

**UNIVERSIDADE JOSÉ DO ROSÁRIO VELLANO  
UNIFENAS**

**MICROBIOTA FÚNGICA E AFLATOXINAS EM  
ALIMENTOS DESTINADOS A CABRAS:  
AFLATOXINA M<sub>1</sub> NO LEITE PRODUZIDO EM  
DIFERENTES CONDIÇÕES CLIMÁTICAS.**

**POLIANA DE OLIVEIRA COELHO**

Alfenas – MG

2010

**UNIVERSIDADE JOSÉ DO ROSÁRIO VELLANO  
UNIFENAS**

**MICROBIOTA FÚNGICA E AFLATOXINAS EM  
ALIMENTOS DESTINADOS A CABRAS:  
AFLATOXINA M<sub>1</sub> NO LEITE PRODUZIDO EM  
DIFERENTES CONDIÇÕES CLIMÁTICAS.**

**POLIANA DE OLIVEIRA COELHO**

Dissertação apresentada à Universidade José do Rosário Vellano, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre, do Curso de Pós-Graduação Stricto Sensu Mestrado em Ciência Animal.

Orientador: Prof. Dr. João Evangelista Fiorini

Co-Orientador: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Nelma de Mello Silva Oliveira

Alfenas – MG

2010

Coelho, Poliana de Oliveira

Microbiota fúngica e aflatoxinas em alimentos destinados a cabras: aflatoxina M<sub>1</sub> no leite produzido em diferentes sistemas e condições climáticas/. -- Poliana de Oliveira Coelho. -- Alfenas: UNIFENAS, 2010.

104 fls

Orientador: Prof. Dr. João Evangelista Fiorini

Dissertação/ Mestrado em Ciência Animal - Universidade José do Rosário Vellano

1. Aflotoxina 2. *Aspergillus flavus* 3. Leite de cabra.

CDU: 636.084 (043)

**UNIVERSIDADE JOSÉ DO ROSÁRIO VELLANO  
UNIFENAS**

**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

**Título:** “ Microbiota fúngica e aflatoxinas em alimentos destinados a cabras: Aflatoxina M<sub>1</sub> no leite produzido em diferentes condições climáticas”.

**Autora:** Poliana de Oliveira Coelho

**Orientador:** Prof. Dr. João Evangelista Fiorini

---

Prof. Dr. João Evangelista Fiorini  
(ORIENTADOR – TITULAR)

---

Prof. Dr. Denismar Alves Nogueira  
(TITULAR)

---

Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Nelma de Mello Silva Oliveira  
(TITULAR)

---

Prof. Dr. Luiz Carlos do Nascimento  
(SUPLENTE – UNIFAL)

---

Prof. Dr. Adriano Bortolotti da Silva  
(SUPLENTE – UNIFENAS)

---

Prof. Dr. Adauton Vilela de Rezende  
(SUPLENTE – UNIFENAS)

Alfenas, 17de Setembro de 2010

---

Prof. Dr. João Evangelista Fiorini  
Presidente da Comissão Examinadora  
Orientador

**Dedico,**

Dedico este trabalho a Deus, por estar sempre me acompanhando nos caminhos que escolho, seja na alegria ou em momentos difíceis, mantendo a retidão do meu caráter.

## **AGRADECIMENTOS**

Considerando esta dissertação como resultado de uma árdua jornada, agradecer pode não ser tarefa fácil, nem justa. Para não correr o risco da injustiça, agradeço de antemão a todos que de alguma forma passaram pela minha vida e contribuíram para a construção e conclusão deste trabalho.

À Deus, por me orientar nos caminhos que decido percorrer e por me iluminar nas decisões a que escolho.

Ao meu orientador, Dr. João Evangelista Fiorini, pela disponibilidade em me orientar, por sua visão de excelência em tudo o que faz, contribuindo para o amadurecimento dos meus conhecimentos na área da microbiologia e pelas contribuições teóricas e práticas para a construção e conclusão da minha dissertação.

A meus pais, Homero Novais de Oliveira e Vilma Aparecida de Faria, pelo carinho e incentivo, sempre motivadores e me mostrando o valor de uma formação profissional.

Ao meu marido, Sávio José Coelho, pelo carinho e paciência, que me permitiu tranquilidade e segurança na realização desse trabalho.

Ao meu filho, Saulo de Oliveira Coelho, que é minha fonte de inspiração em qualquer escolha que faça, minha alegria nos momentos difíceis e quem torna meus dias prazerosos e vantajosos de serem vividos.

Aos proprietários das cabras, que me receberam muito bem em sua propriedade compreendendo a importância e permitindo o desenvolvimento do meu trabalho.

À FAPEMIG (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais), pelo apoio financeiro. Processo N° CBB APQ – 1503-4.01/07;

À UNIFENAS (Universidade José do Rosário Vellano), pelo suporte financeiro e laboratorial, os quais, passei boa parte do meu tempo.

À FUNED (Fundação Ezequiel Dias), em especial ao Dr. Guilherme Prado, pelo auxílio nas análises do leite de cabra coletadas.

Ao amigo Rodrigo de Souza Ferreira, que me auxiliou nas coletas de leite de cabra sempre com muita disponibilidade.

À professora Dr<sup>a</sup> Nelma de Mello Silva Oliveira e Dr<sup>a</sup> Rogéria Maria Alves, pelas orientações teóricas que enriqueceram minha dissertação.

À Luciana Rosa Alves Rufino e Grazielle Esteves Ribeiro, funcionárias do laboratório de microbiologia da Unifenas, e ao meu primo Uemenson Novais de Oliveira, que me auxiliaram no decorrer da parte prática do meu trabalho, além da amizade que tornava meus dias mais agradáveis e menos cansativos.

Ao apoio de meus amigos, que me deram animo de vencer mais essa etapa de minha vida.

## SUMÁRIO

|  |    |
|--|----|
| 1 INTRODUÇÃO.....  | 13 |
| 1.1 OBJETIVOS.....   | 15 |
| 1.1.1 Objetivo geral.....  | 15 |
| 1.1.2 Objetivos específicos.....   | 15 |
| 1.2 JUSTIFICATIVAS.....  | 17 |
| 1.3 HIPÓTESES.....   | 18 |
| 2 REVISÃO DA LITERATURA.....   | 19 |
| 2.1 A IMPORTÂNCIA DA CAPRINOCULTURA LEITEIRA.....                          | 19 |
| 2.2 O LEITE DE CABRA.....  | 19 |
| 2.2.1 Qualidade microbiológica do leite de cabra.....                      | 22 |
| 2.3 OS FUNGOS.....   | 22 |
| 2.3.1 Fatores que controlam o desenvolvimento de fungos nos alimentos..... | 24 |
| 2.3.1.1 Fatores intrínsecos.....   | 25 |
| 2.3.1.2 Fatores extrínsecos.....   | 27 |
| 2.4 AS MICOTOXINAS.....  | 28 |
| 2.5 AS AFLATOXINAS.....  | 29 |
| 2.5.1 Propriedades físico-químicas.....                                    | 30 |
| 2.5.2 Biotransformação.....  | 32 |
| 2.5.3 Excreção.....  | 34 |
| 2.5.4 Toxicidade.....  | 35 |
| 2.5.4 Aflatoxicoses.....   | 36 |
| 2.5.4.1 Aflatoxicoses em caprinos.....                                     | 36 |

|   |    |
|---|----|
| 2.5.4.2 Diagnóstico.....  | 37 |
| 2.5.4.3 Profilaxia.....   | 37 |
| 2.5.5 Legislação.....   | 38 |
| 2.5.6 Incidência de aflatoxinas em rações animais.....  | 38 |
| 2.5.7 Incidência de aflatoxinas em leite.....   | 39 |
| 2.5.8 Incidência de aflatoxinas em leite de cabra.....  | 41 |
| 3 MATERIAL E MÉTODOS.....   | 42 |
| 3.1 MATERIAL E LOCAL DE ANÁLISES E COLHEITAS.....   | 42 |
| 3.1.1 Meios de cultura e reagentes.....   | 42 |
| 3.1.2 Padrões de micotoxinas.....   | 42 |
| 3.1.3 Local de colheita de amostras.....  | 43 |
| 3.2 MÉTODOS.....  | 43 |
| 3.2.1 Colheita das amostras de concentrado e volumoso.....  | 43 |
| 3.2.2 Colheita das amostras de leite.....   | 44 |
| 3.2.3 Dados climatológicos da região.....   | 44 |
| 3.2.4 Determinação da umidade dos alimentos.....  | 44 |
| 3.2.5 Determinação da atividade de água.....  | 45 |
| 3.2.6 Padrões de micotoxinas.....   | 45 |
| 3.2.7 Isolamento dos fungos das amostras de concentrado e volumoso.....   | 45 |
| 3.2.8 Identificação dos fungos das amostras de concentrado e volumoso.....  | 46 |
| 3.2.9 Toxigenicidade das culturas de espécies do gênero <i>Aspergillus</i><br>( <i>Aspergillus flavus</i> e <i>Aspergillus spp</i> )..... | 46 |
| 3.2.9.1 Análise qualitativa.....  | 46 |
| 3.2.10 Análises micotoxicológicas das amostras de concentrado e volumoso<br>para detecção de micotoxinas.....                             | 46 |

|   |    |
|---|----|
| 3.2.10.1. Testes confirmatórios para aflatoxina B1.....                                   | 47 |
| 3.2.11 Análises micotoxicológicas das amostras de leite para aflatoxina M <sub>1</sub> .. | 47 |
| 3.2.11.1 Procedimento.....  | 48 |
| 3.2.11.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE - HPLC).....                      | 48 |
| 3.2.12 Análises estatísticas.....   | 49 |
| 3.2.12.1 O modelo estatístico.....  | 50 |
| 4 RESULTADOS e DISCUSSÃO.....   | 51 |
| 5 CONCLUSÕES.....   | 68 |
| 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....  | 70 |
| 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....   | 71 |
| 7 ANEXO .....   | 88 |

## LISTA DE QUADROS E FIGURAS

|  |    |
|--|----|
| <b>QUADRO 01</b> - Composição média de alguns componentes químicos do leite de cabra e vaca.....   | 20 |
| <b>FIGURA 01</b> - Aspecto macroscópico em placa do <i>Aspergillus flavus</i> .....  | 24 |
| <b>FIGURA 02</b> - Aspecto microscópico do esporângio do <i>Aspergillus flavus</i> .....   | 28 |
| <b>FIGURA 03</b> - Esporângios de <i>Aspergillus</i> (com esporos).....  | 28 |
| <b>FIGURA 04</b> - Estrutura química das principais aflatoxinas.....   | 31 |
| <b>FIGURA 05</b> - Aspecto cromatográfico da aflatoxina M <sub>1</sub> .....   | 32 |
| <b>FIGURA 06</b> - Metabolismo da aflatoxina B <sub>1</sub> .....  | 33 |
| <b>FIGURA 07</b> - Colheita da amostra de volumoso da Fazenda 2.....   | 44 |
| <b>FIGURA 08</b> - Gêneros e espécies de fungos algodonosos identificados nas três propriedades em estudo.....                                       | 53 |
| <b>FIGURA 09</b> - Número de colônias fúngicas no período da seca e chuva estudadas na fazenda 1 (FAZ.1), fazenda 2 (FAZ.2) e fazenda 3 (FAZ.3)..... | 54 |
| <b>FIGURA 10</b> - Valores referentes ao número de amostras de <i>Aspergillus sp</i> produtoras de aflatoxinas B1, B2, G1 e G2.....                  | 61 |
| <b>FIGURA 11</b> - Valores referentes ao número de amostras cultivadas nas épocas da seca e da chuva .....   | 62 |
| <b>FIGURA 12</b> - Cromatografia (HPLC) do leite de cabra .....  | 67 |

## LISTA DE TABELAS

|   |    |
|---|----|
| <b>TABELA 01</b> - Teores de umidade do concentrado e volumoso encontrado na Fazenda 1, 2 e 3, conforme o teste de Tukey.....   | 55 |
| <b>TABELA 02</b> - Número de colônias fúngicas relacionadas com o teor de umidade do alimento destinado a caprinos na Fazenda 1, 2 e 3.....   | 56 |
| <b>TABELA 03</b> - Teores de atividade de água no concentrado da Fazenda 1, 2 e 3....   | 57 |
| <b>TABELA 04</b> - Teores de atividade de água no volumoso da Fazenda 1,2 e 3.....  | 58 |
| <b>TABELA 05</b> - Resultado da umidade relativa do alimento mensal (URA) e da atividade de água no alimento (concentrado e volumoso) da Fazenda 1, 2 e 3.....  | 59 |
| <b>TABELA 06</b> - Resultados da média da umidade relativa do ar (UR%) e índice pluviométrico (chuva em mm) referente à época da seca e época da chuva em que foram realizadas as coletas na Fazenda 1, 2 e 3 ..... | 60 |
| <b>TABELA 07</b> - Ocorrência de aflatoxina B1, B2, G1 e G2 em análises das amostras de concentrado e volumoso por comparação de Rf(s) entre padrões de referência e amostra .....                                  | 63 |

## RESUMO

COELHO, Poliana de Oliveira. **Microbiota fúngica e aflatoxinas em alimentos**

**destinados a cabras** : aflatoxina M1 no leite produzido em diferentes sistemas e

Condições climáticas.

As aflatoxinas são metabólitos tóxicos produzidos por *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus* com efeitos hepatotóxicos, imunossupressores, mutagênicos, carcinogênicos e teratogênicos. Estão presentes em vários alimentos, principalmente nos grãos, sendo amplamente utilizados na fabricação de rações animais. A aflatoxina B1 é a de maior poder tóxico e o seu metabólito é eliminado principalmente no leite, sendo o de maior importância a aflatoxina M1. Os limites aceitos pela legislação brasileira são de 50 ppb de aflatoxinas para alimentos destinados a animais e de 0,5 µg/L e 5,0 µg/L de aflatoxina M1 para leite fluido e em pó, respectivamente. Devido à sua toxicidade, principalmente em indivíduos mais jovens, que são os maiores consumidores de leite, tornam-se um importante problema de saúde pública. Os objetivos deste trabalho foram avaliar a microbiota fúngica e a incidência de aflatoxina B1 em alimentos consumidos por cabras e a incidência de aflatoxina M1 em leite de cabras criadas em 3 propriedades localizadas na região do Sul de Minas Gerais e Média Mogiana Paulista. Os alimentos foram avaliados quanto à microbiota fúngica utilizando-se Ágar Sabouraud Rosa de Bengala. A detecção de aflatoxinas B1 foi avaliada pela técnica de cromatografia em camada delgada, enquanto, no leite, primeiramente foi feita a extração e purificação em colunas de imunoafinidade, sendo a detecção de aflatoxina M1 avaliada utilizando-se a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Aliado a estes levantamentos, foi realizada uma análise das condições meteorológicas das regiões de Minas Gerais e São Paulo, aferindo-se o índice pluviométrico, a temperatura média e a umidade relativa do ar onde foram verificadas e comparadas as épocas de maior incidência de fungos e suas toxinas nos alimentos e no leite. Foram colhidas amostras de dois alimentos (concentrado e volumoso) com quatro repetições e em duas épocas diferentes (chuva e seca) e amostras de leite também com quatro repetições em cada época. O delineamento estatístico foi inteiramente casualizado (DIC) em esquema fatorial e foi utilizado o teste Tukey com 5% de nível de significância. Os resultados obtidos revelaram que a otimização das referidas metodologias de cromatografia em camada delgada para análise de aflatoxina em rações e de HPLC no leite caprino mostraram-se eficientes. Em todas as amostras de leite caprino, não foi detectada a presença de aflatoxinas, demonstrando a boa qualidade do leite quanto à contaminação por essas toxinas. Porém, após a análise qualitativa da toxigenicidade das culturas da espécie do gênero *Aspergillus*, observou-se que, das 64 amostras de rações analisadas, 22,6 % encontravam-se contaminadas com aflatoxina B1.

Palavras-chaves: 1) aflatoxina 2) *Aspergillus flavus* 3) leite de cabra

## ABSTRACT

Coelho, Poliana de Oliveira. Mycoflora and aflatoxins in food estin the goats : aflatoxin M1 in milk produced in different systems and weather conditions.

Aflatoxins are hepatotoxic, immunosuppressive, mutagenic, carcinogenic and teratogenic metabolites produced by *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. They are found in various kinds of food, especially grains, and are widely used in the manufacture of animal feed. Aflatoxin B1 has the highest toxic power, and its most important metabolite, aflatoxin M1, is eliminated mainly via the milk. The limit values of aflatoxin accepted by Brazilian legislation are 50 ppb for animal feed, and 0.5 µg/L and 5.0 µg/L, for liquid and powdered milk, respectively. Young people are great milk consumers, and thereby milk toxicity becomes an important public health issue. This study evaluated the fungal microbiota and incidence of aflatoxin M1 in the milk of goats raised in three farms, located in the south of Minas Gerais and *Mogiãna Paulista* region. The culture medium Rose-Bengal Sabouraud agar was used to evaluate food fungal microbiota. The presence of aflatoxin B1 was assessed by thin layer chromatography. Aflatoxin M1 in milk was determined by immunoaffinity column cleanout with high performance liquid chromatography (HPLC). In addition, meteorological conditions were surveyed in the regions studied to measure the pluviometric index, the average temperature and relative humidity of air, where the periods of higher incidence of fungi and toxins were found in feed and milk. Two feed samples were collected: concentrate and fodder, with four replications, in two different seasons (rains and drought). Milk samples were also collected, with four replications. Two experiments were conducted: one in the rainy season; another in drought. Their statistical design was completely randomized and factorial . The Tukey test was applied at the 5% significance level. The results showed that the improved methods were efficient to detect aflatoxin: thin layer chromatography, in feed; and high performance liquid chromatography, in milk. The good quality of the goat milk was confirmed by the absence of aflatoxin in the samples. However, the qualitative analysis of *Aspergillus* cultures revealed that of the 64 samples analyzed, 22,6% were contaminated by aflatoxin B1.

**Keywords:** 1) aflatoxin 2) *Aspergillus flavus* 3) goat milk

## **1. INTRODUÇÃO**

A caprinocultura é uma atividade agropecuária de grande importância sócioeconômica no Brasil. O efetivo de caprinos leiteiros do país consiste em aproximadamente 4.500.000 animais, representando o oitavo maior rebanho do mundo.

