

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA DE ALIMENTOS

**POSSÍVEL EXPOSIÇÃO DE CRIANÇAS
AS AFLATOXINA M₁ E OCRATOXINA A,
ATRAVÉS DO LEITE MATERNO,
NA CIDADE DE SÃO PAULO**

PARECER

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por **Sandra Aparecida Navas** aprovada pela Comissão Julgadora em 25 de fevereiro de 2003.

Campinas, 25 de fevereiro de 2003.



Profa. Dra. Delia Rodriguez Amaya
Presidente da Banca

Sandra Aparecida Navas
Química Industrial

Delia B. Rodriguez-Amaya
Orientadora

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de Mestre em Ciência de Alimentos.

Campinas – SP

2003

i

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

NIDADE	(1) 0
CHAMADA	T/UNICAMP
	N 228p
EX	
OMBO BC	53564
ROC.	124/03
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	01/05/03
CPD	

CM001B2263-0

IB ID 289752

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA F.E.A. – UNICAMP

N228p Navas, Sandra Aparecida
Possível exposição de crianças as aflatoxina M₁ e ocratoxina A, através do leite materno / Sandra Aparecida Navas. – Campinas, SP: [s.n.], 2003.

Orientador: Delia B. Rodriguez-Amaya
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1.Leite humano. 2.Aflatoxinas. 3.Ocratoxina. 4.Análise.
I.Rodriguez-Amaya, Delia B. II. Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos. III.Título.

BANCA EXAMINADORA

Delia B. Rodriguez-Amaya

Prof. Dra. Delia B. Rodriguez-Amaya
(Orientadora)

Benedito Corrêa

Prof. Dr. Benedito Corrêa

Helena Teixeira Godoy

Prof. Dra. Helena Teixeira Godoy

Prof. Dra. Myrna Sabino

00315876

O DOM SUPREMO

*“O Amor é paciente,
é benigno,
o amor não arde em ciúmes,
não se ufana nem se ensoberbece,
O amor não se conduz inconvenientemente,
não procura seus interesses,
não se exaspera.*

*Não se ressentido do mal.
Não se alegra com a injustiça,
mas regozija-se com a verdade.
O Amor nunca falha, e a vida
não falhará enquanto houver
Amor.*

*O poder da vontade não
transforma o homem.
O tempo não transforma o homem.
O Amor transforma.”*

(Henry Drummond)

DEDICO,

*esta conquista a Deus, minha estrela guia,
aos meus pais, pela vida e educação,
obrigada pelo afeto e compreensão.*

AGRADECIMENTOS

À Prof. Dra. Delia B. Rodriguez-Amaya pela orientação, apoio, e pelos ensinamentos.

Aos professores Dr. Benedito Corrêa, Dra. Helena Teixeira Godoy e Dra. Myrna Sabino, membros da banca examinadora, pelas sugestões apresentadas à pesquisa.

*À FUNCAMF e CNPQ pela ajuda financeira na aquisição do material.
Às mães doadoras dos leites utilizados neste trabalho.*

Aos amigos e funcionários do Banco de Leite Humano do Hospital Regional Sul da cidade de São Paulo, Dr. Nelson Mauricio Nogueira Pesciotta, Dra. Rosângela Gomes dos Santos, Luzia de Lourdes Martins Santos, Conceição Miranda Barbosa, Leonina Cândida de Souza Santos, Amália Gomes Pinto Régis Quirino e Rosana Maria Oliveira, pela disposição em ajudar na coleta dos leites e na aplicação dos questionários.

Ao Dr. Cristiano Corrêa de Azevedo Marques, diretor do Instituto Adolfo Lutz, Dr. Odair Zenebon, diretor da Divisão de Bromatologia e Química e Dr. Paulo Tíglea, diretor da Química Aplicada, pelo consentimento em poder realizar a parte experimental da pesquisa no Instituto Adolfo Lutz de São Paulo.

Aos amigos e funcionário da seção de Química Biológica do Instituto Adolfo Lutz, pelo apoio, ajuda e compreensão e em especial para Viviane Cristina Alonso pela grande ajuda na execução das análises dos leites e Valter Ruvieri, na parte de informática.

Aos caros funcionários da Secretaria do Departamento de Ciência de Alimentos, da Secretaria de Pós-Graduação, Biblioteca e aos demais funcionários da Faculdade de Engenharia de Alimentos, pela disposição em colaborar.

Ao "Pessoal dos Carotenóides", à Elza e à Débora, pela colaboração.

À amiga Maria Helena Iha, por fornecer informações importantes sobre o equipamento.

À amiga Elaine Federici Moela pela grande ajuda e experiência na área de computação.

Aos meus irmãos Eduardo e Sílvio pelas conversas, apoio e colaboração.

À grande amiga Roseby Cunha, pelo apoio, compreensão e crescimento, em qualquer lugar que você estiver.

Aos amigos, incondicional e indistintamente.

À todos que de alguma maneira colaboraram para este trabalho, seja através de conselhos, conversas ou comentários.

ÍNDICE	Página
Índice de Tabelas	x
Índice de Figuras	xi
Resumo	xiii
Abstract	xiv
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	2
3. REVISÃO DA LITERATURA	3
3.1 Aflatoxinas	3
3.2 Aflatoxina M ₁	6
3.3 Absorção e Distribuição de Aflatoxinas no Organismo	8
3.4 Bioativação e Excreção de Aflatoxinas	10
3.5 Incidência de Aflatoxinas em Alimentos em São Paulo	18
3.6 Ocratoxina A	20
3.7 Incidência de Ocratoxina A em Alimentos em São Paulo	24
3.8 Incidência de Aflatoxina M ₁ e Ocratoxina A em Leite Materno	24
3.9 Metodologia Analítica para Aflatoxina M ₁ e Ocratoxina	26
4. MATERIAL E MÉTODO	32
4.1 Amostra	32
4.2 Preparo das Soluções Padrões de Aflatoxina M ₁ e de Ocratoxina A	33

4.3	Determinação de Aflatoxina M ₁	34
4.4	Determinação de Ocratoxina A	37
4.5	Instrumentação e Condições Cromatográficas	40
4.6	Avaliação dos Métodos	40
4.6.1	Construção da curva padrão	41
4.6.2	Avaliação da recuperação	42
4.6.3	Determinação do limite de quantificação	42
4.7	Confirmação da Aflatoxina M ₁ nas Amostras Positivas	43
4.8	Confirmação da Ocratoxina A nas Amostras Positivas	43
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
5.1	Características da Curva Padrão	43
5.2	Taxas de Recuperação dos Métodos	46
5.3	Teores de Aflatoxina M ₁ e Ocratoxina A nas Amostras de Leite Materno	49
6.	CONCLUSÃO	57
7.	RECOMENDAÇÃO PARA INVESTIGAÇÃO FUTURA	57
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58
9.	ANEXOS	73

ÍNDICE DE TABELAS	Página
1. Ocorrência mundial de AFM ₁ e OTA em leite materno	25
2. Metodologias analíticas para identificação e quantificação de AFM ₁ e OTA em leite materno	31
3. Propriedades das curvas padrão das micotoxinas	44
4. Resultados do estudo de recuperação de AFM ₁ adicionada às amostras de leite materno (25 mL)	48
5. Resultados do estudo de recuperação de OTA adicionada às amostras de leite materno (25mL)	48
6. Resultados das determinações realizadas em 22 amostras de leite materno do período de inverno de diversos tipos	49
7. Resultados das determinações realizadas em 28 amostras de leite materno do período de verão de diversos tipos	50
8. Dieta alimentar das mães em que as amostras deram resultados positivos para AFM ₁ e OTA no leite materno	55
9. Dieta alimentar das mães em que as amostras deram resultados negativos para AFM ₁ e OTA no leite materno	56

ÍNDICE DE FIGURAS	Página
1. Estruturas químicas das aflatoxinas	5
2. Via metabólica de micotoxinas e sua distribuição para os produtos de origem animal	9
3. Bioativação de aflatoxina B ₁	12
4. Bioativação da aflatoxina B ₁ por enzimas hepáticas	13
5. Caminho metabólico induzindo formação de aductos de DNA e FAPY por aflatoxinas	15
6. Principais vias de bioativação da AFM ₁	16
7. Estruturas químicas das ocratoxinas	23
8. Diagrama esquemático de cromatografia de imunoafinidade para concentração e purificação de aflatoxina M ₁	28
9. Fluxograma do procedimento analítico para a determinação e quantificação de AFM ₁	36
10. Fluxograma do procedimento analítico para a determinação e quantificação de OTA	39
11. Cromatograma de padrões de AFM ₁ e OTA de 0,08ng.	44
12. Curva padrão de aflatoxina M ₁	45
13. Curva padrão de ocratoxina A	45

14. Cromatograma da amostra de leite materno utilizada para o estudo da recuperação do método	46
15. Cromatograma da amostra de leite materno com adição de padrão de AFM ₁ e OTA na concentração de 0,01 ng/mL.	47
16. Cromatograma da amostra de leite materno contaminado com 0,024 ng/mL de AFM ₁	50
17. Cromatograma da amostra de leite materno contaminado com 0,011 ng/mL de OTA	51
18. Cromatograma da amostra de leite materno contaminado com 0,024 ng/mL de OTA	52

RESUMO

Tendo em vista o fato das crianças serem mais sensíveis aos efeitos adversos de aflatoxina M₁ (AFM₁) e ocratoxina A (OTA) comparativamente aos adultos, este trabalho teve como objetivo padronizar metodologia para determinação de AFM₁ e OTA em leite materno, avaliar a incidência das citadas toxinas em Banco de Leite Humano do Hospital Regional Sul, da cidade de São Paulo, e correlacionar os resultados obtidos com a alimentação consumida pelas mães. Os métodos estabelecidos para a determinação de AFM₁ e OTA envolveram extração da AFM₁ com metanol e OTA com bicarbonato de sódio 1% e metanol, seguido da limpeza por colunas de imunoafinidade com anticorpos específicos para cada micotoxina e separação por cromatografia líquida de alta eficiência e quantificação com detector de fluorescência. A confirmação de AFM₁ foi realizada através da reação de derivatização com ácido trifluoroacético (TFA) e para OTA por meio da reação de derivatização com ácido clorídrico concentrado (HCl). O método estabelecido para AFM₁ apresentou porcentagem de recuperação e coeficiente de variação de 93,6% e 17,5%, respectivamente para a contaminação de 0,01 ng/mL. Para o método de OTA, os valores correspondentes são 83,9% e 14,1% no mesmo nível de contaminação (0,01 ng/mL). O limite de quantificação para ambos os métodos foi de 0,01 ng/mL. Do total de 50 amostras analisadas, apenas uma continha a AFM₁ (2% do total), em nível de 0,024 ng/mL e duas com OTA (4% do total), em nível de 0,011 e 0,024 ng/mL. Portanto, houve baixa incidência de AFM₁ e OTA em leite materno proveniente do Banco de Leite do Hospital Regional Sul da cidade de São Paulo.

ABSTRACT

Since infants are more susceptible than adults to the adverse effects of aflatoxin M₁ (AFM₁) and ochratoxin A (OTA), this work was carried out to establish and evaluate methods for the determination of AFM₁ and OTA in human milk collected by the Human Milk Bank of the Southern Regional Hospital, city of São Paulo, and correlate the incidence of these mycotoxins to the mothers' diets, information obtained through a questionnaire. The methods established for the determination of AFM₁ and OTA involved the extraction of AFM₁ with methanol and OTA with 1% sodium bicarbonate and methanol, followed by clean-up with immunoaffinity columns with antibodies specific for each mycotoxin and quantification by high performance liquid chromatography with a fluorescent detector. Confirmation of the identity of AFM₁ was carried out by derivatization with trifluoroacetic acid (TFA) and of OTA by derivatization with concentrated hydrochloric acid (HCl). The method established for AFM₁ had mean recovery percentage and coefficient of variation of 93.6% and 17.5%, respectively, at the contamination level of 0.01 ng/mL. For the OTA method, the corresponding values were 83.9% and 14.1% at the same level of contamination. The limit of quantification for both methods was 0.01 ng/mL. Of a total of 50 samples analyzed, only one was contaminated with AFM₁ (2%), at 0.024 ng/mL and two with OTA at 0.011 and 0.024 ng/ml. There was low incidence of AFM₁ and OTA, therefore, in human milk from the Milk Bank of the Southern Regional Hospital, city of São Paulo.

1. INTRODUÇÃO

Micotoxinas são metabólitos tóxicos secundários produzidos por fungos filamentosos (bolors) que se desenvolvem naturalmente em produtos alimentícios, capazes de provocar uma ampla variedade de efeitos tóxicos no homem e nos animais (STEYN, 1998). Os principais fungos produtores de micotoxinas pertencem aos gêneros *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium*.

A descoberta das aflatoxinas ocorreu em 1960, na Inglaterra, com a morte de mais de 100.000 perus de 4 a 6 semanas provocada pela ingestão de rações que continham farelo de amendoim de procedência brasileira, contaminada com o fungo ("A. flavus toxin") denominado *Aspergillus flavus*. As toxinas identificadas como metabólitos foram caracterizadas quimicamente e designadas aflatoxinas (ASAO *et al*, 1963, 1965).

Determinados fungos são capazes de crescer, produzir e liberar toxinas em produtos agrícolas, no campo, no armazenamento, durante o transporte, na fase de industrialização e em qualquer momento da fase de consumo. Os fungos toxigênicos podem crescer devido a vários fatores intrínsecos (quando inerentes ao substrato) e extrínsecos (quando inerentes às condições que envolvem o substrato). Os fatores mais importantes que favorecem o desenvolvimento de fungos e produção de toxinas são: temperatura, umidade relativa, conteúdo de umidade, linhagem do fungo contaminante e competição microbiana.

O leite, definido como uma secreção da glândula mamária, com pH neutro (6,5 a 6,7), é uma emulsão de gorduras em água, estabilizada por uma dispersão coloidal de proteínas, sais minerais, vitaminas, peptídeos, lactose, oligossacarídeos, caseína e outras proteínas. Contém, também, enzimas, anticorpos, hormônios, pigmentos, dióxido de carbono, oxigênio e nitrogênio. O leite materno é a principal e a mais importante fonte de alimentação desde o nascimento do bebê até um período de tempo, sendo fundamental e indispensável um leite de boa qualidade e seguro para as crianças, através de um controle da exposição de mães a alimentos contaminados com micotoxinas. As crianças são mais sensíveis que adultos aos efeitos adversos de micotoxinas porque elas possuem baixo peso corpóreo, a velocidade metabólica é rápida, têm baixa capacidade para detoxificação e desenvolvimento incompleto de alguns órgãos e tecidos, principalmente o sistema nervoso central (KUIPER-GOODMAN, 1989; GALVANO *et al*, 1996).

2. OBJETIVOS

Os objetivos do presente trabalho foram:

- a) avaliar e padronizar metodologias analíticas para determinação de Aflatoxina M₁ (AFM₁) e Ocratoxina A (OTA) em leite materno;
- (b) determinar AFM₁ e OTA em leite materno coletado em Banco de Leite Humano do Hospital Regional Sul, no bairro de Santo Amaro, São Paulo;

(c) correlacionar a incidência de AFM₁ e OTA com a alimentação consumida pelas mães.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. Aflatoxinas

As aflatoxinas são metabólitos secundários produzidos por *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus* e eventualmente *A. nomius* (WHO, 1997). Existem quatro aflatoxinas principais, as quais são classificadas nos grupos B e G, baseados na sua fluorescência, verde (green) e azul (blue), sob luz ultravioleta quando adsorvidas sobre um substrato sólido, a saber: aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂. As aflatoxinas B₁ e G₁ ocorrem mais freqüentemente e em maior quantidade na natureza (PITTET, 1998). Uma distinção bioquímica entre isolados das duas espécies de fungos produtores de aflatoxinas é que o *A. parasiticus* pode produzir as quatro aflatoxinas, enquanto o *A. flavus* normalmente produz somente B₁ e B₂ (LILLEHOJ, 1991).

A contaminação de alimentos no campo por aflatoxinas é difícil de ser controlada devido, principalmente, as condições climáticas tais como a umidade relativa (85%) e a temperatura (25-30° C) (PITTET, 1998). Solo úmido, estiagem, danos produzidos por insetos e deficiências minerais são também fatores importantes na contaminação.

Altas concentrações de aflatoxinas são também associadas com o crescimento pós-colheita de *Aspergillus* em alimentos mal armazenados. Embora a contaminação possa ser controlada por uma secagem rápida e armazenagem apropriada, esta contaminação ainda parece ser extremamente comum em clima quente e úmido de países tropical e subtropical (PITTET, 1998).

Os principais alimentos passíveis de contaminação são: amendoim, milho, semente de algodão, sementes oleaginosas, nozes, farinha de cereais, arroz, painço, castanha do Pará, pistache, avelãs.

As aflatoxinas apresentam, quimicamente, um grupo de compostos heterocíclicos altamente oxigenados; têm um núcleo cumarina fundido a um bifurano, contendo também um anel pentanona ou 6-lactona (APPLEBAUM *et al*, 1982). Atualmente, mais de uma dezena de aflatoxinas estão caracterizadas, sendo todas com origem nos grupos B e G. Estruturalmente, todas apresentam o grupo diidrofurobenzofurano. A Figura 1 apresenta as estruturas químicas das principais aflatoxinas.

