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus* and *Aspergillus flavus* **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 46, n. 3, p. 178-184, Mar. 1983.

PATTERSON, D. S. P. Metabolism as a factor in determining the toxin action of the aflatoxins in different animal species. **Food Cosmetics Toxicology**, Surrey, v. 11, n. 2, p. 287-294, 1973.

PICH, P. H.; NORDIM, N. S. D.; NOLL, I. B. Detecção de aflatoxinas em produtos derivados de milho comercializados na região de Porto Alegre- RS. In: ENCONTRO NACIONAL DE MICOTOXINAS, 9., 1998, Florianópolis. **Proceedings...** Florianópolis: [s.n.], 1998. P.120-

PIER, A. C.; RICHARD, J. L.; CYSEWSKI, S. J. Implications of mycotoxins in animal disease. **Journal of the American Veterinary medical Association**, Ames, v. 176, n. 8, p.719-724, 1980.

PITT, J. I.; HOCKING, A. D.; CSIRO GLENN, D. R. An improved medium for the detection of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus*. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v.54, n. 1, p. 109-114, 1983.

PITT, J.I.; HOCKING, A. D. **Fungi and Food Spoilage**. 2. ed. London: Blackie Academic and Professional, 1997. 593p.

PRADO, G.; VIEIRA, M. B. C. M.; NICÁCIO, M. A. S.; GLÓRIA, M. B. z. Efeito da umidade relativa na contaminação microbiana e produção de aflatoxinas em amendoim em grão. **Ciência e Tecnologia dos Alimentos**, Campinas, v.11, n. 2, p. 264-273, mar./jun. 1991.

PRADO, G.; OLIVEIRA, M. S.; ABRANTES, F. M.; SANTOS, L. G.; SOARES, C. R.; VELOSO, T. Ocorrência de aflatoxina M₁ em leite consumido na cidade de Belo Horizonte- Minas Gerais/Brasil- agosto/98 à abril/99. **Ciência e Tecnologia dos Alimentos**, Campinas, v.19, n.3, p. 420-423, set./dez. 1999.

PREVIDI, M. P. Influenza del cloruro di sodio e della temperatura sullo sviluppo e sulla produzione di aflatossine da parte di *Aspergillus parasiticus*. **Industria Conserve**, v. 62, p. 215-219, 1987.

PURCHASE, I. F. STEYN, M.; RINSMA, R.; TUSTIN, R. C. Extration and estimation of aflatoxin M₁ in milk by processing. **Food Cosmetics Toxicology**, Oxford, v.10, n. 3, p. 383-387, 1972.

RIBEIRO, J. M. M.; ROSA, C. A. R.; CURVELLO, F. A.; FRAGA, M. E. Toxigenic mycoflora and mycotoxins (aflatoxins and ochratoxin A) in poultry feed in Rio de Janeiro Brazil. In: INTERNATIONAL IUPAC SYMPOSIUM ON MYCOTOXINS AND PHYCOTOXINS, 10., 2000, Guarujá. **Proceedings...Guarujá: UNICAMP, 2000. p.156-**

RODRIGUES-AMAYA, D. B. Research on mycotoxins in Latin America. In: INTERNATIONAL IUPAC SYMPOSIUM ON MYCOTOXINS AND PHYCOTOXINS, 10., 2000, **Proceedings...Guarujá, UNICAMP, 2000. p.156-**

ROSA, C. A. R.; MIAZZO, R.; MAGNOLI, C.; SALVANO, M.; CHIACCHIRA, S. M.; FERRERO, S.; CARVALHO, E. C. Q.; DALCERO, A. M. Evaluation of the efficacy of bentonite from south of Argentina to ameliorate the toxic effects of aflatoxins in broilers. *Poultry Science*. Baltimore- USA., v. 80, n. 2, p. 139-144, 2001.

RUSTON, I. Y. S. Aflatoxin in food and feed: occurrence, legislation and inactivation by physical methods. **Food Chemistry**, Oxford, v. 59, n. 1, p. 57-67, May 1997.

RUSUL, G., EL-GAZZAR, F.E., MARTH, E.H. Growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus* NRRL 2999 in the presence of acetic or propionic acid and at different initial pH values. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 50, n.11, p. 909-914, Nov. 1987.

SABINO, M.; LAMARDO, L. C. A.; INOMATA, E. I.; ICHIKAWA, A.; GIANNATTASIO, C. M. P. Ocorrência de aflatoxina B₁ em produtos alimentícios e rações animais, consumidos no Estado de São Paulo e em várias outras regiões do Brasil, no período de 1980 a 1987. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 48, n. 1/2 p. 81-85, jan./jun. 1988.

SALAY, E.; MERCADANTE, A. Z. Mycotoxins in Brazilian corn for animal feed: occurrence and incentives for private sector to control the level of contamination. **Food Control**, Oxford, v. 13, n. 2, p. 87-92, Mar. 2002.

SANDERS, T. H.; DAVIS, N. D.; DIENER, U. L. Effect of carbon dioxide, temperature, and relative humidity on production of aflatoxin in peanuts. **Journal of the American Oil Chemists Society**, Washington, v. 45, n. 10, p. 683-685, Oct. 1968.

SCUSSEL, M. V. **Micotoxinas em alimentos**. Florianópolis: Insular, 1998. 144p.

SHIH, C. N.; MARTH, E. H. Experimental production of aflatoxin on brick cheese. **Journal of Milk Food Technology**, Des Moines, v. 35, n. 10, p. 585-591, 1972.

SYLOS, C. M.; RODRIGUES-AMAYA, D. B.; SANTÚRIO, J. M.; BALDISSERA, M. A. Occurrence of aflatoxins and cyclopiazonic acid in Brazilian peanut and corn. In: INTERNATIONAL IUPAC SYMPOSIUM ON MYCOTOXINS AND PHYCOTOXINS, 9., 1996, Rome. **Proceedings...Rome: FAO**, 1996. p. 132-

SYLOS, C. M.; RODRIGUES-AMAYA, D. B. Ocorrência simultânea de ácido ciclopiazônico e aflatoxinas B e G em amendoim e milho. In: CONGRESSO LATINO AMERICANO DE MICOTOXICOLOGIA, 1., ENCONTRO NACIONAL DE MICOTOXINAS, 8., 1994, Rio de Janeiro. **Anais...Rio de Janeiro: [s.n]**, 1994. p. 83-

SYLOS, C. M.; RODRIGUES-AMAYA, D. B. Ocorrência de micotoxinas em alimentos brasileiros. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 16., 1998, Rio de Janeiro. **Anais...Rio de Janeiro: SBCTA**, 1998. p. 314-

SIAME, B. A.; MPUCHANNE, S. F.; BERHANU, A. G.; ALLOTEY, J.; TEFFERA, G. Occurrence of aflatoxins, fumonisin B₁, and zearalenone in foods and feeds in Botswana. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 61, n. 12, p. 1670-1673, Dec. 1998.

SING, P. L.; AHMED, S. K. S.; BHAGAT. Effect of salinity on aflatoxin production by *A. flavus*. **Indian Phytopathology**, New Delhi, v. 40, n. 4, p. 553-555, Dec. 1987.

SORENSEN, W. G.; HESSELTINE, C. W.; SHOTWELL, C. L. Effect of temperature on production of aflatoxin on rice by *Aspergillus flavus*. **Mycopathologia et Mycologia Applicata**, Den Haag, v. 33, n. 1, p. 49-55, 1967.

STOLOFF, L.; TRUCSESS, M., HARDIN, N., FRANCIS, O. J., HAYES, J.R., POLAN, C. E., CAMPBELL, T. C.. Stability of aflatoxin M₁ in milk. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 58, n. 12, p. 1789-1793, Dec. 1975.

TAVEIRA, J. de A.; MÍDIO, A. F. Aflatoxina M₁- A micotoxina do leite. **Boletim da Sociedade Brasileira em Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 33, n.1, p. 115-126, jan./jun. 1999.

TORREY, G. S., MARTH, E. H. Temperature in home refrigerators and mold growth at refrigeration temperatures. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 40, n. 6, p. 393-397, June 1977.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F.; GOMPERTZ, O. F., CANDEIAS, J. A. N. **Biologia dos fungos**. In: GOMPERTZ, O. F. et al. **Microbiologia médica**. [S./]: Atheneu, 1999. p. 365-374.

VALE, V. L. Variação dos níveis de aflatoxina B₁ em milho de pipoca comercializado em Fortaleza, durante 1991. In: ENCONTRO NACIONAL DE MICOTOXINAS, 7, 1992, São Paulo. **Anais...** São Paulo: [s.n.], 1992. p. 13.

VARGAS, E. A.; SOUZA, L. M. Programa nacional de controle de micotoxinas em produtos, subprodutos derivados de origem vegetal_PNCMV. In: MOLIN, R.; VALENTINI, M. L. **Simpósio sobre micotoxinas em grãos**, São Paulo: Fundação Cargill/Fundação ABC, 1999. 208p.

WILLIS, R. M.; MULVIHILL, J. J.; HOOFNAGLE, J. H. Attempted suicide with purified aflatoxin. **Lancet**, Bethesda, v. 1, n. 8179, p. 1198-1199, 1980.

WOOD, G. E. Mycotoxins in foods and feeds in the United States. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 70, n. 12, p.3941-3949, Dec. 1992.

CAPÍTULO 2

ISOLAMENTO, IDENTIFICAÇÃO E DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE TOXIGÊNICA DE FUNGOS EM ALIMENTO ANIMAL

1 Resumo

PEREIRA, Maria MarluCIA Gomes. Isolamento, identificação e determinação da capacidade toxigênica de fungos em alimento animal. In: ____ Estudo da presença de fungos produtores de micotoxinas e pesquisa de aflatoxinas em alimento animal e aflatoxina M₁ em leite cru e após tratamento térmico, 2003 p. 33-56 Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) Universidade Federal de Lavras, Lavras.

Foram analisadas 40 amostras de alimento destinado ao consumo animal. Estas foram avaliadas quanto à contagem de fungos (\log_{10} / g) nos meios DRBC, DG18 e AFPA as quais apresentaram médias de 4,83, 3,55 e 2,28, respectivamente. No meio DRBC cerca de 21 das 35 amostras de alimento animal analisadas (60%) apresentaram contagem de fungos menor que 5 \log_{10} /g, valores que constituem boa qualidade microbiológica, 12 amostras (34,3%) apresentaram-se com contagens entre 5 e 7,5 \log_{10} /g. e 2 amostras (5,7%) apresentaram contagens superiores à 7,5 \log_{10} /g, podendo se dizer que estes últimos produtos são impróprios para o consumo animal, ou seja, nestes valores o alimento não deveria ser analisado quanto à presença de micotoxinas pois em tais condições o mesmo apresenta-se com suas propriedades organolépticas alteradas. Destas, 346 cepas foram isoladas e identificadas quanto ao gênero e espécie. Na ração foram isolados *Penicillium* (32,08%), *Aspergillus* (28,32%), *Fusarium* (27,45%) e, com um percentual inferior, os gêneros *Alternaria*, *Eurotium*, *Cladosporium*, *Taralomyces* e *Paecilomyces*. No farelo de soja, os principais gêneros correspondiam a *Aspergillus* (31,42%), *Penicillium* (14,28%), seguidos dos gêneros *Alternaria*, *Eurotium* e *Cladosporium*. No farelo de soja e trigo houve uma predominância de *Penicillium* (44,44%), *Fusarium* (33,33%) e *Aspergillus* (22,22%) e no caroço de algodão, *Aspergillus* (36,37%), *Penicillium* (27,27%), *Curvularia* (18,9%) e, com menor percentual, *Alternaria* e *Cladosporium*. Em relação às espécies aflatoxigênicas pesquisadas, houve maior predominância de cepas das espécies *A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. ochraceus*, *A. niger* e *A. niveus*.

Orientadora: Profa. Dra. Eliana Pinheiro de Carvalho – UFLA

2 Abstract

PEREIRA, Maria Marluca Gomes. Isolamento, identificação and determination of the toxigênica capacity of fungos in animal food. In: ___ Study of the presença of mycotoxin and B1 aflatoxin producing fungi in feed and M₁ aflatoxin in raw milk and after heat treatment. , 2003 p. 33-56 Thesis (Doctorate in Food Science) Federal University of Lavras, Lavras.