A produção nacional de leite perfaz um total de aproximadamente 22.000 litros/dia, sendo que a produção da Região Sudeste corresponde a 54,6 % de todo o leite de cabra produzido no País. Esta região possui uma cadeia produtiva organizada, com processamento industrial e garantia de comercialização do leite e de seus derivados, o que garante a sua evolução no setor.

Devido ao seu alto valor nutricional, excelente digestibilidade e baixo potencial alergênico, o leite de cabra vem sendo bastante utilizado na alimentação humana, especialmente de crianças, idosos e indivíduos portadores de alergia ao leite bovino. Além disto, o leite de cabra vem conquistando crescente mercado na forma pasteurizada, embalagens longa vida, em pó, iogurtes, doces e queijos.

Os produtos de origem animal, inclusive o leite de cabra, podem ser contaminados por substâncias tóxicas, de origem biológica ou química.

Dentre estas substâncias, destacam-se as micotoxinas, que são metabólitos fúngicos, altamente tóxicos, representando um perigo em potencial para a saúde humana e animal .

As micotoxinas são naturalmente produzidas em uma infinidade de grãos de cereais, entre eles a soja e o milho, que são amplamente utilizados na fabricação de alimentos para várias espécies animais, inclusive os caprinos.

O primeiro relato de intoxicações por micotoxinas ocorreu na Idade Média, entre os séculos XI e XVI, com as primeiras observações de quadros patológicos da doença denominada “ Fogo de Santo Antônio” causando epidemias de ergotismo em populações da Europa, alimentadas com pão elaborado a partir de centeio contaminado com o fungo *Claviceps purpúrea*. Entretanto, somente em 1930 a doença foi relacionada com alcalóides tóxicos daquele cereal.

Intoxicações humanas e de animais, pela ingestão de alimento contaminado, tem sido uma constante, contudo, o mais conhecido episódio de micotoxicose, ocorreu em 1960, na Inglaterra, quando Allcroft *et al.* (1961), obtiveram extratos clorofórmicos a partir da torta de amendoim importada do Brasil, que tinha sido responsável pela moléstia denominada “Turkey-X-disease”. O mesmo extrato, quando inoculado experimentalmente em marrecos jovens, reproduziu lesões hepáticas semelhantes à doença natural, denominando-se ” aflatoxinas” ao composto responsável pelos efeitos tóxicos.

A formação destas toxinas em qualquer substrato depende de uma série de fatores, dentre os quais os que possuem maior importância são a umidade e a temperatura, e por esta razão são muito frequentes em países tropicais como o Brasil.

Dentre todas as micotoxinas já identificadas, a de maior importância do ponto de vista econômico e clínico é a aflatoxina que é produzida por fungos do gênero *Aspergillus sp.*, cujo poder hepatotóxico, imunossupressor, mutagênico e carcinogênico, tanto em animais como em seres humanos, confere à mesma uma grande importância na área de saúde pública.

## **1.1 OBJETIVOS**

### **1.1.1 OBJETIVO GERAL**

Este trabalho teve como objetivo geral determinar a prevalência de aflatoxinas na ração destinada a caprinos leiteiros, assim como sua prevalência no leite em diferentes condições climáticas.

### **1.1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:**

Tomando como base a importância que as micotoxinas vêm assumindo na agropecuária, particularmente na produção leiteira de caprinos, aliada à falta de informações dos produtores e profissionais do setor, os objetivos específicos deste trabalho foram:

- Avaliar a microbiota fúngica do concentrado e volumoso utilizados na alimentação dos caprinos, determinando-se a contagem global dos principais gêneros de fungos, principalmente as espécies do gênero *Aspergillus sp.*;

- Determinar o teor de umidade dos alimentos destinados às cabras;
- Relacionar o isolamento de fungos toxigênicos com a umidade e atividade de água da ração e volumoso;
- Avaliar a ação toxigênica das amostras de concentrado e volumoso utilizadas na alimentação das cabras para detecção de aflatoxina B<sub>1</sub>;
- Avaliar a ação toxigênica das amostras de leite em relação à presença da aflatoxina M<sub>1</sub>;
- Avaliar a incidência de aflatoxina B<sub>1</sub> em alimentos fornecidos a cabras, bem como a ocorrência de seu metabólito, a aflatoxina M<sub>1</sub>, no leite produzido pelas mesmas e observar a correlação entre as duas toxinas;
- Relacionar a(s) época(s) do ano com maior e menor incidência de aflatoxinas nos alimentos e no leite de cabra e associá-las com a umidade dos alimentos e umidade relativa do ar do ambiente.

## 1.2 JUSTIFICATIVAS

Devido à sua alta toxigenicidade, principalmente em crianças, que são os maiores consumidores de leite, é de grande importância a detecção destas toxinas antes que as mesmas cheguem ao consumidor final. Justifica-se, portanto, a identificação de aflatoxina M<sub>1</sub> em leite de cabra, já que a mesma é resultante do processo de biotransformação hepática da aflatoxina B<sub>1</sub> presente na circulação sanguínea de cabras que ingeriram alimentos contaminados.

O crescimento contínuo da caprinocultura de leite no Brasil, associado à deficiência de dados oficiais neste país sobre a presença de aflatoxina M<sub>1</sub> no leite de cabra e à escassez de informações referentes à contaminação por micotoxinas em produtos destinados à alimentação animal, também justificam o presente trabalho.

### 1.3 HIPÓTESES

A estreita relação entre a ração mofada, o *Aspergillus flavus*, a aflatoxina B<sub>1</sub> e a excreção de aflatoxina M<sub>1</sub> no leite estimulam maiores investigações a respeito da inter-relação entre essas variáveis, na determinação de intoxicações dos caprinos, para que sejam traçados parâmetros de controle epidemiológicos e microbiológicos, entre eles:

- Em ambientes com umidade relativa do ar acima de 60%, há maior incidência de fungos toxigênicos?
- Rações com umidade dos grãos acima de 14%, há maior incidência de fungos toxigênicos?
- Os fungos crescem quando o coeficiente de atividade de água (Aa) varia entre 0,80 e 0,90 nos alimentos.
- A maior incidência de aflatoxina no leite é na época da seca ?
- A existência e a quantidade de aflatoxina M<sub>1</sub> no leite de cabras estão relacionadas com a existência e a quantidade de aflatoxina B<sub>1</sub> nos alimentos destinados a estes animais.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 A IMPORTÂNCIA DA CAPRINOCULTURA LEITEIRA**

A caprinocultura é uma atividade pecuária de grande importância no Brasil e estima-se que o efetivo de caprinos leiteiros seja de 4.500.000 animais (FAO, 2004), sendo que a produção de leite de cabra da Região Sudeste corresponde a 54,6% de todo país (COSTA, 2006).

No decorrer dos anos, alguns pioneiros começaram a produzir leite de cabra, mesmo sem a garantia de mercado regular. Assim, hoje temos uma grande produção deste leite no país, principalmente nos estados de Minas Gerais, São Paulo e Rio de Janeiro (SILVA & SILVA, 2005). Relataram que a caprinocultura de leite, organizada, existe há aproximadamente três décadas, porém os problemas atuais, em sua maioria, ocorrem há mais de vinte anos e continuam sem soluções adequadas, sendo eles:

- a) Legalização do leite;
- b) Tributação dos produtos caprinos;
- c) Preconceitos sobre os produtos derivados de cabra;
- d) Falta de divulgação e “marketing”;

- e) Condução de diversos criatórios, sem a devida profissionalização e gestão;
- f) Organizações de classe desprovidas de planos estratégicos;
- g) Desatenção dos órgãos governamentais de saúde animal com os caprinos;
- h) Descuido com o grande mercado potencial existente, entre outros.

## 2.2 O LEITE DE CABRA

O leite de cabra é um alimento de alto valor nutritivo e de fácil digestão, sendo composto principalmente por gorduras, proteínas, açúcares, vitaminas e sais minerais. A composição química desse leite apresenta grande variabilidade, e é influenciada por diversos fatores, tais como raça, período de lactação, tipo de alimentação, idade e estado fisiológico do animal (MEDEIROS *et al.* 1994).

O leite de cabra vem conquistando aumento constante do mercado, não somente nas formas de leite pasteurizado e longa vida, mas também como leite em pó, iogurtes, doces e queijos (ZACHARIAS, 2001).

Sua composição média é comparável à do leite de vaca, apresentando um teor de gordura e proteínas ligeiramente mais elevados e menor conteúdo de água, conforme pode ser observado no QUADRO 01.

QUADRO 01 - Composição média de alguns componentes químicos do leite de cabra e vaca.

| <b>Componentes</b> | <b>Cabra</b> | <b>Vaca</b> |
|--------------------|--------------|-------------|
| Proteína (%)       | 3,95         | 3,26        |
| Gordura (%)        | 4,69         | 3,52        |
| Lactose (%)        | 4,72         | 4,76        |
| Cinzas (%)         | 0,77         | 0,71        |

|                                 |       |       |
|---------------------------------|-------|-------|
| Extrato Seco Total (%)          | 14,12 | 12,25 |
| Extrato seco desengordurado (%) | 9,43  | 8,73  |
| Água (%)                        | 85,88 | 87,75 |
| Densidade ( <sup>o</sup> D)     | 1,031 | 1,030 |
| Acidez ( <sup>o</sup> D)        | 17,7  | 16,7  |
| pH                              | 6,57  | 6,65  |

Fonte: Furtado & Woltschoon-Pombo (1978)

As cinco principais proteínas do leite de cabra são  $\beta$ -lactoglobulina,  $\alpha$ -lactoalbumina,  $\kappa$ -caseína,  $\beta$ -caseína e  $\alpha_{s2}$ -caseína, as quais têm grande semelhança com seus homólogos no leite de vaca. O leite de ambas as espécies contém níveis similares de  $\beta$ -lactoglobulina, enquanto o leite caprino apresenta um nível bastante reduzido de  $\alpha_{s1}$  caseína e aproximadamente o dobro da quantidade de  $\beta$ -caseína e  $\alpha$ -lactoalbumina encontradas no leite bovino (JENNESS, 1980). A  $\beta$ -caseína constitui-se quantitativamente no principal componente do leite de cabra, representando 60% da caseína do mesmo (FURTADO, 1981).

O leite de cabra é um dos principais alimentos que existem na nutrição humana, sendo rico em extratos secos, tem pouco colesterol, serve para a fabricação dos principais queijos finos do mundo, além de outros produtos lácticos. Alivia alergias e enxaquecas provocadas pelo leite de vaca e é um fortificante por sua fácil digestão e composição. Portanto é muito importante na alimentação de pessoas convalescentes de doenças como o câncer, de idosos com dificuldades digestivas e crianças, principalmente as acometidas de alergias (SILVA & SILVA, 2005).

A utilização do leite de cabra na alimentação de indivíduos alérgicos ao leite de vaca tem sido recomendada por médicos e nutricionistas (ALVES &

XIMENES, 1999; RIBEIRO & RIBEIRO, 2001). Esse processo alérgico é frequentemente observado em crianças, e caracteriza-se pela manifestação de distúrbios gastrintestinais, rinite, urticária, eczemas, asma e anafilaxia (PARK, 1994).

Os principais alérgenos encontrados no leite de vaca são, possivelmente, a  $\beta$ -lactoglobulina, que não está presente no leite materno, a caseína, a  $\alpha$ -lactoalbumina e a albumina sérica (RIBEIRO & RIBEIRO, 2001). Silva (1998) descreve que 99% das crianças alérgicas ao leite de vaca respondem satisfatoriamente ao tratamento com leite de cabra. A eficácia desse tratamento pode decorrer das variações nas sequências de aminoácidos entre as proteínas homólogas dos leites de cabra e vaca (JENNESS, 1980) e da baixa concentração de  $\alpha_{s1}$  caseína no leite caprino (PARK, 1994).

### **2.2.1 Qualidade Microbiológica do Leite de Cabra**

A qualidade higiênica do leite depende de vários aspectos, tais como: estado sanitário dos animais, higiene e habilidade do ordenhador e limpeza de equipamentos e de todas as superfícies que entram em contato com o produto. As condições sob as quais o leite é produzido, estocado na fazenda e transportado para a usina de beneficiamento também afetam diretamente a sua qualidade higiênica (TEIXEIRA, 1993).

A avaliação da contaminação microbiológica de alimentos, entre eles o leite de cabra, é um dos parâmetros mais importantes para a determinação do seu período de vida útil e para que sejam oferecidos produtos que não ofereçam risco à saúde de quem o consome. Um produto alimentício deve ser manipulado assepticamente, devendo ser submetido a controles microbiológicos tanto por responsáveis pelo processamento como por órgãos de fiscalização e por isto

ressalta-se a grande importância da atuação dos Serviços de Inspeção Municipal, Estadual e Federal, para que assim o consumidor tenha acesso a um produto de melhor qualidade (SILVA *et al.* 1999).

### **2.3 OS FUNGOS**

Por muito tempo os fungos foram considerados vegetais, mas a partir de 1969, foram classificados em um reino à parte, o Reino Fungi (TRABULSI & TOLEDO, 1996; PEREIRA, 2004).

Os fungos são seres eucarióticos, com um só núcleo, como as leveduras, ou multinucleados, como os fungos filamentosos, também chamados de bolores (GOMPertz *et al.* 1999) que vivem como parasitas. São microrganismos heterotróficos, que se alimentam de matéria orgânica morta (como saprófitos) ou de outros organismos vivos (como simbiontes), nas micorrizas ou nos líquens (PEREIRA, 2004), sendo encontrados principalmente no solo, na água, nos vegetais, em animais, no homem e em detritos, e por isto são considerados ubíquos (CEBALLOS *et al.* 1996), além de algumas espécies serem patogênicas para o homem, animais e vegetais.

Os fungos não possuem o pigmento verde clorofila necessário à fotossíntese, o processo pelo qual as plantas verdes são capazes de sintetizar o seu próprio alimento a partir de substâncias inorgânicas (PEREIRA, 2004).

Morfologicamente os fungos possuem dois tipos de colônias, sendo elas: leveduriformes, que são cremosas, compreendendo o grupo das leveduras, ou

filamentosas, que são cotonosas e compreendem o grupo dos bolores (GOMPertz *et al.*, 1999).

Os bolores são constituídos de hifas que podem ser contínuas, cenocíticas ou septadas. Os fungos que possuem hifas septadas pertencem aos filos Ascomycota, Basidiomycota e Deuteromycota (CEBALLOS *et al.* 1996). Os fungos do Filo Deuteromycota são chamados imperfeitos por causa da falta da fase sexual, estando incluído neste filo o gênero *Aspergillus* (MOREIRA & SIQUEIRA, 2002), que macroscopicamente apresenta-se com coloração amarela esverdeada (SIDRIM & MOREIRA, 1999), conforme pode ser visualizado na FIG. 01, e microscopicamente com aspecto de cabeça de medusa, devido à disposição do órgão de frutificação, conforme pode ser visualizado na FIG. 02.

Segundo Pereira (2004), os fungos do gênero *Aspergillus* podem-se reproduzir assexuadamente a partir de fragmentos do micélio ou através de estruturas microscópicas chamadas esporos, que podem ser visualizadas com maior aumento em microscopia óptica, conforme FIG. 03.

O crescimento deste fungo ocorre em presença de altas concentrações de açúcar e sal e em alimento de baixa umidade (FRAZIER, 1981). Porém, Midio & Martins (2000) relataram que ele se desenvolve em alimentos ricos em amido, com teor de água de 18,3 a 18,5% e umidade relativa do ar de 85% e em alimentos gordurosos com teor de água de 9 a 10% e umidade relativa de 85%. Já Schultz (1999) relata o seu desenvolvimento em cereais com teor de água de 13 a 18% e umidade relativa de 75 a 80%.

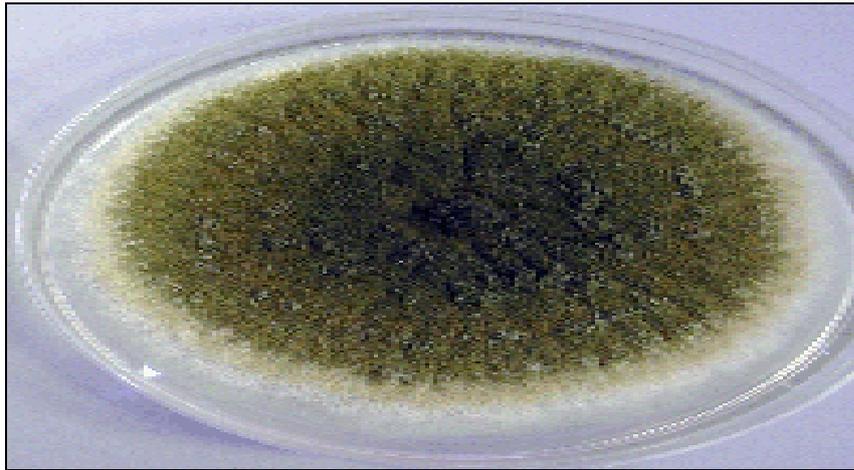


FIGURA 01 – Aspecto macroscópico em placa do *Aspergillus flavus*.

Fonte: Kung'u (2005)

### **2.3.1 Fatores que controlam o desenvolvimento de fungos nos alimentos**

A capacidade de sobrevivência ou de multiplicação dos microrganismos presentes em um alimento depende dos seguintes fatores: intrínsecos, que estão relacionados com as características do próprio alimento, e extrínsecos, que estão relacionados com o ambiente em que o alimento se encontra (FRANCO, 1996).

#### **2.3.1.1 Fatores intrínsecos:**

a) Atividade de água ( $A_a$ ): é a água na forma disponível existente nos alimentos suficiente para o metabolismo e multiplicação dos microrganismos. A água ligada a macromoléculas por forças físicas não está livre para agir como solvente ou para participar de reações químicas e, portanto, não pode ser aproveitada pelos microrganismos (FRANCO, 1996).

Segundo Franco (1996), a atividade de água é definida como a relação existente entre a pressão parcial de vapor da água contida na solução ou no alimento ( $P$ ) e a pressão parcial de vapor da água pura ( $P_o$ ), a uma dada temperatura:  $A_a = P/P_o$ . E os valores de  $A_a$  variam de 0 a 1, considerando que a  $A_a$

da água pura seja de 1,00 e o valor limitante de  $A_a$  para a multiplicação de qualquer microrganismo é de 0,60 .