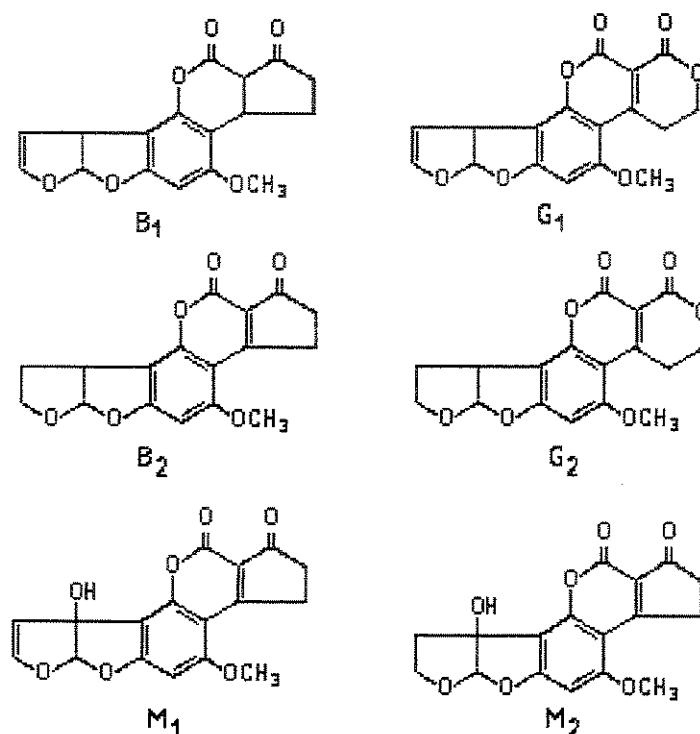


Figura 1 – Estruturas químicas das aflatoxinas

As aflatoxinas são intensamente fluorescentes sob luz ultravioleta de ondas longas. A intensidade de emissão de fluorescência é diferente entre elas: a da AFB₂ é oito vezes maior que da AFB₁. Por sua vez, AFM₁ e AFM₂ têm sido descritas como três vezes mais fluorescentes que B₁ e B₂, respectivamente. Em técnicas analíticas, esta intensa fluorescência é fundamental para detecção e quantificação destas micotoxinas (ANDRELLOS *et al*, 1966, 1967).

As aflatoxinas depois de extraídas são fotossensíveis, sofrendo decomposição quando expostas ao ar, à luz visível e ultravioleta, podendo interferir nas análises para quantificação por comparação das fluorescências (YOUSEF & MARTH, 1985). A presença do anel de lactona na estrutura das

aflatoxinas, essencial para sua fluorescência sob luz ultravioleta, torna-as suscetíveis a hidrólise por soluções aquosas alcalinas (PARKER & MELNICK, 1966).

As aflatoxinas são solúveis em solventes orgânicos mais polares, como metanol e clorofórmio, e especialmente em dimetilsulfóxido, o qual é usado como um veículo na administração de aflatoxinas em animais de experimentos. As aflatoxinas também são solúveis em soluções de benzeno-acetonitrila em diferentes proporções. Mantidas ao abrigo da luz e sob refrigeração (- 4° C), permanecem estáveis.

3.2. Aflatoxina M₁

Mamíferos que ingerem alimentos contaminados com AFB₁ e AFB₂ secretam em seu leite produtos de bioativação tóxicos, conhecidos como micotoxinas do leite ou AFM₁ e AFM₂. A bioativação pode sofrer variação de animal para animal, de um dia para outro e entre as ordenhas (PITTET, 1998). Um novo derivado hidroxilado de aflatoxina B₁ foi detectado no leite comercializado na França (LAFONT *et al.*, 1986a). Esse metabólito foi nomeado aflatoxina M₄, pela posição do grupo hidroxilado estar no carbono 4 do anel ciclopentanona da AFM₁.

A ocorrência de AFM₁ em leite de vaca é transitório, normalmente obtendo um pico dentro do prazo de 2 dias após a ingestão da ração contaminada com aflatoxina B₁ e desaparecendo do leite em 4 a 5 dias após a eliminação da ração

contaminada (LANCASTER, 1969; LYNCH, 1972). A contaminação do leite por AFM₁ tem uma tendência sazonal. Os índices menores de contaminação foram encontrados durante os meses de verão, quando os animais são geralmente alimentados em pastagens ao invés de rações concentradas (GALVANO *et al.*, 1996).

É sabido que AFM₁ além de ocorrer em leite de gado pode também estar presente em leite de ovelha, cabra, búfala e camela (GALVANO *et al.*, 1996). Além disso, relatos recentes mostram que a micotoxina é detectada em leite humano, em vários países algumas vezes em níveis altos em amostras de regiões tropicais e subtropicais (EL-NEZAMI *et al.*, 1995; SAAD *et al.*, 1995; GALVANO *et al.*, 1996).

A AFM₁ é um sólido cristalino com elevado ponto de fusão (299° C). Apresenta fórmula empírica de C₁₇H₁₂O₇, sendo quimicamente o 2,3,6a,9a-tetraidro-9a-hidroxi-4-metoxi-ciclopenta[c]furo[3',2':4,5]furo[2,3-h][1]benzopiran-1,11diona ou 4-hidroxi aflatoxina B₁.

A AFM₁ é tão tóxica quanto AFB₁ para ratos; a DL₅₀ para patinhos de 1 dia de vida é 0,24 mg de AFB₁/kg e 0,32 mg de AFM₁/kg (GALVANO *et al.*, 1996). De acordo com Barnes (1970), AFM₁ não é tão mutagênica quanto AFB₁. Testes têm indicado que aflatoxina M₄ é mais tóxica e carcinogênica do que aflatoxina B₁ e M₁ (LAFONT & LAFONT, 1987).

AFM₁ parece estar associada à fração protéica do leite (caseína), estando assim presente não somente nos tipos líquido ou em pó como também em seus produtos derivados (APPLEBAUM *et al.*, 1982).

Nenhum procedimento para a eliminação de AFM₁ do leite é conhecido, sem promover alteração em sua composição (STOLOFF, 1980-a e b). EGMOND (1983) mostrou que leite, naturalmente contaminado, não sofreu redução na concentração de AFM₁ quando submetido a processos de esterilização e pasteurização.

Resultados variáveis foram apresentados em estudos quanto à estabilidade da AFM₁ em leite durante armazenamento sob condições de resfriamento e congelamento. Entretanto, por alguns meses, o congelamento do leite e produtos lácteos contaminados parece não afetar a concentração de AFM₁ (EGMOND, 1994).

AFM₁ em leite materno é um excelente biomarcador quanto à exposição das mães à AFB₁ através dos alimentos e um prognóstico de crianças provavelmente expostas a esta alimentação (EL-NEZAMI *et al.*, 1995).

3.3. Absorção e Distribuição de Aflatoxinas no Organismo

Nos animais a contaminação por micotoxinas se dá principalmente pela via oral. A via metabólica da micotoxina e sua distribuição em produtos de origem animal estão esquematizadas na Figura 2.

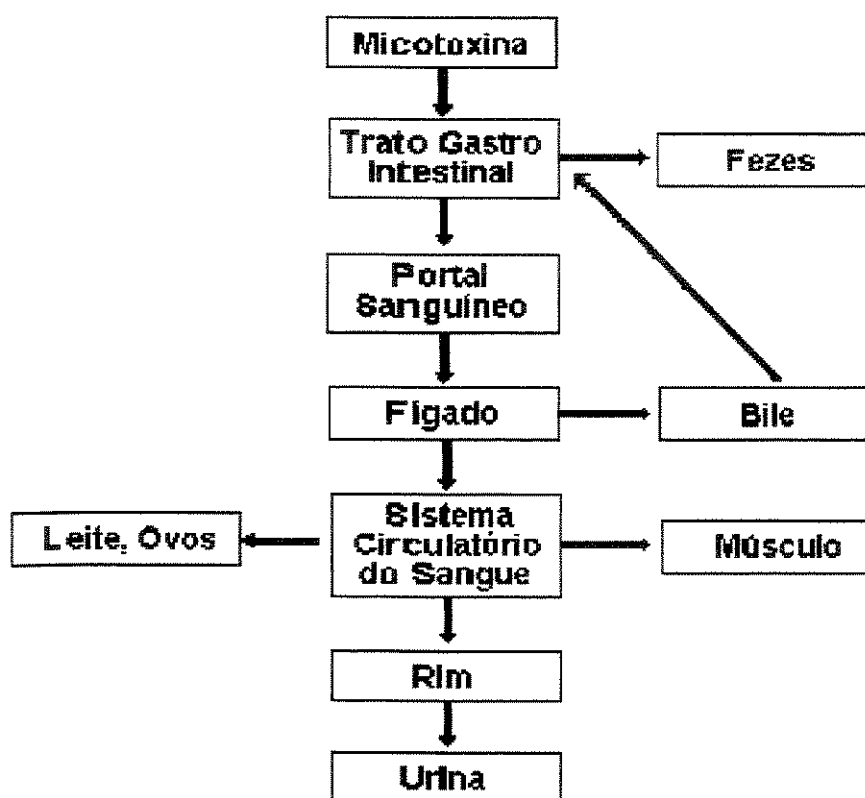


Figura 2: Via metabólica de micotoxinas e sua distribuição para os produtos de origem animal (HSIEH, 1983).

A aflatoxina B₁ é rapidamente absorvida via trato gastrointestinal pelo processo de difusão passiva, entrando na circulação sangüínea através da via portal, e levada para o fígado onde sofre os primeiros processos de bioativação. A capacidade da molécula de atravessar as membranas celulares depende da sua propriedade lipofílica. Uma parte de AFB₁ é ativada e ligada aos tecidos hepáticos. Alguns metabólitos de AFB₁ são excretados na bile e, subseqüentemente, nas fezes (TRUCKSESS *et al.*, 1983; STUBBLEFIELD *et al.*, 1983).

Em geral, a transmissão para o sistema circulatório e distribuição sistêmica é feita por outros conjugados solúveis em água e produtos de degradação: os

aductos de macromoléculas-B₁ e os metabólitos B₁. Estes resíduos de B₁ eventualmente são distribuídos no leite, ovos e tecidos comestíveis (RODRICKS & STOLOFF, 1977). Resíduos de AFB₁ tem sido encontrado nos tecidos de animais, incluindo fígado, coração, rins e músculo (RODRICKS & STOLOFF, 1977).

Segundo GALVANO *et al.* (1996), AFM₁ foi encontrada por diversos autores em leite materno, cordão umbilical e sangue de mães residentes em alguns países do continente africano.

3.4. Bioativação e Excreção de Aflatoxinas

A bioativação das aflatoxinas tem sido demonstrada como uma etapa fundamental em seus efeitos tóxico e carcinogênico. A maioria das pesquisas sobre bioativação de aflatoxina tem focado alterações metabólicas de aflatoxina B₁ (AFB₁), aflatoxina de maior potencial tóxico e carcinogênico. AFB₁ é também usualmente encontrada em altas concentrações em alimentos e rações contaminadas (EATON *et al.*, 1994).

A fonte principal de exposição humana as aflatoxinas são os alimentos contaminados, os quais podem apresentar duas situações: a) alimentos contaminados principalmente por AFB₁ e b) produtos provenientes de animais que consumiram ração contaminada. Os produtos de origem animal tais como leite, ovos e carnes comestíveis são de grande preocupação no processo da bioativação e transmissão das aflatoxinas.

O animal adulto é considerado um eficiente modificador e eliminador de toxina (STOLOFF, 1979) e o processo de bioativação e transmissão atua como um filtro, permitindo que apenas uma pequena parcela das toxinas passem diretamente na forma de metabólitos menos tóxicos. Nos produtos de origem animal as toxinas presentes são normalmente metabólitos detoxificados da micotoxina original presente na ração e a concentração desses metabólitos corresponde a uma fração da toxina original. Portanto, a principal preocupação com as micotoxinas e seus metabólitos nos produtos de origem animal é a toxicidade crônica induzida por estes compostos. A carcinogenicidade é um problema resultante da exposição a níveis baixos por um período longo (GARNER *et al*, 1972; HSIEH, 1983).

A susceptibilidade a bioativação inclui vários fatores como: composição genética das espécies, idade, estado de saúde, condições nutricionais e exposição à reação de epoxidação (HSIEH & WONG, 1994).

A Figura 3 mostra o caminho da bioativação da aflatoxina B₁. Os metabólitos principais da primeira fase são a forma ativa AFB₁-8,9-epóxido, os metabólitos hidroxil AFM₁ e AFQ₁, o produto de demetilação AFP₁ e o produto de redução aflatoxicol. Os metabólitos principais da segunda fase são a glutaciona, glucuronídeo e sulfato conjugados de AFB₁ (HSIEH & WONG, 1994). Nota-se que nem todos os metabólitos têm sido identificados em qualquer espécie e há diferenças quantitativas significantes na formação de vários produtos que possam existir (EATON *et al.*, 1994).

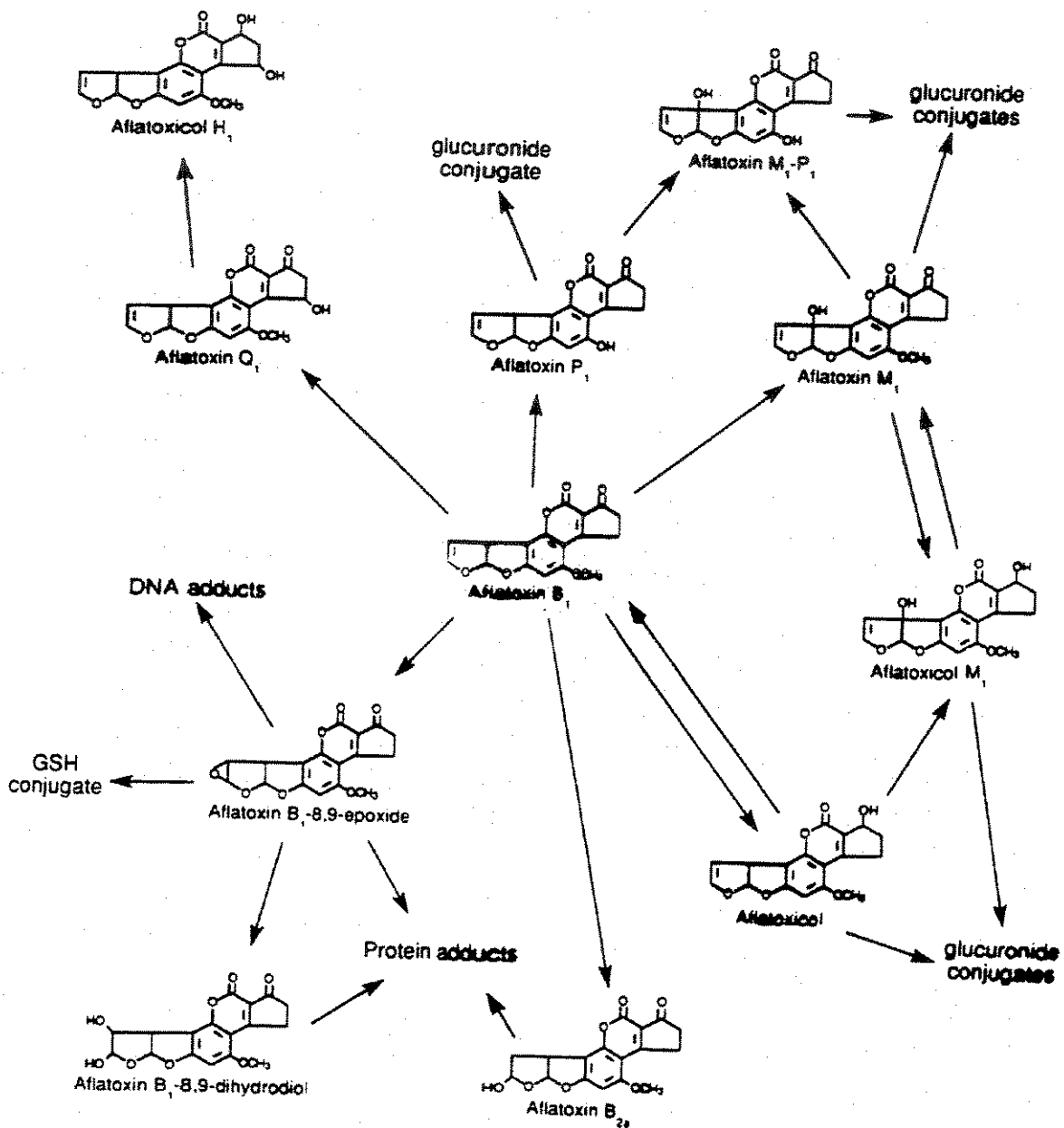


Figura 3: Bioativação de aflatoxina B₁ (EATON *et al.*, 1994).

Os efeitos tóxicos de AFB₁ são agora reconhecidos e podem ser atribuídos à ação dos metabólitos que são capazes de reagir com macromoléculas celulares.

A oxidação pelo citocromo P450 desempenha um papel central no caminho que promove para a formação de tais produtos (EATON *et al.*, 1994).

A compreensão da bioativação das aflatoxinas e de seu mecanismo de toxicidade é fundamental e é realizada através de estudos em animais de laboratório; tal conhecimento pode ser aplicado para o homem. As possíveis alterações produzidas na bioativação da AFB₁, descritas anteriormente, estão representadas esquematicamente na Figura 4, onde: (a) é ataque redutivo ou hidratação da dupla ligação de éter vinílico, (b) é a abertura da estrutura bifuranóide, (c) é *o*-demetilação, (d) é fissão hidrolítica da lactona cumarínica, (e) é redução da ciclopentanona e (f) é hidroxilação.