40 food samples analyzed destined to the animal consumption were analysed. These had been evaluated considering the counting of fungos (\log_{10}/g) in the DRBC, DG18, and AFPA media which presented average countings of 4,83, 3,55 and 2,28, respectively. In DRBC media about 21 of the 35 samples of the analyzed animal feed (60%) presented a counting of fungi lower than 5 \log_{10}/g , values that constitute a good microbiological quality, 12 samples (34,3%) presented countings from 5 to 7,5 \log_{10}/g and 2 samples (5,7%) presented countings above 7,5%, allowing to be concluded that this last products are not proper for animal consuming, that is to say, within these values the feed should not be analyzed considering the presence of fungal toxins because in such conditions its organoleptic properties are altered. Of these samples 346 were isolated and identified according to the sort and species. In the ration *Penicillium* (32,08%), *Aspergillus* (28,32%), *Fusarium* (27,45%) were isolated. With an inferior percentage, the sorts *Alternaria*, *Eurotium*, *Cladosporium*, *Taralomyces* and *Paecilomyces* were isolated. In the soy bran, the main sorts corresponded to the *Aspergillus* (31,42%), *Penicillium* (14,28%), followed by the sorts *Alternaria*, *Eurotium* and *Cladosporium*. In the bran of soy and wheat there was a predominance of *Penicillium* (44,44%), *Fusarium* (33,33%) and *Aspergillus* (22,22%) and in cotton seed, *Aspergillus* (36,37%), *Penicillium* (27,27%), *Curvularia* (18,9%) and with lower percentage,, *Alternaria* and *Cladosporium*. In relation to the searched aflatoxigenic species, there was a greater predominance of the species *A.flavus*, *A.parasiticus*, *A.ochraceus*, *A.niger* and *A.niveus*.

Adviser: Profa. Dra. Eliana Pinheiro de Carvalho – UFLA

3 Introdução

Os fungos têm sido evidenciados como microrganismos de grande importância para os alimentos. Estes têm sido responsáveis por perdas econômicas de relevância, o que representa uma série de prejuízos em todo o mundo.

Atualmente existe uma variedade de espécies de fungos conhecidos. Os fungos de maior importância em alimentos são os do gênero *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*.

Alguns fungos são capazes de produzir substâncias denominadas micotoxinas. Tais substâncias são responsáveis por transtornos tanto na saúde animal quanto para o homem. Em alguns países representam perdas de extrema significância, além de serem responsáveis por problemas relacionados à saúde pública.

O controle de fungos tem sido uma grande preocupação para os órgãos competentes. O crescimento do fungo, uma vez estabelecido, pode promover a síntese de micotoxinas, embora nem sempre a presença do fungo signifique presença da toxina ou vice-versa.

A aflatoxina pode ser produzida por três espécies de *Aspergillus*: *A. flavus*, *A. parasiticus* e *A. nomius*. O *A. flavus* produz apenas AFB₁ e AFB₂, enquanto as outras duas espécies produzem aflatoxina B e G (Creppy, 2002).

Alguns fatores como temperatura, umidade e substrato exercem importante papel no crescimento dos fungos e na síntese das micotoxinas. Condições adequadas de colheita e armazenamento são de extrema relevância no contexto geral do controle de micotoxinas.

As espécies de *A. parasiticus* e *A. flavus* necessitam de temperatura, umidade e atividade de água que favoreçam sua proliferação. A temperatura e a

atividade de água geralmente interagem estimulando a síntese de micotoxina. Para D'Mello & Macdonald (1997), o risco da presença de micotoxinas em alimentos é maior em produtos oriundos de trópicos úmidos.

Para Smith & Moss (1985) apud Martins & Martins (2001), nas matérias-primas ou numa ração de boa qualidade microbiológica não devem existir mais de 10^5 ufc de fungos/g. Com teores acima de $10^{7,5}$ ufc/g, estes alimentos cheiram a mofo, são organolepticamente anormais e sobretudo representam um perigo potencial para a saúde dos animais por poderem conter substâncias zootóxicas.

Em experimento realizado por Martins (1987) apud Martins & Martins (2001) foram encontrados teores médios da ordem dos $8,6 \times 10^4$ ufc/g em amostras de ração destinada ao consumo bovino. Nesse mesmo estudo, o autor cita ter ocorrido uma significativa variabilidade sazonal e que os teores mais elevados registraram-se sistematicamente nos meses do fim do inverno e primavera.

Em 189 amostras de rações bovinas analisadas por Martins & Martins (2001), o teor micológico encontrado foi de $5,8 \times 10^2$ a $1,7 \times 10^5$ ufc/g, com média de $6,6 \times 10^4$ ufc/g, e o bolor de maior prevalência foi o gênero *Aspergillus*.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a qualidade de amostras de alimento animal coletados diretamente em fazendas quanto à contagem total de fungos e ao isolamento e à determinação da capacidade toxígena.

4 Material e Métodos

4.1 Coleta das amostras

As amostras de alimento animal foram coletadas nas fazendas em quantidade correspondente a aproximadamente 1 kg. As amostras de ração, farelo de soja, farelo de soja e trigo e caroço de algodão eram coletadas diretamente em sacos de aproximadamente 60 kg ou em tambores de aço, através dos quais os animais eram alimentados no dia da coleta. A ração era homogeneizada diretamente no depósito, e só então era retirado a amostra.

Foi analisado um total 40 amostras de alimento animal, as quais corresponderam a um total de 35 amostras de ração (a base de milho), 3 de farelo de soja, 1 de farelo de soja e trigo e 1 de caroço de algodão.

4.2 Isolamento e contagem da microbiota

A contagem de unidades formadoras de colônias (ufc g⁻¹) de fungos filamentosos e leveduras foi realizada segundo metodologia de diluição decimal seriada descrita por Pitt & Hocking (1997), conforme a seguir:

Foram agitadas em liquidificador, com copo esterilizado, 50 gramas da amostra em 450 mL de água peptonada a 0,1%. A partir dessa diluição inicial (10⁻¹), prepararam-se diluições decimais seriadas até 10⁻⁵. Os inóculos foram alíquotas de 1mL por placa de Petri (em triplicata) de cada uma das diluições nos meios de cultivos, tais como: Dichloran Rose Bengal Cloranfenicol (DRBC), utilizado para contagem geral (King et al., 1979; Dichloran 18% Glicerol Agar (DG18), que é um meio seletivo para fungos xerofílicos (Hocking & Pitt, 1980); *Aspergillus flavus e parasiticus* Agar (AFPA), utilizado para o isolamento e a diferenciação de cepas aflatoxigenas (Bothast & Fennell, 1974), e

o meio de Nash-Snyder Agar (NSA) para isolamento de espécies do gênero *Fusarium* (Nelson et al., 1983).

As placas de DRBC, DG18, AFPA foram incubadas a 28 °C por sete dias em ausência de luz. As placas de NSA foram incubadas a 25 °C por 7 dias em fotoperíodos de 12 horas sob luz fria e 12 horas de luz negra. Todas as placas foram observadas diariamente, sendo selecionadas as que apresentaram (ufc) em torno de 10 a 100 (Dalcero et al., 1997; Dalcero et al., 1998).

As colônias fúngicas selecionadas para identificação foram isoladas e mantidas até a repicagem nos meios correspondentes e próprios a cada gênero/espécie, isto é, SDA (Sabouraud Dextrose Agar), BDA (Batata Dextrose Agar) ou MEA (Agar Extrato de Malte), onde se fez a prevalência dos gêneros e espécies.

Após contagem de unidades formadoras de colônia (ufc g⁻¹), as cepas de fungos isoladas foram identificadas segundo as chaves taxonômicas de Pitt & Klich (1988) para o gênero *Aspergillus*. As chaves taxonômicas de Pitt & Hocking (1997) também foram utilizadas e todas foram baseadas na semeadura em três meios básicos: Czapek Yeast Extract Agar (CYA); Malte Extract Agar (MEA) e 25% Glycerol Nitrate Agar (G25N).

A identificação e isolamento dos fungos foi realizada no Laboratório do Núcleo de Pesquisas Micológicas e Micotoxicológicas (NPMM/UFRRJ) do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

4.3 Capacidade toxicógena das cepas fúngicas isoladas

Os isolados fúngicos identificados foram analisados quanto à capacidade toxicógena por cultivo em Czapek Yeast Extract Agar (CYA), Agar Extrato de Levedura Sacarose (YES) e Agar Leite de Coco (CAM) e da aplicação do Agar

Plug Method descrito por Frisvad & Thrane (1995), modificado por Bragulat et al. (1998).

5 Resultados e Discussão

Os valores médios da contagem de fungos (\log_{10}/g) nos meios DRBC, DG18 e AFPA (Figura 1 e Tabela 1A) representam 4,83 com oscilações de 2,25 a 8,38; 3,55 com oscilações de 2 a 7,41 e 2,28 com oscilações de 1 a 5,58, respectivamente. As contaminações fúngicas estavam presentes em 100% das amostras. O meio DRBC restringe o espalhamento das colônias sem afetar excessivamente a germinação dos conídios. Já o meio DG18 é usado na enumeração de fungos em alimentos de baixa umidade, ou seja, favorece o crescimento de fungos xerofílicos. O meio AFPA é recomendado para a detecção e enumeração de fungos potencialmente aflatoxigênicos, como *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus* e *A. nomius*. Em um misto de alimento animal, Abarca et al. (1994) obtiveram valores em \log_{10}/g que variaram de 2 a 8. Em amostras de rações para bovinos, Martins (1987) apud Martins (2001) encontrou valores médios de 4,93 \log_{10}/g e Martins (2001) obteve valores médios da ordem de 4,82, oscilando entre 2,76 a 5,23 \log_{10}/g .

De acordo com o mesmo pesquisador, em matérias-primas ou numa ração de boa qualidade microbiológica o teor de fungos não deve ser maior que 5 \log_{10}/g e o desenvolvimento das populações fúngicas nos alimentos promove um estado de deterioração logo que estas alcançam teores totais da ordem de 7,5 \log_{10}/g . No experimento observou-se que, no meio DRBC cerca de 21 das 35 amostras de alimento animal analisadas (60%) apresentaram contagem de fungos menor que 5 \log_{10}/g valores, que segundo Smith & Moss (1985) apud Martins & Martins (2001) constituem boa qualidade microbiológica, 12 amostras (34,3%) apresentaram-se com contagens entre 5 e 7,5 \log_{10}/g . e 2 amostras (5,7%) apresentaram contagens superiores à 7,5 \log_{10}/g , podendo se dizer que estes últimos produtos são impróprios para o consumo animal, ou seja,

nestes valores o alimento não deveria ser analisado quanto à presença de micotoxinas pois em tais condições o mesmo apresenta-se com suas propriedades organolépticas alteradas.

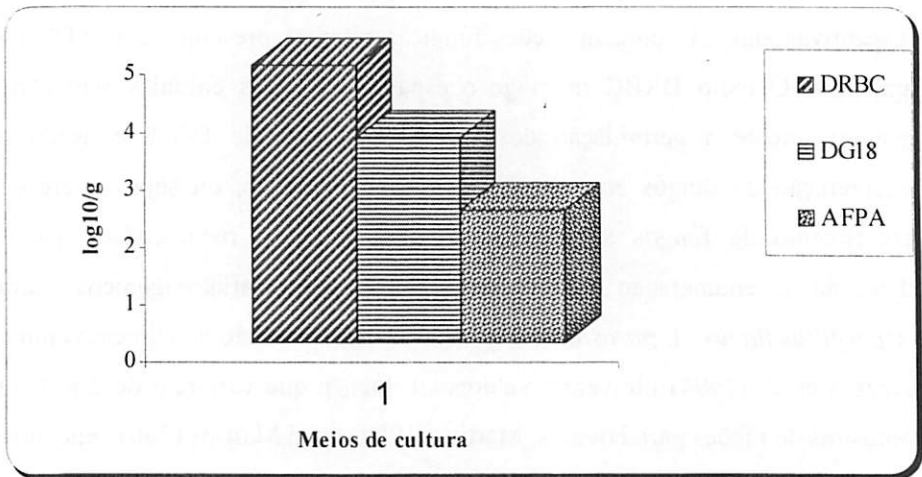


FIGURA 1 Valores médios da contagem de fungos em log₁₀/g em alimento animal na região de Lavras, Sul de Minas Gerais, obtido em três diferentes meios de cultivo

Na Figura 2 e Tabela 2A estão apresentados os gêneros fúngicos presentes na ração animal. De um total de 346 isolados, o gênero *Penicillium* correspondeu a 32,08%, o *Aspergillus* representou 28,32% e o *Fusarium*, 27,45%; com e em um percentual inferior estão os gêneros *Alternaria*, *Eurotium*, *Cladosporium*, *Talaromyces* e *Paecilomyces* (4,05; 3,47; 2,31; 1,15 e 1,15, respectivamente).

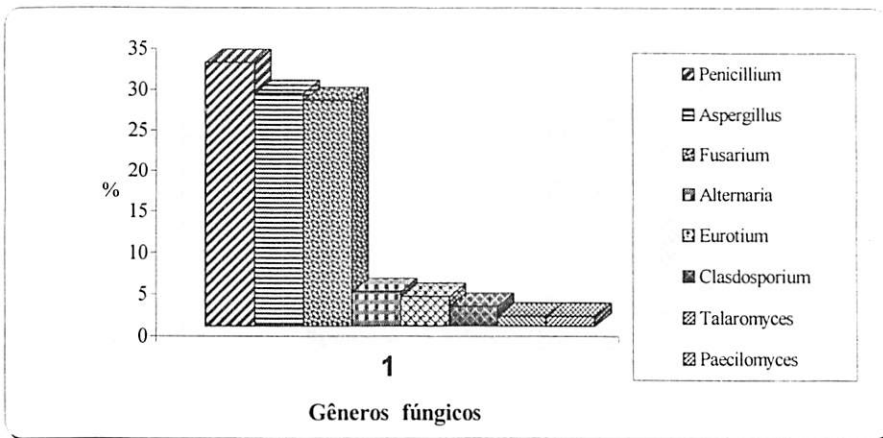


FIGURA 2 Gêneros fúngicos de maior prevalência em ração animal na região de Lavras, Sul de Minas Gerais

Os principais gêneros fúngicos isolados de farelo de soja (Figura 3, Tabela 3A) foram *Fusarium* (37,14%), *Aspergillus* (31,42%) e *Penicillium* (14,28%), seguidos pelos gêneros *Cladosporium*, *Eurotium* e *Alternaria*, representando 11,43 e 2,85%, respectivamente.