A atividade de água, temperatura e disponibilidade de nutrientes são interdependentes. Assim, a qualquer temperatura, a capacidade de microrganismos multiplicarem-se abaixa quando a  $A_a$  abaixa e quanto mais próxima da temperatura ótima de multiplicação, mais larga é a faixa de  $A_a$  em que o crescimento bacteriano é possível. A presença de nutrientes também é importante, pois amplia a faixa de  $A_a$  em que os microrganismos podem multiplicar-se.

b) Acidez (pH): verifica-se que pH em torno da neutralidade (entre 6,5 e 7,5) é o mais favorável para a maioria dos microrganismos. Os bolores e leveduras mostram maior tolerância ao pH, sendo que os bolores podem multiplicar-se em valores de pH mais baixos que as leveduras, sendo estas mais tolerantes que as bactérias a valores baixos de pH (FRANCO, 1996).

c) Potencial de oxirredução: é a facilidade com que determinado substrato ganha ou perde elétrons. Quando um elemento perde elétrons, ele é dito oxidado, e quando ganha elétrons, reduzido. Esta diferença de potencial durante a transferência de elétrons é medida por instrumentos apropriados e expressa em volts (V) ou em milivolts (mV). Quanto mais oxidado é um composto, mais positivo é seu potencial de oxirredução e quanto mais reduzido, mais negativo é esse potencial, que é expresso pelo símbolo Eh (FRANCO, 1996).

Os microrganismos aeróbios, incluindo a maioria dos bolores e as leveduras oxidativas, requerem valores de Eh positivos para a multiplicação. Em alimentos, os fungos importantes são aeróbios, enquanto as leveduras de importância são aeróbias ou anaeróbias facultativas (FRANCO, 1996).

d) Composição química: para que ocorra multiplicação microbiana, os nutrientes indispensáveis são: água, fonte de energia (açúcares, álcoois e aminoácidos), fonte de nitrogênio (aminoácidos), vitaminas (do complexo B, biotina e ácido pantotênico) e sais minerais (sódio, potássio, cálcio e magnésio) (FRANCO, 1996).

e) Fatores antimicrobianos naturais: são substâncias capazes de retardar ou até mesmo impedir a multiplicação microbiana, como os condimentos que contêm vários óleos essenciais com características antimicrobianas, como o eugenol no cravo (FRANCO, 1996).

O leite bovino possui numerosas substâncias antimicrobianas naturais, como as imunoglobulinas, o fator complemento, os macrófagos e os linfócitos, que agem de forma específica, e como a lactoperoxidase, que age de forma inespecífica. A lactoferrina do leite também tem atividade antimicrobiana, pois é uma proteína que inibe a multiplicação através da retirada de íons ferro do leite, assim como a lisozima (naturalmente presente no leite) e nisina (produzida por bactérias lácticas no leite), que são importantes no controle do desenvolvimento microbiano (FRANCO, 1996).

f) Interações entre microrganismos: caracterizadas pela produção de metabólitos, durante o crescimento microbiano, que podem afetar a capacidade de sobrevivência e de multiplicação de outros microrganismos presentes no alimento (FRANCO, 1996).

#### 2.3.1.2 Fatores extrínsecos:

a) Temperatura ambiental: é o fator ambiental mais importante na multiplicação de microrganismos, havendo registros de multiplicação a temperaturas de -35°C a 90°C. Os fungos são capazes de crescer em faixa de temperatura mais

ampla do que bactérias, podendo multiplicar-se até em alimentos refrigerados (FRANCO, 1996).

b) Umidade relativa do ambiente: está correlacionada entre a atividade de água ( $A_a$ ) de um alimento e a umidade relativa de equilíbrio do ambiente. Os alimentos conservados em ambiente com umidade relativa superior à sua  $A_a$  tenderão a absorver umidade do ambiente, causando aumento em sua  $A_a$ , enquanto que perderão água se a umidade ambiental for inferior à sua  $A_a$  (FRANCO, 1996).

c) Composição gasosa do ambiente: pode determinar os tipos de microrganismos que poderão predominar no alimento. A presença de oxigênio favorecerá a multiplicação de microrganismos aeróbios, enquanto que a ausência causará predominância de anaeróbios (FRANCO, 1996).



FIGURA 02 – Aspecto microscópico do esporângio do *Aspergillus flavus*.

Fonte: Volk (2005)

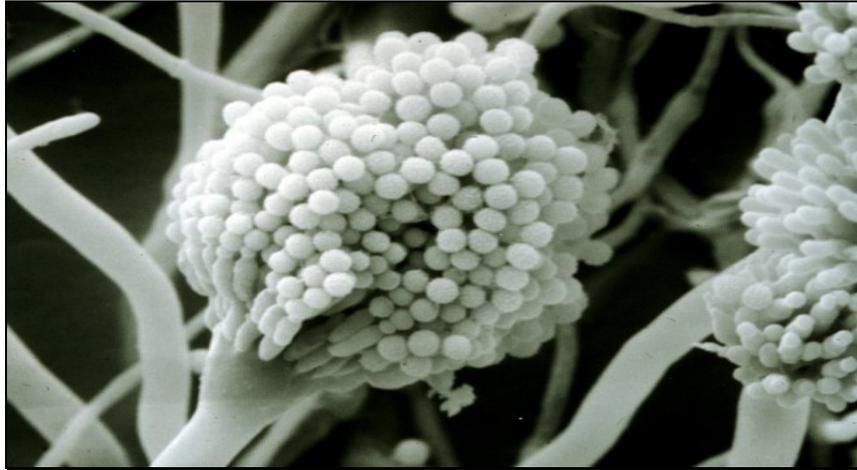


FIGURA 03 - Esporângios de *Aspergillus* (com esporos).

Fonte: Pereira (2004)

## 2.4 AS MICOTOXINAS

O primeiro relato de intoxicações por micotoxinas ocorreu na Idade Média, causando a doença chamada “Fogo de Santo Antônio”, causada por alcalóides tóxicos produzidos pelo fungo *Claviceps purpurea* em pães produzidos com centeio (PIER, 1973).

Existem três importantes gêneros de fungos produtores de micotoxinas e que se encontram amplamente distribuídos em todo o mundo, sendo eles: *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium* (LOSTE *et al.* 2002).

As micotoxinas são metabólitos secundários tóxicos produzidos por fungos filamentosos e encontrados em alimentos. Quando ingeridos causam risco potencial para a saúde do homem e do animal (CORRÊA & CORRÊA, 1992; JONES *et al.* 1997; LENMOS, 2001).

As micotoxinas podem ser destruídas com o uso de solventes polares ou pela degradação por substâncias químicas, como argila de origem vulcânica,

estruturas modificadas de leveduras e enzimas quelantes das estruturas químicas de certas toxinas (SANTURIO & SANTOS, 2001).

## 2.5 AS AFLATOXINAS

Foram identificadas e denominadas pela primeira vez a partir de inoculação experimental de extrato clorofórmico de torta de amendoim em marrecos jovens, causando lesões hepáticas (ALLCROFT & CARNAGHAN, 1962). São metabólitos tóxicos produzidos por *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus* (BUSBY & WOGAN, 1981; MIDIO & MARTINS, 2000). São substâncias apolares e por esta razão são solúveis em clorofórmio, metanol, benzeno e acetonitrila, além de serem instáveis à luz ultravioleta (MIDIO & MARTINS, 2000).

As principais aflatoxinas são AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub> e AFG<sub>2</sub>, sendo a AFB<sub>1</sub> considerada como a mais tóxica e potente agente carcinogênico (IARC, 1993; CREPPY, 2002), além de produzir efeitos mutagênicos (DENISSENKO *et al.* 1999; CHAN *et al.* 2003) e teratogênicos (KIHARA *et al.* 2000; WANGIKAR *et al.* 2005).

### 2.5.1 Propriedades Físico-químicas

As aflatoxinas são biossinteticamente consideradas bisfurano cumarinas derivadas de decacetídeos (MERCK, 1996).

As principais aflatoxinas são denominadas de aflatoxinas **B**<sub>1</sub> (2,3,6α,9α-tetrahydro-4-met-oxiciclopental [c]furo [3',2':4,5]furo[2,3h][1]benzopirano1,11-diona), **B**<sub>2</sub> (2,3,6α,8,9,9α-Hexahidro-4-metoxiciclopental [c]furo [3',2':4,5]furo[2,3-h] [1] benzopirano1, 11-diona), **G**<sub>1</sub> (3,4,7α,10α-Tetrahydro-5-metoxi-1H,12H-furo[3'2':4,5]furo[2,3h] pirano[3,4-c][1]benzopirano1,12-diona) e **G**<sub>2</sub> (3,4,7α,9,10,10α-Hexahidro-5-metoxi-1H, 12H- furo[3',2':4,5] furo[2,3h]pirano [3,4-c][1]benzopirano1,12-diona)

(DINIZ, 2002), sendo que a AFB<sub>1</sub> e AFG<sub>1</sub> ocorrem mais frequentemente e em maior quantidade nos produtos agrícolas (PITTET, 2001). As aflatoxinas **M<sub>1</sub>** (2,3,6a,9a-Tetrahydro-9a-hidroxi-4-metoxiciclopental [c]furo[3',2':4,5]furo[2,3-h][1]benzopirano-1,11-diona.4-idroxiaflatoxina B1) e **M<sub>2</sub>**(2,3,6a,8,9,9a-Hexahidro-9a-hidroxi-4-metoxiciclopental [c] furo [3'2':4,5] furo [2,3-h] [1] benzopirano-1 ,11-diona.4-hidroxiaflatoxina B2) são metabólitos hidroxilados de AFB<sub>1</sub> e AFB<sub>2</sub> respectivamente, sendo excretadas no leite, carne e urina (DINIZ, 2002). A FIG. 04 apresenta as estruturas químicas das principais aflatoxinas.

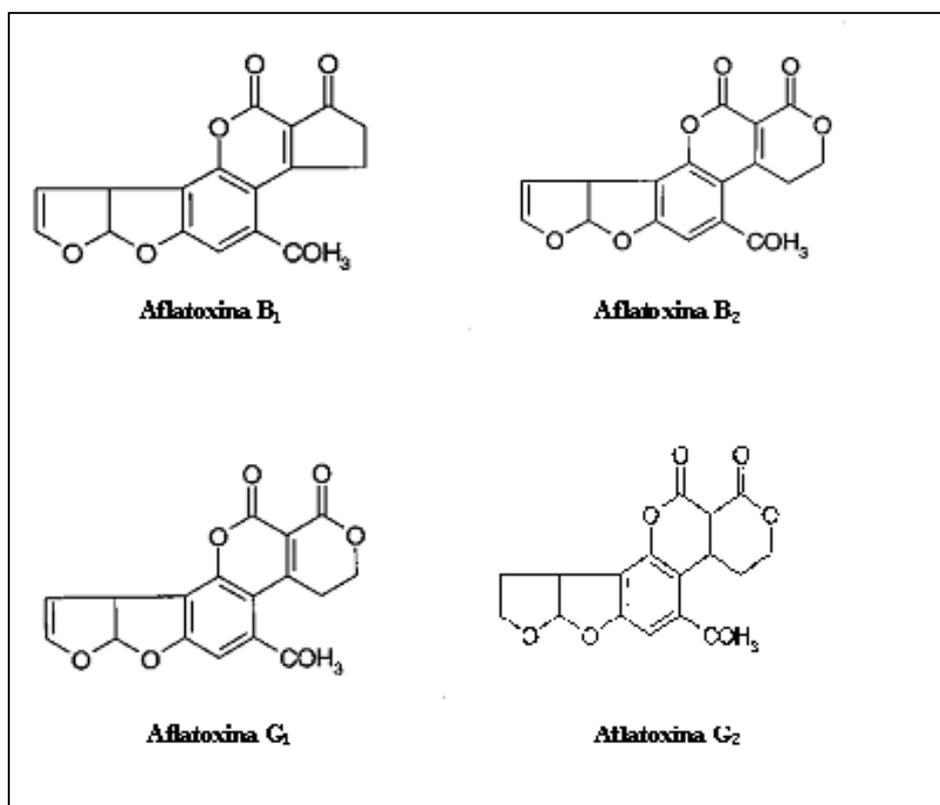


FIGURA 04 - Estrutura química das principais aflatoxinas.

Fonte: Diniz (2002)

A aflatoxina B<sub>1</sub> possui peso molecular baixo e é uma molécula lipossolúvel, o que facilita a sua absorção (HSIEH & WONG, 1994).

Dentre os produtos de metabolismo da aflatoxina B<sub>1</sub> por hidroxilação, destaca-se a aflatoxina M<sub>1</sub>, a qual é excretada no leite de animais que ingerem alimentos contaminados (CAST, 2003), sendo também referida como agente carcinogênico (D'MELLO & MACDONALD, 1997; CREPPY, 2002). A presença dessa toxina no leite e em seus derivados constitui um dos mais sérios problemas no controle de qualidade alimentar, consistindo em fonte potencial de risco à saúde pública (GALVANO *et al*, 1996), uma vez que o leite de cabra é parte integrante da alimentação humana, especialmente de crianças, idosos e indivíduos alérgicos ao leite bovino (SILVA, 1998; RIBEIRO & RIBEIRO, 2001). O teor de aflatoxina M<sub>1</sub> diminui em leites pasteurizados (SYLOS, 1994).

A diferença entre os grupos B e G foi baseada nas intensas fluorescências azul e verde, respectivamente, quando os produtos da cromatografia são

submetidos à luz ultravioleta de ondas longas (BUSBY & WOGAN, 1981; LAZZARI, 1993; JONES *et al.* 1997). Entretanto a aflatoxina M<sub>1</sub> emite fluorescência azul-violeta (CAST, 2003), conforme pode ser visualizado na FIGURA 05.

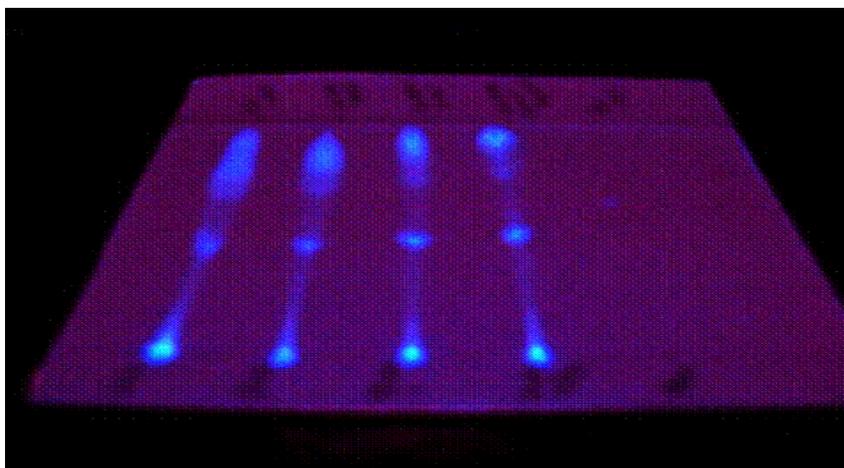
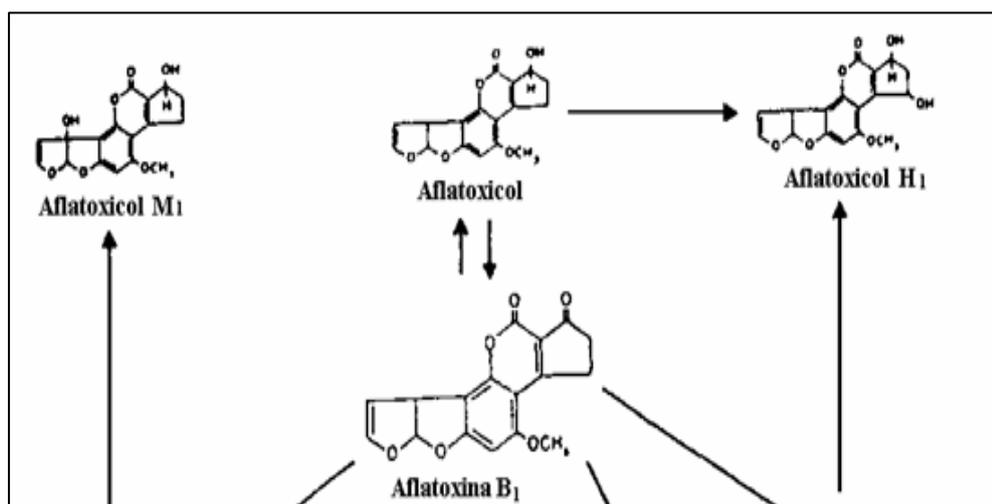


FIGURA 05 - Aspecto cromatográfico da aflatoxina M<sub>1</sub>.

Fonte: Botura (2005), Modificado.

### 2.5.2 Biotransformação

A taxa de absorção e biotransformação da aflatoxina B<sub>1</sub> pode ser afetada pela rota de administração, sendo que, quando ingerida pela via oral (forma mais frequente), a extensão da absorção e biotransformação no trato gastrointestinal determina a concentração dessa micotoxina e seus metabólitos no fluxo porta hepático (HSIEH & WONG, 1994). O metabolismo da aflatoxina B<sub>1</sub> pode ser visualizado através da FIG. 06.



## FIGURA 06 - Metabolismo da aflatoxina B<sub>1</sub>

Fonte: McLean & Dutton (1995)

A conversão em aflatoxina M<sub>1</sub> ocorre no fígado, produzida pela hidroxilação do quarto carbono da molécula de aflatoxina B<sub>1</sub> (CAMPBELL & HAYES, 1976; APPLEBAUM *et al.* 1982).

As reações químicas relacionadas na biotransformação são classificadas como reação das fases I e II. As reações da fase I em geral, convertem a droga em metabólitos mais polares por oxidação, redução ou hidrólise. Os metabólitos resultantes podem ser mais ou menos ativos que a molécula original, ou até mesmo inativos. As reações da fase II, denominadas de reações de conjugação, envolvem o acoplamento de seu metabólito a um substrato endógeno, como ácido glicurônico,

sulfúrico, acético ou a um aminoácido. O sistema enzimático microsômico hepático é responsável pela maioria dos metabólicos, e o rim, plasma, pulmão e trato gastrointestinal também contribuem para a biotransformação (BENET & SHEINER, 1987).