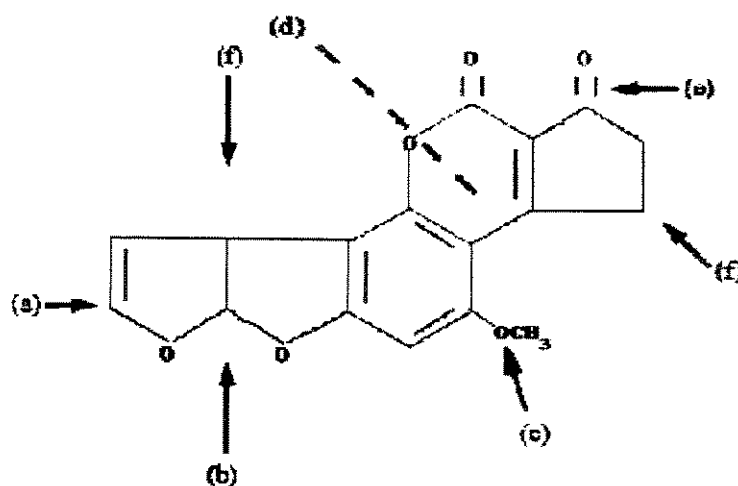


Figura 4: Bioativação da aflatoxina B₁ por enzimas hepáticas

A AFB₁ é bioativada por reações de oxidação, mediadas por oxigenases de função mista, para três derivados monoidroxilados que são: aflatoxina M₁ (9a-hidroxiaflatoxina, AFM₁); aflatoxina P₁ (4-hidroxiaflatoxina, AFP₁) e aflatoxina Q₁ (3-hidroxiaflatoxina, AFQ₁). Estes derivados em geral são menos tóxicos (MOSS & NEAL, 1985; EATON *et al.*, 1988; RAMSDELL & EATON, 1990).

A principal reação de ativação da aflatoxina B₁, em termos de toxicidade, é a reação de epoxidação da dupla ligação dos carbonos 8-9, anteriormente denominado AFB₁-2,3 epóxido, formando um intermediário altamente reativo, capaz de interagir com macromoléculas nucleofílicas, incluindo o DNA e o RNA (SABBIONI *et al.*, 1987; EATON *et al.*, 1988; RAMSDELL & EATON, 1990; FORRESTER *et al.*, 1990; CHUTURGOON *et al.*, 1998; EATON *et al.*, 1994). O caminho metabólico promovendo para formação de aductos de DNA e FAPY* por aflatoxinas está representado na Figura 5.

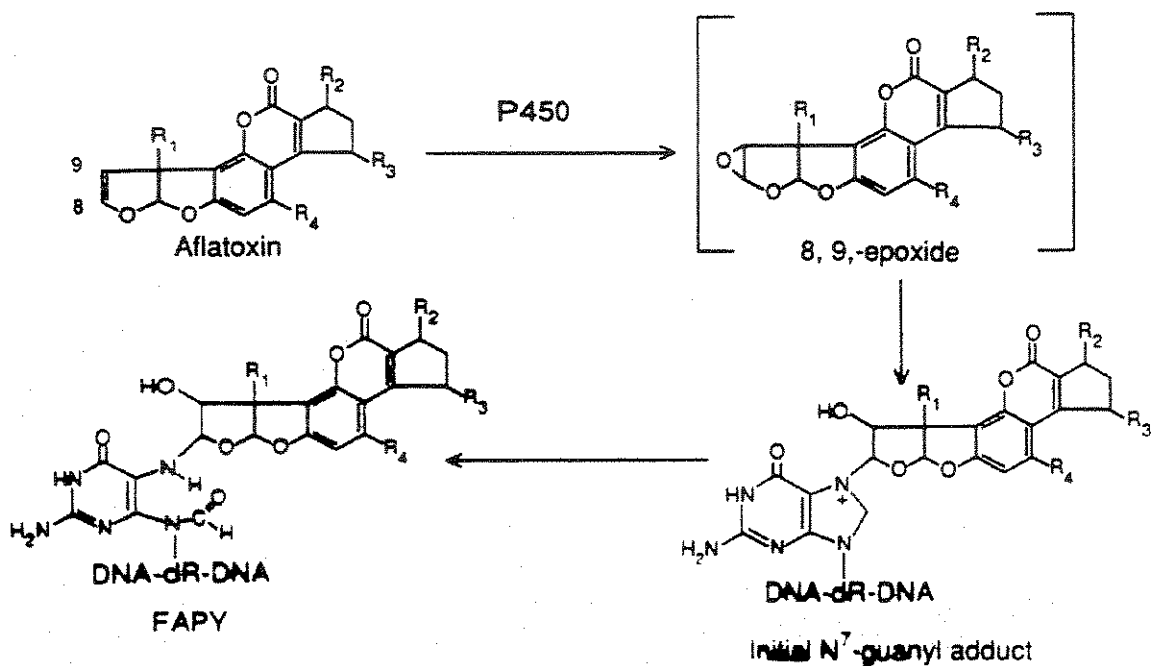


Figura 5: Caminho metabólico induzindo formação de aductos de DNA e FAPY* por aflatoxinas. AFB₁, AFM₁ e AFP₁ produzem aductos DNA diretamente; AFL não produz aductos DNA diretamente. AFB₁: R₁=H, R₂=O, R₃=H, R₄=OCH₃; AFM₁: R₁=OH, R₂=O, R₃=H, R₄=OCH₃; AFL: R₁=H, R₂=OH, R₃=H, R₄=OCH₃; AFP₁: R₁=H, R₂=O, R₃=H, R₄=OH; AFLM₁: R₁=OH, R₂=OH, R₃=H, R₄=OCH₃; AFQ₁: R₁=H, R₂=O, R₃=OH, R₄=OCH₃ (BAILEY, 1994).

*FAPY = formamidopirimidina.

O epóxido também pode ser hidratado espontaneamente ou enzimaticamente para formar 8,9-dihidro-8,9-dihidroxi-B₁ (B₁-diol) que sob condições fisiológicas é capaz de reagir com os grupos aminos de proteínas, particularmente lisina formando base de SCHIFF tendo o íon fenolato dialdeidico como intermediário (HSIEH, 1983). A aflatoxina M₁ é formada pela hidroxilação da

aflatoxina B₁ (Fig. 6, via A). Sendo estruturas análogas, suas possíveis vias de bioativação podem ser as mesmas.

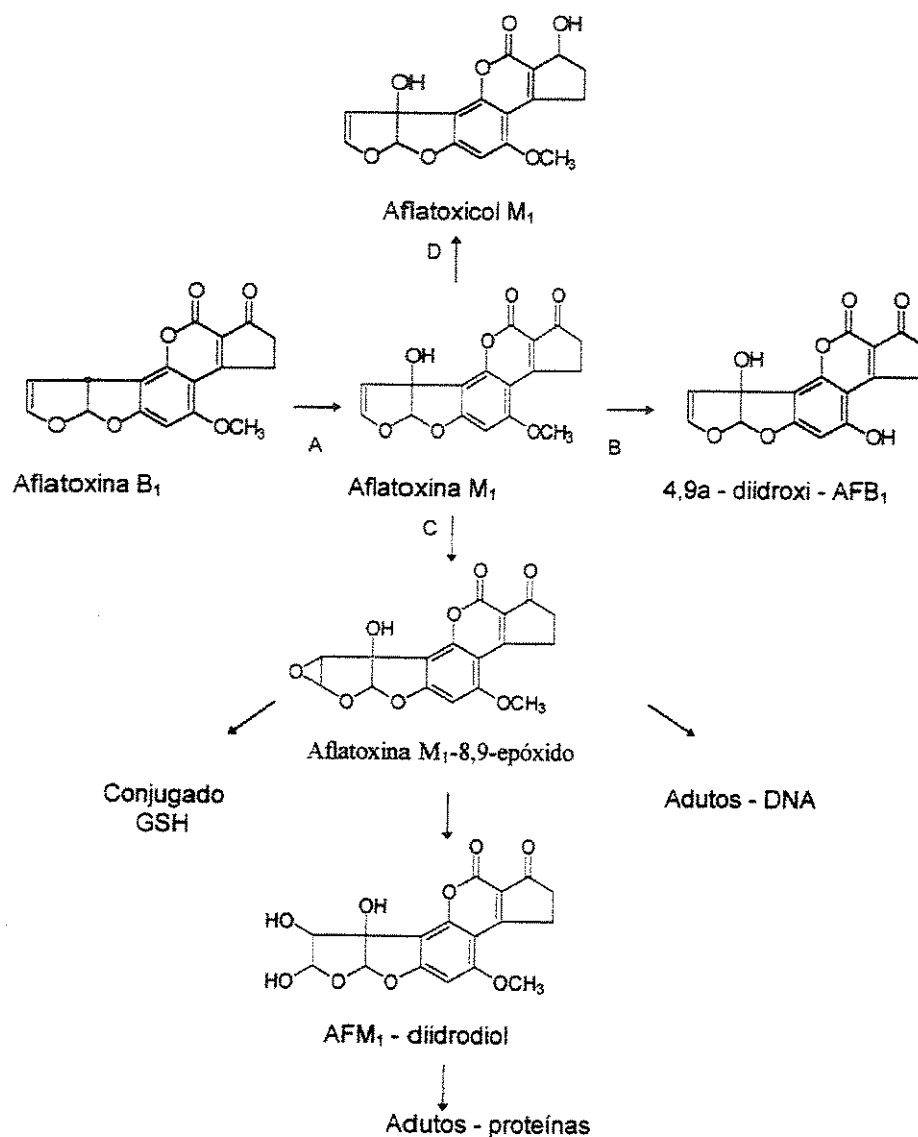


Figura 6: Principais vias de bioativação da AFM₁ (TAVEIRA, 2000).

Observou-se, em um estudo do bioativação de aflatoxinas M₁ e B₁ em microsomas hepáticos humano *in vitro*, que a capacidade de catalisar a epoxidação de aflatoxina M₁ foi muito limitada, e que a aflatoxina M₁ não é

estritamente um produto de detoxicação da aflatoxina B₁. Desta forma, estudos sobre sua bioativação são necessários para elucidar os mecanismos pelos quais esta micotoxina exerce sua ação tóxica (NEAL *et al.*, 1998).

MOSS & NEAL (1985) estudaram as velocidades do metabolismo NADPH – dependente de AFB₁ por microsomas isolado de fígado humano, constaram AFQ₁ principal metabólito, com quantidades menores de aflatoxina-8,9-dihidrodiol e AFM₁.

Dependendo da eficácia da absorção gastrintestinal, da intensidade da concentração hepática e sua bioativação, as aflatoxinas e seus metabólitos são removidos do organismo por excreção fecal e urinária.

AFM₁ foi detectada na urina de humanos que consumiram pasta de amendoim contaminada com AFB₁ (CAMPBELL *et al.*, 1974; ZHU *et al.*, 1987; HSIEH & WONG, 1994). GROOPMAN *et al.* (1986) detectaram o principal aducto DNA-aflatoxina, 1,3-dihidro-2-(N⁷-GUANIL)-3-hidroxi-aflatoxina B₁ (AFB₁-N-Gua) e os metabólitos AFM₁ e AFP₁, em amostras de urina humana obtidas de pessoas expostas a AFB₁ através da ingestão de alimentos contaminados.

Em amostras de urina humana, somente cerca de 5% é recuperada como AFM₁ (CAMPBELL *et al.*, 1979). As baixas concentrações de excreções sugerem a existência de uma via maior *in vivo* para a formação de metabólitos não fluorescentes.

Nas monografias da International Agency for Research on Cancer (IARC) sobre a avaliação do risco de câncer que apresentam algumas substâncias

químicas para o homem, foram incluídas várias micotoxinas (IARC, 1976, 1983 e 1993). Existem provas limitadas ou suficientes da carcinogenicidade de muitas micotoxinas em animais experimentais. Somente para as aflatoxinas existem alguns estudos epidemiológicos que oferecem provas limitadas de carcinogenicidade no ser humano.

No caso da aflatoxina M₁, desde a década de 60, quando de sua descoberta como um produto de bioativação da AFB₁ e posterior identificação, a secreção láctea tem-se mostrado, também, como uma via de remoção desta micotoxina (FROBISH *et al.*, 1986).

3.5. Incidência de Aflatoxinas em Alimentos em São Paulo

Um recente artigo de revisão referente às publicações no período entre 1991 e 2000, realizado por Rodriguez-Amaya & Sabino (2002), revelou que as aflatoxinas continuam representando um sério problema, especificamente em amendoim e produtos de amendoim. A porcentagem de amostra contaminada no estado de São Paulo variou de 44 a 65%, em 1988 a 1997 (total de amostra = 1.545), com faixa de contaminação de 4-12999 µg/kg de AFB₁ + AFG₁, com tendência decrescente para os anos mais recentes (FREITAS & BADOLATO, 1992; FONSECA *et al.*, 1991; SABINO *et al.*, 1999; BRIGIDO *et al.*, 1995; FREITAS & BRIGIDO, 1998; SABINO *et al.*, 1999a).

A ocorrência de aflatoxinas em milho, cultura considerada internacionalmente a mais susceptível à contaminação por esta toxina, não foi alta. A porcentagem de amostra contaminada se situou entre 0,8 a 8,5%, (total de amostra = 224), com faixa de contaminação de 2-89 $\mu\text{g}/\text{kg}$ para AFB_1 com uma amostra contendo 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (POZZI *et al*, 1995; GLÓRIA *et al*, 1997).

Nenhuma das amostras de trigo e produtos de trigo (FURLONG *et al*, 1995; VALENTE SOARES & FURLANI, 1996), "health foods" e cereais matinais (VALENTE SOARES & FURLANI, 1996a), (total de amostra = 161) apresentaram-se positivas.

Em nozes, de 110 amostras, 2 amostras continham 10-26 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de AFB_1 e 1 amostra 15 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de AFG_1 (FURLANI & SOARES, 1996).

A ocorrência de aflatoxina M_1 em leite e laticínios necessita de novas investigações, devido aos resultados obtidos apresentarem divergências. De 138 amostras de leite pasteurizado e leite em pó, 4 amostras (3%) continham de 0,07-0,37 ng/mL de AFM_1 . Em 66 amostras de queijo e iogurte não foram encontradas amostras positivas para AFM_1 (SYLOS *et al*, 1996). Em 144 amostras de leite cru, não foram encontradas amostras positivas (CORRÊA *et al*, 1997), no entanto, em 300 amostras de leite em pó reconstituído, 33 amostras (11%) continham AFM_1 , com faixa de contaminação de 0,10-1,0 ng/mL (OLIVEIRA *et al*, 1997).

3.6. Ocratoxina A

Ocratoxina A (OTA) é uma micotoxina nefrotóxica e nefrocarcinogênica, produzida por *Penicillium verrucosum* em países de clima temperado ou frio, por espécies de *Aspergillus* em países de clima quente e tropical. A espécie melhor conhecida de *Aspergillus* produtor de OTA é *A. ochraceus* (também conhecida como *A. alutaceus*). Outras espécies produtoras são *A. sulphureus*, *A. sclerotium* e *A. melleus*, os quais são raramente encontradas em alimentos e rações. *Penicillium verrucosum* está especialmente associado com armazenamento de cereais e é muito comum em países do norte da Europa e Canadá, enquanto que *Aspergillus ochraceus* é mais comum em grãos de café verde e temperos e é também freqüentemente isolado de grãos de cacau, soja, amendoim, arroz e milho. Embora a contaminação tem sido mostrada por ocorrer tanto antes da colheita como após colheita, a formação de OTA após colheita é geralmente observada como fator predominante na contaminação de alimentos e rações (PITTET, 1998).

Embora uma extensa variedade de derivados de ocratoxina terem sido isolados de culturas em laboratórios, somente OTA e raramente ocratoxina B têm sido encontradas como contaminantes naturais de plantas deterioradas. OTA tem recebido considerável atenção desde 1993, quando a International Agency for Research on Cancer (IARC) a classificou como possível carcinógeno para o homem. A ocratoxina A é a mais tóxica e é produzida em grandes quantidades e

freqüentemente encontrada como um contaminante natural de alimentos e rações. OTA mostrou-se um possível agente causador de doenças em humanos (nefropatia endêmica dos Balcãs), em porcos (nefropatia suína da Dinamarca) e em aves (STEYN, 1984).

Ocratoxina A foi isolada primeiramente de *Aspergillus ochraceus* K-804, de uma cepa de grão de sorgo, por Scott (1965). Alguns fatores determinam a produção de ocratoxinas como o tipo de cepas de fungos, substrato, temperatura e atividade de água (STEYN, 1984).

A atividade de água (a_w) mínima para o crescimento de *P. verrucosum* é 0,81 e para *A. ochraceus* 0,76, mas o mínimo para a produção de ocratoxina é 0,85 para ambos organismos, a ótima sendo em $>0,97$. Para a_w ótima a faixa de temperatura para ocratoxina é 4-31°C (ótima a 24°C) para *P. verrucosum* e 12-37°C (ótima a 25°C) para *A. ochraceus* (MOSS, 1996).

Além de cereais como milho, cevada, trigo, sorgo, centeio, aveia e arroz em que a OTA tem sido relatada como uma ocorrência natural, esta toxina também tem sido encontrada em muitos outros produtos alimentícios incluindo: soja, feijão, grãos de café verde, grãos de cacau, vinho e suco de uva, cerveja, condimento e ervas, rins de suínos (PITTET, 1998).

Em 1985, Creppy *et al* mostraram que OTA causa rompimento na molécula de DNA *in vitro* de células de baço de camundongos (DIRHEIMER, 1998). O tratamento com OTA induz a formação de aductos DNA em camundongos e ratos dependendo da dose e do tempo (DIRHEIMER, 1998). Outros efeitos negativos

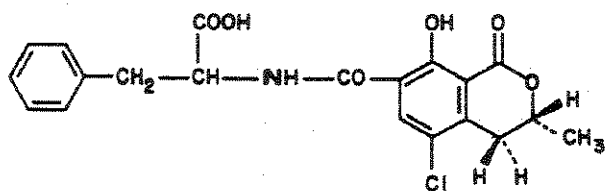
têm sido observados como hepatotoxicidade, produção de enterites em animais intoxicados, imunossupressão e teratogênese.

Análises de amostras de soro humano em vários países da Europa revelaram que os sangues de pessoas saudáveis freqüentemente contêm OTA, o que confirma uma contínua e ampla exposição (PITTET, 1998).