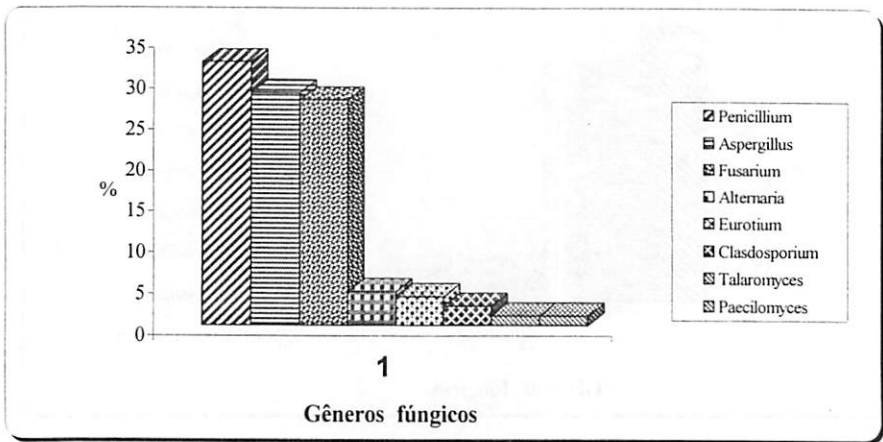


FIGURA 3 Gêneros fúngicos de maior prevalência em farelo de soja na região de Lavras, Sul de Minas Gerais

Os gêneros fúngicos isolados dos farelos de soja e trigo (Figura 4, Tabela 4A) foram *Penicillium* (44,44%), *Fusarium* (33,33%) e *Aspergillus* (22,22%). Já no caroço de algodão (Figura 5, Tabela 5A) constatou-se uma maior predominância dos gêneros *Aspergillus* (36,37%) e *Penicillium* (27,27), seguidos dos gêneros *Curvularia* (18,9%), *Alternaria* (9,1%) e *Cladosporium* (9,1%).

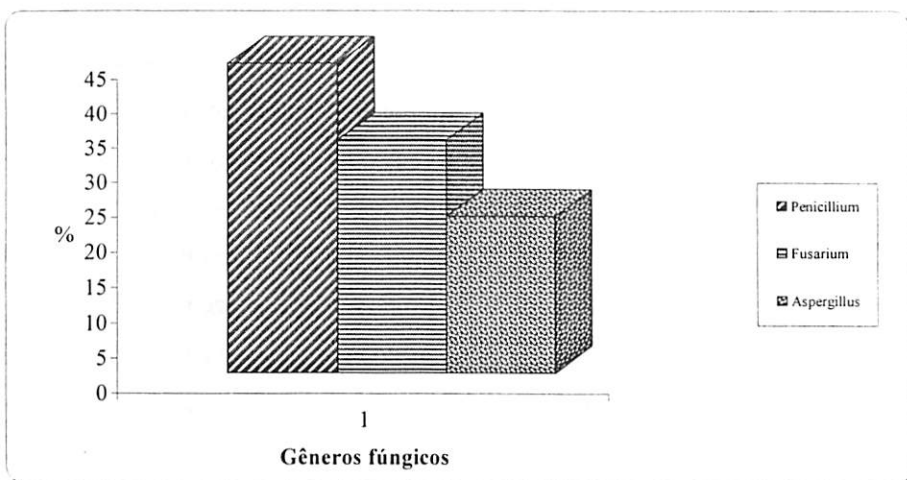


FIGURA 4 Gêneros fúngicos de maior prevalência em farelos de soja e trigo na região de Lavras, Sul de Minas Gerais

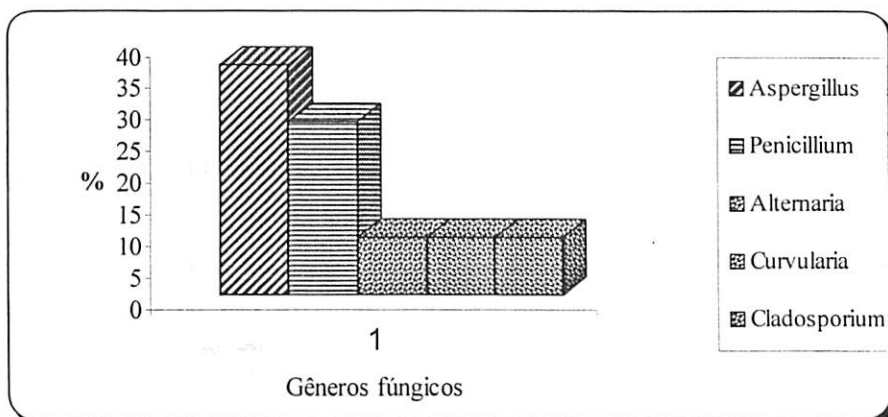


FIGURA 5 Gêneros fúngicos de maior prevalência em caroço de algodão na região de Lavras, Sul de Minas Gerais

Martins & Martins (2001) analisaram 189 amostras de ração bovina

durante um período de 4 anos e os gêneros predominantes foram *Aspergillus* (91,0%), *Penicillium* (58,0%), *Mucor* (52,3%), *Phoma* (31,6%), *Absidia* (30,3%) e *Fusarium* (20,0%). Os dados diferem em relação aos apresentados em nosso levantamento, em que se observou que os gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* apresentaram um percentual inferior aos obtidos por tais autores e, ainda, que os gêneros *Mucor*, *Phoma* e *Absidia* não foram isolados em nossas amostras, mas estão em conformidade com o fato de que os gêneros *Penicillium* e *Aspergillus* têm sido evidenciados como os de maior frequência na maioria das pesquisas, convém citar, que o meio utilizado em nosso experimento foi o Dicloran Rose Bengal Cloranfenicol e o meio usado por Marins & Martins (2001) o Rose Bengal Cloranfenicol.

De acordo com o ICMSF (1996), a microbiota fúngica natural que coexiste com a produção de alimentos é dominada pelos gêneros *Penicillium*, *Aspergillus* e *Fusarium*, o que está de acordo com os dados do presente estudo em que tais gêneros apresentaram-se com maior frequência nos produtos avaliados, excetuando-se o gênero *Fusarium*, que não foi isolado da amostra de caroço de algodão (Figura 5)

Em levantamento feito por Bullerman (1986) em alimentos como trigo, farinha de milho, soja e milho, as espécies potencialmente toxigênicas presentes foram *A. flavus*, *A. ochraceus*, *A. versicolor*, *Fusarium spp*, *P. citinum*, *P. citreo-viride*, *P. cyclopium*, *P. martensii*, *P. patulum*, *P. puberulum*, *P. viridicatum*, *P. expansum*, *P. islandicum*, *P. urticae*, *Alternaria spp* e *Cladosporium spp*. Em nosso levantamento, as espécies de *Aspergillus* isoladas da ração, farelo de soja, farelo de soja e trigo e caroço de algodão foram *A. flavus*, *A. niger*, *A. parasiticus*, *A. ochraceus* e *A. fumigatus*, *A.candidus*, *A. niveus* e *A. terreus*. As de maior frequência foram as espécies *A. flavus* e *A. niger*, as quais estiveram presentes nos quatro produtos analisados (Tabelas 2A, 3A, 4A e 5A). Resultados semelhantes foram encontrados por Abdel-Fattah et

al. (1982) em ração, segundo os quais houve maior incidência das espécies *A. flavus* e *A. niger*. Os dados apresentados por Bullerman (1986), não especificamente em ração, mas em seus ingredientes mostraram a presença de *A. flavus*, *A. ochraceus* e *A. versicolor*. Sanchis et al. (1986), em 228 amostras de alimentos testados, verificaram que em 100% das amostras a incidência de fungos foi variável; em amostras de milho, os mesmos autores verificaram uma maior frequência de *A. flavus* (54,5%). Em levantamento feito por Abarca et al. (1994), as espécies mais comuns encontradas em uma mistura de alimento animal foram: *A. flavus* (52,2%), *A. fumigatus* (40,%), *A. candidus* (23,2%), *Eurotium chevalieri* (23,2%) e *Fusarium moniliforme* (47,6%).

Em relação ao gênero *Penicillium*, observou-se que apenas a espécie *P. citrinum* esteve presente tanto nos isolados por Bullerman (1986) como nos isolados em nosso trabalho, sendo diferentes as demais espécies predominantes. As espécies de *Penicillium* de maior frequência foram *P. restrictum* e *P. crustosum*, das quais constatou-se presença nos quatro produtos analisados (Tabelas 2A, 3A, 4A e 5A).

O gênero *Fusarium* esteve presente na ração, farelo de soja e farelo de soja e trigo (Figuras 2, 3 e 4). As espécies predominantes nos três produtos foram *Fusarium* spp, *F. verticillioides* e *F. solani* (Tabelas 2A, 3A e 4A). Dutton & Kinsey (1995) constataram que o gênero *Fusarium* em ração foi o fungo dominante, representando um percentual maior que 70%. Em vários alimentos avaliados por Munimbazi & Bullerman (1996), a espécie de *F. moniliforme* foi dominante em cereais; e Abaraca et al. (1994) obtiveram um percentual de 47,6% do mesmo fungo em um misto de alimento animal.

Nas Tabelas 2, 3, 4 e 5 estão sumarizados os totais de isolados de *Aspergillus* produtoras de micotoxinas em ração, farelo de soja, farelo de soja e trigo e caroço de algodão.

Na ração foram isoladas 98 cepas de *Aspergillus*. Destas, 31 cepas eram

A. flavus, das quais 38,71% eram produtoras de AFB₁ e 32,26%, de AFB₂. O *A. niger* correspondeu a 22 isolados, em que 27,27% eram produtoras de ochratoxina A. De *A. parasiticus* obtivemos 19 isolados e ocorreu a produção de AFB₁, AFB₂, AFG₁ e AFG₂ em 84,21%, 73,68%, 84,21% e 52,63%, respectivamente. Dos 11 isolados de *A. ochraceus* (15), 46,67% eram produtores de Ochratoxina A. Dos isolados de *A. fumigatus*, um total de 11, nenhum era produtor de toxinas.

Nas amostras de farelo de soja foram isoladas 11 cepas de *Aspergillus*, das quais foram obtidas cepas de *A. flavus* (5), *A. niger* (2), *A. fumigatus*(1), *A. candidus* (1), *A. niveus* (1) e *A. terreus* (1). O *A. flavus* foi produtor de AFB₁ e AFB₂ em 40,0% dos isolados e o *A. niveus*, produtor de citrinina em 100,0%.

Os isolados presentes no farelo de soja e trigo (4) caracterizaram-se como *A. flavus* (1), *A. niger* (1), *A. parasiticus* (1) e *A. ochraceus* (1). A cepa de *A. parasiticus* era produtor de AFB₁ (1), AFB₂ (1), AFG₁ (1) e AFG₂ (1) e o *A. ochraceus*, produtor de Ochratoxina A (1).

No caroço de algodão foram isoladas 4 cepas pertencentes às espécies *A. flavus* (1), *A. niger* (1), *A. terreus* (1) e *A. fumigatus*(1), as quais não eram produtoras de toxinas.

Podemos observar que (Tabela 6) as espécies de *A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. ochraceus* e *A. niveus* apresentaram um percentual de isolados produtores de toxinas, enquanto as demais espécies eram não produtoras. Dos isolados de *A. flavus* avaliadas, observamos que 36,64% eram produtoras de AFB₁ e 31,57%, produtoras de AFB₂. Do *A. niger*, 23,08% das cepas isoladas eram produtoras de ochratoxina A. As espécies de *A. parasiticus* apresentaram um maior índice de isolados produtores de aflatoxinas e observamos que 85,0%, 75,0%, 85,0% e 55,0% eram produtoras de AFB₁, AFB₂, AFG₁ e AFG₂, respectivamente. Dos isolados de *A. ochraceus*, 50,0% eram produtoras de ochratoxina A; em *A. niveus* 100% dos isolados eram produtores de citrinina.

Um total de 269 isolados do gênero *Aspergillus* de amostras de produtos alimentícios foram analisadas quanto à capacidade toxigênica (Gelli et al., 1990). Os autores detectaram que apenas 2,79% destas eram positivas, um índice baixo quando comparados aos obtidos pelos demais autores. Sanchis et al. (1986), em amostras de milho, constataram que 17,2% dos isolados de *A. flavus* eram produtores de aflatoxina, e em um misto de alimentos animal, encontraram 9,7% de isolados aflatoxígenos. Cepas de *A. flavus* e *A. parasiticus* isoladas de um misto de alimento animal avaliadas, quanto à sua capacidade toxígena, apresentaram 13,5% de isolados positivos, sendo 4 deles pertencentes à espécie *A. flavus* e 1 isolado, a *A. parasiticus* (Abarca et al., 1994).