### **2.5.3 Excreção**

As principais vias de eliminação das aflatoxinas e seus metabólitos são a urinária e fecal, embora a secreção láctea também seja considerada como uma via de excreção da aflatoxina M<sub>1</sub> (BUSBY & WOGAN, 1981; HSIEH & WONG, 1994; CAST, 2003). Acima de 90% da AFB<sub>1</sub> ingerida é geralmente eliminada do organismo no período de 24 horas, embora pequenas quantidades de aflatoxinas não sejam excretadas, podendo permanecer nos tecidos por longos períodos (BUSBY & WOGAN, 1981; CHEEKE & SHULL, 1985; HSIEH & WONG, 1994;).

A taxa de conversão de aflatoxina B<sub>1</sub>, presente na ração ingerida pelos animais, para aflatoxina M<sub>1</sub> excretada no leite está em torno de 0,3 a 6,2% (CREPPY, 2002), porém Sylos (1994) demonstra uma conversão média de 1,5%.

Segundo Oliveira & Germano (1997), a imprecisão dos valores de conversão da aflatoxina B<sub>1</sub> em aflatoxina M<sub>1</sub> reforça a importância da realização de análises rotineiras no leite e em seus derivados, como fator imprescindível para o controle da ocorrência de aflatoxina M<sub>1</sub>.

Goto & Hsieh (1985) administraram [<sup>14</sup>C]-aflatoxina B<sub>1</sub> por via oral e endovenosa a cabras em lactação, e verificaram taxa de excreção entre 0,45 a 1,1% no leite coletado durante o período de 24 horas. O principal metabólito da AFB<sub>1</sub> encontrado nesse leite foi a AFM<sub>1</sub>.

## 2.5.4 Toxicidade

A toxicidade das aflatoxinas varia de acordo com a espécie animal, idade, sexo, estado nutricional, tempo de exposição à toxina e quantidade da toxina ingerida (DINIZ, 2002). Animais mais jovens, geralmente, são mais susceptíveis aos efeitos tóxicos dessas toxinas, uma vez que seus sistemas enzimáticos hepáticos ainda não estão completamente desenvolvidos (PATTERSON, 1973).

Existem quatro tipos básicos de toxicidade, sendo eles: aguda, que acarreta distúrbios das funções hepática e renal; crônica, com indução de câncer principalmente em fígado; mutagênica e teratogênica, devido à interferência das micotoxinas na replicação do DNA (GOMPertz *et al.* 1999).

As aflatoxinas B<sub>1</sub> e M<sub>1</sub> apresentam potencial carcinogênico e genotóxico, além de toxicidades semelhantes (PONS & WOGAN, 1971).

A ingestão diária aceitável de aflatoxina M<sub>1</sub> é de 6,8 ng/pessoa/dia na Europa; 3,5 ng/pessoa/dia na América Latina; 12 ng/pessoa/dia no Extremo Oriente e 0,7 ng/pessoa/dia na África (CREPPY, 2002).

### 2.5.4.1 Aflatoxicoses

Os animais mais sensíveis às aflatoxinas são os perus, patos, suínos, bezerros até o terceiro mês de idade, cães e o homem. Os ovinos são mais resistentes e crias de gansos e pintinhos raramente adoecem (SCHULTZ, 1999). Os animais jovens são mais susceptíveis (JONES *et al.* 1997).

Em suínos a intoxicação por aflatoxina causa os seguintes sintomas: icterícia, apatia, inapetência, diminuição da taxa de crescimento e alterações reprodutivas e na conversão alimentar (LAZZARI, 1993; SCHULTZ, 1999).

Em aves, os sintomas observados são: abatimento, inapetência, opistótono, diarreia amarelada e espasmos musculares (SCHULTZ, 1999), além da hipoplasia da Bursa, imunossupressão, queda de desempenho e aumento da fragilidade dos vasos sanguíneos (KRABBE, 1998).

Em bovinos, em casos agudos observam-se abatimento e morte rápida e em casos crônicos, perda de peso, diminuição da produção de leite (SCHULTZ, 1999) e alterações reprodutivas (LAZZARI, 1993).

#### 2.5.4.2 Aflatoxicoses em Caprinos

As aflatoxinas promovem alterações na função ruminal, tais como redução da motilidade (COOK *et al.* 1986), da atividade microbiana (WESTLAKE *et al.* 1989) e da produção de ácidos voláteis (GHOSH & CHHABRA, 1995).

Poucos relatos sobre a intoxicação natural de caprinos por aflatoxinas têm sido descritos. Samarajeewa *et al.* (1975) relataram a ocorrência de aflatoxicose no Sri Lanka, com óbito de 194 caprinos, em decorrência da ingestão de concentrado contaminado com aflatoxinas durante o período de quatro meses. Os sinais clínicos observados consistiram em secreção nasal não purulenta, icterícia, anorexia, letargia, urina com coloração escura, ocorrendo óbito entre o 5º e 7º dia após o início dos sintomas. À necropsia, verificou-se icterícia nos tecidos subcutâneos e maioria dos órgãos, congestão e fibrose hepática. Os achados histopatológicos revelaram hiperplasia dos ductos biliares, fibrose periportal hepática e necrose das células epiteliais tubulares renais. O diagnóstico da aflatoxicose foi confirmado pela detecção de AFB<sub>1</sub> (150 µg/kg) e AFG<sub>1</sub> (230µg/kg) no concentrado, e pela presença de AFB<sub>1</sub> e AFM<sub>1</sub> no fígado, urina e bile dos animais intoxicados.

#### 2.5.4.3 Diagnóstico

O diagnóstico das aflatoxicoses é realizado através da anamnese, lesões e observação de alimentos contaminados, ou seja, para a conclusão de uma suspeita de contaminação alimentar deve-se enviar amostras a serviços especializados em cultivo de fungos, isolamento e identificação de micotoxinas. O alimento suspeito deve ser enviado, mesmo apresentando-se sem bolor, já que o fungo pode não estar presente, mas a aflatoxina permanece inalterada (CORRÊA & CORRÊA, 1992).

#### 2.5.4.4 Profilaxia

Para se evitar as aflatoxicoses, o produtor deve controlar o estresse hídrico ou excesso de água na irrigação das plantas, pois estresse hídrico pode enfraquecer as plantas, tornando-as mais susceptíveis à contaminação por fungos (COSTA, 1998). Além disto, devem-se armazenar os alimentos em locais secos e limpos, recomendando-se não deixar os alimentos próximos à parede ou a cantos do chão, já que estas áreas possuem índice de umidade mais elevado (ALBUQUERQUE, 1999).

#### **2.5.5 Legislação**

Os limites máximos de tolerância de aflatoxinas para o feno de alfafa, farelo de algodão, aveia, farelo de babaçu, farelo de cacau, bagaço de cana, farelo de coco, farelo de colza, farelo de dendê, farelo de girassol, levedura de cerveja, farelo de mamona detoxicado, farelo de mandioca, farelo de milho, farelo de soja e farelo de trigo é de 50 ppb (BRASIL, 1988), e de 20 ppb para o farelo de polpa cítrica (BRASIL, 1999), que são as diversas matérias primas empregadas na alimentação animal (BRASIL, 1988).

Os limites máximos de tolerância de aflatoxina M<sub>1</sub> em leite são considerados ainda fatores políticos e econômicos (VAN EGMOND, 1994), sendo que a União Européia adotou o limite máximo de tolerância de 0,05 µg/L (CE, 1998).

O regulamento técnico do Mercosul sobre os limites máximos de aflatoxinas estabeleceu os níveis de 0,5 µg/L e 5,0 µg/L para leite fluido e em pó, respectivamente (MERCOSUL, 1994; BRASIL, 2002), que são os limites utilizados pelo Brasil (BRASIL, 1996).

Para a coleta de amostras de leite fluido, deve-se utilizar a Norma FIL – IDF 50 B, 1985: Métodos de Amostragem para Leite e Produtos Lácteos e/ou suas atualizações, sendo que as amostras de leite serão subdivididas no mínimo em três subamostras e conservadas congeladas. Em relação aos critérios para aceitação ou rejeição do lote, deve-se aceitar quando, na análise da primeira subamostra do leite fluido, o resultado for igual ou menor a 0,5 µg/L, e rejeitar quando for superior a este limite (BRASIL, 2002).

#### **2.5.6 Incidência de Aflatoxinas em Rações Animais**

Pereira *et al.* (2005) não constataram a presença de aflatoxina B<sub>1</sub> em nenhuma das 33 amostras de alimentos para bovinos analisadas, compreendendo amostras de ração, milho, farelo de soja, silagem de milho e capim.

Botura (2005) verificou que as análises de aflatoxinas em rações destinadas à alimentação de caprinos e em leite de cabra no Estado da Bahia não revelaram a presença dessas toxinas em todas as amostras avaliadas.

#### **2.5.7 Incidência de Aflatoxinas em Leite**

Os métodos para determinação de aflatoxina M<sub>1</sub> em leite utilizam, em sua maioria, extração com clorofórmio e purificação cromatográfica. Tanto a cromatografia em camada delgada (CCD) como a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) constituem as técnicas oficiais e convencionais para separação, detecção e quantificação de aflatoxina M<sub>1</sub> em extratos de leite (VAN EGMOND & DEKKER, 1995).

Outro método utilizado, porém em pequena proporção, foi descrito por Domingues *et al.* (1992) e Tuinstra *et al.* (1981), utilizando a técnica de diálise difásica para analisar aflatoxina M<sub>1</sub> em leite desnatado e diversos produtos lácteos, baseada no uso de membranas para separação de substâncias aplicadas em indústrias alimentícias há várias décadas.

Os níveis de contaminação do leite existente no mercado com aflatoxina M<sub>1</sub> estão sendo pesquisados nos países mais desenvolvidos, com o objetivo de verificar a extensão da contaminação e realizar uma maior conscientização, sendo que os resultados obtidos estão sendo utilizados por cada país, tentando-se definir limites máximos de tolerância (BENTO *et al.* 1989).

Prado *et al.* (1994) verificaram contaminação em duas das 38 amostras de leite cru do Estado de Minas Gerais, não detectando aflatoxina M<sub>1</sub> em 60 amostras de leite em pó analisadas. Apesar do baixo nível de contaminação, eles relatam a necessidade de um monitoramento por um prazo de 1 a 2 anos para confirmação.

Sabino *et al.* (1997) detectaram contaminação em uma das 100 amostras de leite pasteurizado e em nove das 50 amostras de leite cru analisadas no Estado de São Paulo. Entretanto, ainda existe uma lacuna de informações sobre a aflatoxina M<sub>1</sub>, tanto em relação à metodologia quanto à sua ocorrência.

Pereira *et al.* (2005) observaram a presença de aflatoxina M<sub>1</sub> em 19 das 36 amostras de leite cru (52,8%) e em 13 das 34 amostras de leite pasteurizado (38,2%) colhidas em propriedades da região de Lavras, Sul de Minas Gerais, porém nenhuma das amostras contaminadas estava com concentrações acima do limite máximo permitido pela legislação brasileira. Apesar de constatar contaminações nos dois casos citados anteriormente, as concentrações de aflatoxina M<sub>1</sub> nos leites crus e pasteurizados não diferiram entre si.

Martins & Martins (1986) constataram a presença de aflatoxina M<sub>1</sub> somente em uma amostra de cada marca de leite B das 4 marcas analisadas, totalizando um total de 224 amostras. Este leite é comercializado no município de São Paulo e apresentou baixos índices de contaminação e em pequena proporção (1,8%).

O teor de aflatoxina M<sub>1</sub> no leite tem mostrado sofrer uma influência sazonal (TUNG & HAMILTON, 1973; SMITH JR. *et al.*, 1976; VAN PEE *et al.*, 1977), sendo observado que as análises efetuadas no leite durante o inverno apresentaram uma proporção mais elevada de aflatoxina M<sub>1</sub> e, conseqüentemente, mais mensurável do que no verão, em virtude do maior consumo de ração (VAN PEE *et al.*, 1977; FREMY *et al.* 1981).

Segundo Applebaum *et al.* (1982), neste período de entressafra, geralmente o consumo de ração pelas vacas é bem mais elevado e, como há uma relação direta entre a ingestão de aflatoxina B<sub>1</sub> e a incidência de aflatoxina M<sub>1</sub> no leite, haveria maior probabilidade de ser encontrada.

Como o leite existente no comércio é uma mistura de leites de diferentes procedências, os níveis de aflatoxina M<sub>1</sub> são, muitas vezes, inferiores aos limites de

detecção dos métodos de análise utilizados (VAN EGMOND, 1994; SABINO *et al.* 1997).

### **2.5.8 Incidência de Aflatoxinas em Leite de Cabra**

Tiwari & Chauhan (1991) realizaram pesquisa sobre a ocorrência natural de aflatoxinas em leite de diferentes espécies animais na Índia, e verificaram a presença de AFM<sub>1</sub> e AFB<sub>1</sub>, em leite de búfala, vaca e ovelha; AFM<sub>2</sub>, no leite de cabra; e AFB<sub>1</sub>, em leite de camela. Os resultados desse estudo ainda revelaram que as maiores concentrações de AFM<sub>1</sub> foram observadas no leite de búfalas, enquanto no leite de ovelhas foram encontrados baixos níveis dessa toxina, sugerindo que ovelhas e camelas promovem menor conversão metabólica da AFB<sub>1</sub> em AFM<sub>1</sub> quando comparadas com a búfala.

Botura (2005) verificou que as otimizações dos métodos de CCD (Cromatografia em Camada Delgada) descritos pelo IAL (1985) e por SABINO *et al.* (1989) demonstraram eficiência das técnicas para a determinação de aflatoxinas em ração e AFM<sub>1</sub> no leite de cabra, respectivamente.

## **3 MATERIAL E MÉTODOS**

### **3.1 MATERIAL E LOCAL DE ANÁLISES E COLHEITAS**

As análises microbiológicas foram realizadas no Laboratório de Biologia e Fisiologia de Microrganismos da Universidade José do Rosário Vellano (UNIFENAS) em Alfenas, MG.

#### **3.1.1 Meios de cultura e reagentes**

- Ágar rosa de bengala cloranfenicol: 500 g (Difco);
- Ágar sabouraud-dextrose: 500g (Difco);
- Ágar potato-dextrose: 500 g (Difco);
- Caldo sabouraud-dextrose: 500g (Difco);
- Placas de sílica gel G60 – 20x20mm: 2 caixas com 25 unidades (Merck);
- Clorofórmio p.a.: 5 litros (Merck);
- Álcool metílico p.a.: 5 litros (Merck);
- Acetona p.a.: 2 litros (Merck);
- Sulfato de cobre: 500g (Merck);
- Terra diatomácea: 500g (Merck);
- Cloreto de potássio: 250g (Merck);
- Hexano p.a.: 2 litros (Merck).

### **3.1.2 Padrões de micotoxinas**

- Padrão de aflatoxina B<sub>1</sub> 50 mg (Sigma Chemical Company);
- Padrão de aflatoxina M<sub>1</sub> 50 mg (Sigma Chemical Company);
- Coluna de imunoafinidade para aflatoxina M<sub>1</sub>: *kits* para 25 análises (VICAM).

### **3.1.3 Local de colheita de amostras**

As amostras de ração e leite foram colhidas em três propriedades rurais localizadas no Sul de Minas Gerais e Média Mogiana Paulista, durante o ano de 2008 e início de 2009.

## 3.2 MÉTODOS

### 3.2.1 Colheita das amostras de concentrado e volumoso

As amostras de concentrado foram colhidas separadamente antes da mistura nos coxos numa quantidade de 250g de cada concentrado que foi utilizado em cada propriedade. Desta amostra foram feitas duas subamostras, uma de 100g, que foi enviada ao Laboratório de Análise de Alimentos para determinação de umidade, e outra, de 150g, que foi enviada ao Laboratório de Microbiologia para análise da microbiota fúngica. A colheita foi realizada uma vez no período de chuva e outra no período da seca em todas as propriedades. Do volumoso foi retirada uma amostra de 500g (FIG. 07), sendo que a amostra foi subdividida em 2 subamostras de 250g cada, sendo que uma foi armazenada em saco plástico e encaminhada ao Laboratório de Análise de Alimentos para avaliação da umidade e a outra foi acondicionada em saco de papel Kraft estéril e encaminhada imediatamente ao Laboratório de Microbiologia para análises.



FIGURA 07 – Colheita da amostra de volumoso da Fazenda 2.

### **3.2.2 Colheita das amostras de leite**

A colheita de amostras de leite também foi realizada em duas épocas, uma no período de chuva e outra no período da seca, em cada propriedade, sendo que foi feita uma colheita do “pool” do leite produzido por todas as cabras de cada propriedade. As colheitas de leite das cabras foram realizadas 12 horas após a ingestão das rações, sendo colhidas amostras de 150mL de leite. As amostras de leite foram colhidas em frascos estéreis envoltos em papel alumínio e encaminhadas imediatamente ao Laboratório de Microbiologia.

### **3.2.3 Dados climatológicos da região**

Durante o período de colheita foram avaliadas as condições climáticas (temperatura, altitude, latitude, umidade relativa do ar e índice pluviométrico), onde foi correlacionada a incidência de fungos toxigênicos de acordo com a temperatura e umidade relativa de cada região.

### **3.2.4 Determinação da umidade dos alimentos**

As amostras de alimento (concentrado ou volumoso) foram encaminhadas ao Laboratório de Análise de Alimentos, sendo que somente as amostras de volumoso foram submetidas à secagem em estufa com circulação forçada de ar a 60°C, durante 48 horas. Posteriormente, tanto as amostras de volumoso pré-secadas, quanto as amostras de concentrado foram moídas em peneiras com malhas de 2 mm de diâmetro, retirando-se uma subamostra para análise da matéria seca (MS), conforme a Association of Official Analytical Chemists - AOAC (1975).

### **3.2.5 Determinação da atividade de água**

A atividade de água das amostras de ração e volumoso foi determinada através de Aparelho Paw Kit, marca DECAGON Devices Aqualab (Decagon Devices Inc. Pullman, WA).

### **3.2.6 Padrões de micotoxinas**

Foram utilizados padrões de aflatoxina B<sub>1</sub> e aflatoxina M<sub>1</sub> (Sigma Chemical Company).