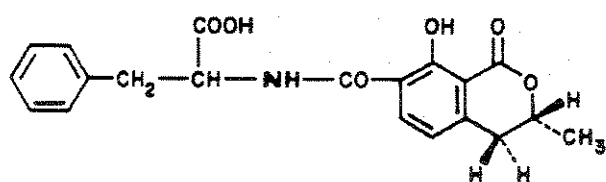
Atualmente, AFM₁ e OTA têm sido detectadas como contaminantes naturais em leite de vaca uma vez que a propagação das formas não ionizadas destas moléculas permite a sua transferência diretamente pela barreira sangue-leite (GALTIER, 1998).

Químicos da África do Sul caracterizaram ocratoxina A e ocratoxina B em 1965 (VAN DER MERWE *et al.*, 1965). As ocratoxinas são, de fato, o primeiro grupo de micotoxinas identificadas após a descoberta das aflatoxinas. (STEYN, 1984).

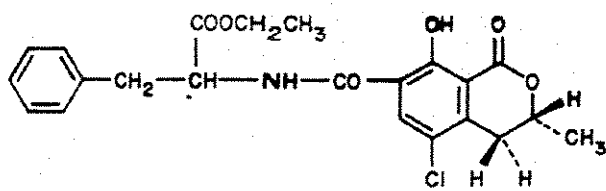
Ocratoxina é um composto cristalino e incolor. É altamente solúvel em solventes orgânicos polares, levemente solúvel em água e dissolve em solução aquosa de bicarbonato de sódio. A estrutura de ocratoxina A foi elucidada por hidrólise ácida da ligação amida e caracterização do amino ácido como L-β-fenilalanina e o ácido como 7-carboxi-5-cloro-8-hidroxi-3,4-diidro-3R-metilisocumarina pela forma físico-química (STEYN, 1984). Esta micotoxina possui fluorescência verde sob luz ultravioleta de ondas longas e tem uma molécula de cloro na fórmula responsável pelo caráter tóxico. As estruturas químicas das ocratoxinas estão representadas na Figura 7.



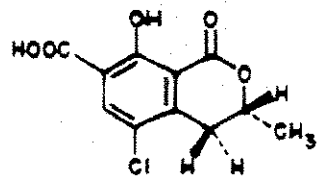
Ochratoxin A



Ochratoxin B



Ochratoxin C



Ochratoxin α

Figura 7: Estruturas químicas das ochratoxinas (STEYN, 1984).

3.7. Incidência de Ocratoxina A em Alimentos em São Paulo

No artigo de revisão de Rodriguez-Amaya & Sabino (2002), concluiu-se que a contaminação por OTA não foi tão preocupante como na Europa. De 20 amostras de trigo e 38 amostras de produtos de trigo, comercializadas no estado de São Paulo, nenhuma amostra apresentou a OTA (FURLONG *et al*, 1995; VALENTE SOARES & FURLANI, 1996).

A Europa vem se preocupando com a presença desta toxina no café. No entanto, em amostras de café torrado e instantâneo, comercializado no estado de São Paulo, num total de 48 amostras, 37 estavam contaminadas, porém, com níveis baixos, variando 0,3 a 6,5 µg/kg (LEONI *et al*, 2000).

3.8. Incidência de Aflatoxina M₁ e Ocratoxina A em Leite Materno

Na Tabela 1 pode-se observar a ocorrência de AFM₁ e OTA em vários países com porcentagem de incidência e valores de contaminações diferentes nas amostras analisadas.

TABELA 1: Ocorrência mundial de AFM₁ e OTA em leite materno.

País	Micotoxina	Nº de amostras positivas/Nº total de amostras	Porcentagem das amostras contaminadas	Faixa de contaminação ng/mL	Limite de detecção ng/mL	Referência
Noruega	OTA	17/80	21%	0,01 - 0,182	0,01	Skaug <i>et al</i> , 2001
Itália	OTA	294/465	63%	0,017 - 2,350	0,015	Brera <i>et al</i> , 2001
Itália	OTA	74/85	87%	0,02 - > 1,0	0,02	Miraglia <i>et al</i> , 1998
Australia	OTA	2/100	2%	3 - 3,6	1,6	Apostolou <i>et al</i> , 1998
Austrália Tailândia	AFM ₁	11/73 5/11	15% 45%	0,028 - 1,031 0,039 - 1,736	0,01	El-Nezami <i>et al</i> , 1995
Abu Dhabi	AFM ₁	443/445	99,5%	0,002 - 3,0	-	Saad <i>et al</i> , 1995
Itália	OTA	22/111	20%	0,1 - 12,0	0,1	Micco <i>et al</i> , 1995
Itália	OTA	9/33	27%	0,08 - 0,54	0,06	Miraglia <i>et al</i> , 1995
Serra Leoa	AFM ₁	35/113	31%	0,2 - 99	0,2	Jonsyn <i>et al</i> , 1995
Serra Leoa	OTA	40/113	35%	0,2 - 337	0,2	Jonsyn <i>et al</i> , 1995
Suíça	OTA	4/40	10%	0,005-0,014	-	Zimmerli <i>et al</i> , 1995
Suécia	OTA	23/40	58%	0,01 - 0,04	0,01	Breitholtz-Emanuelsson <i>et al</i> , 1993
França Zimbábue	AFM ₁	0/42 6/54	0% 11%	- 0,014 - 0,05	- 0,002	Wild <i>et al</i> , 1987

Internacionalmente são ainda poucas as pesquisas realizadas sobre a determinação de micotoxinas em leite humano e é inexistente no Brasil. Assim há uma necessidade de estudar a presença de AFM₁ e OTA em leite materno em

nosso país, permitindo avaliar a exposição das mães a alimentos contaminados com micotoxinas.

3.9. Metodologia Analítica para Aflatoxina M₁ e Ocratoxina A em Leite Materno

Os métodos existentes para determinação de micotoxinas, baseiam-se em algumas medidas físicas ou características químicas das mesmas tais como: absorção no UV, fluorescência ou mudança de cor quando ocorre alguma reação química. As micotoxinas têm uma grande variação nas estruturas químicas, conseqüentemente nas suas propriedades físicas como, por exemplo, solubilidade e coeficiente de partição.

Vários estudos mostram que a concentração de aflatoxinas e/ou metabólitos em tecidos e produtos de animais que consumiram rações contaminadas, em geral são baixas (ng/g) (FURTADO *et al.*, 1979; HSIEH, 1983; STOLOFF & TRUCKSESS, 1979). A AFM₁, em particular, é monitorada para quantidades que variam de 0,1 até 0,5 ng/mL, portanto, é necessário a utilização de métodos analíticos muito sensíveis para a detecção de quantidades pequenas de aflatoxinas (APPLEBAUM *et al.*, 1982).

Um procedimento analítico compreende as seguintes etapas: a) amostragem, b) extração do contaminante, c) limpeza (extração fase sólida e coluna de imunoafinidade), d) detecção e quantificação, e) confirmação da identidade química da toxina.

A limpeza do extrato da amostra é essencial em métodos de análises para micotoxinas. Para isso, vem sendo largamente usada hoje a extração em fase sólida e coluna de imunoafinidade. A cromatografia de imunoafinidade envolve várias etapas e está esquematizada na Figura 8. A coluna de imunoafinidade já vem com o anticorpo específico imobilizado em um suporte sólido, Sepharose ou Ultrogel, o qual é empacotado em uma coluna pequena (cartucho). A solução teste (amostra) é passada através da coluna. Então o antígeno (a micotoxina, por exemplo) é adsorvido no gel da fase sólida pela ligação com o anticorpo específico. Após a lavagem da coluna com uma solução tampão e pH neutro para remover as impurezas, o antígeno é desorvido da coluna pelo uso de uma solução tampão de pH baixo apropriada ou pelo uso de uma solução alcoólica, e então submetido posteriormente a outras técnicas de quantificação tais como os métodos imunoquímicos ou físicoquímicos (FRÉMY & CHU, 1989).

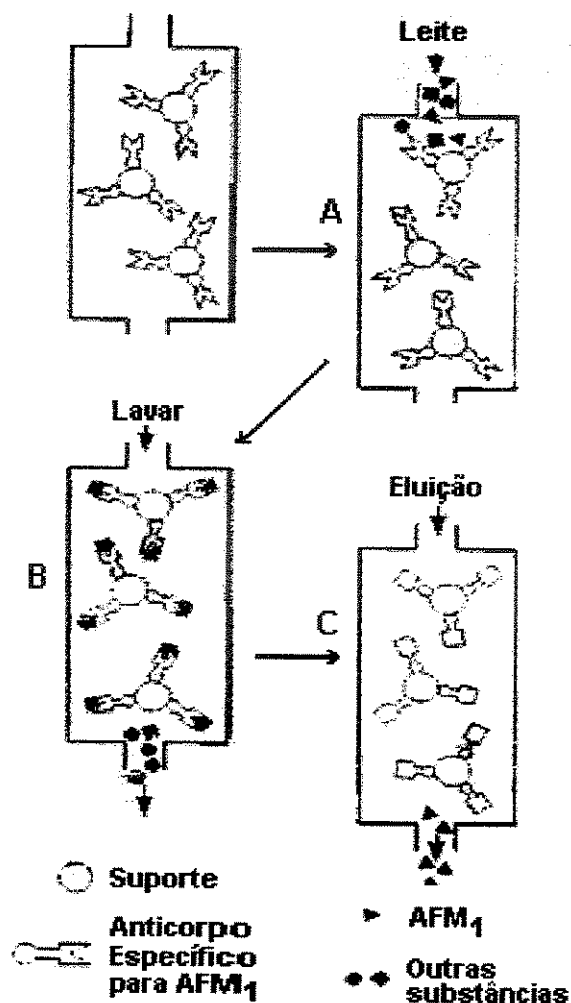


Figura 8: Diagrama esquemático de cromatografia de imunoafinidade para concentração e purificação de aflatoxina M₁ (FRÉMY & CHU, 1989; EGMOND, 1994).

SCOTT *et al* (1997) usaram colunas de imunoafinidade para limpeza e extração de micotoxinas de alimentos e fluídos biológicos, particularmente aflatoxinas, ocratoxina A e fumonisinas. As colunas são preparadas pela ligação de anticorpos específicos para uma dada micotoxina em um suporte de fase sólida dentro de um cartucho. As maiores vantagens são a especificidade, eliminando muitos interferentes e conseqüentemente permitindo limite de detecção baixo, a

rapidez, uso de pouco solvente, possibilidades de automação e de reusar a coluna. As desvantagens são o custo das colunas, a disponibilidade de colunas comerciais somente para poucas micotoxinas, a vida útil limitada e ocasionalmente a necessidade de uma limpeza pré-coluna. Em alguns casos, resulta em recuperação baixa pela pouca afinidade da toxina ou insuficiência de anticorpos ligados a coluna.

Para a separação de micotoxinas métodos cromatográficos vêm sendo utilizados. Nos últimos anos a cromatografia em camada delgada (CCD) vem sendo substituída pela cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), entretanto, observa-se na literatura publicações que ainda utilizam CCD uni e bidimensional (TUINSTR, 1975), e ainda bi-direcional (TRUCKSESS, 2001).

A CLAE é amplamente aplicada para a determinação de micotoxinas, considerando que várias delas, inclusive as aflatoxinas (GREGORY & MANLEY, 1981; ROBERTS et al, 1981) têm grupos cromóforos e propriedades fluorescentes, e com a melhoria dos sistemas de detecção poderão ser analisadas com maior sensibilidade. Em geral, métodos de CLAE combinados com sistema de detecção de ultravioleta e fluorescência têm mostrado boa sensibilidade e excelente reprodutibilidade.

Uma boa prática de laboratório é a confirmação da identidade química para evitar resultados falsos positivos.

A Tabela 2 mostra os métodos analíticos utilizados para a determinação de AFM₁ e OTA em leite materno de vários países. Pode-se observar que a extração da AFM₁ e OTA foi realizada por sistemas de solventes diversos. A limpeza da amostra foi realizada de diferentes maneiras como: por coluna de sílica gel, cartucho Sep-Pak de C₁₈ ou sílica, coluna de imunoafinidade, centrifugação, partição com éter de petróleo e filtração com filtro de nylon. Cinco trabalhos utilizaram cromatografia líquida com detector de fluorescência empregando derivatização com metanol-trifluoreto de boro (BF₃), dois também utilizaram solução 10% de amônia pós-coluna para OTA. Dois trabalhos usaram 0,1 mL de HCl concentrado para derivatização de OTA. O ácido trifluoroacético (TFA) foi utilizado em um trabalho para AFM₁ aumentando a intensidade de fluorescência e auxiliando na identificação. Dois trabalhos utilizaram a técnica de imunoenensaio - ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) para determinação de AFM₁, e posteriormente, para as amostras positivas, a cromatografia líquida de alta eficiência.

TABELA 2: Metodologias analíticas para identificação e quantificação de AFM₁ e OTA em leite materno.

EXTRAÇÃO	MICOTOXINA	LIMPEZA	IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO	CONFIRMAÇÃO	REFERÊNCIA
Metanol em meio ácido e Clorofórmio	OTA	Purificação por coluna de sílica gel	CLAE* com detector de fluorescência	Derivatização com 0,1 mL de HCl concentrado	Skaug <i>et al</i> , 2001
Acetato de etila	OTA	Centrifugação e coluna de imunoafinidade	CLAE* com detector de fluorescência	Derivatização - metanol contendo 14% BF ₃	Brera <i>et al</i> , 2001
Clorofórmio e Ác.Fórmico (95:5)	OTA	Cartucho Sep-Pak de sílica	CLAE* com detector de fluorescência	-	Apostolou <i>et al</i> , 1998
Diclorometano	AFM ₁	Cartucho Sep-Pak C ₁₈ e centrifugação	ELISA	Determinadas por CLAE	El-Nezami <i>et al</i> , 1995
Clorofórmio	OTA	-	CLAE* com detector de fluorescência	Derivatização - BF ₃ -metanol - (pré-coluna) Solução 10% de amônia - (pós-coluna)	Micco <i>et al</i> , 1995
Clorofórmio e Acetonitrila	AFM ₁	Éter de petróleo	CLAE* com detector UV e de fluorescência	Derivatização - TFA	Saad <i>et al</i> , 1995
Acetato de etila	OTA	Centrifugação e Filtro de nylon	CLAE* com detector de fluorescência	Derivatização - BF ₃ -metanol - (pré-coluna). Solução 10% de amônia - (pós-coluna)	Miraglia <i>et al</i> , 1995
Clorofórmio	AFM ₁ e OTA	Éter de petróleo	CLAE* com detector de fluorescência	Derivatização - OTA metanol contendo 20% BF ₃	Jonsyn <i>et al</i> , 1995
NaHCO ₃ 1% e Clorofórmio	OTA	Coluna de imunoafinidade	CLAE* com detector de fluorescência	Derivatização com 0,1 mL de HCl concentrado	Zimmerli <i>et al</i> , 1995
Clorofórmio, Metanol, NaHCO ₃ 1% e NaHCO ₃ -Metanol 1%	OTA	Purificação por coluna de sílica gel	CLAE* com detector de fluorescência	Derivatização - metanol contendo 20% BF ₃	Breitholtz-Emanuelsson <i>et al</i> , 1993
Acetonitrila 30% e Diclorometano	AFM ₁	Cartucho Sep-Pak C ₁₈	ELISA	Determinadas por CLAE	Wild <i>et al</i> , 1987

*CLAE - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.

4. MATERIAL E MÉTODO

4.1. Amostras e Solventes

Foram analisadas 50 amostras de leite materno, das quais 26 amostras de colostro, 4 amostras de leite de transição, 11 amostras de leite maduro e 9 amostras de leite não classificado, sendo 22 amostras no inverno e 28 amostras no verão, coletadas no Banco de Leite Humano do Hospital Regional Sul, no bairro de Santo Amaro, São Paulo.

O colostro humano é o primeiro produto da secreção láctica da nutriz até 7 dias após o parto. O leite de transição é o produto intermediário, entre colostro e leite maduro, obtido entre o 7º e 15º dia pós-parto. O leite maduro é o produto de secreção láctica da nutriz a partir do 15º dia pós-parto.

As amostras de leite materno foram coletadas pelo próprio Banco de Leite de dois grupos diferentes de mães: mães hospitalizadas e mães não hospitalizadas.

As amostras foram acondicionadas em frascos de vidro e colocadas em freezer (-20º C), sendo analisadas uma única vez, devido a pouca quantidade de leite cedido pelas mães ao Banco de Leite (aproximadamente 60 mL.).

Foi aplicado um questionário para as mães, sobre a dieta alimentar para verificar uma correlação com a presença ou ausência de AFM₁ e OTA no leite (consentimento livre e questionário em anexos).

Os solventes benzeno, tolueno, ácido acético glacial 100% e metanol foram todos grau analítico, a acetonitrila e metanol grau CLAE (cromatografia líquida de alta eficiência) Merck (Darmstadt, Alemanha).

4.2. Preparo das Soluções Padrões de Aflatoxina M₁ e de Ocratoxina A

Os padrões primários de aflatoxina M₁ e ocratoxina A utilizados neste estudo foram adquiridos da Sigma Chemical Co. (St Louis, MO, EUA). As soluções-estoque de aflatoxina M₁ e ocratoxina A foram preparadas segundo o descrito no Manual de Métodos Oficiais de Análises da AOAC, (1990) seções 49, procedimentos 970.44, 971.22 e 973.37.

O padrão primário de aflatoxina M₁ com valor teórico de 5 µg foi dissolvido em 25 mL de uma solução de benzeno/acetonitrila (90:10, v/v) e sua absorbância foi lida no comprimento de onda de máxima absorção (350 nm) em espectrofotômetro Hewlett Packard 8453.

O padrão primário de ocratoxina A com valor teórico de 1,0 mg foi dissolvido em 100 mL de uma solução de tolueno/ácido acético (99:1, v/v) e a sua absorbância foi lida no comprimento de onda de máxima absorção (333 nm) em espectrofotômetro (Hewlett Packard 8453). As concentrações das micotoxinas foram calculadas pela seguinte fórmula:

$$\mu\text{g micotoxina/mL} = \frac{A \times CF \times PM \times 1000}{E}$$

onde: A = absorvância; CF = fator de correção do aparelho; PM = peso molecular da micotoxina; E = absortividade molar da micotoxina. As concentrações de AFM₁ e OTA foram de 0,16 µg/mL, 9,72 µg/mL, respectivamente.