TABELA 2 Principais espécies de *Aspergillus* produtoras de metabólitos tóxicos isoladas de ração.

| Amostras | | Microrganismos | | Metabólitos tóxicos produzidos | |
|---------------------|----|---------------------|-------------|--------------------------------|----|
| Tipo | Nº | Espécie | Nº isolados | Tipo | Nº |
| Ração | 35 | <i>A. flavus</i> | 31 | AFB ₁ | 12 |
| | | | | AFB ₂ | 10 |
| | | <i>A. niger</i> | 22 | Ochrtoxina A | 6 |
| | | | | <i>A. parasiticus</i> | 19 |
| | | AFB ₂ | 14 | | |
| | | | | AFG ₁ | 16 |
| | | | | AFG ₂ | 10 |
| | | <i>A. ochraceus</i> | 15 | Ochrtoxina A | 7 |
| <i>A. fumigatus</i> | 11 | não detectado | 0 | | |

TABELA 3 Principais espécies de *Aspergillus* produtoras de metabólitos tóxicos isoladas de farelo de soja.

| Amostras | | Microrganismos | | Metabólitos tóxicos produzidos | |
|-------------------|----|---------------------|-------------|--------------------------------|----|
| Tipo | Nº | Espécie | Nº isolados | Tipo | Nº |
| F. de soja | 3 | <i>A. flavus</i> | 5 | AFB ₁ | 2 |
| | | | | AFB ₂ | 2 |
| | | <i>A. niger</i> | 2 | não detectado | 0 |
| | | <i>A. fumigatus</i> | 1 | não detectado | 0 |
| | | <i>A. candidus</i> | 1 | não detectado | 0 |
| | | <i>A. niveus</i> | 1 | Citrinina | 1 |
| <i>A. terreus</i> | 1 | não detectado | 0 | | |

TABELA 4 Principais espécies de *Aspergillus* produtoras de metabólitos tóxicos isoladas de farelo de soja e trigo.

| Amostras | | Microrganismos | | Metabólitos tóxicos produzidos | |
|---------------------|----|-----------------------|-------------|--------------------------------|----|
| Tipo | Nº | Espécie | Nº isolados | Tipo | Nº |
| F. soja/trigo | 1 | <i>A. flavus</i> | 1 | não detectado | 0 |
| | | <i>A. niger</i> | 1 | não detectado | 0 |
| | | <i>A. parasiticus</i> | 1 | AFB ₁ | 1 |
| | | | | AFB ₂ | 1 |
| | | | | AFG ₁ | 1 |
| | | | | AFG ₂ | 1 |
| <i>A. ochraceus</i> | 1 | Ocratoxina A | 1 | | |

TABELA 5 Principais espécies de *Aspergillus* produtoras de metabólitos tóxicos isoladas de caroço de algodão

| Amostras | | Microrganismos | | Metabólitos tóxicos produzidos | |
|-------------------|----|---------------------|-------------|--------------------------------|----|
| Tipo | Nº | Espécie | Nº isolados | Tipo | Nº |
| Caroço de Algodão | 1 | <i>A. flavus</i> | 1 | não detectado | 0 |
| | | <i>A. niger</i> | 1 | não detectado | 0 |
| | | <i>A. terreus</i> | 1 | não detectado | 0 |
| | | <i>A. fumigatus</i> | 1 | não detectado | 0 |

TABELA 6 Total de isolados de *Aspergillus* produtoras de metabólitos tóxicos e principais toxinas isoladas em alimento animal.

| Microrganismos | | | Isolados produtores toxina | |
|-----------------------|-------------|-------------------|----------------------------|-------|
| Espécie | Nº isolados | Metabólito tóxico | Nº | % |
| <i>A. flavus</i> | 38 | AFB ₁ | 14 | 36,84 |
| | | AFB ₂ | 12 | 31,57 |
| <i>A. niger</i> | 26 | Ochratoxina A | 6 | 23,08 |
| <i>A. parasiticus</i> | 20 | AFB ₁ | 17 | 85,0 |
| | | AFB ₂ | 15 | 75,0 |
| | | AFG ₁ | 17 | 85,0 |
| | | AFG ₂ | 11 | 55,0 |
| <i>A. ochraceus</i> | 16 | Ochratoxina A | 8 | 50,0 |
| <i>A. niveus</i> | 1 | Citrinina | 1 | 100,0 |

6 Conclusões

De acordo com os resultados obtidos neste trabalho, pode-se concluir que:

- A microbiota fúngica apresentou um valor médio da ordem de 4,83 (\log_{10}/g) no meio DRBC, 3,55 no meio DG18 e 2,28 no meio AFPA.
- Os gêneros fúngicos de maior prevalência na ração foram *Penicillium*, *Aspergillus* e *Fusarium* e, com um percentual menor, os gêneros *Alternaria*, *Eurotium*, *Cladosporium*, *Talaromyces* e *Paecilomyces*.
- No farelo de soja, os gêneros de maior frequência foram *Fusarium*, *Aspergillus* e *Penicillium*, seguidos pelos gêneros *Cladosporium*, *Eurotium* e *Alternaria*, com um percentual inferior.
- No misto de farelo de soja e trigo, os gêneros de maior predominância foram *Penicillium*, *Fusarium*, e *Aspergillus*.
- No caroço de algodão, como gêneros de maior predominância, tivemos *Aspergillus*, *Penicillium* e *Curvularia*, seguidos dos gêneros *Alternaria* e *Cladosporium*.
- As espécies de *Aspergillus* de maior frequência na ração, farelo de soja, farelo de soja e trigo e caroço de algodão foram *A. flavus* e *A. niger*.
- As espécies de *Penicillium* de maior predominância foram *P. restrictum* e *P. crustosum*, as quais estavam presente nos quatro produtos analisados.
- As espécies de *Fusarium* predominantes na ração, farelo de soja e farelo de soja e trigo foram *Fusarium* spp, *F. verticillioides* e *F. solani*.
- Das isolados de *A. flavus* avaliados, 36,64% eram produtoras de AFB₁ e 31,57%, produtoras de AFB₂.

- Do *A. niger*, 23,08% das cepas isoladas eram produtoras de ochratoxina A.
- Dos isolados de *A. parasiticus*, 85,0%, 75,0%, 85,0% e 55,0% eram produtoras de aflatoxinas AFB₁, AFB₂, AFG₁ e AFG₂, respectivamente.
- Das isolados de *A. ochraceus*, 50,0% eram produtoras de ochratoxina A.
- Na espécie de *A. niveus*, uma cepa isolada foi produtora de citrinina.
- Das 35 amostras de alimento animal analisadas 21 amostras (60%) apresentaram boa qualidade microbiológica e 2 amostras (5,7%) apresentaram-se impróprias para o consumo.

7 Referências Bibliográficas

ABARCA, M. L.; BRAGULAT, M. R.; CASTELLÁ, G.; CABAÑES, F. J. Mycoflora and aflatoxin-producing strains in animal mixed feeds. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 57, n. 3, p. 256-258, Mar. 1994.

ABDEL-FATTAH, H. M.; KAMEL, Y. Y.; MEGALLA, S. E.; HAFEZ, A. H. Aflatoxin and aflatoxicosis. I. Fungal flora of some food and animal feed with special references to aflatoxin-producing abilities. **Mycopathologia**, Dordrecht, v. 77, n. 3, p. 129-135, 1982.

BOTHAST, R. J.; FENNEL, D. I. A medium for rapid identification and enumeration of *Aspergillus flavus* and related organisms. **Mycologia**, Bronx, v. 66, n. 2, p.365-369, 1974.

BRAGULART, M. R.; ABARCA, M. L.; ACCENSI, F.; CABAÑES, J. L. New Screening method for ochratoxigenic molds in pure culture. **Revista Médica**, Madrid, v.6, n. 515, 1998.

BULLERMAN, L. B. Mycotoxins and food safety. **Food Technology**, v. 40, n.5, p. 59-66, May 1986.

CREPPY, E. E. Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe. **Toxicology Letters**, Amsterdam, v. 1/2, p. 1-10, Jan. 2002.

DALCERO, A.; MAGNOLI, C.; CHIACCHIERA, S.; PALACIO, G.; REYNOSO, M. M. Mycoflora and incidence of aflatoxin B1, zearalenone and deoxynivalenol in poultry feeds in Argentina. **Mycopathologia**, Dordrecht, v.137, n. 3, p179-184, 1997.

DALCERO, A.; MAGNOLI, C.; LUNA, M.; ANCASI, G.; REYNOSO, M. M.; CHIACCHIERA, S.; MIAZZO, R.; PALACIO, G. Mycoflora and naturally occurring mycotoxins in poultry feeds in Argentina. **Mycopathologia**, Dordrecht, v. 141, n. 1, p. 37-43, 1998.

D'MELLO, J. P. F.; MACDONALD, A. M. C. Mycotoxins. **Animal Feed Science Technology**, Amsterdam, v. 69, n. 1/3, p. 155-166, Nov. 1997.

DUTTON, M. F.; KINSEY, A. Occurrence of mycotoxins in cereal and animal feedstuffs in Natal, South Africa, 1994. **Mycopathologia**, Dordrecht, v. 131, p.31-36, 1995.

FRISVAD, J. C.; THRANE, U. Mycotoxins production by food-borne fungi. p.251-260. In: R.A. SANSON; HOEKSTRA, T.S ; FRISVAD, J.C.; FILTENBORG. Introduction to Food-Borne Fungi. 4 ed. **Centraalbureau voor Schimmelcultures**, Baarn: The Netherlands,1995

GELLI, D. S.; JAKABI, M.; PORTO, E. Isolamento de *Aspergillus* spp, aflatoxigênicos de produtos alimentícios- São Paulo, capital. **Revista do Instituto. Adolfo Lutz**, São Paulo, v.50, n. 1/2, p. 319-323, jan./fev. 1990.

HOCKING, A. D.; PITT, J. I. Dichloran-Glycerol media for enumeration xerophilic fungi from low moisture foods. **Applied Environmental Microbiology**, v.39, p. 488-492, Mar.1980.

ICMSF. INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS. **Microorganismos de los alimentos: Características de los patógenos microbiano**. Zaragoza: Acribia, p. 403-428, 1996.

KING, A. D.; HOCKING, A. D.; PITT, J. I. Dichloran-Rose bengal medium for enumeration and isolation of fungi from foods. **Applied Environmental Microbiology**, v. 37, n. 5, p. 959-964, May. 1979.

MARTINS, H. M.; MARTINS, M. L. Qualidade micológica de rações para bovinos (Portugal: 1996-1999). **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v. 96, n. 538, p. 85-88, 2001.

MUNIMBAZI, C ;BULLERMAN, L. B. Molds and mycotoxins in foods from Burundi. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 59, n. 8, p. 869-875, 1996.

NELSON, P. E.; TOUSSOUN , T. A ; MARASAS, W. F. O. **Fusarium species: An illustrated manual for identification**. University Park, PA. The Pennsylvania State University Press, 1983.

PITT, J. I.; HOCKING, A. D. **Fungi and Food Spoilage**. 2.ed. London: Blackie Academic and Professional, 1997. 593p.

PITT, J.Y.; KUCH, M.A. A laboratory guide to common Aspergillus species and their teleomorphs. **CDIRO**, Division of food research Sydney, Academic Press, Australia, 89p. 1988

SANCHIS, V.; SALA, N.; PALOMES, A.; SANTAMARINA, P.; BURDASPAL, P. A. Occurrence of aflatoxin and aflatoxigenic molds in foods and feed in Spain. **Journal Food Protection**. Des Moines, v. 49, n. 6, p. 445-448, Jun. 1986.

CAPÍTULO 3

PESQUISA DE AFLATOXINA EM ALIMENTO ANIMAL E AFLATOXINA M₁ EM LEITE

1 Resumo

PEREIRA, Maria Marlucia Gomes. Pesquisa de aflatoxina B₁ em alimento animal e aflatoxina M₁ em leite. In: ____ Estudo da presença de fungos produtores de micotoxinas e pesquisa de aflatoxinas em alimento animal e aflatoxina M₁ em leite, 2003 p.57-80 Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) Universidade Federal de Lavras, Lavras.

O presente trabalho teve como objetivo pesquisar a presença de aflatoxina B₁ em alimento animal e aflatoxina M₁ em amostras de leite cru e após pasteurização de 63 +/- 2°C por 30 minutos. As amostras de leite foram coletadas 24 horas após o consumo do alimento. Em 33 amostras de alimento animal analisadas (100%) não foi detectada presença de AFB₁. Nas amostras de leite em um teste piloto, onde 10 amostras foram analisadas, 9 amostras (90,0%) apresentaram presença de aflatoxina M₁ e as concentrações encontradas variaram de traços a 20 ng/L. Na segunda fase do experimento foram analisadas 36 amostras de leite cru e 34 amostras de leite após pasteurização. Dezenove amostras (52,77%) de leite cru e 13 amostras (38,23%) de leite pasteurizado apresentaram presença de aflatoxina e os níveis variaram de traços a 74,1 ng/L e traços a 58,9 ng/L, respectivamente. As concentrações de AFM₁ no leite cru e após pasteurização não diferiram entre si ($p > 0,05$). A não detecção de AFB₁ no alimento animal e presença de AFM₁ no leite pode ser explicado pela baixa concentração de AFB₁. As concentrações de AFM₁ detectadas nas amostras de leite estão de acordo com os padrões regulamentares em nossa legislação (Brasil, 2002).