### **3.2.7 Isolamento dos fungos das amostras de concentrado e volumoso**

Das amostras de ração e volumoso foram selecionados 25g, os quais foram diluídos em 225 mL de água peptonada (diluição 10<sup>-1</sup>), sendo que foram feitas diluições decimais sucessivas até 10<sup>-3</sup>. Após isto, as soluções foram agitadas em agitador horizontal por 5 minutos. De cada diluição foi retirado 1mL e semeado em placas vazias estéreis, sendo em seguida adicionados 20mL de ágar rosa de bengala cloranfenicol (100mg/L), resfriado a 45°C (“pour plate”), em duplicata. Após a solidificação do ágar, as placas foram incubadas a 25°C por um período de 5 a 7 dias. Após o período de incubação foi realizada contagem de Unidades Formadoras de Colônias por grama (UFC/g).

### **3.2.8 Identificação dos fungos das amostras de concentrado e volumoso**

A identificação dos fungos foi feita de acordo com suas características macro e microscópicas, seguindo os métodos recomendados por Rapper & Fennell (1965), Barnett & Hunter (1972) e Nelson *et al.* (1983).

### **3.2.9 Toxigenicidade das culturas de espécies do gênero *Aspergillus* (*Aspergillus flavus* e *Aspergillus spp.*)**

As culturas do gênero *Aspergillus* isoladas das amostras de concentrado e volumoso foram inoculadas em duplicata em garrafas de Roux contendo caldo Sabouraud (FRISVAD & SAMSON, 1991), incubadas a 25° C durante 15 dias, até que se formou um tapete de crescimento fúngico na superfície do meio. Após esse período foram realizadas extrações das culturas para detecção de aflatoxina B<sub>1</sub> (LIN & DIANESE, 1976).

#### **3.2.9.1 Análise qualitativa**

Após a extração, os extratos foram submetidos a análises micotoxicológicas pela técnica de cromatografia em camada delgada (CDC) com os respectivos solventes e padrões de referência por comparação de Rf(s) e aspecto da mancha entre padrões e amostra.

#### **3.2.10 Análises micotoxicológicas das amostras de concentrado e volumoso para detecção de micotoxinas.**

As amostras de ração e volumoso que apresentaram contaminação com fungos toxigênicos foram submetidas às análises micotoxicológicas, onde empregou-se o método de Soares & Rodrigues-Amaya (1989), pela técnica de cromatografia em camada delgada (CCD), com limite de detecção de 2; 5; 15 e 55 µg/kg para aflatoxina B<sub>1</sub>, ochratoxina A, esterigmatocistina e zearalenona, respectivamente.

##### **3.2.10.1 Testes confirmatórios para aflatoxina B1**

Com as análises qualitativas positivas foram realizados os seguintes testes confirmatórios:

- a) Desenvolvimento da placa cromatografada em éter etílico. Esta técnica foi utilizada para remover certas impurezas presentes na sílica gel e remoção de gorduras presentes nas amostras;
- b) Aspersão de ácido sulfúrico a 50% sobre as manchas fluorescentes para se observar a mudança de fluorescência azul para amarela;
- c) Cromatografia em camada delgada bidimensional.

#### **6.2.11 Análises micotoxicológicas das amostras de leite para aflatoxina M<sub>1</sub>**

O método utilizado foi o descrito por Tuinstra *et al.* (1993), em que a aflatoxina M<sub>1</sub> foi extraída do leite após passagem da amostra em uma coluna de imunoafinidade. A coluna contém anticorpos monoclonais específicos que formam com a aflatoxina M<sub>1</sub> um conjugado antígeno-anticorpo. Todos os outros componentes do leite foram lavados da coluna com água. A aflatoxina M<sub>1</sub> foi então eluída com acetonitrila.

##### **6.2.11.1 Procedimento**

O leite foi passado diretamente através da coluna de imunoafinidade, onde foram recolhidos 60 mL. Posteriormente, foram transferidos aos poucos 50mL deste leite preparado para a seringa de vidro, permitindo sua passagem pela coluna em um fluxo de 2-3mL/minuto. Após a eluição da amostra, lavou-se a coluna com 10mL de água deionizada, deixando-a secar completamente. Após a coluna ser desconectada do sistema de vácuo, foram passados 4mL de acetonitrila, que ficou em contato com a coluna por 2-3 minutos para garantir uma completa remoção da

aflatoxina M<sub>1</sub>. Então recolheu-se o eluato em um frasco âmbar de 5mL. Este sofreu evaporação a 50°C, sob atmosfera de nitrogênio, e resuspensão imediata em 1mL da fase móvel de injeção. Agitou-se em ultrassom por 1 minuto e filtrou-se na membrana PTFE de 0,45 µm de poro.

Foram então injetados 100 µL da amostra (duplicatas) e 100 µL de cada solução padrão de aflatoxina M<sub>1</sub> (2 repetições). A partir do cálculo da área do pico da aflatoxina M<sub>1</sub> do extrato da amostra e das soluções padrões, foi calculado o teor de aflatoxina M<sub>1</sub> na amostra.

#### 6.2.11.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

A separação e quantificação da aflatoxina M<sub>1</sub> foi conduzida em um sistema de cromatografia Shimadzu com detector de fluorescência (excitação: 366nm e emissão: 428nm) e com coluna Shim-pack CLC-ODS RP-18, 5 µm 4,6 x 250mm, precedida de pré-coluna Shim-pack G-ODS 5 µm 4 x 10mm. A coluna foi eluída isocraticamente com água; isopropanol; acetonitrila (80:12:8) a um fluxo de 1mL/min. Todos os solventes utilizados foram os recomendados para cromatografia líquida e a água foi purificada pelo sistema de ultrafiltração (Barnstead). Durante toda a análise foi borbulhado gás hélio na fase móvel.

#### 6.2.12 Análises estatísticas

O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado (DIC), em esquema fatorial (3 X 2 X 2), em que o fator alimento foi em número de dois e correspondentes ao volumoso e concentrado fornecidos às cabras. As três Fazendas em estudo foi o segundo fator e as duas épocas o terceiro fator. Foram realizadas 4 repetições dos alimentos em cada época e em cada propriedade. O

experimento foi realizado em duas épocas: época 1 (E1), representando o verão, quando ocorre aumento das chuvas e da temperatura, e época 2 (E2), representando o inverno, quando ocorre exatamente o inverso. A análise conjunta foi realizada para incorporar o efeito da época ao estudo sendo portanto época um dos fatores. Cada fazenda possui 16 parcelas.

Os resultados obtidos foram analisados com o uso do Programa Sisvar e os fatores foram comparados utilizando-se o teste de Tukey em nível de significância de 5%.

Para a realização da análise conjunta foi necessário testar as variâncias dos erros experimentais no nível de significância de 5%, utilizando o teste de Bartlett.

### **6.2.13 O Modelo Estatístico:**

O modelo estatístico utilizado neste estudo foi:

$$y_{ijkl} = \mu + F_i + E_j + A_k + FA_{ik} + EA_{jk} + FE_{ij} + FEA_{ijk} + \epsilon_{ijkl}$$

$y_{ijkl}$  = observação da parcela da fazenda  $i$ , época  $j$ , tratamento  $k$  na repetição  $l$ ;

$\mu$  = média geral do experimento;

$F_i$  = efeito da fazenda  $i$  ( $i = 1, \dots, 3$ );

$E_j$  = efeito da época  $j$  ( $j = 1$  a  $2$ );

$A_k$  = efeito do alimento  $k$  ( $k = 1$  a  $2$ );

$FA_{ik}$  = efeito da interação entre a fazenda i e o alimento k ;

$EA_{jk}$  = efeito da interação entre a época j e o alimento k;

$FE_{ij}$  = efeito da interação entre a fazenda i e a época j;

$FEA_{ijk}$  = efeito da interação entre a fazenda i, a época j e o alimento k;

$\varepsilon_{ijkl}$  = erro experimental;

#### **4 RESULTADOS E DISCUSSÃO:**

Uma atividade agropecuária que vem demonstrando crescimento no Brasil é a caprinocultura leiteira, sendo que a produção da Região Sudeste corresponde a 54,6 % de todo o leite de cabra produzido no País, sendo frequentemente utilizado na alimentação humana devido ao seu alto valor nutricional, excelente digestibilidade e baixo potencial alergênico, utilizado especialmente para crianças, idosos e indivíduos portadores de alergia ao leite bovino. O triunfo nacional e internacional da produção de leite está diretamente relacionado com o monitoramento da qualidade do mesmo.

A presença de micotoxinas em alimentos é um sério problema para saúde pública e para a qualidade dos alimentos. Os fungos são conhecidos pela sua capacidade de produzir metabólitos tóxicos, particularmente as aflatoxinas. A rapidez na identificação e caracterização das aflatoxinas e a demonstração da aflatoxina B<sub>1</sub> como um carcinógeno extremamente potente ao ser humano e animal, impulsionaram a realização deste trabalho.

A cromatografia de camada delgada (CCD) é uma das técnicas mais utilizadas na rotina laboratorial para a análise de aflatoxina em alimentos, devido a

sua simplicidade, baixo custo e possibilidade de análise simultânea de mais de uma aflatoxina e variados substratos.

Durante a avaliação da microbiota fúngica do concentrado e volumoso utilizados na alimentação dos caprinos, verificou-se que, das amostras analisadas após o crescimento e identificação macro e microscópica foi observado um total de 166 colônias fúngicas. Sassahara *et al.*(2003) relataram que vários fatores contribuem para a contaminação fúngica, como inadequação das estruturas físicas dos depósitos e das condições de armazenamento dos alimentos destinados às cabras, as infiltrações de paredes e telhados, dos lugares de armazenamento dos alimentos, podem favorecer o aumento da umidade no interior dos mesmos e da elevação do teor de umidade dos produtos armazenados, assim como a violação dos recipientes de rações por roedores tanto favorece o aumento do teor de umidade dos alimentos como podem esses animais atuar como carregadores de fungos para o interior das embalagens dos alimentos.

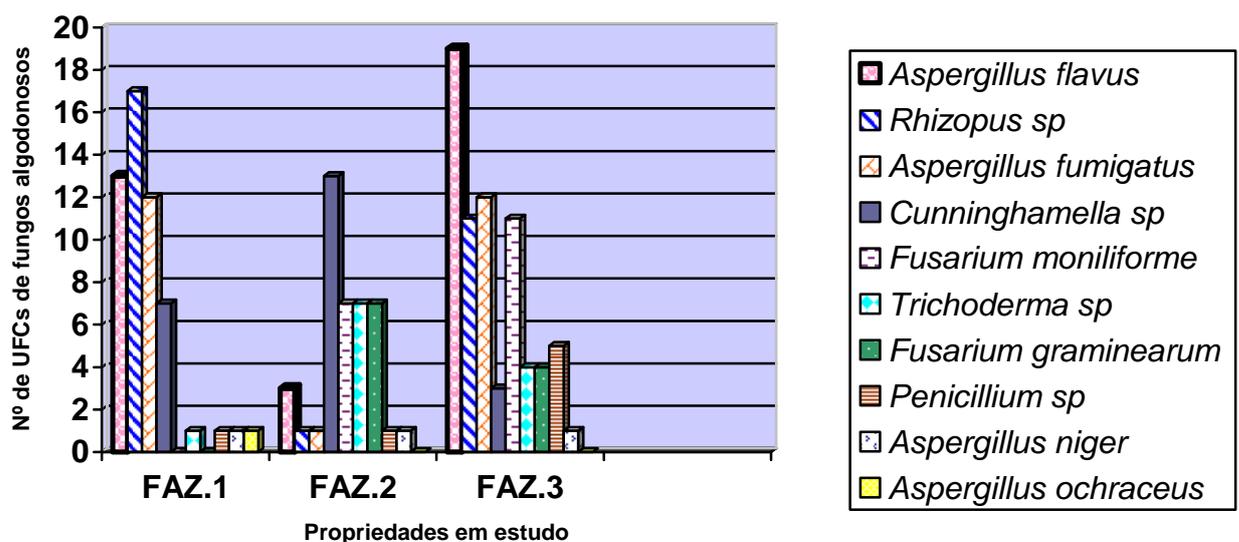
Carvalho (1995) evidencia que a contaminação de alimentos por micotoxinas pode promover prejuízos de ordem econômica, sanitária e comercial, em decorrência da perda de produtos vegetais e da redução na produção de alimentos de origem animal, além da exposição humana e animal a essas toxinas, o que justifica também a realização deste trabalho.

O sistema de criação de caprinos leiteiros nas propriedades avaliadas era de confinamento na Fazenda 1 e semi-intensivo na Fazenda 2 e 3, onde, de acordo com Zacharias (2001), este tipo de sistema de criação é geralmente caracterizado por práticas de armazenamento de produtos utilizados na alimentação dos animais. Porém, Pier *et al.* (1980) relatam que estocagem de alimento contribui para a redução dos problemas nutricionais dos rebanhos, mas aumenta os riscos de

contaminação dos alimentos por fungos e conseqüentemente por aflatoxinas, principalmente se o armazenamento for feito de forma inadequada e em regiões com temperatura e umidade elevadas.

Os alimentos destinados às cabras, concentrado e volumoso, eram amostras de milho, farelo de soja, silagem de milho e capim. Hollinger & Ekperigin (1999) relatam que os fungos podem ser encontrados em vários produtos alimentícios como o milho, trigo e ração, propiciando desta maneira a contaminação por aflatoxinas.

Na FIG. 08, pode-se observar que, entre as 166 colônias de fungos algodonosos detectados nas três Fazendas, 35 (21,1%) são de *Aspergillus flavus*, 29 (17,5%) de *Rhizopus sp*, 25 (15,1%) de *Aspergillus fumigatus*, 23 (13,9%) de *Cunninghamella sp*, 12 (7,2%) de *Trichoderma sp*, 18 (10,8%) foi de *Fusarium moliniforme*, 11 (6,6%) de *Fusarium graminearum*, 7 (4,2%) de *Penicillium sp*, 03 (1,8%) de *Aspergillus niger*, 2 (1,2%) de *Epicoccum sp* e 1 (0,6%) de *Aspergillus ochraceus*.

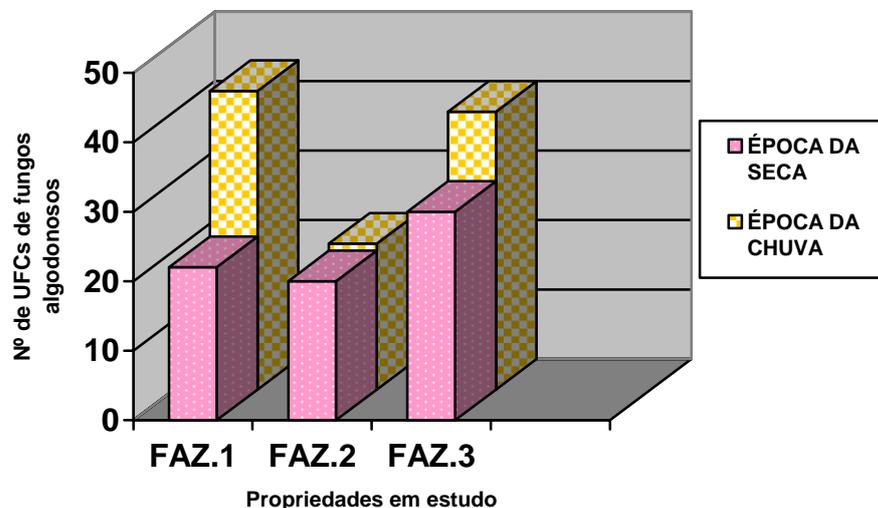


**FIGURA 08** - Gêneros e espécies de fungos algodonosos identificados (LACAZ, 1984) nas três propriedades em estudo, sendo fazenda 1 (Faz.1), fazenda 2 (Faz.2) e fazenda 3 (Faz. 3).

Das 166 colônias fúngicas analisadas no concentrado e volumoso destinados à alimentação dos caprinos leiteiros, 64 (38,6%) eram do gênero *Aspergillus* e foram utilizadas para análise de aflatoxina B1 no alimento destinado às cabras, onde Moss (2002) afirma que as aflatoxinas são um grupo de micotoxinas de importância em alimentos e rações, e os principais fungos toxigênicos produtores de aflatoxinas são: *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus* e *A. nomius*, sendo que Lazzari (1993) evidencia que a importância das micotoxinas se deve aos danos provocados à saúde humana e animal, e também aos prejuízos econômicos na agricultura.

Observou-se que na época da seca houve um crescimento de 72 (43,5%) colônias fúngicas e ocorreu um aumento de 33,0% do crescimento desses fungos na época da chuva, totalizando 94 (76,6%) das colônias em estudo ( FIG. 09). Midio & Martins (2000) relataram que a umidade relativa do ar em torno de 85% propicia o desenvolvimento de fungos, observando que na época da chuva houve um aumento de 25% da umidade relativa do ar, ficando em torno de 80% em relação à época da seca, onde a umidade relativa do ar foi de 64%, justificando-se o maior crescimento

fúngico na época da chuva.



**FIGURA 09** - Número de colônias fúngicas no período da seca e chuva estudadas na fazenda 1 (FAZ.1), fazenda 2 (FAZ.2) e fazenda 3 (FAZ.3).

TABELA 01

Teores de umidade do concentrado e volumoso encontrados nas fazendas 1, 2 e 3, conforme o teste de Tukey.

| TRATAMENTOS        | FAZENDA 1     | FAZENDA 2 | FAZENDA 3 |
|--------------------|---------------|-----------|-----------|
|                    | <b>MÉDIAS</b> |           |           |
| <b>CONCENTRADO</b> | 10,864 Bb     | 10,445 Bb | 44,575 Ba |
| <b>VOLUMOSO</b>    | 73,798 Aa     | 62,345 Ab | 75,250 Aa |

FONTE: Laboratório de Biologia e Fisiologia de Microrganismos – UNIFENAS, 2010

NOTA: Pelo teste de Tukey médias seguidas por mesma letra, dentro das linhas minúsculas e colunas letras maiúsculas, são estatisticamente iguais no nível de significância de 5%.