4.3. Determinação de Aflatoxina M₁

No início deste estudo foi feita uma tentativa de estabelecer um método simultâneo para a AFM₁ e OTA em leite materno. Isso não foi possível pela necessidade de solventes de extração e colunas de imunoafinidade diferentes para estas micotoxinas.

Tanto para leite bovino (AOAC, 1990) como no procedimento indicado pelo fornecedor (RHÔNE – Diagnostics Technologies LTD., comunicação pessoal), a amostra de leite é passada diretamente na coluna de imunoafinidade. Como ocorreu o entupimento da coluna com algumas amostras de leite materno, foi então introduzido a extração por metanol antes da limpeza pela coluna de imunoafinidade.

O método estabelecido para a AFM₁ está esquematizado na Figura 9. Em uma alíquota de 25 mL de leite materno, adicionou-se 10 mL de água, centrifugou-se a $1100 \times g$ por 15 minutos; retirou-se a camada de gordura e adicionou-se 35 mL de metanol p.a. ao leite. Agitou-se por 10 minutos em agitador mecânico, centrifugou-se novamente a $1100 \times g$ por 15 minutos para a precipitação de proteínas e interferentes, retirou-se o sobrenadante e adicionou-se a 50 mL de

água deionizada. O volume total de 120 mL foi passado pela coluna de imunoafinidade para análise de AFM₁ com um fluxo de 2-3 mL/min. Após a passagem do volume total, a coluna de imunoafinidade RHÔNE – Diagnostics Technologies LTD. (Glasgow Scotland, Reino Unido) foi lavada com 30 mL de água para a retirada de resíduos da coluna. Eluiu-se a AFM₁ da coluna de imunoafinidade com 2 mL de acetonitrila/metanol (3:2, v/v) grau CLAE, evaporou até secar e o resíduo redissolvido em 500 µL de água/ácido acético/acetonitrila/metanol (39,6:0,4:35:25, v/v). Uma alíquota de 20 µL da amostra foi injetada no cromatógrafo líquido de alta eficiência para a separação e a quantificação foi efetuada utilizando detector de fluorescência.

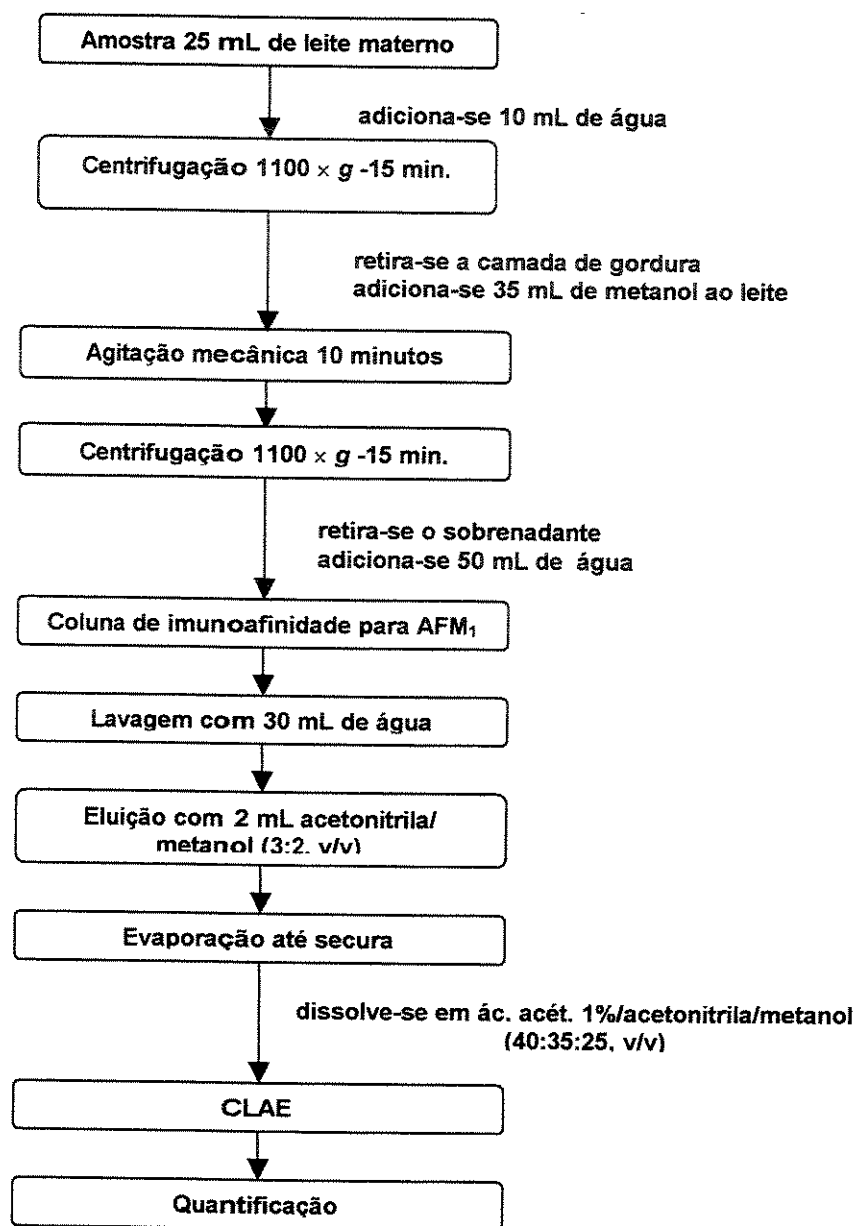


Figura 9: Fluxograma do procedimento analítico para a determinação e quantificação de AFM₁.

4.4. Determinação de Ocratoxina A.

No início deste estudo para a determinação de ocratoxina A em leite materno utilizou-se o método para cerveja, indicado pelo fornecedor das colunas de imunoafinidade específica para OTA (RHÔNE – Diagnostics Technologies LTD.), com a diminuição da quantidade de amostra para 50 mL. Como a passagem direta na coluna de imunoafinidade provocou entupimento para algumas amostras de leite materno, uma extração foi também realizada antes da limpeza, com bicarbonato de sódio 1% e metanol. O fluxograma do procedimento analítico estabelecido encontra-se na Figura 10. Em uma alíquota de 25 mL de leite materno, adicionou-se 10 mL de uma solução de bicarbonato de sódio 1%, agitou-se por 3 minutos manualmente, centrifugou-se a $1100 \times g$ por 15 minutos, retirou-se a camada de gordura e adicionou-se 30 mL de metanol p.a. ao leite. Agitou-se por 10 minutos em agitador mecânico, centrifugou-se novamente a $1100 \times g$ por 15 minutos para a precipitação de proteínas e interferentes, retirou-se o sobrenadante e adicionou-se a 50 mL de uma solução de tampão fosfato (PBS). O volume total de 115 mL foi passado pela coluna de imunoafinidade RHÔNE – Diagnostics Technologies LTD. (Glasgow Scotland, Reino Unido) para análise de OTA com um fluxo de 2-3 mL/min. Após a passagem do volume total, a coluna de imunoafinidade foi lavada com 30 mL de água para a retirada de resíduos da coluna. Eluiu-se a OTA da coluna de imunoafinidade com 2 mL de ácido acético/metanol (2:98, v/v), evaporou-se até securo e o resíduo redissolvido em

500 μL de água/ácido acético/acetonitrila/metanol (39,6:0,4:35:25, v/v). Uma alíquota de 20 μL da amostra foi injetada no cromatógrafo líquido de alta eficiência para a separação e a quantificação foi efetuada utilizando o detector de fluorescência.

Para a solução tampão fosfato (PBS), com pH = 7,4, foram utilizados os seguintes reagentes de grau analítico: 0,20 g de fosfato de potássio monobásico (F.Maia S/A Indústria e Comércio), 1,10 g de fosfato de sódio dibásico anidro (Mallinckrodt), 8,0 g de cloreto de sódio (Vetec) e 0,20 g de cloreto de potássio (Merck) para um litro de solução em água deionizada. O bicarbonato de sódio, grau analítico, Merck.

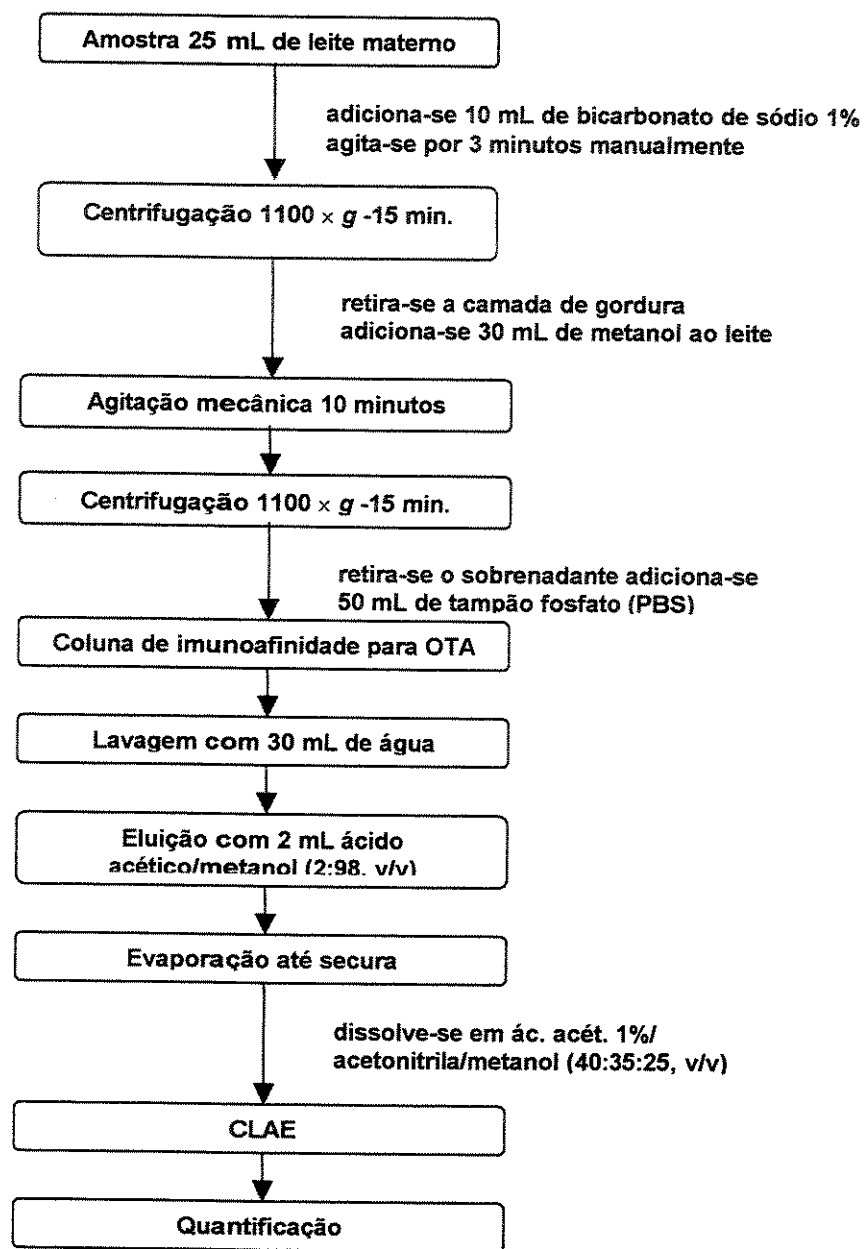


Figura 10: Fluxograma do procedimento analítico para a determinação e quantificação de OTA

4.5. Instrumentação e Condições Cromatográficas

A determinação da AFM₁ e de OTA foi realizada por CLAE, usando uma coluna de fase reversa LiChrosorb C₁₈ (250 x 4 mm, 10 µm) (Merck, Alemanha). O equipamento foi um cromatógrafo líquido Shimadzu, constituído de bomba modelo LC-10ADVP, válvula FCV-10ALVP, degaseificador DGU-14A, injetor automático SIL-10 ADVP, forno CTO-10ASVP, detector de fluorescência RF-10AXL, controlador SCL-10AVP. A eluição teve como fase móvel água/ácido acético/acetonitrila/metanol (39,2:0,8:35:25, v/v). A programação foi a seguinte: 40:35:25 mL em 10 minutos. O fluxo foi de 1,0 mL/min, e injetou-se tanto do padrão como da amostra 20 µL. Esta fase móvel foi escolhida em testes preliminares, nos quais foram juntadas as fases móveis recomendadas pela RHÔNE – Diagnostics Technologies LTD. para AFM₁ (água, acetonitrila, metanol) e para OTA (acetonitrila, água, ácido acético).

Os comprimentos de onda de excitação e emissão para aflatoxina M₁ foram 360-430 nm no período de 0 a 5 minutos e os de ocratoxina A foram 333-443 nm no período de 5,1 a 10 minutos. A identificação das micotoxinas foi baseada inicialmente na injeção de padrões separadamente e em conjunto.

4.6. Avaliação dos Métodos

O método foi avaliado de acordo com os seguintes parâmetros: repetibilidade, recuperação, limite de quantificação.

4.6.1. Construção da curva padrão

Da solução-estoque do padrão de OTA de concentração 9,72 $\mu\text{g/mL}$ foi retirado uma alíquota de 100 μL e elevado o volume até 5 mL com uma solução de tolueno/ácido acético (99:1, v/v) ficando com uma concentração de 0,19 $\mu\text{g/mL}$. Uma alíquota de 165 μL foi retirada para a construção da curva padrão.

Da solução-estoque do padrão de AFM₁ de concentração 0,16 $\mu\text{g/mL}$ foi retirada diretamente uma alíquota de 200 μL para a construção da curva padrão.

Curvas padrão de sete pontos foram construídas para as duas micotoxinas, em concentrações baseadas nas estimativas dos teores no leite materno da literatura. As alíquotas dos padrões foram misturadas e os solventes evaporados sob corrente de nitrogênio; as micotoxinas foram redissolvidas em água/ácido acético/acetonitrila/metanol (39,6:0,4:35:25, v/v) e o volume elevado a 3200 μL . Desta solução, volumes de 50, 100, 200, 400, 600, 800 e 1000 μL foram retirados para sete frascos de 1 mL e completados os volumes pelo mesmo solvente para a injeção. Cada frasco de 1 mL correspondeu as seguintes concentrações: 0,5, 1,0, 2,0, 4,0, 6,0, 8,0, 10,0 ng/mL constituindo um ponto para a construção da curva e para cada ponto da curva foi injetado seis vezes o volume de 20 μL . As concentrações em 20 μL injetadas de cada ponto corresponderam a 0,01, 0,02, 0,04, 0,08, 0,12, 0,16, 0,2 ng.

4.6.2. Avaliação da recuperação

Das soluções-estoque do padrão de AFM₁ e OTA foi preparado uma solução de trabalho, com as duas toxinas juntas, cada uma de concentração de 0,02 µg/mL, em metanol grau CLAE para utilização nas análises de recuperação.

O estudo da recuperação do método foi realizado através da adição de quantidades conhecidas as subamostras de um lote de leite materno sem contaminação, a partir de padrões de AFM₁ e de OTA de concentração 0,02 µg/mL.

Foram retiradas várias alíquotas de 50 mL, do leite que foram colocadas em frasco Erlenmeyer. Padrões de AFM₁ e OTA com as seguintes quantidades: 0,5, 1,5, 2,5 ng, correspondendo às concentrações de 0,01, 0,03 e 0,05 ng/mL de leite materno. Após a adição dos padrões, foi feita a divisão da amostra pela metade. Uma das alíquotas de 25 mL foi utilizada para determinar o teor de AFM₁ e a outra para determinar o teor de OTA conforme a metodologia descrita no item 4.3, 4.4 e 4.5.

4.6.3. Determinação do limite de quantificação

O limite de quantificação (LQ), menor concentração precisamente medida (CHASIN et al, 1994), foi determinado a partir da adição de quantidades decrescentes (ng) dos padrões às amostras não contaminadas baseadas nas

estimativas dos teores no leite materno retirados da literatura e do estudo de recuperação do método.

4.7. Confirmação da Aflatoxina M₁ nas Amostras Positivas

O teste para a confirmação da presença de AFM₁ nas amostras que se apresentaram positivas, foi realizado por derivatização com ácido trifluoroacético (TFA), segundo procedimento descrito no Manual de Métodos Oficiais de Análises da AOAC, (1990) seções 49, procedimento 986.16 E.

4.8. Confirmação da Ocratoxina A nas Amostras Positivas

O teste para a confirmação da presença de OTA nas amostras que se apresentaram positivas, foi realizado por derivatização com ácido clorídrico concentrado (HCl), segundo procedimento descrito em Zimmerli *et al*, 1995 e Skaug *et al*, 2001.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Características da Curva Padrão

Um cromatograma de padrões de AFM₁ de 0,08ng/20μL e OTA de 0,08ng/20μL está apresentado na Figura 11.