Orientadora: Profa. Dra. Eliana Pinheiro de Carvalho – UFLA

2 Abstract

PEREIRA, Maria Marlucia Gomes. Research of B₁ aflatoxin in feed and M₁ aflatoxin in raw cow's milk. **In:___** Study of the presença of mycotoxins and aflatoxin producing fungi in feed and M₁ aflatoxin in raw milk, 2003 p.57-80 Thesis (Doctorate in Food Science) Federal University of Lavras, Lavras.

The present work aimed intended to research the presence of B₁ aflatoxin in feed and M₁ aflatoxin in raw milk samples and after pasteurization of 63+/- 2C for 30 minutes. The milk samples were collected 24 hours after feed consumption. In 33 samples of feed analyzed (100%) ,presence of AFB₁ was not detected. In the milk samples in a pilot test, where 10 samples were analyzed, 9 samples (90.0%) showed the presence of M₁ aflotoxin and the concentrations found ranged from traces to 20ng/L. In the second phase of the experiment 36 samples of raw milk and 34 samples of milk were analyzed after pasteurization. 19 samples (52.77%) of raw milk and 23 samples (38.23%) of milk with pasteuriation showed the presence of aflatoxin and the levels ranged from traces to 74.1 ng/L and traces to 58.9ng/L, respectively. The concentrations of AFM₁ in raw milk and after pasteurization did not differ between them ($p > 0.05$). The non-detection of AFB₁ in feed and the presence of AFM₁ in milk may be accounted for by the low concentration of AFB₁. The concentrations of AFM₁ detected in the samples of milk are in accordance to the regulation standards in our legislation. (Brasil, 2002).

Adviser: Profa. Dra. Eliana Pinheiro de Carvalho – UFLA

3 Introdução

A estimativa da produção de leite no Brasil referente ao ano de 2001 foi de 20.825 (em milhões de litros) e o consumo *per capita* em litros/hab, 127,14. O consumo de lácteos no Brasil é considerado muito abaixo do recomendado pela OMS - Organização Mundial de Saúde. O preconizado pelo órgão é de 175 litros de lácteos equivalente litros por habitante (Associação..., 2002; Consumo...,2002).

A qualidade do leite é de extrema importância. Além dos microrganismos, a detecção de substâncias tóxicas assume um papel fundamental no controle de qualidade do leite.

A produção de aflatoxinas pode ocorrer por 3 espécies de fungos: *A. flavus*, *A. parasiticus* e, o mais raro, *A. nomius*. O *A. flavus* produz apenas aflatoxina B, enquanto as outras duas espécies produzem tanto aflatoxina B quanto aflatoxina G. A aflatoxina B₁ é considerada o mais potente hepatocarcinogênico para mamíferos (Creppy, 2002).

O estudo sobre a presença de micotoxinas em leite apresenta relevante importância. A primeira pesquisa sobre micotoxinas teve início no ano de 1960. Dentre as micotoxinas, as aflatoxinas têm sido as mais pesquisadas em leite e seus derivados. A presença de aflatoxina em leite se deve à sua presença no alimento destinado ao consumo animal. Seu efeito crônico é o fator mais preocupante e neste ponto há um consenso .

As aflatoxinas são primariamente metabolizadas por um misto de funções oxidases (MFO) no fígado. Tais enzimas são responsáveis pelo metabolismo oxidativo de um grande número de xenobióticos (Biehl & Buck, 1987).

A absorção gastrointestinal é a primeira etapa de entrada das aflatoxinas M₁ na corrente sanguínea. Após a absorção gastrointestinal, estas são transportadas pelo sangue, podendo se ligar as suas células ou proteínas plasmáticas (Taveira & Mídio, 1999).

Para Galtier (1998), a biotransformação é uma etapa importante na disposição de uma micotoxina no organismo animal e as reações envolvidas no processo são consideradas como vias enzimáticas que formam compostos hidrossolúveis e de menor toxicidade.

Para Oliveira & Germano (1997), a imprecisão dos valores de conversão da AFB1 em AFM₁ reforça a importância da realização de análises rotineiras no leite e em seus derivados como fator imprescindível para o controle da ocorrência de AFM₁.

A taxa de conversão de AFB1 em ração animal para AFM₁ no leite está em torno de 0,3 a 6,2%. A ingestão diária de aflatoxina M₁ é determinada como sendo de 6,8 ng/pessoa/dia na Europa, 3,5 ng/pessoa/dia na América Latina, 12 ng/pessoa/dia no Extremo Oriente e 0,7 ng/pessoa/dia na África (Creppy, 2002).

Face à importância da detecção deste metabólito em alimento, esta pesquisa visa determinar a presença de aflatoxina B1 em alimento animal e aflatoxina M₁ em leite cru e após pasteurização.

4 Material e Métodos

4.1 Coleta das amostras de alimento animal

As amostras foram coletadas em fazendas da região sul de Minas Gerais, em quantidade correspondente a aproximadamente 1 kg. As amostras de ração (a base da ração era o milho), milho e farelo de soja eram coletadas diretamente em sacos de aproximadamente 60 kg ou em tambores de aço, através dos quais os animais eram alimentados no dia da coleta. A ração era homogeneizada diretamente no depósito e só então era retirado a amostra. As amostras de silagem e capim eram coletadas aleatoriamente no local de armazenamento.

Foram analisadas 33 amostras de alimento animal, as quais foram divididas em 18 amostras de ração, 2 de milho, 4 de farelo de soja, 6 de silagem e 3 de capim.

4.1.2 Determinação de aflatoxinas em amostras de alimento animal

4.1.2.1 Preparo e determinação das soluções padrões de aflatoxinas

Foram utilizados padrões de aflatoxinas B1, B2, G1 e G2 da Sigma Chemical Company, que foram dissolvidos em Benzeno:Acetonitrila (90:2). Durante o trabalho, ficaram acondicionados em frascos de vidro com tampas esmeriladas a -18 °C. A concentração das soluções padrões de aflatoxinas B1, B2, G1 e G2 foi determinada segundo o método descrito pela - Association..., (1998) e resumido a seguir:

Determinou-se o comprimento de onda máximo de cada solução padrão de aflatoxina, traçando-se o espectro na faixa de 280 a 400 nm. A partir do valor de absorvância (A) encontrado no comprimento de onda de máxima absorção, calculou-se a concentração de cada solução padrão de aflatoxina, a partir da seguinte equação: $\mu\text{g aflatoxina/mL} = A \times PM \times 1000 \times F / \epsilon$ em que:

F= Fator de calibração do espectrofotômetro;

PM= Peso molecular da aflatoxina;

A= Absorvância da solução padrão de aflatoxina, no comprimento de onda máximo;

ϵ = Absortividade molar da aflatoxina - 18.815 à 350 nm

4.1.2.2 Preparo da amostra

As amostras de silagem e capim foram previamente moídas e homogeneizadas em liquidificador de modo a obter partículas pequenas. As amostras de ração, milho e farelo de soja já estavam trituradas, então foram passadas em peneira de 20 mesh.

4.1.2.3 Extração das toxinas

Foram pesados 50 g das amostras, em duplicata, em Erlenmeyer de 500mL. Adicionaram-se 270 mL de metanol e 30 mL de KCl 4%. Em seguida o material foi agitado em shaker/agitador por 30 minutos e filtrado em papel de filtro comum e em papel de filtro Whatman nº 4 ou similar. Foram recolhidos 150 mL.

A metodologia utilizada foi a descrita por Soares & Rodrigues-Amaya (1989) e o limite de detecção é de 2 µg/kg.

4.1.2.4 Purificação do extrato

Transferiu-se a alíquota de 150 mL para um béquer de 600 mL, ao qual adicionaram-se 150 mL de sulfato de cobre a 10% (farelo de soja, silagem e capim) ou sulfato de amônio 30% (milho e ração) e 50 mL de celite para todas as amostras (medido em béquer de 50 mL). O material foi homogeneizado com a ajuda de um bastão de vidro. Em seguida, foi filtrado em papel Whatman nº 4 ou similar e foram recolhidos 150 mL em uma proveta de 250 mL.

4.1.2.5 Partição líquido-líquido

Transferiu-se a alíquota de 150 mL para um funil de separação de 500 mL com torneira de teflon e tampa de polietileno, contendo 150 mL de água destilada. Realizaram-se duas extrações com 10 mL de clorofórmio sob agitação vigorosa por 3 minutos. Após separação das camadas, foi recolhido os extratos em um béquer de 25 mL, do qual se retirou 6 mL.

4.1.2.6 Concentração e diluição

O extrato clorofórmico foi evaporado em banho-maria, sob atmosfera de nitrogênio, sendo posteriormente reabsorvido (100 a 500 μ L), conforme a amostra, com solução de benzeno: acetonitrila (98:2). Em seguida o extrato seco foi acondicionado em freezer.

4.1.2.7 Identificação e quantificação

O resíduo, após a adição da solução de benzeno:acetonitrila (98:2), foi agitado por 1 minuto em agitador de tubos. A placa de cromatografia utilizada foi de sílica gel 60G, cromatofolha de 20x20 cm, sem indicador fluorescente e de 0,25 mm de espessura. Foram aplicados então, na placa, 1, 3, 5, 7 e 10 μ L de cada solução padrão de aflatoxina: B1, B2, G1 e G2 e 3 e 5 μ L do extrato da amostra. A placa foi desenvolvida em tolueno: acetato de etila: clorofórmio: ácido fórmico 90%, na proporção de 70:50:50:20 v/v, em câmara saturada por 1 hora. Após o desenvolvimento da placa, deixou-se na capela por 5 minutos à temperatura ambiente, e em seguida na estufa a 105 °C por 5 minutos. A placa foi visualizada sob luz ultravioleta a 366 nm, utilizando-se, para isso, um cromatovisor. As aflatoxinas apresentam fluorescência azul e verde em Rf (fator de retenção) em torno de 0,4-0,5.

Cálculo: μ g/kg de amostra = $S \times Y \times V / X \times W$, onde:

S: μ L da solução padrão da toxina com intensidade de fluorescência igual à da

amostra;

Y: concentração da solução padrão de toxina em $\mu\text{g/mL}$;

V: volume da diluição de extrato final da amostra (μL);

W: peso em gramas da amostra contido no extrato final; se as quantidades não forem alteradas, é igual a 3,75 g;

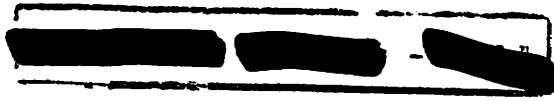
X: μL da solução da amostra com intensidade de fluorescência igual à da solução padrão (S);

4.2 Coleta das amostras de leite

Inicialmente foram coletadas amostras de leite cru, perfazendo um total de 10. Destas 10 amostras, fez-se a determinação de aflatoxina M_1 ; tais amostras foram utilizadas como piloto para verificar a viabilidade do experimento. A partir de então foram selecionados 12 produtores com média de produção em torno de 250 litros de leite diários. Destes, foram feitas coletas de amostras de ração e após 24 horas fez-se a coleta do leite. Dos 12 produtores selecionados, o trabalho permaneceu com apenas 2, os quais apresentavam valores significativos de Aflatoxina M_1 .

4.3 Tratamento das amostras de leite

As amostras de leite foram avaliadas quanto à quantidade de aflatoxina M_1 no leite cru e após tratamento térmico; todas as análises foram realizadas em duplicatas. O tratamento térmico do leite foi realizado de acordo com o que se segue: em torno de 400 mL de leite eram acondicionados em recipiente plástico, que então era disposto em banho-maria (DUBNOFF - TECNAL), e no qual fazia-se o controle da temperatura em painel e também através de um termômetro colocado diretamente na amostra de leite. A temperatura utilizada foi $63^\circ\text{C} \pm 2$ por 30 minutos. Após o tratamento térmico foram feitas as provas de fosfatase e peroxidase (Brasil, 1981).



4.4 Teste de recuperação de aflatoxina M₁ em leite cru

Uma amostra de leite com 7,66 ng/L foi contaminada com níveis de 40, 80 e 120 ng/L. O procedimento foi executado em duplicata para cada nível de contaminação.

A partir de uma solução padrão de aflatoxina M₁ 3,29 µg/mL em benzeno:acetonitrila (90:10), transferiram-se 150 µL para balão volumétrico de 25 mL, completando o volume com o mesmo solvente, obtendo-se uma solução com 19,74 ng/mL de aflatoxina M₁. Transferiram-se, então, 100 µL, 200 µL e 300 µL em duplicata para Erlenmeyers de 125 mL e adicionaram-se 50 mL de leite previamente aquecido a 37 °C, centrifugado a 3578 g por 15 min. e filtrado em papel Watman nº 4. As amostras foram mantidas em shaker por 30 minutos.