O teor médio de umidade do concentrado 3 foi estatisticamente diferente e mais elevado do que o teor médio de umidade do concentrado 1 e 2, que são estatisticamente iguais e com teores médios de umidade mais baixos do que o apresentado no concentrado 3, de acordo com o teste de Tukey. Observa-se também que os teores de umidade do volumoso 3 e 1 foram estatisticamente iguais e mais elevados que o do volumoso 2, que estatisticamente apresentou teor de umidade mais baixo do que os demais, de acordo com o teste de Tukey. (TAB.01). O coeficiente de variação foi de 8,93%, demonstrando a boa precisão dos resultados analisados. A fonte de variação fazenda versus tratamento apresenta um p-valor de 0,0000, indicando que os tratamentos não são iguais, veja o desdobramento apresentado na TAB.01. O erro padrão foi de 1,46. Comparando-se os teores médios de umidade dos concentrados com os dos volumosos observa-se que os teores de umidades médios dos volumosos nas três fazendas em estudo são estatisticamente diferentes e mais elevados que os teores de umidades médios dos concentrados que são estatisticamente mais baixos. As fazendas 1 e 3 utilizam concentrado comercial e, na fazenda 2 o concentrado é preparado na propriedade, mas ambos os concentrados apresentam constituintes com pouco teor de umidade e maior quantidade de matéria seca, enquanto os volumosos das três propriedades foram silagem com aspecto suculento e menor quantidade de matéria seca, o que justifica a diferença entre os teores de umidade do concentrado e volumoso.

TABELA 02

Número de colônias fúngicas relacionadas com o teor de umidade do alimento destinado a caprinos nas fazendas 1, 2 e 3.

| Fazendas | Nº de colônias fúngicas |             | * URA mensal (%) |             |
|----------|-------------------------|-------------|------------------|-------------|
|          | VOLUMOSO                | CONCENTRADO | VOLUMOSO         | CONCENTRADO |

|           |    |    |       |       |
|-----------|----|----|-------|-------|
| FAZENDA 1 | 10 | 45 | 73,80 | 10,86 |
| FAZENDA 2 | 14 | 27 | 62,30 | 11,70 |
| FAZENDA 3 | 20 | 50 | 75,30 | 11,50 |

---

FONTE: Laboratório de Biologia e Fisiologia de Microrganismos – UNIFENAS, 2010\* URA = Umidade relativa do alimento.

A fazenda 3 apresentou um número de colônias fúngicas 17,5% superior ao da fazenda 2 e 11,1% da fazenda 1, Verificou-se também que onde o teor de umidade do alimento se apresenta mais elevado, fazenda 3 e fazenda 1, o número de colônias também foi maior (TAB 2).

Visando caracterizar os alimentos destinados às cabras quanto à disponibilidade de água para crescimento fúngico no momento da amostragem, todos os alimentos coletados, volumoso e concentrado, foram avaliados em laboratório quanto à atividade de água (Aa) do seu conteúdo. A atividade de água encontrada no concentrado e volumoso variava em média de 0,94 para o volumoso e 0,66 para o concentrado, e em ambos os alimentos foram encontrados crescimento fúngico e presença de aflatoxina. Segundo Taniwaki & Silva (1996), para crescimento fúngico e produção de aflatoxinas, são necessários valores de Aa superiores a 0,65, o que justifica o crescimento fúngico encontrado nos alimentos analisados.

A contaminação fúngica e conseqüentemente a produção de aflatoxinas nos alimentos destinados aos caprinos leiteiros, dentre vários fatores, inclui a inadequação das estruturas físicas dos depósitos e das condições de armazenamento dos alimentos. Em todas as propriedades avaliadas o regime de alimentação era semelhante, constituído de volumoso e concentrado (ração comercial ou preparada na propriedade), onde o alimento era fornecido duas vezes ao dia para os caprinos em lactação. Não se observou diferença significativa sobre a

contaminação por aflatoxinas entre as rações comerciais e aquelas preparadas na propriedade, Porém, Sassahara *et al.*, (2003) relatam maior ocorrência dessas toxinas em amostras de ração preparadas na propriedade.

TABELA 03  
Teores de atividade de água no concentrado das fazendas 1, 2 e 3.

| <b>Tratamentos</b>       | <b>Médias</b>  |
|--------------------------|----------------|
| CONCENTRADO DA FAZENDA 3 | 0,824 <b>a</b> |
| CONCENTRADO DA FAZENDA 1 | 0,675 <b>b</b> |
| CONCENTRADO DA FAZENDA 2 | 0,671 <b>b</b> |

FONTE: Laboratório de Biologia e Fisiologia de Microrganismos – UNIFENAS, 2010

NOTA: Pelo teste de Tukey médias seguidas por mesma letra são estatisticamente iguais no nível de significância de 5%.

Na TAB. 03, verificou-se a atividade de água do concentrado nas três propriedades em estudo. Observou-se que o concentrado da fazenda 3 é estatisticamente diferente e com maior teor de água livre em seu interior do que o encontrado no concentrado das fazendas 2 e 1, que são estatisticamente iguais e com atividade de água mais baixa do que o concentrado da fazenda 3, de acordo com o teste de Tukey com nível de confiança de 95%. O coeficiente de variação foi de 8,02%, indicando a boa precisão dos resultados analisados. A fonte de variação fazendas versus tratamento apresenta um p-valor de 0,0002, indicando que os tratamentos não são iguais e possuem um erro padrão de 0,24.

TABELA 04  
Teores de atividade de água no volumoso das fazendas 1,2 e 3.

| <b>Tratamentos</b>    | <b>Médias</b>  |
|-----------------------|----------------|
| VOLUMOSO da FAZENDA 1 | 0,955 <b>a</b> |
| VOLUMOSO da FAZENDA 2 | 0,954 <b>a</b> |
| VOLUMOSO da FAZENDA 3 | 0,913 <b>a</b> |

FONTA: Laboratório de Biologia e Fisiologia de Microrganismos – UNIFENAS, 2010

NOTA: Pelo teste de Tukey médias seguidas por mesma letra são estatisticamente iguais no nível de significância de 5%.

Conforme a TAB. 04, o valor da atividade de água do volumoso das fazendas 1, 2 e 3 são estatisticamente iguais. O coeficiente de variação foi de 8,02%, indicando a boa precisão dos resultados analisados. A fonte de variação fazendas versus tratamento apresenta um p-valor de 0,0002, indicando que os tratamentos não são iguais. O erro padrão foi de 0,228.

Os valores encontrados referentes à umidade relativa do alimento fornecido às cabras e à atividade de água dos mesmos podem ser observados na TAB.05.

TABELA 05

Resultado da umidade relativa do alimento mensal (URA) e da atividade de água no alimento (concentrado e volumoso) das Fazendas 1, 2 e 3.

| <b>Fazendas</b>      | <b>*URA mensal (%)</b> |              | <b>ATIVIDADE DE ÁGUA NO ALIMENTO</b> |              |                 |                    |
|----------------------|------------------------|--------------|--------------------------------------|--------------|-----------------|--------------------|
|                      | <b>SECA</b>            |              | <b>CHUVA</b>                         |              | <b>VOLUMOSO</b> | <b>CONCENTRADO</b> |
|                      | <b>VOL.</b>            | <b>CONC.</b> | <b>VOL.</b>                          | <b>CONC.</b> |                 |                    |
| FAZ.1 <sup>(1)</sup> | 73,5                   | 11,1         | 74,1                                 | 10,7         | 0,95            | 0,67               |

|                      |      |      |      |      |      |      |
|----------------------|------|------|------|------|------|------|
| FAZ.2 <sup>(2)</sup> | 62,3 | 11,3 | 62,4 | 12,1 | 0,95 | 0,67 |
| FAZ.3 <sup>(3)</sup> | 75,8 | 11,2 | 75,6 | 11,9 | 0,93 | 0,66 |

---

FONTE: Laboratório de Biologia e Fisiologia de Microrganismos – UNIFENAS, 2010

NOTAS: <sup>(1)</sup> Fazenda 1; <sup>(2)</sup> Fazenda 2; <sup>(3)</sup> Fazenda 3;

URA = Umidade relativa do alimento.

As condições climáticas, de forma geral, caracterizadas por altos índices de temperatura (21° a 28° C), a umidade relativa do ar entre 64 e 79,5% e a precipitação pluviométrica favoreceram o desenvolvimento de fungos toxigênicos, principalmente dos produtores de aflatoxinas, resultados estes semelhantes aos trabalhos de Gourama & Bullerman (1995), que relatam que condições climáticas caracterizadas por altos índices de temperatura (25 a 30°C), umidade relativa do ar (acima de 80%) e precipitação pluviométrica favoreceram o desenvolvimento de fungos toxigênicos.

Yanaka *et al.*(2004) têm demonstrado uma correlação positiva entre fatores climáticos e o nível de contaminação por aflatoxinas em produtos alimentícios como ração e milho. Entretanto, a ausência da influência de fatores climáticos sobre a frequência de fungos do gênero *Aspergillus* ( POZZI *et al.* 1995) e sobre a produção de aflatoxinas (THOMPSON & HENKE, 2000), tem sido descrita em amostras de milho. Porém, Baldissera *et al.*(1993) não relataram diferenças entre o nível de contaminação por aflatoxinas em produtos destinados à alimentação animal nas diferentes estações do ano no Brasil.

As variações dos fatores climáticos apresentaram valores similares nas três fazendas em estudo e tiveram influência significativa sobre a presença de colônias fúngicas e presença de aflatoxinas nos alimentos analisados, como mostra a TAB. 06.

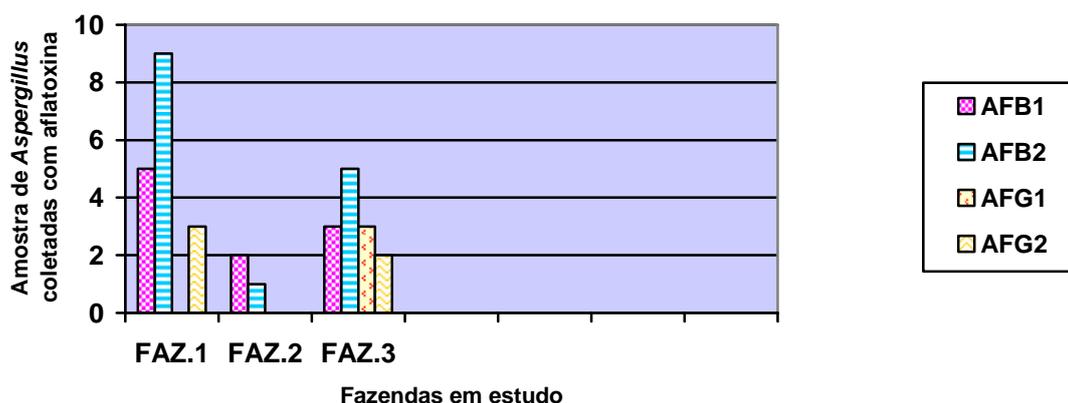
TABELA 06

Resultados da média da umidade relativa do ar (UR%) e índice pluviométrico (chuva em mm) referente à época da seca e época da chuva que foram realizadas as coletas nas Fazendas 1, 2 e 3.

| COLETAS        | FAZENDA 1       |                       | FAZENDA 2       |                       | FAZENDA 3       |                       |
|----------------|-----------------|-----------------------|-----------------|-----------------------|-----------------|-----------------------|
|                | UR %<br>(MÉDIA) | CHUVA (mm)<br>(MÉDIA) | UR %<br>(MÉDIA) | CHUVA (mm)<br>(MÉDIA) | UR %<br>(MÉDIA) | CHUVA (mm)<br>(MÉDIA) |
| ÉPOCA DA SECA  | 64,2            | 1,7                   | 64,2            | 1,7                   | 64,3            | 1,5                   |
| ÉPOCA DA CHUVA | 79,5            | 8,5                   | 79,5            | 8,5                   | 79,2            | 7,1                   |

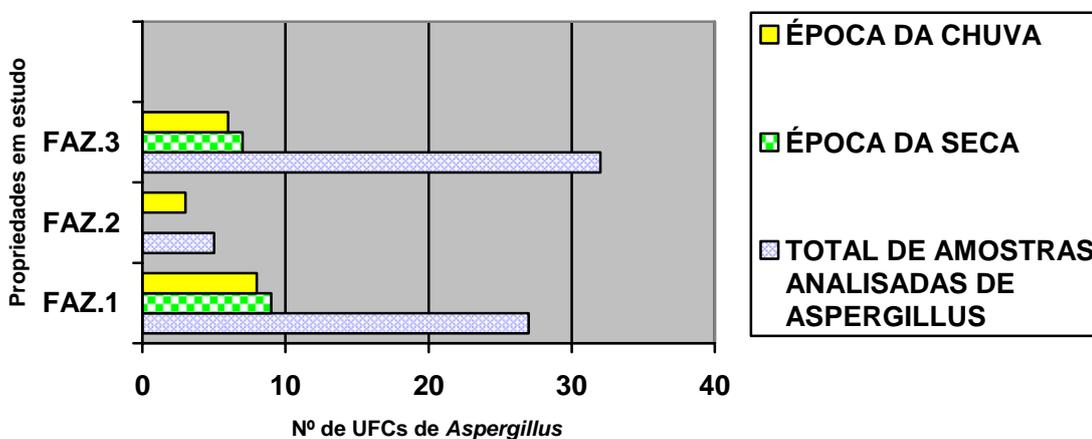
FONTE: Laboratório de Biologia e Fisiologia de Microrganismos – UNIFENAS, 2010

Após a análise qualitativa da toxigenicidade das culturas da espécie do gênero *Aspergillus*, observou-se, de acordo com a FIG. 10, a presença de aflatoxina B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub>. Na fazenda 1, das 27 amostras de *Aspergillus* coletadas, 05 (18,5%) apresentaram aflatoxina B<sub>1</sub>; 09 (33,3 %), aflatoxina B<sub>2</sub>; 03 (11,1%), aflatoxina G<sub>2</sub>; e do total de amostras nenhuma foi produtora de aflatoxina G<sub>1</sub>. Na fazenda 2, de 05 amostras analisadas, 02 (40%) apresentaram aflatoxina B<sub>1</sub>; 01 (20%), aflatoxina B<sub>2</sub>; e do total de amostras, nenhuma foi produtora de aflatoxina G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub>. Na fazenda 3, das 32 amostras analisadas, 03 (9,4%) foram produtoras de aflatoxina B<sub>1</sub>; 05 (15,6%), de aflatoxina B<sub>2</sub>; 03 (9,4%) estavam contaminadas por aflatoxina G<sub>1</sub> e 02 (6,3%) eram de aflatoxina G<sub>2</sub>.



**Figura 10** - Valores referentes ao número de amostras de *Aspergillus sp* produtoras de aflatoxinas B1, B2, G1 e G2.

Na FIG. 11, pode-se observar que houve um aumento de fungos do gênero *Aspergillus* na época da seca nas fazendas 1 e 3. Porém, na fazenda 2 não se encontrou este gênero nesta época, em virtude da forma do manejo utilizado, onde o volumoso foi preparado no momento de ser oferecido às cabras, assim como o concentrado que também foi preparado na fazenda e estocado por um curto período de dias, mas a presença de fungos do gênero *Aspergillus* foi verificada na época da chuva.



**Figura 11** - Valores referentes ao número de amostras cultivadas de *Aspergillus* nas épocas da seca e da chuva.

WangiKar *et al.* (2005) afirmam que as quatro aflatoxinas encontradas em produtos alimentícios são: B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>), B<sub>2</sub> (AFB<sub>2</sub>), G<sub>1</sub> (AFG<sub>1</sub>) e G<sub>2</sub> (AFG<sub>2</sub>), sendo que a AFB<sub>1</sub> é considerada como mais tóxica e potente agente carcinogênico, o que concorda com o fato de, no alimento analisado destinado às cabras, ter sido encontrado AFB<sub>1</sub> somente na Fazenda 3, em 29,2% das amostras. AFB<sub>2</sub> foi encontrada na propriedade 3 e 2, com proporções respectivas de 12,5 e 43,8%. A AFG<sub>1</sub> foi encontrada nas três fazendas em estudo, sendo de 25% na Fazenda 3; 6,3% na Fazenda 2; e 25% na Fazenda 1. A AFG<sub>2</sub> foi encontrada somente nas Fazendas 3 e 1, nas proporções respectivas de 12,5 % e 25%. Os resultados encontrados para aflatoxina são semelhantes aos resultados encontrados por Solovey *et al.*,(1999), nas quais não houve detecção de aflatoxinas em 37 amostras de alimentos derivados de milho provenientes da Argentina, e as de Abdulkadar *et al.* (2002), que observaram contaminação de AFB<sub>1</sub> em três das 54 amostras de milho e derivados provenientes do Catar.

As amostras de volumoso e concentrado foram submetidas à cromatografia em camada delgada (CCD). Observou-se que nas Fazendas 1, 2 e 3 as amostras de ração apresentavam-se contaminadas com aflatoxinas nas proporções de 16 (50%), 16 (50%) e 24 (79,2%), respectivamente (Tabela 07). Também, na fazenda 1, houve maior produção de aflatoxinas no volumoso (50% na época da seca e 50% na época da chuva), estando ausentes no concentrado. Na fazenda 2 houve presença de aflatoxina nas duas épocas , sendo de 18,8% no volumoso e de 31,3% no concentrado. A fazenda 3 também apresentou aflatoxinas no volumoso e concentrado nas duas épocas em estudo, sendo de 29,2% de

aflatoxinas presentes no volumoso e de 50% no concentrado, onde se nota um aumento de 50% da presença de aflatoxina do concentrado na época da chuva.

**TABELA 07**  
Ocorrência de aflatoxina B1, B2, G1 e G2 em análises das amostras de concentrado e volumoso por comparação de Rf(s) entre padrões de referência e amostra.

| <b>Amostras</b>                 | <b>FAZENDA 1</b> | <b>FAZENDA 2</b> | <b>FAZENDA 3</b> |
|---------------------------------|------------------|------------------|------------------|
| Nº ANALISADO                    | 16               | 16               | 24               |
| VOLUMOSO<br>(época da seca)     | 04               | 01               | 05               |
| VOLUMOSO<br>(época da chuva)    | 04               | 02               | 02               |
| CONCENTRADO<br>(época da seca)  | 00               | 03               | 04               |
| CONCENTRADO<br>(época da chuva) | 00               | 02               | 08               |
| AFB <sub>1</sub> <sup>(1)</sup> | ND*              | ND*              | 07               |
| AFB <sub>2</sub> <sup>(2)</sup> | ND*              | 07               | 03               |
| AFG <sub>1</sub> <sup>(3)</sup> | 04               | 01               | 06               |
| AFG <sub>2</sub> <sup>(4)</sup> | 04               | ND*              | 03               |

FONTE: Laboratório de Biologia e Fisiologia de Microrganismos – UNIFENAS, 2010

NOTAS: <sup>(1)</sup> FAflatoxina B<sub>1</sub>; <sup>(2)</sup> Aflatoxina B<sub>2</sub>; <sup>(3)</sup> FAflatoxina G<sub>1</sub>; <sup>(4)</sup> Aflatoxina G<sub>2</sub>

ND\*: não detectado

Em relação à análise de AFM1 em leite de cabra, observou-se que nos resultados obtidos não foi detectado em nenhuma das 24 amostras de leite caprino analisados a presença da aflatoxina em estudo, como demonstra a FIG. 12.