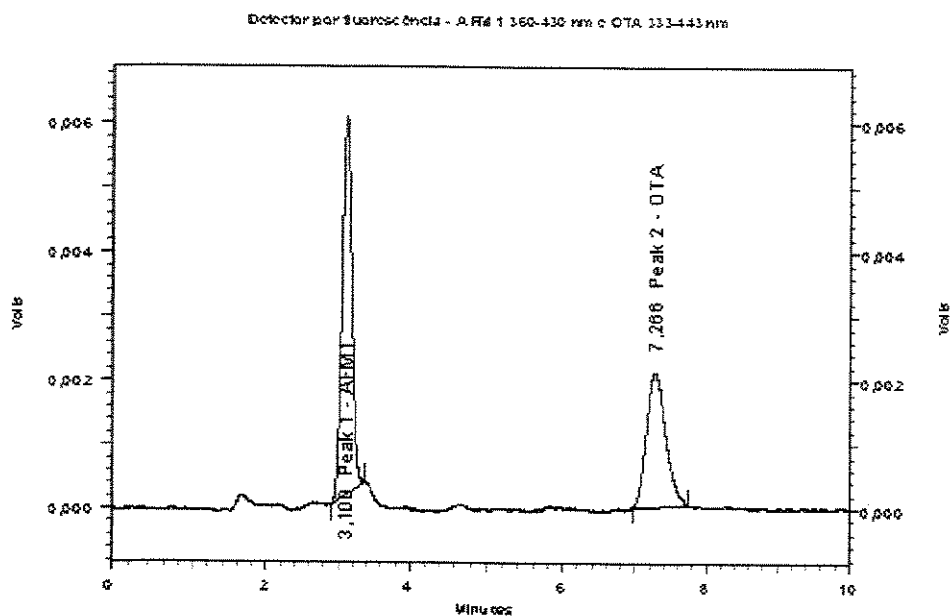


Figura 11: Cromatograma de padrões de aflatoxina M₁ e ocratoxina A de 0,08ng. Condições cromatográficas estão descritas no texto. Picos: aflatoxina M₁ (1) ocratoxina A (2).

As curvas padrão passaram pela origem (Figura 12 e 13) e apresentaram-se lineares nas faixas de concentrações. A Tabela 3 mostra os dados obtidos de cada curva.

Tabela 3: Propriedades das curvas padrão das micotoxinas.

Micotoxinas	Faixa de concentração (ng/20μL)	Coefficiente de correlação	Desvio padrão relativo (%)
Aflatoxina M ₁	0,01 – 0,2	0,9997	1,68
Ocratoxina A	0,01 – 0,2	0,9983	3,20

Os coeficientes de correlação foram bons para aflatoxina M₁ e ocratoxina A, ambos maiores que 0,99. Os desvios padrão relativos foram de 1,68 a 3,20, desvios bastante satisfatórios para as micotoxinas.

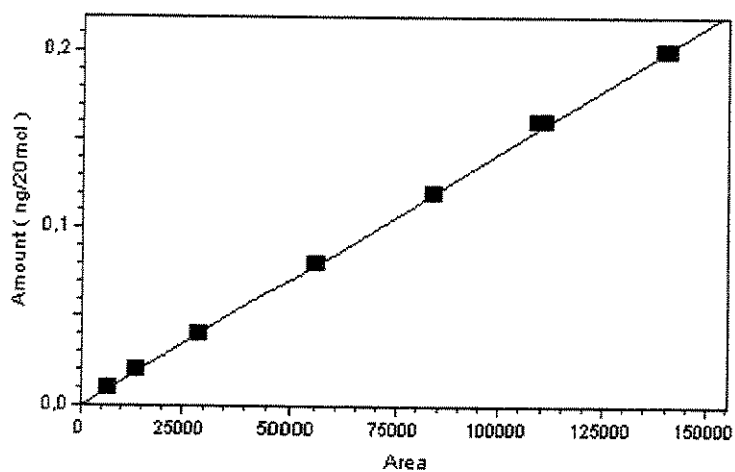


Figura 12: Curva padrão de aflatoxina M₁.

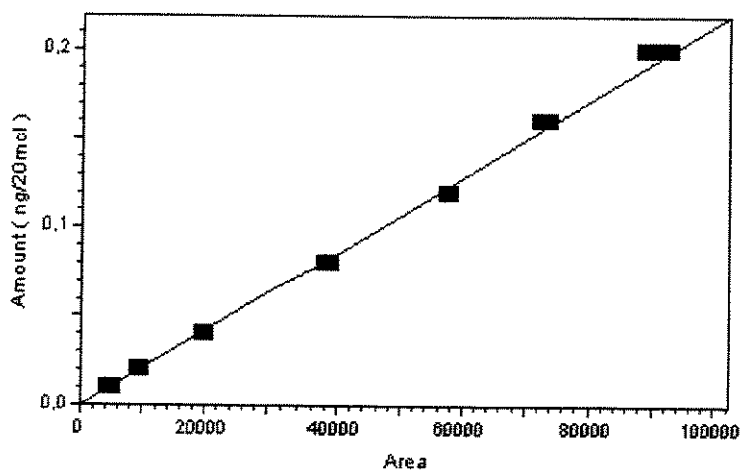


Figura 13: Curva padrão de ocratoxina A.

5.2. Taxas de Recuperação dos Métodos

A Figura 14 apresenta o cromatograma da amostra de leite materno utilizada para o estudo da recuperação do método.

A Figura 15 apresenta o cromatograma da amostra de leite materno com adição de padrão de aflatoxina M₁ e ocratoxina A para 0,01 ng/mL.

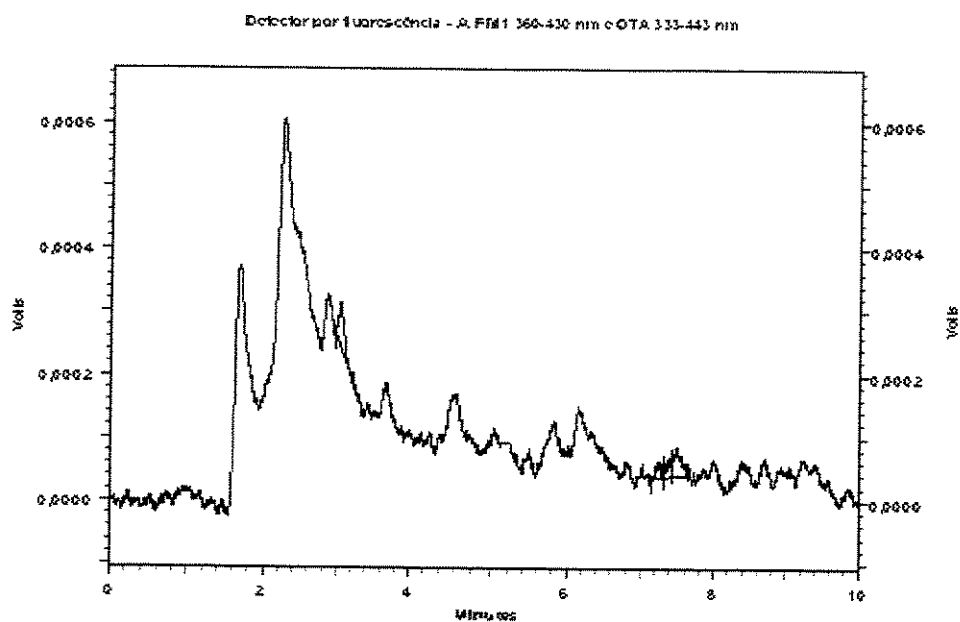


Figura 14: Cromatograma da amostra de leite materno utilizada para o estudo da recuperação do método. Condições cromatográficas estão descritas no texto.

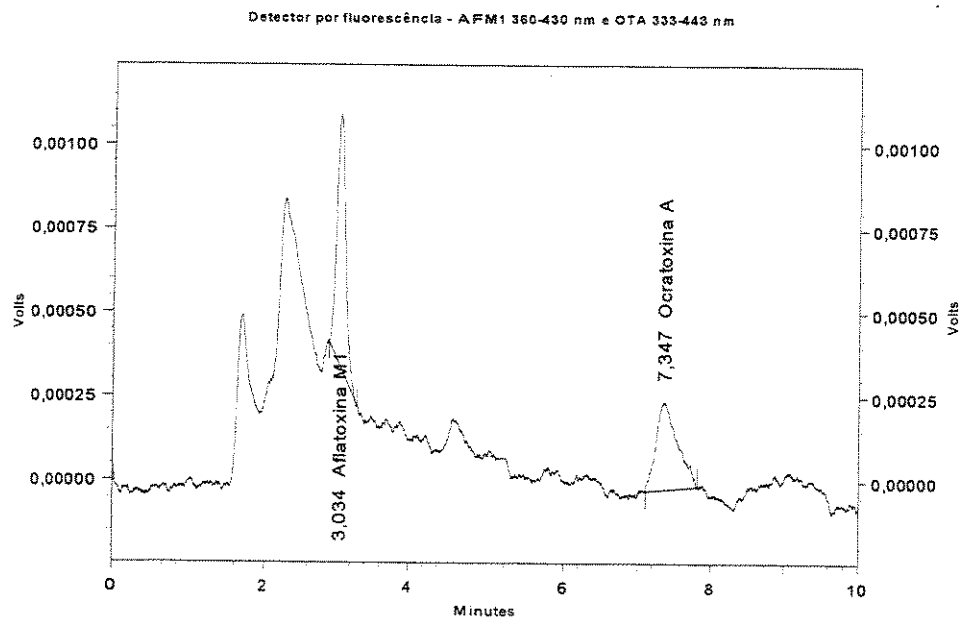


Figura 15: Cromatograma da amostra de leite materno com adição de padrão de aflatoxina M_1 e ocratoxina A na concentração de 0,01 ng/mL. Condições cromatográficas estão descritas no texto.

Picos: aflatoxina M_1 (1) ocratoxina A (2).

O estudo da recuperação do método, realizado em 5 vezes para a concentração de 0,01 ng/mL, 4 vezes para as concentrações de 0,03 e 0,05 ng/mL para AFM₁ e OTA deram os resultados apresentados nas Tabelas 4 e 5.

Tabela 4 - Resultados do estudo de recuperação de AFM₁ adicionada às amostras de leite materno (25 mL)

Quantidade adicionada (ng/mL)	Recuperação média (%)	Coefficiente de variação (%)
0,01	93,6	17,5
0,03	77,0	3,4
0,05	81,5	4,2

Tabela 5 - Resultados do estudo de recuperação de OTA adicionada às amostras de leite materno (25 mL)

Quantidade adicionada (ng/mL)	Recuperação média (%)	Coefficiente de variação (%)
0,01	83,9	14,1
0,03	84,5	3,7
0,05	75,0	4,0

Como esperado o coeficiente de variação foi maior em concentrações menores. A quantidade adicionada de 0,01 ng/ml para AFM₁ e OTA resultou em CV de 17,5% e 14,1% respectivamente. Destes resultados, pode-se concluir que o limite de quantificação para estas micotoxinas nas amostras de leite materno foi de 0,01 ng/ml.

A recuperação média obtida foi considerada satisfatória e aceitável para aflatoxina M₁ e ocratoxina A no leite materno, pelas pequenas quantidades que foram testadas e estando assim de acordo com os valores encontrados na literatura.

5.3. Teores de AFM₁ e OTA nas Amostras de Leite Materno

Os resultados obtidos na determinação de AFM₁ e OTA nas 50 amostras de leite materno, 22 no inverno e 28 no verão, de diversos tipos estão apresentados nas Tabelas 6 e 7.

Tabela 6 – Resultados das determinações realizadas em 22 amostras de leite materno do período de inverno de diversos tipos.

Mães	Tipo de leite	Nº de amostras analisadas	Nº de amostra positiva para AFM ₁	Nº de amostra positiva para OTA	Concentração ng/mL
Hospitalizadas	colostro	10	0	0	ND*
	transição	1	0	0	ND
	maduro	3	0	0	ND
	não classificado	2	0	0	ND
Não Hospitalizadas	colostro	2	1	0	0,024
	transição	1	0	0	ND
	maduro	2	0	0	ND
	não classificado	1	0	0	ND

Limite de quantificação do método: 0,01 ng/mL.

*ND: não detectado

A Figura 16 apresenta o cromatograma da amostra de leite materno contaminado com 0,024 ng/ml de AFM₁.

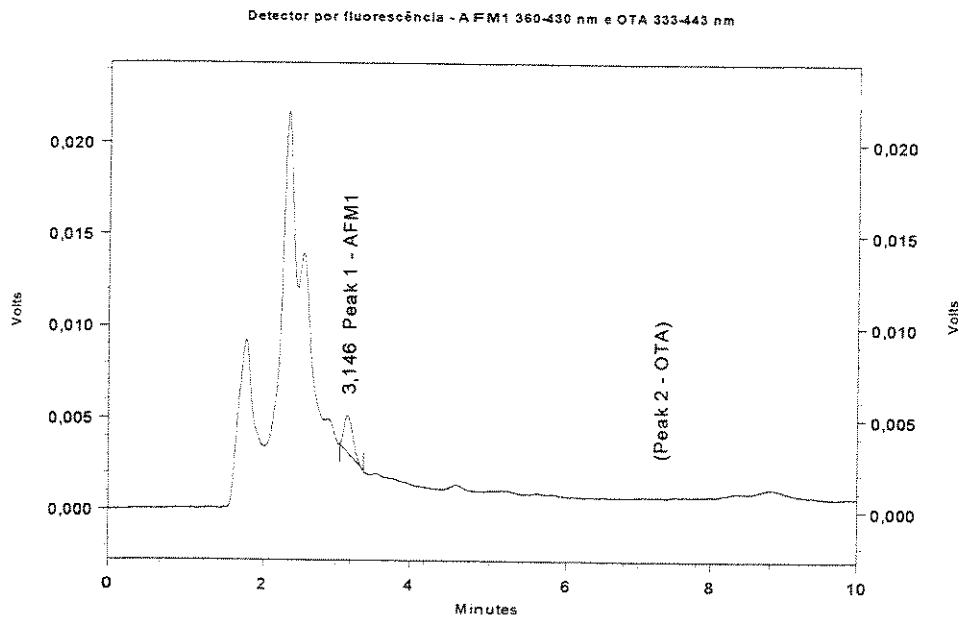


Figura 16: Cromatograma da amostra de leite materno contaminado com 0,024 ng/ml de AFM₁. Condições cromatográficas estão descritas no texto. Pico: aflatoxina M₁ (1).

Tabela 7 – Resultados das determinações realizadas em 28 amostras de leite materno do período de verão de diversos tipos.

Mães	Tipo de leite	Nº de amostras analisadas	Nº de amostra positiva para AFM ₁	Nº de amostra positiva para OTA	Concentração ng/mL
Hospitalizadas	colostro	14	0	0	ND*
	transição	2	0	1	0,024
	maduro	2	0	0	ND
	não classificado	6	0	1	0,011
Não Hospitalizadas	maduro	4	0	0	ND

Limite de quantificação do método: 0,01 ng/mL.

*ND: Não detectado

As Figuras 17 e 18 apresentam os cromatogramas das amostras de leite materno contaminados com 0,011 e 0,024 ng/ml de OTA.

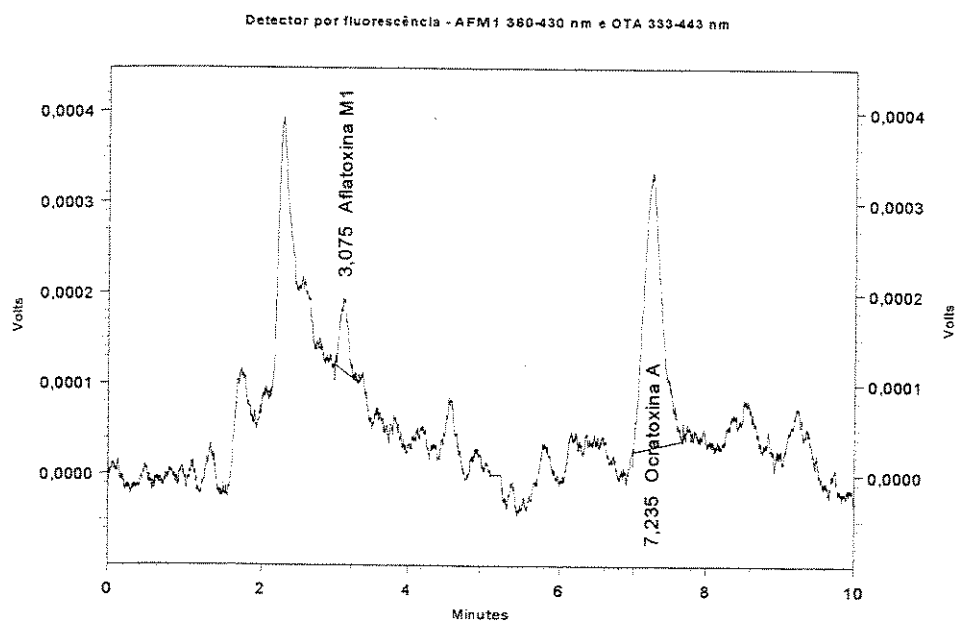


Figura 17: Cromatograma da amostra de leite materno contaminado com 0,011 ng/ml de OTA. Condições cromatográficas estão descritas no texto. Pico: ocratoxina A (2).

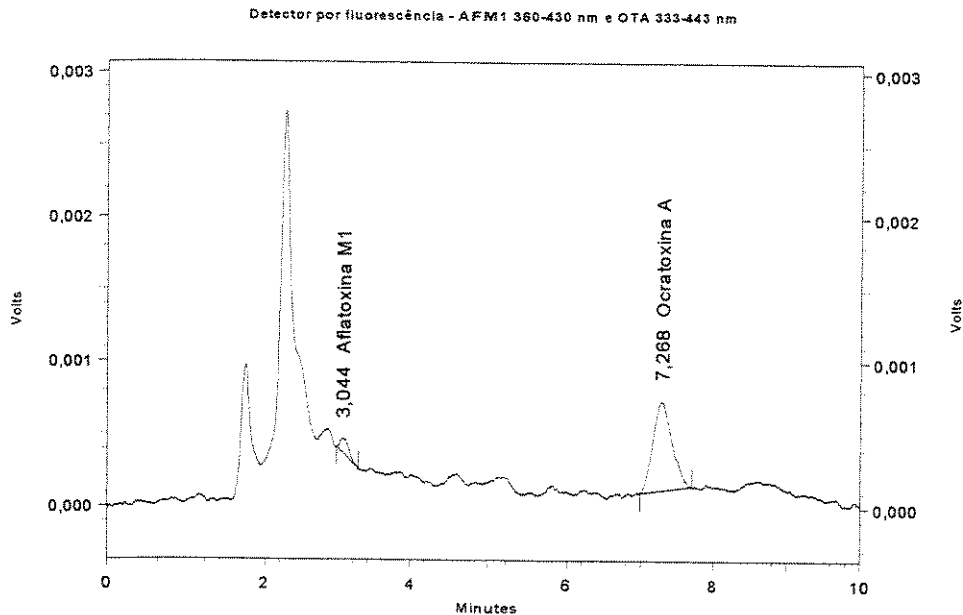


Figura 18: Cromatograma da amostra de leite materno contaminado com 0,024 ng/ml de OTA. Condições cromatográficas estão descritas no texto. Pico: ocratoxina A (2).