A metodologia utilizada foi a descrita por Tuinstra et al. (1993), através da qual foram utilizadas colunas de imunoafinidade para extração e CLAE (Cromatografia líquida de alta eficiência) para determinação da aflatoxina M₁.

4.5 Determinação de aflatoxina M₁ em leite

4.5.1 Preparo da solução padrão de aflatoxina M₁

Foi utilizado padrão da Sigma Chemical Company dissolvido em benzeno:acetonitrila (90:10) para obter uma concentração de aflatoxina M₁ em torno de 10 µg/mL (AOAC, 1998).

Determinou-se, a seguir, a absorvância próxima a 350 nm (pico máximo) e calculou-se a concentração exata da aflatoxina M₁ na solução usando a seguinte equação:

$\mu\text{g aflatoxina } M_1/\text{mL} = A \times PM \times F \times 1000 / \epsilon$ onde:

A= Absorvância medida no pico máximo (próximo de 350 nm);

PM= Peso molecular da aflatoxina M₁ = 328;

F= Fator de correção do Espectofotômetro;

ϵ = Absortividade molar da aflatoxina M_1 em benzeno:acetonitrila (90:10): 18.815.

Essa solução foi armazenada em freezer (aproximadamente -18°C). A concentração da aflatoxina M_1 na solução foi verificada de 6 em 6 meses.

4.5.2 Preparo das soluções padrão de aflatoxina M_1

Inicialmente preparou-se uma solução intermediária (SI) de aproximadamente $0,10 \mu\text{g/L}$ em clorofórmio PA. Essa solução foi obtida transferindo-se um volume conhecido da solução padrão de aflatoxina M_1 (4.5.1) para um balão volumétrico âmbar de 5 mL. Após concentração em nitrogênio, diluiu-se rapidamente com clorofórmio grau

Em seguida, preparou-se uma solução de trabalho (ST) transferindo-se $250 \mu\text{L}$ da solução intermediária (SI) para um balão volumétrico âmbar de 5 mL. Após concentração em nitrogênio até secura, ressuspendeu-se imediatamente na fase móvel de injeção água:acetonitrila grau CLAE (70:30), previamente filtrada em membrana de celulose regenerada de $0,45 \mu\text{m}$. Após agitação por 1 minuto em ultra-som, foram realizadas diluições sucessivas da ST de $2,5 \text{ mL}$ em $5,0 \text{ mL}$ (e outros volumes) com a fase móvel de injeção para obter concentração de aflatoxina M_1 na faixa próxima de $0,15$ a $3,0 \text{ ng/mL}$. Seguiu-se agitação em agitador de tubos ou ultrasom.

4.5.3 Purificação das amostras de leite em coluna de imunoafinidade

As amostras foram aquecidas em banho-maria até atingir $37^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$.

Após o aquecimento, centrifugaram-se 100 mL de cada amostra a 3578 g por 15 min .

Filtrou-se a amostra em papel de filtro Whatman nº 4; As colunas de imunoafinidade Afla- M_1 marca Vicam, foram mantidas de $2-8^\circ\text{C}$ (não deixar congelar);

As colunas foram mantidas à temperatura ambiente na hora do uso;

Alguns cuidados foram tomados antes do uso das colunas, tais como não deixar as colunas secarem, isto é, o tampão deve estar acima do gel; e observar se a ponta inferior da coluna está obstruída convenientemente com uma tampa clara;

Adaptou-se uma rolha furada no centro a um kitazato, o qual foi conectado a uma bomba de vácuo. Em seguida, adaptou-se a coluna de imunoafinidade à rolha;

Retirou-se a tampa branca da coluna, e com auxílio de tesoura, fez-se um pequeno furo no centro ou então utilizou-se uma agulha (15x15), adaptando-a na tampa da coluna e, em seguida,, a uma seringa de vidro de 20 mL;

Pipetou-se 50 mL da amostra (pipeta volumétrica ou proveta) para uma proveta ou Erlenmeyer;

Transferiram-se inicialmente ± 10 mL de leite para a seringa e, constatando antes se não havia algum vazamento, desconectou-se a tampa clara da parte inferior da coluna para iniciar a eluição (não foi preciso fazer vácuo);

Após a eluição de toda a amostra (não se deixou secar), a coluna foi lavada com 10 mL de água ultrapura (MILIQ, USA) colocando aos poucos ± 2 mL;

Esgotou-se por completo toda a água. Para isso utilizou-se vácuo;

A coluna foi desconectada do sistema de vácuo e da rolha. Fechou-se a coluna utilizando a tampa clara;

Foi conectada outra seringa à coluna e prendeu-se este sistema, com uma garra, a um suporte;

Um frasco âmbar de 5 mL foi colocado na ponta da coluna para receber o eluato;

Adicionaram-se 4 mL de acetonitrila CLAE na seringa, deixando de 6-7 minutos a acetonitrila em contato com a coluna (para isso, pressionou-se o êmbolo até que a acetonitrila preenchesse a coluna pela metade);

Recolheu-se o eluato por gravidade no frasco âmbar de 5 mL;

Evaporou-se o eluato da amostra com aquecimento (50 °C) em banho-maria e nitrogênio até secar completamente;

Após a secagem, a amostra foi ressuspendida imediatamente em 200 µL da fase móvel de injeção (água:acetonitrila 70:30). Agitou-se em seguida em agitador de tubos e filtrou-se em membrana de celulose regenerada de 13 mm de diâmetro e 0,45 µm de poro para um pequeno frasco ambar com auxílio de uma seringa de insulina tipo longa.

4.5.4 Condições cromatográficas

A separação e quantificação da AFM₁ foram conduzidas em um sistema de cromatografia Shimadzu com detector de fluorescência (excitação: 366 nm e emissão 428 nm), coluna de fase reversa C18 (250x4,6 mm) com partículas de 5 µm, guarda coluna C18 (25x4,6 mm), loop de 20 µL, fluxo 1,0 mL/minuto, fase móvel: água: isopropanol:acetonitrila (80:12:8), filtrada em membrana de 0,45 µm a vácuo, com detector de fluorescência: excitação 366 nm, emissão 428 nm. O tempo de retenção nessas condições foi de aproximadamente 10 minutos.

4.5.5 Préparo da curva de calibração da aflatoxina M₁

Preparou-se a curva de calibração injetando 20 µL das soluções padrões de aflatoxina M₁ (descrito no item 4.5.2) com concentrações na faixa de 0,15 a 0,30 ng/mL, nas condições cromatográficas descritas em 4.5.4.

Construiu-se o gráfico área versus massa de aflatoxina M₁ injetada e verificou-se a linearidade da curva de calibração, onde $r^2 \geq 0,99$.

4.5.6 Determinação da aflatoxina M₁ no extrato da amostra

Injetou-se alíquotas de 20 µL do extrato da amostra purificado (4.5.3) usando as mesmas condições cromatográficas utilizadas na elaboração da curva de calibração (4.5.5).

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

4.5.7 Cálculo

A partir da curva de calibração, calculou-se a massa de aflatoxina M₁ pela equação da reta através de regressão linear do Programa Excel-E.

$$\text{ng de aflatoxina } M_1/L = A \times V / M,$$

onde,

A: Quantidade de aflatoxina M₁ determinada pela equação da reta;

V: Volume do extrato final da amostra em µL (1000 µL);

M: Volume do leite líquido utilizado (50 mL).

4.6 Análises estatísticas

A análise estatística para as variáveis estudadas foi realizada através de teste não paramétrico. O teste utilizado foi o Teste de Wilcoxon - Mann-Whitney, o qual foi realizado através de "aproximação normal" (Campos, 1983).

5 Resultados e Discussão

As amostras de alimento animal representaram um total de 30 amostras, as quais foram divididas em 18 amostras de ração, 2 de milho, 4 de farelo de soja, 6 de silagem e 3 de capim. Em 100% das amostras analisadas não foi detectada presença de aflatoxina. Como as amostras de ração eram coletadas 24 horas antes da coleta do leite e verificou-se a presença de aflatoxina no leite e não na ração, tal amostra foi encaminhada aos laboratórios de Micologia e Micotoxinas da FUNED-MG e da UFRRJ-RJ para confirmação dos resultados encontrados no laboratório da UFLA-MG; nos três laboratórios não foi encontrado presença de aflatoxina na ração.

Para Trucksess et al. (1983), vacas em lactação mediante o consumo de ração com 300.000 µg de AFB1 em 1 dia, a quantidade excretada de AFM₁ foi de 100 µg/L, o que corresponde uma taxa de 0,03%. Entretanto, Creppy (2002) cita que a taxa de conversão de AFB1 da ração animal para AFM₁ no leite está em torno de 0,3 a 6,2%.

Em levantamento realizado por Sabino et al. (1988), em produtos alimentícios e rações animais 93,22% (974 amostras) não apresentaram fluorescência no cromatograma, sendo que as rações animais correspondiam a 276 amostras, em 89,61% das quais não foi detectada aflatoxina.

Entre as várias pesquisas de AFB1 em alimentos destinados ao consumo animal no Brasil, observa-se uma grande variedade dos dados, ou seja, valores de 0 até 7400 ppb, o que demonstra a necessidade de uma vigilância constante para garantir a qualidade do alimento (Salay & Marcadante, 2002).

Para Scussel et al. (1984), a confiabilidade dos resultados analíticos na determinação de micotoxinas é preocupante, tendo em vista vários fatores, como a distribuição não uniforme das micotoxinas nos alimentos e rações animais, as

baixas concentrações, em que os níveis encontrados estão em (g/kg, e ainda a presença de interferentes.

A quantidade da aflatoxina presente na ração pode não ser detectada pelo método utilizado, mesmo quando da sua presença no leite em forma de AFM₁. O maior índice encontrado neste experimento para AFM₁ foi 74,1 ng/L (Tabela 6A). Comparando-o com o descrito por Trucksess et al. (1983), o nível de aflatoxina B1 ingerido foi estimado em 0,25 µg/dia, o que representam um índice muito baixo, além de não poder ser detectado pelo método de Soares e Amaya (1988), o qual foi empregado.

Um outro fator importante é a amostragem, hoje considerado um ponto de extrema importância, que sugere que para um melhor controle de qualidade da ração a coleta seja feita diretamente nas fábricas, o que permite uma coleta em um universo maior e, assim, a obtenção de uma amostra mais homogênea, o que permitiria uma maior segurança dos dados, com efetiva diminuição do erro analítico.

Os resultados de recuperação e coeficiente de variação obtidos de leite cru com quantidade de aflatoxina M₁ padronizado estão apresentados na Tabela 7.

Os valores de recuperação encontrados apresentaram um percentual de 95,37%, 82,05% e 87,84%; na validação de métodos, a recuperação deve ser de no mínimo 70%, o que demonstrou que a recuperação esteve dentro dos padrões esperados. Os valores de recuperação encontrados por Prado et al. (1999) variaram de 88,9% a 104,9% e as médias de recuperação encontradas por Souza (1997) em três métodos estudados estavam entre 60,0 e 127,4%, em que 58,0% destes valores estavam acima de 90,0%; 32,0% entre 71,0 e 90,0% e apenas 10,0% apresentaram-se com valores menores ou iguais a 70%; os valores obtidos neste trabalho foram superiores ao mínimo estabelecido e aceitável.

TABELA 7 Recuperação média e coeficiente de variação de aflatoxina M₁ em amostra de leite cru após determinação da quantidade de aflatoxina presente na amostra e adição de aflatoxina.

| FM ₁ adicionada | ng/L AFM ₁ encontrada | ng/L Média | Desvio padrão | Recuperação | Coeficiente de variação |
|-------------------------------|--|---------------|---------------|-------------|----------------------------|
| Branco | 7,66 | 7,66 | 0,0 | - | 0,0 |
| Branco | 7,66 | 7,66 | 0,0 | - | 0,0 |
| 40,0 | 31,80 | | | | |
| 40,0 | 42,48 | 37,18 | 7,49 | 95,37 | 20,0 |
| 80,0 | 64,13 | | | | |
| 80,0 | 64,62 | 64,37 | 0,35 | 82,05 | 0,5 |
| 120,0 | 92,18 | | | | |
| 120,0 | 118,43 | 105,30 | 18,56 | 87,84 | 17,7 |

Na Tabela 8 estão expressos os resultados de AFM₁ em 10 amostras de leite cru. Do total de amostras analisadas, 100% estavam dentro dos padrões estabelecidos pela legislação (500 ng/L) (Brasil, 2002), sendo que quatro amostras apresentaram valores abaixo dos níveis de detecção; em uma amostra não foi detectada aflatoxina e em 05 amostras foram encontrados valores que variaram de 7 a 20 ng/L. Os valores encontrados por Bento et al. (1989) em leite pasteurizado estavam entre 100 a 400 ng/L e os detectados por Prado et al. (1994) em 4,55% das amostras de leite cru e leite em pó apresentaram-se entre 38-79 ng/L. Valores superiores foram encontrados por Souza et al. (1997), os quais variaram de 650-1300 ng/L em 2% das amostras de leite analisadas; Prado et al. (1999), em leite pasteurizado, detectaram, em 83% das amostras, uma faixa de 8-77 ng/L. Os padrões preconizados pela União Européia para leite "in natura" e seus derivados são de 0,05 ng/L. No entanto, cada país tem determinado seu próprio padrão e a Romênia apresenta um dos mais baixos, 0 ppb. Os resultados demonstram a necessidade de um efetivo monitoramento no controle de aflatoxinas no leite, pois os dados são bastante variados. Para Galvano et al. (1996), programas de monitoramento de aflatoxinas M₁ em leite e

seus derivados, principalmente nos países de clima tropical e subtropical, são de extrema importância.