A caprinocultura leiteira vem apresentando considerável crescimento no Brasil, pois o leite de cabra é frequentemente utilizado na alimentação humana, devido às suas características nutricionais, pois é rico em extratos secos, tem pouco colesterol, alivia alergias e enxaquecas provocadas pelo leite de vaca e é um fortificante, pela sua fácil digestão e composição. Portanto é muito importante na alimentação de pessoas convalescentes de doenças como o câncer, de idosos com

dificuldades digestivas e crianças, principalmente as acometidas de alergias (SILVA & SILVA, 2005).

A aflatoxina M<sub>1</sub> é um produto da biotransformação da aflatoxina B<sub>1</sub>, sendo que sua conversão ocorre no fígado e é excretada no leite de animais que ingeriram alimentos contaminados com aflatoxina B<sub>1</sub> (CAST, 2003).

Os resultados da análise de AFM<sub>1</sub> nas amostras de leite de cabra avaliadas pelo método descrito por Tuinstra *et al.* (1993) não revelaram a presença da toxina. Provavelmente o resultado decorreu da utilização de rações de boa qualidade, cujo acondicionamento era realizado em recipientes fechados e mantidos em depósitos e em bom estado de conservação e arejamento com curto período de dias, em torno de uma a duas semanas. Estudos realizados por Martins *et al.* (1994), em Portugal, e por Tiwari & Chauhan (1991), na Índia, e Botura (2005), no Brasil, também não evidenciaram a presença de AFM<sub>1</sub> em amostras de leite caprino analisadas. Porém, a ocorrência de AFM<sub>1</sub> no leite caprino tem sido verificada por estudos realizados por Hahn & Korr (1989), na Alemanha, Finoli e Vecchio (1997) e Roussi *et al.* (2002), na Itália.

Kamkar (2002) demonstrou em uma tendência sazonal na contaminação do leite de diferentes espécies animais por AFM<sub>1</sub>, onde a maior incidência geralmente ocorre no inverno, quando os animais são alimentados principalmente com concentrado, o que não foi observado no desenvolvimento deste trabalho. Porém, na FIG. 09, observou-se um aumento de colônias fúngicas algodonosas no inverno de 50% na Fazenda 1; 33,3% na Fazenda 3; sendo que, na Fazenda 2, não houve um aumento significativo, mas, mesmo com o aumento das colônias fúngicas não houve contaminação do leite por aflatoxina em nenhuma das épocas em estudo, ou seja, época da seca e da chuva.

O Regulamento Técnico do MERCOSUL sobre os limites máximos de aflatoxinas estabeleceu os níveis de 0,5 µg/L e 5,0 µg/L para leite fluido e em pó, respectivamente, (BRASIL, 2002), que são os limites utilizados pelo Brasil (BRASIL, 1996), sendo que a União Européia adotou o limite máximo de tolerância de 0,05 µg/L (CE, 1988).

Sassahara *et al.* (2003) relataram a presença de aflatoxina M<sub>1</sub> principalmente em leite de bovino, evidenciando níveis de contaminação superiores a 0,5 µg/L, limite estabelecido pela legislação brasileira.

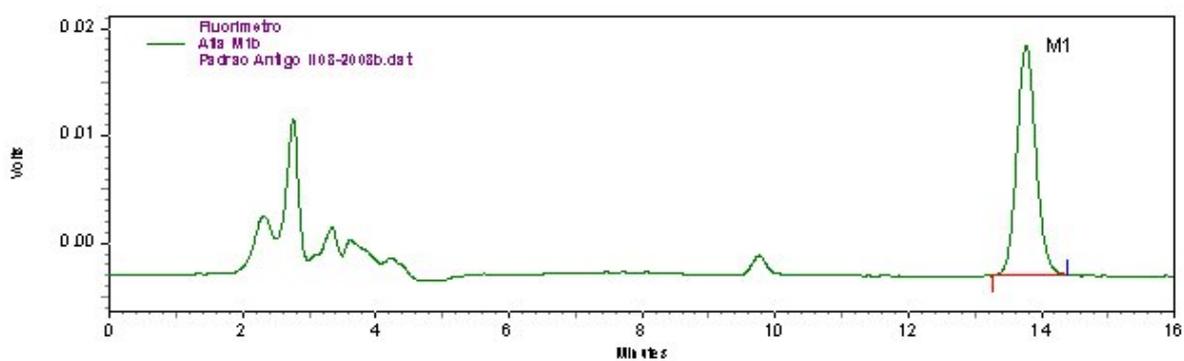
Botura (2005) verificou que as análises de aflatoxina em rações destinadas às cabras e no leite caprino no estado da Bahia não revelaram a presença de aflatoxina em todas as amostras avaliadas, cujos resultados estão de acordo com a presente pesquisa em relação às análises do leite caprino, porém a maioria das rações avaliadas encontravam-se contaminadas com aflatoxinas.

Os resultados obtidos mostram que a ausência de aflatoxina M<sub>1</sub> no leite de cabra na região de Alfenas - MG e Espírito Santo do Pinhal – SP. É um ponto favorável para a produção de leite de cabra nessas regiões. Entretanto, por se tratar de um problema de saúde pública, é necessário o constante monitorando da ocorrência desta toxina no leite de cabra, a fim de alcançar uma visão mais complexa.

A FIG.12 demonstra a análise do leite de cabra de uma das 24 amostras coletadas. A FIG.12 (A) é o resultado da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) de uma amostra padrão de leite enriquecida com aflatoxina M<sub>1</sub>, onde o pico dessa toxina aparece em um tempo de retenção aos 14 minutos. A FIG. 12 (B) é o resultados de CLAE da amostra do leite de cabra da propriedade 1, onde não se

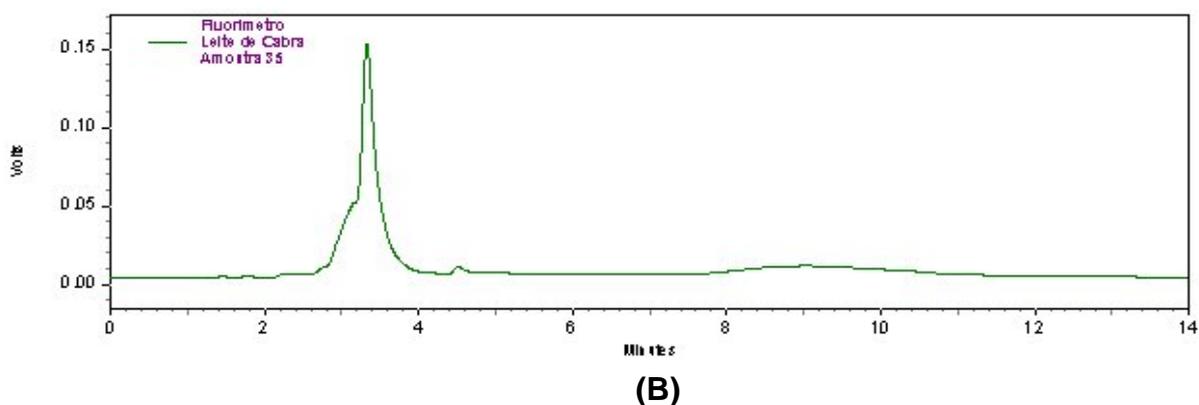
observa o pico de aflatoxina M1 no tempo de retenção aos 14 minutos, indicando a não detecção da toxina em estudo na amostra considerada.

Cromatograma



(A)

## Cromatograma



**Figura 12:** Cromatografia de leite de cabra. (A) Leite de cabra enriquecido com aflatoxina M<sub>1</sub> (amostra padrão). (B) Amostra de leite de cabra da sexta coleta da propriedade 1.

## 6 CONCLUSÕES

Durante a avaliação da microbiota fúngica do concentrado e volumoso utilizados na alimentação dos caprinos, verificou-se um total de 166 colônias fúngicas, das quais 64 (38,6%) eram do gênero *Aspergillus* ;

O teor de umidade dos alimentos destinados às cabras foi de 73,5% para o volumoso e de 11,1% para o concentrado na época da seca; e na época da chuva

foi de 74,1% para o volumoso e de 10,7% para o concentrado, na Fazenda 1. Na Fazenda 2 os teores de umidade do alimento foram de 62,3% para o volumoso e de 11,3% para o concentrado na época da seca, e de 62,4% para o volumoso e de 12,1% para o concentrado na época da chuva; e na Fazenda 3 foi de 75,8% para o volumoso e de 11,2% para o concentrado na época da seca e de 75,6% para o volumoso e de 11,9% para o concentrado na época da chuva.

Observou-se um aumento de fungos do gênero *Aspergillus* na época da seca nas fazendas 1 e 3; porém, na fazenda 2 não se encontrou este gênero nesta época, mas sua presença foi verificada na época da chuva. Em relação à umidade relativa do alimento fornecido às cabras e à atividade de água dos mesmos, os valores encontrados foram de aproximadamente 74,6% no volumoso e de 11,2% no concentrado na época da seca, e de 74,8 % no volumoso e de 11,3% no concentrado na época da chuva, para as propriedades 1 e 3, e de 62,3% no volumoso e de 11,3% no concentrado na época da seca, e de 62,4,2 % no volumoso e de 12,1% no concentrado na época da chuva, para a propriedade 2. Em relação à atividade de água no alimento, encontrou-se o valor de 0,95 para o volumoso e de 0,67 para o concentrado nas propriedades 1 e 2, de 0,93 para o volumoso e 0,66 para o concentrado na propriedade 3.

Observou-se que somente a Fazenda 3, das 19 amostras de concentrado e volumoso contaminadas com aflatoxinas, somente 7 amostras apresentaram contaminadas com aflatoxina B1.

Das 24 amostras de leite de cabra analisadas em relação à ação toxigênica da aflatoxina M1 nenhuma delas revelou a presença da toxina.

Observou-se uma maior incidência de aflatoxinas nas amostras de alimentos fornecidos às cabras na época da chuva, porém não foi detectada

aflatoxina M1 em nenhuma das amostras de leite coletadas, tanto na época da seca quanto na época da chuva.

## **7 CONSIDERAÇÕES FINAIS**

As análises de aflatoxinas em rações destinadas à alimentação de caprinos leiteiros, realizadas neste trabalho, demonstraram presença de aflatoxinas nas três propriedades em estudo, possivelmente relacionada à estocagem dos alimentos, tanto do concentrado (ração comercial) quanto do volumoso (silagem de capim com milho), o que proporciona contaminação por fungos e conseqüentemente

por aflatoxinas. O concentrado encontra-se empilhado sobre o piso e apoiado na parede do depósito, o que favorece o aumento da umidade no interior do alimento e da elevação do teor de umidade do produto, proporciona também aumento da proliferação fúngica e contaminação por aflatoxina. Devem-se armazenar os alimentos em locais secos e limpos, recomendando-se não deixar os alimentos próximos à parede ou a cantos do chão, já que estas áreas possuem índice de umidade mais elevado.

Na análise do leite de cabra por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), não se observou pico de aflatoxina M1 em nenhuma das amostras, indicando a não detecção da toxina em estudo nas amostras consideradas, o que demonstra a boa qualidade do leite.

A presença de aflatoxinas em alimentos destinados a animais e humanos representa um perigo em potencial para a saúde, especialmente a de humanos. O monitoramento contínuo, associado à admissão de boas práticas agrícolas, como colheita, manufatura e armazenamento de produtos destinados à alimentação animal, faz-se necessário para o controle da ocorrência de aflatoxinas, no caso em estudo a prevenção da contaminação do leite caprino por aflatoxinas.

## **7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

ABDULKADAR, A.H.W.; ABDULLA, A.A.; AL-JEDAH, J.H. Occurrence of aflatoxin in commodities imported into Qatar, 1997-2000, **Food Addit. Contam.**, v. 19, p. 666-670, 2002.

ALBUQUERQUE, A. *Umidade: o inimigo oculto. Gado Holandês*, v. 64, p. 21-24, 1999.

ALLCROFT, R. et al. *Roundmet toxicity Aspergillus flavus toxin (aflatoxin) in animal products. Preliminary communications. Vet. Rec.* v.74, p863-864, 1962.

ALLCROFT, R. et al. *Toxic factor in Brazilian groundnut meal. Vet. Rec.*, v.73, n.17, p.128-129, 1961.

ALVES, S.F.; XIMENES, L.J.F. *Valores químicos e bioquímicos do leite de cabra e sua importância para nutrição humana. Rev Cient Rural*, v. 4, n. 2, p. 188-193, 1999.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS - AOAC. *Official methods of analysis*. 12.ed. Washington, D.C.: Association of Analytical Chemistry, 1975. 1094p.

APPLEBAUM, R. S. et al. *Responses of dairy cows to dietary aflatoxin: feed intake and yield, toxin content and quality of milk of cows treated with pure and impure aflatoxin. J. Dairy Sci.*, v. 65, n. 8, p. 1503-1508, 1982.

BALDISSERA, M.A. et al. *Aflatoxinas, ocratoxina A e zearalenona em alimentos para animal. Inst Adolfo Lutz.*, v.53, n.1/2, p5-10, 1993.

BARNETT, H.L.; HUNTER, B.B. *Illustrated Genera of Imperfect Fungi*. Mineapolis, MN: Burgess, 1972.

BENET, L.Z.; SHEINER, L.B. *Farmacocinética: a dinâmica da absorção, da distribuição e da eliminação das drogas*. In: GILMAN, A.G. et al. **As bases da farmacologia terapêutica**. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 1987. p. 3-14.

BENTO, H.; FERNANDES, A.M.; BARBOSA, M. *Pesquisa de aflatoxina M<sub>1</sub> em leite corrente pasteurizado e em leite em pó*. **Ci. Vet.**, v. 84, p. 163-171, 1989.

BOTURA, M. B. *Otimização por metodologia de CCD para determinação de aflatoxina M<sub>1</sub> em leite de cabra e investigação de sua ocorrência no estado da Bahia*. **Rev.Inst. Adolfo Lutz**, v. 64, n. 2, p. 193-199, 2005.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Secretaria de Desenvolvimento Rural. Instrução Normativa nº 08, de 18 de maio de 1999. Determina que todos os estabelecimentos fabricantes de farelo de polpa cítrica destinado à alimentação animal estejam devidamente registrados no setor competente do Ministério da Agricultura e do Abastecimento - MA. **Diário Oficial da União, Poder Executivo**, Brasília, DF, 20 de maio de 1999. Seção 1, pág. 5.

BRASIL. Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária. Gabinete do Ministro. Portaria nº 183, de 21 de março de 1996. Adota Regulamento Técnico MERCOSUL sobre seus limites máximos admissíveis no leite, amendoim e milho. **Diário Oficial da União, Poder Executivo**, Brasília, DF, 25 de março de 1996. Seção Suplemento, pág. 42.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Secretaria de Fiscalização Agropecuária. Portaria nº 007, de 09 de novembro de 1988. Estabelece, os padrões mínimos, das diversas matérias primas empregadas na alimentação animal. **Diário Oficial da União, Poder Executivo**, Brasília, DF, 14 de novembro de 1988. Seção 1, pág. 21968.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Resolução – RDC nº 274, de 15 de outubro de 2002. Aprova o Regulamento Técnico sobre limites máximos de aflatoxinas admissíveis no leite, no amendoim e no milho **Diário Oficial da União, Poder Executivo**, Brasília, DF, 16 de outubro de 2002.

BUSBY JR, W.F.; WOGAN, G.N. Aflatoxins. In: SHANK, R.C. *Mycotoxins and N-nitrosos compounds environmental risks*. Boca Raton: CRC Press, 1981. v. 1, p. 1-27.

CAMPBELL, T.C.; HAYES, J.R. *The role of aflatoxin metabolism in its toxic lesion*. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 35, n. 2, p. 199-222, 1976.

CARVALHO ECQ. *Micotoxinas e alimentos: implicações na saúde humana e animal*. **R Brás Ci Vet**, v.2, n.1, p.27-31, 1995.

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

CE – Comunidades Europeias. *Regulamento CE nº 1525/98*. **Jornal Oficial das Comunidades Europeias**. [s.n. 1], 1998. (Diretiva das Comunidades Europeias).

CEBALLOS, B.S.O; GOMPERTZ, O.F.; CORNEJO, L.C.Z. **Microbiologia**. 2.ed. São Paulo: Atheneu, 1996. p. 241 - 242.

CHAN, K.; HSIEH, D.P.H.; LUNG, M.L. In vitro aflatoxin B<sub>1</sub>-induced p53 mutations. **Cancer Lett**, v. 199, p. 1-7, 2003.

CHEEKE, P.R.; SHULL, L.R. Mycotoxins. In: **Natural Toxicants in feeds and poisonous plants**. USA: AVI publishing company; 1985. p.393-471.

COOK, W.O. et al. Clinical and pathologic changes in acute bovine aflatoxicosis: rumen motility and tissue and fluid concentrations of aflatoxins B<sub>1</sub> and M<sub>1</sub>. **Am J Vet Res**, v. 47, n. 8, p. 1817-1825, 1986.

CORRÊA, W.M.; CORRÊA, C.N.M. **Enfermidades Infecciosas dos Mamíferos Domésticos**. 2. ed. São Paulo: Medsi, 1992. p. 464-466.

COSTA, A.L. Leite caprino: um novo enfoque de pesquisa. 2006. Disponível em: <<http://www.cnpc.embrapa.br/artigo-4.htm>>. Acesso em: 01 de jul. de 2006.

COSTA, B. *Micotoxinas: riscos e prejuízos que estão afetando as vacas leiteiras*. **Balde Branco**, São Paulo, v. 35, n. 409, p. 9-15, 1998.

CREPPY, E. E. Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe. **Toxicology Letters**, Amsterdam, v. 127, p. 19-28, 2002.

D'MELLO, J.P.F.; MAC DONALD, A.M.C. Mycotoxins. *Anim Feed Sci Technol*, v. 69, p. 155-166, 1997.