Os resultados das análises micotoxicológicas das 50 amostras de leite materno revelaram a presença de AFM₁ em 1 amostra (2%) e de OTA em 2 amostras (4%), obtidas no período de inverno e verão, respectivamente. Em relação a AFM₁, tais resultados estão abaixo daqueles obtidos na África (11 – 31%), na Ásia (45%), na Austrália (15%) e na União do Emirado Árabe (99,5%) (WILD *et al*, 1987; JONSYN *et al*, 1995; EL-NEZAMI *et al*, 1995; SAAD *et al*, 1995). Quanto a OTA, a incidência relatada para a Europa foi de (10 – 87%), África (35%) e Austrália (2%) (ZIMMERLI *et al*, 1995; BREITHOLTZ-EMANUELSSON *et al*, 1993; MIRAGLIA *et al*, 1995; MICCO *et al*, 1995; SKAUG *et al*, 2001; BRERA *et al*, 2001; MIRAGLIA *et al*, 1998; JONSYN *et al*, 1995, APOSTOLOU *et al*, 1998).

O teor de contaminação para AFM₁ encontrado na presente investigação (0,024 ng/mL) em leite materno está dentro das faixas encontrado em países como Abu Dhabi (faixa de 0,002 – 3,0 ng/mL) (SAAD *et al*, 1995), Austrália (de 0,028 – 1,031 ng/mL) (EL-NEZAMI *et al*, 1995) e Zimbábue (de 0,014 – 0,05 ng/mL) (WILD *et al*, 1987).

Os teores de contaminação de 0,011 e 0,024 ng/mL encontrados para OTA em leite materno em nosso trabalho, estão abaixo dos níveis de contaminação encontrados em países como Itália (faixa de 0,02 - > 1,0 ng/mL) (MIRAGLIA *et al*, 1998), (faixa de 0,017-2,350 ng/mL) (BRERA *et al*, 2001) e Noruega (faixa de 0,01-0,182 ng/mL) (SKAUG *et al*, 2001). Entretanto, os valores são comparáveis com aqueles encontrados na Suécia (0,01 – 0,04 ng/mL) (BREITHOLTZ-EMANUELSSON *et al*, 1993) e acima da faixa de contaminação encontrados na Suíça (0,005-0,014 ng/mL) (ZIMMERLI *et al*, 1995).

O baixo número de amostras contaminadas prejudicou a análise estatística da correlação com a dieta. De fato, esta baixa incidência pareceu ser surpreendente, considerando os relatos publicados, especialmente na Europa. No entanto, a incidência em alimentos no estado de São Paulo (RODRIGUEZ-AMAYA & SABINO, 2002) mostra que a possível fonte de contaminação por AFB₁ seria amendoim e produtos de amendoim e ocasionalmente milho. A presença de AFB₁ nestes produtos ingeridos pelas mães possibilita a bioativação desta toxina para AFM₁ que será detectada no leite. Entretanto, a única mãe que produziu leite contaminado não consumiu amendoim e nem milho. (Tabela 8). Por outro lado,

mães que consumiram produto de amendoim e milho produziram leite não contaminado.

Quanto a OTA, a incidência de alimentos contaminados no estado de São Paulo demonstrou a presença desta toxina em várias amostras de café, embora em baixas concentrações (RODRIGUEZ-AMAYA & SABINO, 2002). As duas mães que tiveram leite contaminado, de fato, tomaram café / café com leite. Entretanto, várias mães cujo leite não apresentou contaminação, também consumiram café / café com leite.

Quanto à amostra positiva para AFM_1 , não houve a possibilidade de correlação com a dieta alimentar consumida pela mãe, devido à ausência na alimentação de amendoim, produtos de amendoim, milho e produtos de milho fonte de contaminação para AFM_1 no estado de São Paulo, entretanto como o questionário foi respondido sem a nossa presença, acreditamos que algumas falhas pode ter ocorrido nas informações. Sabe-se que a AFM_1 , em leite de vaca é transitório, normalmente obtendo um pico no prazo de 02 dias após a ingestão do alimento contaminado com AFB_1 e desaparecendo do leite em 4 a 5 dias após a eliminação do alimento contaminado. Entretanto, esta informação com relação ao leite humano não foi encontrada na literatura, possivelmente este tipo de estudo ainda não foi efetuado.

Tabela 8 –Dieta alimentar das mães em que as amostras deram resultados positivos para AFM₁ e OTA no leite materno.

Alimentos	Consumo pela mãe com amostra positiva para AFM₁	Consumo pela mãe com amostra positiva para OTA	Consumo pela mãe com amostra positiva para OTA
Amendoim	não	não	não
Arroz	sim	sim	sim
Café	sim	sim	não
Café com leite	sim	sim	sim
Carne branca	não	sim	sim
Carne vermelha	sim	sim	sim
Cerveja	não	não	não
Farelo de arroz	não	sim	não
Feijão	sim	não	sim
Frutas	sim	sim	sim
Frutas Secas	não	sim	não
Margarina	sim	não	não
Milho	não	sim	não
Pão	sim	sim	sim
Produtos de amendoim	não	sim	não
Produtos de milho	não	sim	não
Verduras	sim	sim	sim

Quanto às amostras positivas para OTA, em uma delas houve a possibilidade de correlação com a dieta alimentar consumida pela mãe, devido à presença de café na alimentação, enquanto que, para outra amostra não houve a possibilidade de correlação devido à ausência na alimentação de café, fonte de contaminação para ocratoxina A.

Uma análise das respostas dos questionários sobre a dieta alimentar das mães em que os resultados foram negativos para AFM₁ e OTA está descrita na Tabela 9.

Tabela 9 –Dieta alimentar das mães em que as amostras deram resultados negativos para AFM₁ e OTA no leite materno.

Alimentos	Consumo pelas mães no período de inverno	Consumo pelas mães no período de verão	Total de Mães
Café	17	20	37
Café com leite	18	24	42
Amendoim ou produtos de amendoim	12	13	25
Milho ou produtos de milho	20	18	38

6. CONCLUSÕES

1. Os métodos estabelecidos para detecção de AFM₁ e OTA em leite materno apresentaram desempenho satisfatório.
2. O limite de quantificação do método para AFM₁ e OTA foi de 0,01 ng/mL.
3. Houve baixa incidência de AFM₁ e OTA nas amostras de leite materno analisadas.
4. Não houve correlação entre a incidência de AFM₁ e OTA com a dieta consumida pelas mães.
5. Apesar da baixa incidência, os resultados demonstram que crianças alimentadas com leite materno, possivelmente fiquem expostas a contaminação por aflatoxina M₁ e ocratoxina A.

7. RECOMENDAÇÃO PARA INVESTIGAÇÃO FUTURA

Embora os resultados encontrados na presente pesquisa sejam indicativos da baixa incidência de AFM₁ e OTA, recomenda-se a continuidade de estudos desta natureza em outras regiões do país. Tal fato, caso se concretize, contribuirá para a obtenção de um panorama amplo da contaminação do leite materno por AFM₁ e OTA e a disponibilidade de método com desempenho adequado deve incentivar tal ampliação do estudo.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ANDRELLOS, P.J.; BECKWITH, A.C.; EPPLEY, R.M. Photochemical changes of aflatoxin B₁. *J. Ass. Off Anal. Chem.* Washington, v. 49, p. 1268, 1966.
2. ANDRELLOS, P.J.; BECKWITH, A.C.; EPPLEY, R.M. Photochemical changes of aflatoxin B₁. *J. Ass. Off Anal. Chem.* Washington, v. 50, p. 346-350, 1967.
3. APOSTOLOU, E.; EL-NEZAMI, H.S.; AHOKAS, J.T.; DONOHUE, D.C. The evaluation of ochratoxin A in breast milk in Victoria (Australia). *Rev. Méd. Vét. Toulouse*, v. 149, n. 6, p.709, 1998.
4. APPLEBAUM, R.S.; BRACKETT, R.E.; WISEMAN, D.W.; MARTH, E.H. Aflatoxin: toxicity to dairy cattle and occurrence in milk and milk products – a review. *J. Food Prot.* Ames, v. 45, n. 8, p. 752-777, 1982.
5. ASAO, T.; BUCHI, G.; ABDEL-KADER, M.M.; CHANG, S.B.; WICK, E.L.; WOGAN, G.N. Aflatoxins B and G. *J. Am. Chem. Soc.* 85, p. 1706-1707, 1963.
6. ASAO, T.; BUCHI, G.; ABDEL-KADER, M.M.; CHANG, S.B.; WICK, E.L.; WOGAN, G.N. The structures of aflatoxins B and G. *J. Am. Chem. Soc.* 87, p. 882-886, 1965.
7. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. Official methods of Analysis of AOAC. 15. ed. Arlington: AOAC, 1990. Cap. 49.

8. BAILEY, G.S. Role of Aflatoxin – DNA Adducts in the Cancer Process. In: EATON, D.L.; GROOPMAN, J.D., eds. *The toxicology of aflatoxins: human health, veterinary and agricultural significance*, San Diego: Academic Press, 1994. p.137-148.
9. BARNES, J.M. Aflatoxins as health hazard. *J. Appl. Bacteriol.* 33, p. 285-298, 1970.
10. BREITHOLTZ-EMANUELSSON, A.; OLSEN, M.; OSKARSSON, A.; PALMINGER, I.; HULT, K. Ochratoxin A in cow's milk and in human milk with corresponding human blood samples. *J. of AOAC International*, v. 76, n. 4, p. 842-846, 1993.
11. BRERA, C.; MIRAGLIA, M.; AMBRUZZI, M.A; CALFAPIETRA, F.R.; PAZZAGLINI, B.; GROSSI, S.; YAZDANPANA, H. Ochratoxin A in human milk: - Exposure assessment of babies. In: *Mycotoxins and Phycotoxins in perspective at the turn of the millennium*. W.J. de KOE, R.A. SAMSON, HANS P. Van EGMOND, J. GILBERT & M. SABINO (eds), Ponsen & Looyen, Wageningen, The Netherlands, p. 201-207, 2001.
12. BRIGIDO, B.M.; BADOLATO, M.I.C.; FREITAS, V.P.S. Contaminação de amendoim e seus produtos comercializados na região de Campinas – SP., por aflatoxinas durante o ano de 1994. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, v. 55, n. 2, p. 85-90, 1995.

13. CAMPBELL, T.C.; SINNHUBER, R.O.; LEE, D.J.; WALES, J.H.; SALAMAT, L. Hepatocarcinogenic material in urine specimens from humans consuming aflatoxin. *J. Natl. Cancer Inst.*, v. 52, p. 1647-1649, 1974.
14. CAMPBELL, T.C.; CAEDO, Jr., J.P.; BULATAO, J.J.; SALAMAT, L.; ENGLE, R.W. Aflatoxin M₁ in human urine. *Nature*, London, v. 227, p. 403-404, 1979.
15. CHASIN, A.A.M., CHASIN, M., SALVADORI, M.C. Validação de métodos cromatográficos em análises toxicológicas. *Rev. Farm. Bioquim. Univ. São Paulo*. São Paulo, v. 30, p. 49-53, 1994.
16. CHUTURGOON, A.; RAMAN, G.; BUX, S.; MOODLEY, S.; DUTTON, M. Aflatoxin B₁ metabolism in the rat liver mitochondrion. *Rev. Méd. Vét. Toulouse*, v. 149, n. 6, p. 575, 1998.
17. CORRÊA, B.; GALHARDO, M.; COSTA, E.O.; SABINO, M. Distribution of molds and aflatoxins in dairy cattle feeds and raw milk. *Rev. Microbiologia*, v. 28, p. 279-283, 1997.
18. DIRHEIMER, G. Recent advances in the genotoxicity of mycotoxins. *Rev. Méd. Vét. Toulouse*, v. 149, n. 6, p.605-616, 1998.
19. EATON, D.L.; MONROE, D.H.; BELLAMY, G.; KALMAN, D.A. Identification of a novel dihydroxy metabolite of aflatoxin B₁ produced in vitro and in vivo rats and mice. *Chem. Res. Toxicol.* Washington, v. 1, p. 108-114, 1988.

20. EATON, D.L.; RAMSDELL, H.S.; NEAL, G.E. Biotransformation of aflatoxins.
In: EATON, D.L.; GROOPMAN, J.D., eds. *The toxicology of aflatoxins: human health, veterinary and agricultural significance*, San Diego: Academic Press, 1994. p. 45-72.
21. EGMOND, H.P.van. Mycotoxins in dairy products. *Food Chem. Barking*, v. 11, p. 289-307, 1983.
22. EGMOND, H.P.van. Aflatoxin in milk. In: EATON, D.L.; GROOPMAN, J.D., eds. *The toxicology of aflatoxins: human health, veterinary and agricultural significance*, San Diego: Academic Press, 1994, p. 365-381.
23. EL-NEZAMI, H.S.; NICOLETTI, G.; NEAL, G.E.; DONOHUE, D.C.; AHOKAS, J.T. Aflatoxin M₁ in human breast milk samples from Victoria, Australia and Thailand. *Food. Chem. Toxicol. Oxford*, v. 33, n. 3, p. 173-179, 1995.
24. FONSECA, H.; VALARINI, I.; DOMINGUES, M.A.C.; WETTSTEIN, A.S.R.; SILVA, A.E.G. Ocorrência de aflatoxina em amendoim, no Estado de São Paulo, durante os anos de 1988-1989. *Anais ESALQ*, v. 48, p. 301-316, 1991.
25. FORRESTER, L.M.; NEAL, G.E.; JUDAH, D.J.; GLANCEY, M.J.; WOLF, C.R. Evidence for involvement of multiple forms of cytochrome P-450 in aflatoxin B₁ metabolism in human liver. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA. Washington*, v. 87, p. 8306-8310, 1990.

26. FREITAS, V.P.S.; BADOLATO, M.I.C. Incidência de aflatoxinas em paçocas de amendoim consumidas na cidade de Campinas, estado de São Paulo. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, v. 52, n. 1/2 p. 83-87, 1992.
27. FREITAS, V.P.S.; BRIGIDO, B.M. Occurrence of aflatoxins B₁, B₂, G₁, and G₂ in peanuts and their products marketed in the region of Campinas, Brazil in 1995 and 1996. *Food Additives and Contaminants*, v. 15, n. 7, p. 807-811, 1998.
28. FRÉMY, J.M.; CHU, F.S. Immunochemical Methods of Analysis for Aflatoxin M₁. In: EGMOND, H.P.van., eds. *Mycotoxins in Dairy Products*, London: Elsevier Applied Science, 1989, p. 97-125.
29. FROBISH, R.A.; BRADLEY, B.D.; WAGNER, D.D.; LONG-BRADLEY, P.E.; HAIRSTON, H. Aflatoxin residues in milk of dairy cows after ingestion of naturally contaminated grain. *J. Food Prot. Ames*, v. 49, n. 10, p.781-785, 1986.
30. FURLANI, R.P.Z.; SOARES, L.M.V. Survey of aflatoxins, ochratoxin A, zearalenone, and sterigmatocystin in tree nuts commercialized in Campinas, São Paulo. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, v. 16, n.3, p. 238-240, 1996.
31. FURLONG, E.B.; VALENTE SOARES, L.M.; LASCA, C.C.; KOHARA, E.Y. Mycotoxins and fungi in wheat harvested during 1990 in test plots in the state of São Paulo, Brazil. *Mycopathologia*, v. 131, p. 185-190, 1995.

32. FURTADO, R.M.; PEARSON, A.M.; HOGBERG, M.G.; MILLER, E.R.
Aflatoxin residues in the tissue of pigs feed a contaminated diet. *J. Agric. Food Chem.*, v. 27, n. 6, p. 1351-1354, 1979.
33. GALTIER, P. Biological fate of mycotoxins in animais. *Rev. Méd. Vét.* Toulouse, v. 149, n. 6, p. 549-554, 1998.
34. GALVANO, F.; GALOFARO, V.; GALVANO, G. Occurrence and stability of Aflatoxin M₁ in milk and milk products: a worldwide review. *J. Food Prot.* Ames, v. 59, n. 10, p. 1079-1090, 1996.
35. GARNER, R.C.; MILLER, E.C.; MILLER, J.A. Liver microsomal metabolism of aflatoxin B₁ to a reactive derivative toxic to *Salmonella typhimurium* TA 1530. *Cancer Res.*, v. 32, p. 2058-2066, 1972.
36. GLÓRIA, E.M.; FONSECA, H.; SOUZA, I.M. Occurrence of mycotoxins in maize delivered to the food industry in Brazil. *Trop. Sci.*, v. 37, p.107-110, 1997.
37. GREGORY, J.F.III; MANLEY, D.B. High performance liquid chromatographic determination of aflatoxins in animal tissues and products. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, Washington, v. 64, p. 144-151, 1981.
38. GROOPMAN, J.D.; BUSBY, W.F.; DONAHUE, P.R.; WOGAN, H.N. Aflatoxins as risk factors for liver cancer: An application of monoclonal antibodies to monitor human exposure. In: HARRIS, C.C. (ed).