TABELA 8 Valores médios de aflatoxina AFM₁ em 10 amostras de leite cru da região de Lavras, Sul de Minas Gerais

| Amostras | ng/L | Amostras | ng/L |
|----------|--------|----------|--------|
| 1 | Traços | 6 | traços |
| 2 | 20,0 | 7 | 11,0 |
| 3 | 7,0 | 8 | 12,0 |
| 4 | Traços | 9 | 8,0 |
| 5 | Traços | 10 | nd |

nd:não detectado; lq-limite de quantificação: 6ng/L; traços < lq

Nas Tabelas 9 e 10 estão expressos os valores médios de aflatoxina M₁ em leite cru e leite com tratamento térmico, respectivamente. Após o tratamento térmico observou-se uma redução de 15,60% da AFM₁, considerando as amostras em que foi detectada presença da aflatoxina em quantidade \geq ao limite de quantificação; no entanto, não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre os tratamentos (Tabela 6A).

No leite cru obtivemos 19 amostras (52,77%) com presença de aflatoxina M₁, com os valores variando de traços a 74,1 ng/L; em 17 amostras (47,22%) não foi detectada aflatoxina. No leite pasteurizado a presença de aflatoxina foi detectada em 13 amostras (38,23%) e os seus valores variaram de traços a 58,9 ng/L; e em 21 amostras (61,76%) não foi detectada aflatoxina. Os valores obtidos estão dentro dos padrões estabelecidos pela legislação (Brasil, 2002).

A estabilidade da aflatoxina no leite tem sido pesquisada e os resultados apresentam discordância entre os vários pesquisadores.

Stoloff et al. (1975) e Egmond (1983) não observaram redução da AFM₁ após pasteurização do leite. O primeiro autor trabalhou com leite artificialmente contaminado (62°C/30 minutos) e o segundo, com leite naturalmente contaminado. Já nos valores encontrados por Purchase et al. (1972) estes observaram uma redução de 32% AFM₁ mediante uma temperatura de 62°C /30 minutos e observou-se que a redução foi proporcional ao aumento da temperatura, mesmo quando ocorreu a redução do tempo de exposição ao tratamento.

No leite após a pasteurização, a taxa de redução encontrada por Kiermeier & Buchner (1977) foi de 6 a 13%. Resultado similar foi observado por Bakirci (2001), que constatou uma redução de 5 a 17%, com uma média de 7,62%, não havendo, no entanto, diferença significativa entre os tratamentos; tais valores são próximos ou similares aos encontrados neste experimento.

TABELA 9 Valores médios de aflatoxina AFM₁ em amostras de leite cru da região de Lavras, Sul de Minas Gerais

| Amostras | AFM ₁ ng/L | Amostras | AFM ₁ ng/L | Amostras | AFM ₁ ng/L | Amostras | AFM ₁ ng/L |
|----------|--------------------------|----------|--------------------------|----------|--------------------------|----------|--------------------------|
| 1 | traços | 10 | 6,2 | 19 | nd | 28 | traços |
| 2 | traços | 11 | nd | 20 | 6,8 | 29 | 8,3 |
| 3 | nd | 12 | nd | 21 | nd | 30 | nd |
| 4 | 35,0 | 13 | 65,0 | 22 | nd | 31 | 27,2 |
| 5 | 22,4 | 14 | 74,1 | 23 | nd | 32 | 28,4 |
| 6 | nd | 15 | 45,9 | 24 | nd | 33 | 26,8 |
| 7 | nd | 16 | nd | 25 | nd | 34 | 48,5 |
| 8 | nd | 17 | traços | 26 | nd | 35 | 26,5 |
| 9 | nd | 18 | nd | 27 | traços | 36 | 26,5 |

nd:não detectado; lq-limite de quantificação: 6ng/L; traços < lq

TABELA 10 Valores médios de aflatoxina AFM₁ em amostras de leite pasteurizado da região de Lavras, Sul de Minas Gerais

| Amostras | AFM ₁ ng/L | Amostras | AFM ₁ ng/L | Amostras | AFM ₁ ng/L | Amostras | AFM ₁ ng/L |
|----------|--------------------------|----------|--------------------------|----------|--------------------------|----------|--------------------------|
| 1 | nd | 10 | traços | 19 | traços | 28 | nd |
| 2 | nd | 11 | nd | 20 | traços | 29 | 7,1 |
| 3 | nd | 12 | nd | 21 | nd | 30 | nd |
| 4 | 36,9 | 13 | 58,9 | 22 | nd | 31 | 18,8 |
| 5 | 23,8 | 14 | 57,6 | 23 | nd | 32 | 24,6 |
| 6 | nd | 15 | 44,6 | 24 | nd | 33 | - |
| 7 | nd | 16 | nd | 25 | nd | 34 | - |
| 8 | nd | 17 | nd | 26 | nd | 35 | 16,1 |
| 9 | nd | 18 | nd | 27 | nd | 36 | 25,9 |

nd:não detectado; lq-limite de quantificação: 6ng/L; traços < lq

6 Conclusões

De acordo com os resultados obtidos neste trabalho, pode-se concluir que:

- Nas amostras de alimento animal analisadas não foi detectada a presença de aflatoxina B1.
- No teste piloto, a presença de aflatoxina M₁ foi constatada em 90% das amostras de leite; no entanto, todas estavam dentro dos padrões estabelecidos pela legislação brasileira.
- Na segunda fase do experimento, a presença de aflatoxina M₁ foi constatada em 52,77% das amostras de leite e todas encontravam-se dentro dos padrões preconizados pela legislação brasileira.
- As concentrações de aflatoxina nos leite cru e pasteurizado não diferiram entre si.
- O método utilizado para detecção de aflatoxinas em ração apresentou um limite de detecção superior à concentração mínima necessária à bioconversão para AFM₁.

7 Referências Bibliográficas

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. Official methods of analysis. 15 ed. Arlington, Virginia, v. 2, cap. 49, p. 49-53, 1998.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS PRODUTORES DE LEITE. Produção, importação e consumo de leite no Brasil. Disponível em:
<http://www.leitebrasil.org.br/estatisticas_03.htm> Acesso em: 27 out. 2002.

BAKIRCI, I. A study on the occurrence of aflatoxin M₁ in milk and milk products produced in Van province of Turkey. **Food Control**, Oxford, v. 12, n. 1, p. 47-51, Jan. 2001.

BENTO, H.; FERNANDES, A.M.; BARBOSA, M. Pesquisa de aflatoxina M₁ em leite corrente pasteurizado e em leite em pó. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, Lisboa, v. 84, p. 163-171, 1989.

BIEHL, M.L.; BUCK, W. B. Chemical contaminants: their metabolism and their residues. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.50, n.12, p. 1058-73, Dec. 1987.

BRASIL. Ministério da Saúde Resolução- RDC nº 274, de 2002. Agência Nacional de Vigilância Sanitária-ANVS.Regulamento técnico MERCOSUL sobre limites máximos de aflatoxinas admissíveis no leite, no amendoim, no milho. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 16 Out. 2002

BRASIL. Ministério da Agricultura. **Métodos analíticos oficiais para o controle de produtos de origem animal e seus ingredientes: Métodos físico-químicos.** Brasília: LANARA, 1981. v.2

CAMPOS, H. de. Testes de posição aplicáveis a duas amostras independentes. In: **___ Estatística experimental não paramétrica..** 4 ed. Piracicaba: ESALQ, 1983, p. 113-139.

CONSUMO de lácteos no Brasil. Disponível em:
<<http://www.fnp.com.br/foldia2/pecuaria/leiteb/200802.pdf>>. Acesso em: 27 out. 2002.

CREPPY, E. E. Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe. **Toxicology Letters**, Amsterdam, v. 000, n.1/2, p.1-10, Jan. 2002.

EGMOND, H. P. Van. Mycotoxins in dairy products. **Food Chemistry**, Barking, v. 11, p. 289-307, 1983.

GALTIER, P. Biological fate of mycotoxins animals. **Revue de Medicine Veterinaire**, Toulouse, v. 149, n. 6, p. 549-554, June 1998.

GALVANO, F., GALOFARO, V., GALVANO, G. Occurrence and stability M₁ in milk and milk products: A worldwide Review. **Journa of Food Protection**, Des Moines, v. 59, n. 10, p. 1079-1090, Oct. 1996.

KIEREMIER, F.; BUCHNER, M. Distribution of aflatoxin M₁ in whey and curd during cheese processing. **Zeitschrift fuer Lebensmittel-Untersuchung und Forschung**, Freising, v. 164, n. 2, p.82-86, 1977.

OLIVEIRA, C. A F. de.; GERMANO, P. M. L. Aflatoxina M₁ em leite e derivados: ocorrência no Brasil e aspectos relativos à legislação. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 11, n. 48, p. 22-25, Mar./Abr. 1997.

PRADO, G.; NICÁCIO, M. A. S.; LARA, M. A. Incidência de aflatoxina M₁ em leite cru e em pó no Estado de Minas Gerais. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 8, n. 38, p. 34-36, nov./ dez. 1994.

PRADO, G.; OLIVEIRA, M. S.; ABRANTES, F. M.; SANTOS, L. G.; SOARES, C. R.; VELOSO, T. Ocorrência de aflatoxina M₁ em leite consumido na cidade de Belo Horizonte- Minas Gerais/Brasil- agosto/98 à abril/99. **Ciências e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.19, n.3, p. 420-423, Set/Dez. 1999.

PURCHASE, I. F. H. STEYN, M.; RINSMA, R.; TUSTIN, R. C. Reduction of aflatoxin M content of milk by processing. **Food and Cosmetics Toxicology**, Oxford, v. 10, n. 3, p.383-387, 1972.

SABINO, M.; LAMARDO, L. C. A.; INOMATA, E. I.; ICHIKAWA, A.; GIANNATTASIO, C. M. P. Ocorrência de aflatoxina B₁ em produtos alimentícios e rações animais, consumidos no Estado de São Paulo e em várias outras regiões do Brasil, no período de 1980 a 1987. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 48, n. 1/2, p. 81-85, Jan./Jun. 1988.

SALAY, E.; MERCADANTE, Z. M. Mycotoxins in Brazilian corn for animal feed: occurrence and incentives for private sector to control the level of contamination. **Food Control**, Oxford, v. 13, n. 2, p. 87-92, Mar. 2002.

SCUSSEL, V. M.; RODRIGUES-AMAYA, D. B. Avaliação comparativa de métodos analíticos para a triagem e quantificação de aflatoxinas. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciências e Tecnologia dos Alimentos**, Campinas, v. 18, n. 3, p. 206-216, 1984.

SOARES, L.M.V.; RODRIGUES-AMAYA, D.B. Survey of aflatoxins, ochratoxin A, zearalenone and sterigmatocystin in some brasilian foods by using multitoxin thin-layer chromatographic method. **Journal of the Association of Official Analytical Chemistry**., Washington, v. 72, n. 1, p. 22-26, Jan./Feb. 1989.

SOUZA, S. V. C. **Aflatoxina M₁ em leite: metodologia e ocorrência no Estado de Minas Gerais**. Belo Horizonte, 1997. 85p. Dissertação (mestrado) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizinte.

STOLOFF, L.; TRUCSESS, M., HARDIN, N., FRANCIS, O. J., HAYES, J.R., POLAN, C. E., CAMPBELL, T. C. Stability of aflatoxin M₁ in milk. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 58, n. 12, p. 1789-1793, Dec. 1975.

TAVEIRA, J. de A.; MÍDIO, A. F. Aflatoxina M₁- A micotoxina do leite. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciências e Tecnologia dos Alimentos**, Campinas, v.33, n. 1, p. 115-126, Jan./Jun. 1999.

TRUCKSESS, M. W.; RICHARD JOHN.; STOLOFF, L. ; MCDONALD JOHN, S.; BRUMLEY, W. Absorption and distribution patterns of aflatoxicol and aflatoxins B₁ and M₁ in blood and milk of cows given aflatoxin B₁. **American Journal of Veterinary Research**, Washington, v. 44, n. 9, p. 1753-1756, 1983.

TUINSTRA, L.G.M.; ROOS, A.H.; TRIJP, J.M.P. Liquid cromatographic determination of aflatoxin M₁ in milk powder using immunoafinity columns for cleanup: interlaboratory study. **Journal of AOAC International**, Gaithersburg, v. 76, n.6, p. 1248-1254, Nov./Dec. 1993.