- Biochemical and Molecular Epidemiology of Cancer*, New York, Allan. R. Liss, p. 233-256, 1986.
39. HSIEH, D.P.H. Metabolism and transmission of mycotoxins. In: *Proceedings of the International Symposium on Mycotoxins*, Cairo, 1981, p. 151-165, 1983.
 40. HSIEH, D.P.H.; WONG, J.P. Pharmacokinetics and excretion of aflatoxins. In: EATON, D.L.; GROOPMAN, J.D., eds. *The toxicology of aflatoxins: human health, veterinary and agricultural significance*, San Diego: Academic Press, 1994. p. 73-88.
 41. IARC. *Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans*, vol. 10, Some Naturally Occurring Substances, Lyon, p. 51-72, 1976.
 42. IARC. *Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans*, vol. 31, Some Food Additives, Feed Additives and Naturally Occurring Substances, Lyon, p. 314, 1983.
 43. IARC. *Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans*, vol. 56, Some Naturally Occurring Substances: Food Items and Constituents, Heterocyclic Aromatic Amines and Mycotoxins, Lyon, p. 256-258 e 523, 1993.
 44. JONSYN, F.E.; MAXWELL, S.M.; HENDRICKSE, R.G. Ochratoxin A and aflatoxins in breast milk samples from Sierra Leone. *Mycopathologia*, v. 131, p. 121-126, 1995.

45. KUIPER-GOODMAN, T. Risk Assessment of Mycotoxins. In: *Mycotoxins and Phycotoxins '88*. S. NATORI, K. HASHIMOTO & Y. UENO (eds), Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, The Netherlands, p.257-264, 1989.
46. LAFONT, P.; PLATZER, N.; SIRIWARDANA, M.G.; SARFATI, J.; MERCIER, J.; LAFONT J. Un nouvel hydroxy-dérivé de l'aflatoxine B₁: l'aflatoxine M₄. I. Production *in vitro* – structure. *Microbiol. Aliment. Nut.*, v. 4, p. 65-74, 1986a..
47. LAFONT, P.; LAFONT, J. Génotoxicité des hydroxy-aflatoxines du lait. Abstract at Journées d'Etudes: Moisissures et Levures indésirable en Industrie Agro-Alimentaire, Paris, France, November, p. 25-27, 1987.
48. LANCASTER, M.C. Mycotoxins in ruminants. *Proc. Nutr. Soc.*, v. 28, p.203-212, 1969.
49. LEONI, L.A.B.; VALENTE SOARES, L.M.; OLIVEIRA, P.L.C. Ochratoxin A in Brazilian roasted and instant coffees. *Food Additives and Contaminants*, v. 17, n. 10, p. 867-870, 2000.
50. LILLEHOJ, E.B. Aflatoxin: an ecological elicited genetic activation signal. In: SMITH, J.E. & HENDERSON, R.S. *Mycotoxins And Animal Foods*. London, CRC Press, 1991, 875 ps.
51. LYNCH, G.P. Mycotoxins in feedstuffs and their effect on dairy cattle. *J. Dairy Sci.*, v. 55, p. 1243-1255, 1972.

52. MICCO, C.; MIRAGLIA, M.; BRERA, C.; CORNELI, S.; AMBRUZZI, A.
Evaluation of ochratoxin A level in human milk in Italy. *Food Additives and Contaminants*, v. 12, n. 3, p. 351-354, 1995.
53. MIRAGLIA, M.; DE DOMINICIS, A.; BRERA, C.; CORNELI, S.; CAVA, E.; MENGHETTI, E.; MIRAGLIA, E. Ochratoxin A Levels in Human Milk and Related Food Samples: An Exposure Assessment. *Natural Toxins*, v. 3, p. 436-444, 1995.
54. MIRAGLIA, M.; BRERA, C.; CAVA, E.; CALFAPIETRA, F.R. The evaluation of major sources of ochratoxin A (OA) intake through the analysis of OA in biological fluids in Italy. *Rev. Méd. Vét. Toulouse*, v. 149, n. 6, p.711, 1998.
55. MOSS, E.J.; NEAL, G.E. The metabolism of aflatoxin B₁ by human liver. *Biochem. Pharmacol. Oxford*, v. 34, n. 17, p. 3193-3197, 1985.
56. MOSS, M.O. Mode of formation of ochratoxin A. *Food Additives and Contaminants*, v. 13, Supplement, p. 5-9, 1996.
57. NEAL, G.E.; EATON, D.L.; JUDAH, D.J.; VERMA, A. Metabolism and toxicity of aflatoxins M₁ and B₁ in human-derived *in Vitro* systems. *Toxicol. Appl. Pharmacol. New York*, v. 151, p. 152-158, 1998.
58. OLIVEIRA, C.A.F.; GERMANO, P.M.L.; BIRD, C.; PINTO, C.A. Immunochemical assessment of aflatoxin M₁ in milk powder consumed by infants in São Paulo, Brazil. *Food Additives and Contaminants*, v. 14, n.1, p. 7-10, 1997.

59. PARKER, W.A.; MELNICK, D. Absence of aflatoxin from refined vegetable oils. *J. Am. Oil Chem. Soc.* Champaign, v. 43, p. 635-638, 1966.
60. PITTET, A. Natural occurrence of mycotoxins in foods and feeds – an updated review. *Rev. Méd. Vét.* Toulouse, v. 149, n. 6, p. 479-492, 1998.
61. POZZI, C.R.; CORRÊA, B.; GAMBALE, W.; PAULA, C.R.; CHACON-RECHE, N.O.; MEIRELLES, M.C.A. Postharvest and stored corn in Brazil: mycoflora interaction, abiotic factors and mycotoxin occurrence. *Food Additives and Contaminants*, v. 12, n. 3, p. 313-319, 1995.
62. RAMSDELL, H.S.; EATON, D.L. Species susceptibility to aflatoxin B₁ carcinogenesis: comparative kinetics of microsomal biotransformation. *Cancer Res.* Philadelphia, v. 50, p. 615-620, 1990.
63. ROBERTS, B.A.; GLANCY, E.M.; PATTERSON, D.S.P. Rapid economical method for determination of aflatoxin and ochratoxin in animal feedstuffs. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, Washington, v. 64, p. 961-963, 1981.
64. RODRICKS, J.V.; STOLOFF, L. Aflatoxin residues from contaminated feed in edible tissues of food-producing animals. In: RODRICKS, J.V.; HESSELTINE, C.W. & MEHLMAN, M.A. (ed.). *Mycotoxin in Human and Animal Health*, Park Forest, Illinois, Pathotox, p. 67-79, 1977.
65. RODRIGUEZ-AMAYA, D.B.; SABINO, M. Mycotoxin research in Brazil: the last decade in review. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 33, p.1-11, 2002.

66. SAAD, A.M; ABDELGADIR, A.M.; MOSS, M.O. Exposure of infants to aflatoxin M₁ from mothers' breast milk in Abu Dhabi, UAE. *Food Addit. Contam.* London, v. 12, n. 2, p. 255-261, 1995.
67. SABBIONI, G.; SKIPPER, P.L; BÜCHI, G.; TANNENBAUM, S.R. Isolation and characterization of the major serum albumin adduct formed by aflatoxin B₁ *in vivo* in rats. *Carcinogenesis*. London, v. 8, n. 6, p. 819-824, 1987.
68. SABINO, M.; INOMATA, E.I.; LAMARDO, L.C.A.; MILANEZ, T.V.; NAVAS, S.A.; ZORZETTO, M.A.P. A survey of the occurrence of aflatoxins in groundnuts (peanuts) and groundnut products in São Paulo state/Brazil in 1994. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, v. 58, n. 1, p. 53-57, 1999.
69. SABINO, M.; MILANEZ, T.V.; LAMARDO, L.C.A.; INOMATA, E.I.; ZORZETTO, M.A.P.; NAVAS, S.A.; STOFER, M. Occurrence of aflatoxins in peanuts and peanut products consumed in the state of São Paulo/Brazil from 1995 to 1997. *Rev. Microbiologia*, v. 30, n. 1, p. 85-88, 1999a.
70. SCOTT, DE B. *Mycopathol. Mycol. Appl.*, v.25, p. 213-222, 1965.
71. SCOTT, P.M.; TRUCKSESS, M.W. Application of Immunoaffinity Columns to Mycotoxin Analysis. *J. of AOAC International*, v. 80, n. 5, p. 941-949, 1997.

72. SKAUG, M.A.; HELLAND, I.; SOLVOLL, K.; SAUGSTAD, O.D. Presence of ochratoxin A in human milk in relation to dietary intake. *Food Addit. Contam.* London, v. 18, n. 4, p. 321-327, 2001.
73. STEYN, P.S. Ochratoxins and related Dihydroisocoumarins. In: BETINA, V., ed. *Mycotoxins – Production, Isolation, Separation and Purification*, Amsterdam: Elsevier Science Publishers B.V., 1984, p. 183-216.
74. STEYN, P.S. The biosynthesis of mycotoxins. *Rev. Méd. Vét. Toulouse*, v. 149, n. 6, p. 469-478, 1998.
75. STOLOFF, L. Mycotoxin residues in edible animal tissues. In: *Interaction of mycotoxins in animal production*. National Academy of Sciences, Washington DC, 1979, p. 157-166.
76. STOLOFF, L.; TRUCKSESS, M.W. Distribution of aflatoxins B₁ and M₁ in contaminated calf and pig livers. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* Washington, v. 62, n.6, p. 1361-1362, 1979.
77. STOLOFF, L. Aflatoxin M in perspective. *J. Food Prot. Ames*, v. 43, n. 3, p. 226-230, 1980a.
78. STOLOFF, L. Aflatoxin control: past and present. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* Washington, v. 63, n. 5, p. 1067-1073, 1980b.
79. STUBBLEFIELD, R.D.; PIER, A.C.; RICHARD, J.L.; SHOTWELL, O.L. Fate of aflatoxins in tissues fluids and excrements from cows dosed orally with aflatoxin B₁. *Am. J. Vet. Res.*, v. 44, p. 1750-1752, 1983.

80. SYLOS, C.M.; RODRIGUEZ-AMAYA, D.B.; CARVALHO, P.R.N. Occurrence of aflatoxin M₁ in milk and dairy products commercialized in Campinas, Brazil. *Food Additives and Contaminants*, v. 13, n. 2, p. 169-172, 1996.
81. TAVEIRA, J.A. Ocorrência de Aflatoxina M₁ em leite comercializado na cidade de São Paulo. São Paulo, 2000.100ps. (Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP).
82. TRUCKSESS, M.W. Rapid Analysis (Thin Layer Chromatographic and Immunochemical Methods) for Mycotoxins in Foods and Feeds. In: *Mycotoxins and Phycotoxins in perspective at the turn of the millennium*. W.J. de KOE, R.A. SAMSON, HANS P. Van EGMOND, J. GILBERT & M. SABINO (eds), Ponsen & Looyen, Wageningen, The Netherlands, p. 29-40, 2001.
83. TRUCKSESS, M.W.; RICHARD, J.L.; STOLOFF, L; McDONALD, J.S.; BRUMLEY, W.C. Absorption and distribution patterns of aflatoxicol and aflatoxins B₁ and M₁ in blood and milk of cows given aflatoxin B₁. *Am. J. Vet. Res.*, v. 44, p. 1753-1756, 1983.
84. TUINSTRA, L.G.M.Th. & BRONGEEST, J.M. Determination of aflatoxin M₁ in milk at the parts per trillion level. *J. Chromatogr. Amsterdam*, v. 111, p. 448-451, 1975.

85. VALENTE SOARES, L.M.; FURLANI, R.P.Z. Survey of mycotoxins in wheat and wheat products sold in health food stores of the city of Campinas, state of São Paulo. *Rev. Microbiologia*, v. 27, n. 1, p. 41-45, 1996.
86. VALENTE SOARES, L.M.; FURLANI, R.P.Z. Survey of aflatoxins, ochratoxin A, zearalenone and sterigmatocystin in health foods and breakfast cereals commercialized in the city of Campinas, São Paulo. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, v. 16, n. 2, p. 126-129, 1996a.
87. VAN DER MERWE, K.J.; STEYN, P.S.; FOURIE, L.; SCOTT, DeB.; THERON, J.J. Ochratoxin A, a toxic metabolite produced by *Aspergillus ochraceus* Wilh. *Nature*, v. 205, p.1112-1113, 1965.
88. WILD, C.P.; PIONNEAU, F.A.; MONTESANO, R.; MUTIRO, C.F.; CHETSANGA, C.J. Aflatoxin detected in human breast milk by immunoassay. *Int. J. Cancer*, v. 40, p. 328-333, 1987.
89. WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Evaluation of certain food additives and contaminants: forty-sixth report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives*. (WHO technical report series; 868), Genebra, p. 45, 1997.
90. YOUSEF, A.E.; MARTH, E.H. Degradation of aflatoxin M₁ in milk by ultraviolet energy. *J. Food Prot. Ames*, v. 48, n. 8, p. 697-698, 1985.
91. ZHU, J.Q.; ZHANG, L.S.; HU, X.; XIO, Y.; CHEN, J.S.; XU, Y.C.; FREMY, J.; CHU, F.S. Correlation of dietary aflatoxin B₁ levels with excretion of aflatoxin M₁ in human urine. *Cancer Res.*, v. 47, p. 1848-1852, 1987.

92. ZIMMERLI, B.; DICK, R. Determination of ochratoxin A at the ppt level in human blood, serum, milk and some foodstuffs by high-performance liquid chromatography with enhanced fluorescence detection and immunoaffinity column cleanup: methodology and Swiss data. *Journal of Chromatography B*, v. 666, p. 85-99, 1995.

ANEXOS

ANEXO I

PESQUISA DE AFLATOXINA M₁ E OCRATOXINA A EM LEITE HUMANO

Consentimento livre e informativo

Eu, _____,

RG.: _____, mãe do bebê _____,

residente _____,

Bairro: _____, CEP: _____, Cidade: _____.

Concordo em participar da pesquisa em parceria com o Instituto Adolfo Lutz, para onde estou doando espontaneamente o meu leite excedente às necessidades do meu filho.

Estou de acordo em responder o questionário sobre a minha gravidez e alimentação, e também, sobre as condições em que retirei o leite e este como foi conservado.

Se por algum motivo decidir não mais participar desta pesquisa, terei liberdade de recusar e retirar o consentimento sem penalização, com comunicação imediata ao médico responsável, sem interrupção do processamento da análise do leite.

São Paulo, ____ de _____ de _____.

Assinatura da Doadora

Pesquisadora do BLH

ANEXO II

PESQUISA DE AFLATOXINA M₁ E OCRATOXINA A EM LEITE HUMANO

QUESTIONÁRIO PARA DOADORAS - PROTOCOLO DE PESQUISA:

Data: ___ / ___ / _____

Ficha doadora nº _____

Doação: () Rotina

() Eventual

() Exclusiva

Dados Pessoais

Nome: _____ Data de Nasc.: ___ / ___ / _____

Peso: _____

Altura: _____

Estado Civil: () casada () solteira () viúva () amasiada

Endereço: _____

Bairro: _____ Cidade: _____ CEP: _____

Tel.: _____ Ponto de Referência _____

Dados Sócio-Econômicos

Profissão: _____ Trabalha: () sim () não Jornada: ___ horas

Grau de escolaridade: () 1º grau _____ () 2º grau _____ () 3º grau _____

Renda Familiar: () de 1 a 3 salários min. () de 4 a 6 salários min. () + 7 salários min.

Moradia: () própria () alugada () água encanada () esgoto () fossa

() rede elétrica

Possui: () geladeira () freezer - condição do equipamento _____

Dados Complementares

Pré-natal da última gravidez? () sim () não

Exames pré-natal () sim () não Quais? _____

Parto: () normal () cesárea () fórceps

Idade gestacional: () pré-termo () termo () pós-termo _____ semanas

Amamentação anterior: () sim () não tempo: _____

História Progressa

() sarampo () catapora () rubéola () coqueluche () caxumba () sífilis

() hepatite () tuberculose () pneumonia () chagas () toxoplasmose

() diabetes () anemia () alergia () hipertensão

Nº de parceiros sexuais: _____

Uso de drogas: () sim () não - Quanto tempo _____ Qual? _____

Uso de medicamentos: () sim () não - Quais? _____ dose _____

Uso de transfusão sanguínea: () sim () não - Quando? _____

Uso de bebidas alcoólicas: () sim () não - Quantas dose/dia? _____

Uso de fumo: () sim () não - Quantos cigarros/dia? _____

Ordenha e doação

Doadora: () nova () já cadastrada - Quanto tempo? _____

() Você recebeu orientação sobre ordenha () amamentação de quem? _____

Quais os cuidados de higiene que você tem antes e durante a ordenha?

() higiene das mãos () higiene das mamas () cabelos presos () máscara

() gorro () outros _____

Aonde realiza a ordenha? _____

Que frasco você acondiciona? () esterilizado em casa () oferecido pelo BLH

Condições de estocagem? () refrigerado () congelado

(F = freezer, C = congelador da geladeira)

Tipo de ordenha: () manual () bomba manual () bomba elétrica

Classificação: () colostro () transição () maduro

Alimentação das mães internas

() dias anteriores a internação

() durante a internação

Café da manhã: _____

Almoço: _____

Jantar: _____

Outros produtos consumidos antes da internação e sua frequência:

- () amendoim () doce de amendoim () paçoca () pé de moleque () ovinhos de amendoim () milho () fubá () farinha de milho () pipoca () bolo de milho () curau () canjica () aveia () soja () farelo de arroz () cevada () frutas secas () nozes () farinha de cereais () castanha do Pará () centeio () café

Alimentação semanal das mães externas

Café da manhã: _____

Almoço: _____

Jantar: _____

Outros produtos consumidos durante a semana e sua freqüência:

- amendoim doce de amendoim paçoca pé de moleque ovinhos de amendoim milho fubá farinha de milho pipoca bolo de milho curau canjica aveia soja farelo de arroz cevada frutas secas nozes farinha de cereais castanha do Pará centeio café

Responsável pela entrevista: _____ Data: ____/____/____

Avaliação da doadora pelo responsável do BLH:

- Doadora Apta Inapta

Data: ____/____/____

Assinatura Médica