ANEXOS

| ANEXO A | Página |
|---|---------------|
| TABELA 1A Contagem de fungos (\log_{10}/g) em alimento destinado ao consumo animal..... | 82 |
| TABELA 2A Principais espécies fúngicas isoladas de ração destinada ao consumo animal..... | 83 |
| TABELA 3A Principais espécies fúngicas isoladas de farelo de soja destinada ao consumo animal..... | 84 |
| TABELA 4A Principais espécies fúngicas isoladas de farelo de soja e trigo destinada ao consumo animal..... | 85 |
| TABELA 5A Principais espécies fúngicas isoladas de caroço de algodão destinada ao consumo animal..... | 85 |
| TABELA 6A Tratamento estatístico nos teores de aflatoxina M ₁ nos leites cru e após tratamento térmico..... | 86 |

TABELA 1A Contagem de fungos (\log_{10}/g) em alimento destinado ao consumo animal na região de Lavras, Sul de Minas Gerais

| Amostras | Meio DRBC | Meio DG18 | Meio AFPA |
|----------|-----------|-----------|-----------|
| 1 | 4,65 | 3,51 | 3,34 |
| 2 | 4,97 | 3,72 | 2,57 |
| 3 | 5,36 | 4,66 | 2,90 |
| 4 | 3,50 | 2,11 | 1,57 |
| 5 | 5,25 | 2,0 | 1,50 |
| 6 | 5,18 | 2,28 | 3,81 |
| 7 | 6,28 | 4,36 | 3,96 |
| 8 | 4,85 | 3,50 | 2,91 |
| 9 | 5,67 | 4,72 | 2,49 |
| 10 | 2,25 | 2,0 | 1,90 |
| 11 | 6,82 | 5,58 | 2,79 |
| 12 | 4,54 | 3,08 | 2,25 |
| 13 | 5,85 | 4,65 | 2,11 |
| 14 | 3,30 | 2,80 | 1,0 |
| 15 | 8,38 | 7,41 | 2,46 |
| 16 | 4,80 | 3,59 | 1,72 |
| 17 | 4,88 | 2,45 | 1,54 |
| 18 | 3,48 | 2,11 | 1,28 |
| 19 | 3,65 | 2,64 | 1,92 |
| 20 | 5,62 | 4,80 | 2,32 |
| 21 | 5,36 | 5,64 | 4,94 |
| 22 | 4,53 | 3,36 | 1,54 |
| 23 | 8,38 | 6,23 | 2,08 |
| 24 | 3,54 | 2,0 | 1,30 |
| 25 | 5,38 | 4,20 | 4,08 |
| 26 | 3,0 | 2,11 | 1,20 |
| 27 | 4,61 | 2,46 | 1,17 |
| 28 | 5,34 | 4,52 | 2,45 |
| 29 | 3,0 | 2,20 | 1,20 |
| 30 | 6,84 | 5,92 | 5,25 |
| 31 | 3,45 | 2,53 | 1,04 |
| 32 | 3,62 | 2,11 | 1,08 |
| 33 | 4,66 | 3,72 | 3,51 |
| 34 | 4,40 | 3,62 | 2,18 |
| 35 | 3,28 | 2,23 | 1,11 |
| Média | 4,83 | 3,55 | 2,28 |

TABELA 2A Principais espécies fúngicas isoladas de ração destinada ao consumo animal na região de Lavras, Sul de Minas Gerais

| Microrganismos | Isolados | |
|---------------------------|----------|-------|
| | Nº | % |
| <i>A. flavus</i> | 31 | 31,63 |
| <i>A. niger</i> | 22 | 22,44 |
| <i>A. parasiticus</i> | 19 | 19,38 |
| <i>A. ochraceus</i> | 15 | 15,30 |
| <i>A. fumigatus</i> | 11 | 11,23 |
| <i>Eurotium spp</i> | 12 | 100,0 |
| <i>P. restrictum</i> | 18 | 12,22 |
| <i>P. citrinum</i> | 13 | 11,71 |
| <i>P. crustosum</i> | 13 | 11,71 |
| <i>P. implicatum</i> | 12 | 10,22 |
| <i>P. viridicatum</i> | 11 | 9,91 |
| <i>P. rugulosum</i> | 11 | 9,91 |
| <i>P. purpurogenum</i> | 9 | 8,11 |
| <i>P. minoluteum</i> | 9 | 8,11 |
| <i>P. variable</i> | 8 | 7,21 |
| <i>P. janthinelum</i> | 7 | 6,30 |
| <i>Taralomyces spp</i> | 4 | 1,15 |
| <i>Fusarium spp</i> | 62 | 65,26 |
| <i>F. verticillioides</i> | 19 | 20,0 |
| <i>F. solani</i> | 14 | 14,73 |
| <i>Alternaria spp</i> | 14 | 100,0 |
| <i>Cladosporium spp</i> | 8 | 100,0 |
| <i>Paecilomyces spp</i> | 4 | 100,0 |
| Total de isolados | 346 | |

TABELA 3A Principais espécies fúngicas isoladas de farelo de soja destinada ao consumo animal na região de Lavras, Sul de Minas Gerais

| Microrganismos | Isolados | |
|---------------------------|----------|-------|
| | Nº | % |
| <i>A. flavus</i> | 5 | 45,5 |
| <i>A. niger</i> | 2 | 18,2 |
| <i>A. fumigatus</i> | 1 | 9,1 |
| <i>A. candidus</i> | 1 | 9,1 |
| <i>A. niveus</i> | 1 | 9,1 |
| <i>A. terreus</i> | 1 | 9,1 |
| <i>Eurotium spp</i> | 1 | 100,0 |
| <i>P. restrictum</i> | 2 | 40,0 |
| <i>P. crustosum</i> | 1 | 20,0 |
| <i>P. implicatum</i> | 1 | 20,0 |
| <i>P. rugulosum</i> | 1 | 20,0 |
| <i>Fusarium spp</i> | 10 | 76,9 |
| <i>F. verticillioides</i> | 2 | 15,4 |
| <i>F. solani</i> | 1 | 7,69 |
| <i>Alternaria spp</i> | 1 | 100,0 |
| <i>Cladosporium spp</i> | 4 | 100,0 |
| Total de isolados | 35 | |

TABELA 4A Principais espécies fúngicas isoladas de farelo de soja e trigo destinada ao consumo animal na região de Lavras, Sul de Minas Gerais

| Microrganismos | Isolados | |
|---------------------------|----------|-------|
| | Nº | % |
| <i>A. flavus</i> | 1 | 25,0 |
| <i>A. niger</i> | 1 | 25,0 |
| <i>A. parasiticus</i> | 1 | 25,0 |
| <i>A. ochraceus</i> | 1 | 25,0 |
| <i>P. restrictum</i> | 1 | 12,5 |
| <i>P. crustosum</i> | 1 | 12,5 |
| <i>P. implicatum</i> | 1 | 12,5 |
| <i>P. viridicatum</i> | 1 | 12,5 |
| <i>P. rugulosum</i> | 1 | 12,5 |
| <i>P. minoluteum</i> | 1 | 12,5 |
| <i>P. janthinelum</i> | 1 | 12,5 |
| <i>P. variable</i> | 1 | 12,5 |
| <i>Fusarium</i> spp | 4 | 66,67 |
| <i>F. verticillioides</i> | 1 | 16,67 |
| <i>F. solani</i> | 1 | 16,67 |
| Total de isolados | 11 | |

TABELA 5A Principais espécies fúngicas isoladas de caroço de algodão destinada ao consumo animal na região de Lavras, Sul de Minas Gerais

| Microrganismos | Isolados | |
|-------------------------|----------|-------|
| | Nº | % |
| <i>A. flavus</i> | 1 | 25,0 |
| <i>A. niger</i> | 1 | 25,0 |
| <i>A. terreus</i> | 1 | 25,0 |
| <i>A. fumigatus</i> | 1 | 25,0 |
| <i>P. restrictum</i> | 1 | 33,33 |
| <i>P. crustosum</i> | 1 | 33,33 |
| <i>P. janthinelum</i> | 1 | 33,33 |
| <i>Alternaria</i> spp | 1 | 100,0 |
| <i>Curvularia</i> spp | 2 | 100,0 |
| <i>Cladosporium</i> spp | 1 | 100,0 |
| Total de isolados | 11 | |

TABELA 6A Tratamento estatístico nos teores de aflatoxina M₁ nos leites cru e após tratamento térmico

| Amostra | Leite cru | leite trat | | | Postos | leite cru | Leite trat. | $H_0: \Delta=0$ |
|---------|-----------|------------|------|------|--------|-----------|-------------|-----------------|
| 1 | 3,0 | 0,0 | 0,0 | 40,0 | 40,0 | 20,5 | 44,5 | 20,5 |
| 2 | 3,0 | 0,0 | 3,0 | 8,0 | 48,0 | 44,5 | 44,5 | 20,5 |
| 3 | 0,0 | 0,0 | 6,2 | 1,0 | 49,0 | 49,0 | 20,5 | 20,5 |
| 4 | 35,0 | 36,9 | 6,8 | 1,0 | 50,0 | 50,0 | 64,0 | 65,0 |
| 5 | 22,4 | 23,8 | 7,1 | 1,0 | 51,0 | 51,0 | 55,0 | 56,0 |
| 6 | 0,0 | 0,0 | 8,3 | 1,0 | 52,0 | 52,0 | 20,5 | 20,5 |
| 7 | 0,0 | 0,0 | 16,1 | 1,0 | 53,0 | 53,0 | 20,5 | 20,5 |
| 8 | 0,0 | 0,0 | 18,8 | 1,0 | 54,0 | 54,0 | 20,5 | 20,5 |
| 9 | 0,0 | 0,0 | 22,4 | 1,0 | 55,0 | 55,0 | 20,5 | 20,5 |
| 10 | 6,2 | 3,0 | 23,8 | 1,0 | 56,0 | 56,0 | 49,0 | 44,5 |
| 11 | 0,0 | 0,0 | 24,6 | 1,0 | 57,0 | 57,0 | 20,5 | 20,5 |
| 12 | 0,0 | 0,0 | 25,9 | 1,0 | 58,0 | 58,0 | 20,5 | 20,5 |
| 13 | 65,0 | 58,9 | 26,4 | 1,0 | 59,0 | 59,0 | 71,0 | 70,0 |
| 14 | 74,1 | 57,6 | 26,5 | 2,0 | 61,0 | 60,5 | 72,0 | 69,0 |
| 15 | 45,9 | 44,6 | 27,2 | 1,0 | 62,0 | 62,0 | 67,0 | 66,0 |
| 16 | 0,0 | 0,0 | 28,4 | 1,0 | 63,0 | 63,0 | 20,5 | 20,5 |
| 17 | 3,0 | 3,0 | 35,0 | 1,0 | 64,0 | 64,0 | 44,5 | 20,5 |
| 18 | 0,0 | 0,0 | 36,9 | 1,0 | 65,0 | 65,0 | 20,5 | 20,5 |
| 19 | 0,0 | 0,0 | 44,6 | 1,0 | 66,0 | 66,0 | 20,5 | 44,5 |
| 20 | 6,8 | 6,8 | 45,9 | 1,0 | 67,0 | 67,0 | 50,0 | 44,5 |
| 21 | 0,0 | 0,0 | 48,5 | 1,0 | 68,0 | 68,0 | 20,5 | 20,5 |
| 22 | 0,0 | 0,0 | 57,6 | 1,0 | 69,0 | 69,0 | 20,5 | 20,5 |
| 23 | 0,0 | 0,0 | 58,9 | 1,0 | 70,0 | 70,0 | 20,5 | 20,5 |
| 24 | 0,0 | 0,0 | 65,0 | 1,0 | 71,0 | 71,0 | 20,5 | 20,5 |
| 25 | 0,0 | 0,0 | 74,1 | 1,0 | 72,0 | 72,0 | 20,5 | 20,5 |
| 26 | 0,0 | 0,0 | | | | | 20,5 | 20,5 |
| 27 | 3,0 | 0,0 | | | | | 44,5 | 20,5 |
| 28 | 3,0 | 0,0 | | | | | 44,5 | 20,5 |
| 29 | 8,3 | 7,1 | | | | | 52,0 | 51,0 |
| 30 | 0,0 | 0,0 | | | | | 20,5 | 20,5 |
| 31 | 27,2 | 0,0 | | | | | 62,0 | 20,5 |
| 32 | 28,4 | 0,0 | | | | | 63,0 | 20,5 |
| 33 | 26,4 | 18,8 | | | | | 59,0 | 54,0 |
| 34 | 48,5 | 24,6 | | | | | 68,0 | 57,0 |
| 35 | 26,5 | 16,1 | | | | | 60,5 | 53,0 |
| 36 | 26,5 | 25,9 | | | | | 60,5 | 58,0 |

$H_0: \Delta=0$
 $H_1: \Delta < 0$
 $\alpha=0,05$
 $T1=1424$
 $T2=1204$
 $\mu(uA)=\mu(uB)=648$
 $\sigma(uA)=\sigma(uB)=88,7918915$
 $uA=538$
 $uB=758$
 $zc=1,24$
 $zt=1,96$
 Aceita-se H_0
 A e B vêm de populações idênticas
 Teste de Wilcoxon
 Mann-Whitney