DENISSENKO, M.F. et al. Quantitation and mapping of aflatoxin B<sub>1</sub>- induced DNA damage in genomic DNA using aflatoxin B<sub>1</sub>-8,-epoxide and microsomal activation systems. *Mutat Res*, v. 425, p. 205-211, 1999.

DINIZ, S.P.S.S. *Micotoxinas*. Rio de Janeiro: Editora Rural, 2002.

DOMÍNGUEZ, L. et al. Diphasic dialysis a new membrane method for a selective and efficient extraction of low molecular weight organic compounds form aqueous solutions. *J. AOAC Int.*, v. 75, p. 854-857, 1992.

DUNCAN, D.B. Multiple range and multiple F tests. *Biometrics*, v. 11, p. 1 a 42, 1955.

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). Global Livestock Production and Health Atlas. 2004. Disponível em: <<http://www.fao.org/ag/aga/glipha/index.jsp>>. Acesso em: 01 jul. 2006.

FINOLI, C.; VECCHIO, A. Aflatoxin M<sub>1</sub> in goat dairy products. *Microbiol Alim Nutr*, v.15, n.1, p.47-52, 1997.

FRANCO, B.D.G.M. *Microbiologia dos alimentos*. São Paulo: Editora Atheneu, 1996. p. 13-24.

FRAZIER, R.B. *Microbiologia de Los Alimentos*. 2. ed. Zaragoza: Acribia, 1981. p. 24-28.

FREMY, J.M. et al. Evaluation de la contamination en Aflatoxine M<sub>1</sub> dans le lait en poudre par H.P.L.C. pour phase inversée. *Ann. Fals. exp. Chim.*, v. 74, p. 547-554, 1981.

FRISVAD, J.C.; SAMSON, P.A. *Handbook of applied mycology: food and feeds*. New York : Marcel Dekker, 1991. 245 p.

FURTADO, M.M.; WOLFSCHOON-POMBO, A.F. Leite de cabra: composição e industrialização. *Rev ILCT*, v. 33, n. 198, p. 15-17, 1978.

FURTADO, M.M. Leite de cabra: características especiais. Seu uso na alimentação. Intolerância. *Rev ILCT*, v. 36, n. 214, p. 31-37, 1981.

GALVANO F, GALOFARO V, GALVANO G. Occurrence and stability of aflatoxin M<sub>1</sub> in milk and milk products: a worldwide review. *J Food Protec*, v. 59, n. 10, p. 1079-1090, 1996.

GHOSH, M.K.; CHHABRA, A. Detoxification of aflatoxin in groundnut cake using certain chemicals and in vitro evaluation of detoxified cake. *Indian J. Dairy Sci*, v. 48, n. 2, p. 118-212, 1995.

GOMPERTZ, O.F. et al. Fungos Tóxicos. In: TRABULSI, L.R. et al. *Microbiologia*. 3. ed. São Paulo: Atheneu, 1999. p. 368-372/423-425.

GOTO, T.; HSIEH, D.P.H. Fractionation of radioactivity in the milk of goats administered  $^{14}\text{C}$ -aflatoxin B<sub>1</sub>. **J Assoc Off Anal Chem**, v. 68, n. 3, p. 456-458, 1985.

GOURAMA, H.; BULLERMAN, L.B. Aspergillus flavus and Aspergillus parasiticus: aflatoxigenic fungi of foods and feeds: a review. **J Food Prot**, v.58, n.12, p. 1395-1404, 1995.

HAHN, G.; KNORR, S. Bacteriological, cutological and residue studies on milk from ewes and goats. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes " **Lebensmittelhygiene**", v.30, p. 332-342, 1989.

HOLLINGER K.; EKPERIGIN H.E. Mycotoxicosis in food producing animals. **Chemical Food Borne Hazards and their Control**, v.15, n.1, p. 133-165, 1999.

HSIEH, D.P.H.; WONG, J.J. Pharmacokinetics and Excretion of Aflatoxins. In: EATON, D.L.; GROOPMAN, J.P. **The Toxicology of Aflatoxins**. London: Press, , 1994, p. 73-85.

IAL ( Instituto Adolfo Lutz). Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. **Métodos químicos e físicos para análise de alimentos**. 3 ed. São Paulo: IMESP; 1985.p. 430-435.

IARC (International Agency for Research on Cancer). Some naturally occurring substances: Food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins, v. 56, 1993.

JENNESS R. Composition and characteristics of goat milk: review 1968-1979. **J Dairy Sci**, v. 63, n. 10, p. 1605-1630, 1980.

JONES, T.C.; HUNT, R.D.; KING, N.W. **Veterinary Pathology**. 6. ed. Fans Tache: London, 1997. p. 506-507/535-543.

KAMBAR, A. A study of the occurrence of aflatoxin m1 in raw milk produced in Sarab city of Iran. **Food Control**, v.16, p.593-599, 2005.

KIHARA, T. et al. Effects of prenatal aflatoxin B<sub>1</sub> exposure on behaviors of rat offspring. **Toxicol Sci**, v. 53, p. 392-399, 2000.

KRABE, E.L. Micotoxinas: como reduzir perdas. **Avicultura Industria**, Porto Feliz, v. 88, n. 1053, p. 26-27, mar. 1998.

KUNG'U, J. *The Mould Aspergillus: How Does It Affect Our Lives?* 2005. Disponível em: [http://www.moldbacteria.com/myblog/2005\\_05\\_01\\_moldbacteria\\_archive.html](http://www.moldbacteria.com/myblog/2005_05_01_moldbacteria_archive.html)>. Acesso em 05 jul. 2006.

LACAZ, C.S. **Micologia médica: fungos, actinomicetos e algas de interesse médico**. 7 ed. São Paulo: Sarvier, 1984.

LAZZARI, F.A. *Umidade, Fungos e Micotoxinas na Qualidade de Sementes, Grãos e Rações*. Curitiba: Pallotti, 1993. p. 73-81.

LENMOS, E. Micotoxinas: prejuízo na produção e riscos para a saúde. *Balde Branco*, p. 32-35, fev. 2001.

LIN, M.T.; DIANESE, J.C. A coconut agar medium for rapid detection of aflatoxin production by *Aspergillus spp.* *Phytopathology*, v. 66, p. 1466-1469, 1976.

LOSTE, A.; SÁEZ, T.J.J.; RAMOS FERNÁNDEZ, A. Principales Micotoxicosis en el Ganado Ovino. *Pequeños rumiantes*, v. 3, n. 3, p. 8-13, 2002.

MARTINS, H.M.L.; MARTINS, M.L.L.; CRUZ, M.B. *Métodos: ELISA e TLC aplicados à pesquisa de aflatoxina M1 em leite de origem ovina e caprina*. *Veterinária Técnica*, v.4, n.6, p. 20-25, 1994.

MARTINS, J.L.S.; MARTINS, I.S. Aflatoxina M1 no leite tipo "B" comercializado no Município de São Paulo, SP (Brasil). *Rev. Saúde Pública*, v. 20, n. 4, p. 303-308, 1986.

MCLEAN, M, DUTTON MF. *Cellular interactions and metabolism of aflatoxin: an update*. *Pharmac Ther*, v. 65, p. 163-192, 1995.

MEDEIROS, L.P. et al. *Leite de cabra: sua importância e aspectos nutritivos*. In: **Caprinos: princípios básicos para sua exploração**. Brasília: Embrapa-SPI, 1994. p. 90-94.

MERCK. *The Merck Index* – 12. ed. New Jersey: Merck & Co, Inc, 1996.

MERCOSUL – Mercado Comum do Cone Sul. **Regulamento técnico sobre limites máximos de aflatoxinas**. Resolução nº 56/94. [s.n.1.], 1994. (Publicação avulsa MERCOSUL).

MIDIO, A.F; MARTINS, D.I. **Toxicologia de Alimentos**. São Paulo: Varela, 2000. p. 64-78.

MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. Lavras: Editora Ufla, 2002. 626p.

MOSS, M.O. *Risk assessment for aflatoxins in foodstuffs*. **Int Biodeterior & Biodegradation**, v.50, p. 37-142, 2002.

NELSON, P.E.; TOUSON, T.A; MARASAS, W.F.O. **Fusarium Species, An Illustrated Manual For Identification**. London, UK: The Pensilvania State University Press, 1983.

OLIVEIRA, C. A. F.; GERMANO, P. M. L. Aflatoxina M<sub>1</sub> em leite e derivados: ocorrência no Brasil e aspectos relativos à legislação. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 11, n. 48, p. 22-25, 1997.

PARK, YW. Hypo-allergenic and therapeutic significance of goat milk. **Small Rumin Res**, v. 14, p. 151-159, 1994.

PATTERSON, D. S. P. Metabolism as a factor in determining the toxic action of the aflatoxins in different animal species. **Fd Cosmet Toxicol**, v. 11, p. 287-294, 1973.

PEREIRA, M. M. G. et al. Aflatoxinas em alimentos destinados a bovinos e em amostras de leite da região de Lavras, Minas Gerais – Brasil. **Ciênc. Agrotec.**, Lavras, v. 29, n. 1, p. 106-112, 2005.

PEREIRA, L. *Reino Fungi*. 2004. Disponível em: <<http://www.geocities.com/leonelpereira/fungos.htm>>. Acesso em: 02 jul. 2006.

PIER.A.C. An overview of the mycotoxicoses of domestic animals. **J.Am.Vet. Med. Assoc.**,v.16, .n.11.p.1259-1261, 1973.

PIER.A.C.; RICHARD J.L.; CYSEWSKIS.J. Implications of mycotoxins in animal disease. **JAVMA**, v. 176, n. 8, p. 719-724, 1980.

PITTET A.; Natural occurrence of mycotoxins in foods and feeds: a decade review. In: KOE, W.J. et al. *Mycotoxins and Phycotoxins in Perspective at Turn of the Millennium*. 2001. p.153-172.

PONS, R.S.; WOGAN, G.N. Toxicity and biochemical and fine structural effects of synthetic aflatoxins M<sub>1</sub> and B<sub>1</sub> in rat liver. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 47, p. 585-592, 1971.

PRADO, G.; NICÁCIO, M.A.S.; LARA, M.A. Incidência de aflatoxina M<sub>1</sub> em leite cru e em pó no estado de Minas Gerais. **Higiene Alimentar**, v. 8, p. 34-36, 1994.

POZZI, C.R. et al. Postharvest and stored corn in Brazil: mycoflora interaction, abiotic factors and mycotoxin occurrence. **Food Addit Contam**, v. 12, n. 3, p. 313-319, 1995.

RAPER, K.B.; FENNEL, D.I. **The Genus Aspergillus**. Baltimore, MD: Williams e Wilkins, 1965.

RIBEIRO, E.L.A.; RIBEIRO, H.J.S.S. Uso nutricional e terapêutico do leite de cabra. **Semina**, v. 22, n. 2, p. 229-235, 2001.

ROUSSI, V. et al. Occurrence of aflatoxin M<sub>1</sub> in raw Milk and market Milk commercialized in Greece. **Food Addit Contam**, v. 19, n.9, p 863-868, 2002.

SABINO, M. et al. Avaliação da eficiência de um kit comercial para detecção de aflatoxina B<sub>1</sub> em amostras de milho, ração, amendoim e seus produtos: In: CONGRESSO LATINOAMERICANO DE MICOTOXICOLOGIA, 2, 1997, Maracay. **Resumos...** Maracay: Universidad Central de Venezuela/Sociedade Latinoamericana de Micotoxicologia, 1997. p. 108-109.

SABINO, M.; PURCHIO, A.; ZORZETTO, M.A.P. Variations in the levels of aflatoxin in cows milk consumed in the city of São Paulo, Brazil. **Food Addit Contam**, v. 6, n. 3, p. 312-326, 1989.

SAMARAJEEWA, U.; ARSECULERATNE, S.N.; TENEKOON, G.E. Spontaneous and experimental aflatoxicosis in goats. **Res Vet Sci**, v. 19, n. 3, p. 269-277, 1975.

SANTURIO, J.; SANTOS, I. Cerco às micotoxinas. **Alimentação Animal**, São Paulo, v. 6, n.21, p. 8-9, jan/mar. 2001.

SASSHARAM, YANAKA E.K, NETTO D.P. Ocorrência de aflatoxina e zearalenona em alimentos ao gado leiteiro na região Norte do Estado do Paraná. **Semina**, 2003.

SCHULTZ, J. Micotoxicose. In: BEER, J. **Doenças Infecciosas em Animais Domésticos**. 2. ed. São Paulo: Roca, 1999. p. 369-378.

SIDRIM, J.J.C.; MOREIRA, J.L. **Fundamentos Clínicos e Laboratoriais da Micologia Médica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. p. 188/234-235.

SILVA, R.R. **Agrobusiness da caprinocultura de leite no Brasil**. Salvador: Bureau, 1998.

SILVA, R.O.C; SILVA, J.W. Leite de cabra: ou começa... ou acaba! **O Berro**, n. 74, p. 19-25, fev. 2005.

SILVA, E.F.; LIMA, V.L.A.G.; SALGUEIRO, A.A. Avaliação microbiológica do leite de cabra pasteurizado e comercializado na Cidade de Recife-PE. **Higiene Alimentar**, v. 12, n. 66/67, p. 71-76, 1999.

SMITH JR., R. B.; FRIFFIN, J. M.; HAMILTON, P. B. Survey of aflatoxicosis in farm animals. **Appl Environ.Microbiol.**, v. 31, n. 3, p. 385-388, 1976.

SOARES, M.L.V.; RODRIGUES-AMAYA, D.B. Survey of aflatoxins, ochratoxin A, zearalenone, and sterigmatocystinin, some Brazilian foods by using multi-toxin thin-layer chromatographic method. **J.Assoc.Off.Anal.Chem**, v. 72, p. 2-26, 1989.

SOLOVEY, M.M. et al. A survey of fumonisins, deoxyvalenol, zearalenone and aflatoxins contamination in corn-based food products in Argentina. **Food Addit. Contam.**, v. 16, p. 325-329, 1999.

SYLOS, C.M. **Avaliação dos métodos de determinação e incidência de aflatoxina M<sub>1</sub>, patulina e ácido ciclopiazônico em alguns alimentos brasileiros**. 1994. (Doutorado em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

TANIWAKI, M. H.; SILVA, N. **Fungos deterioradores de alimentos ocorrência e detecção**. Campinas: ITAL, 1996.

TEIXEIRA, S.R. **Pagamento do leite pela qualidade: estudo de caso**. 78 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Produção). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 1993.

TIWARI, V.; CHAUHAN, R.K.S. *Aflatoxin detection in milk samples of cattle*. **Sci Lett**, v. 14, n. 10, p. 391-392, 1991.

TRABULSI, L.R.; TOLEDO, M.R.F. **Microbiologia**. 2. ed São Paulo: Atheneu, 1996.

TUINSTRA, T. et al. Excretion of certain chlorobiphenyls into the milk fat after oral administration. **J. Netherland milk dairy**, v. 35, p. 145-157, 1981.

TUINSTRA, L. G. M.; ROOS, A. H.; TRIJP, J. M. P. Liquid chromatographic determination of aflatoxin M<sub>1</sub> in milk powder using immunoaffinity columns for cleanup: interlaboratory study. **Food Biol. Contam.**, v. 76, n. 6, p. 1248-1254, 1993.

TUNG, H.T.; HAMILTON, P.B. Decreased plasma carotenoids during aflatoxicosis. **Poult. Sci.**, v. 52, n. 1, p. 80-83, 1973.

THOMPSON, C.; HENKE, S.E. Effect of climate and type of storage container on aflatoxin production in corn and its associated risks to wildlife species. **J Wildl Dis**, v.36, n. 1, p. 172-179, 2000.

VAN EGMOND, H.P. Aflatoxins in milk. In: EATON, D.L; GROOPMAN, J.D. (Ed.) **The toxicology aflatoxins: human health, veterinary, and agricultural significance**. San Diego: Academic Press, 1994. cap. 17, p. 365-381.

VAN EGMOND, H.P.; DEKKER, W.H. Worldwide regulations for mycotoxins in 1994. **Natural Toxins**, v. 3, p. 332-336, 1995.

VAN PEE, W. et al. La detection et le dosage de l'aflatoxine M<sub>1</sub> dans le lait et le lait en poudre. **Rev. Agr.**, v. 30, p. 403-414, 1977.

VOLK, T. *Fungal diseases that must be overcome to have a traditional Thanksgiving dinner*. 2005. Disponível em: <[http://botit.botany.wisc.edu/toms\\_fungi/thanks.html](http://botit.botany.wisc.edu/toms_fungi/thanks.html)>. Acesso em 05 jul. 2006.

WANGIKAR, P.B. et al. Effects of aflatoxin B1 on embryo fetal development in rabbits. **Food Chem Toxicol**, v. 43, p. 607-615, 2005.

WESTLAKE, K.; MACKIE, R.I.; DUTTON, M.F. In vitro metabolism of mycotoxins by bacterial, protozoal and ovine ruminal fluid preparations. **Anim Feed Sci Technol**, v. 25, p. 169-178, 1989.

YANAKA, E.K. et al. Avaliação da presença de micotoxinas em milho (*Zea mays L.*) e rações destinadas à avicultura comercial de postura nas regiões norte e noroeste do estado do Paraná. **Pesqu Ver Brás**, v. 24, p. 79, 2004. Suppl I.

ZACHARIAS, F. **Caprinocultura leiteira : Mercado e orientações de manejo**. Salvador: EBDA, 2001.

**ANEXO 1**

**ARTIGO**

**OCORRÊNCIA DE AFLATOXINA M<sub>1</sub> NO LEITE DE CABRA PRODUZIDO EM  
DIFERENTES SISTEMAS E CONDIÇÕES CLIMÁTICAS.**

## Occurrence of Aflatoxin M<sub>1</sub> in Goat Milk Produced in Different Systems and Weather Conditions

Poliana de Oliveira Coelho <sup>I</sup>; Rodrigo de Souza Ferreira <sup>II</sup>; Rogéria Maria Alves <sup>III</sup>; Guilherme Prado <sup>IV</sup>; Uemenson Novais Oliveira <sup>V</sup>; João Evangelista Fiorini <sup>I</sup>

<sup>I</sup> Laboratório de Biologia e Fisiologia de Microrganismos, Universidade José do Rosário Vellano, Alfenas, MG, Brasil

<sup>II</sup> Coordenadoria de Defesa Agropecuária, Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, São João da Boa Vista, São Paulo, Brasil.

<sup>III</sup> Departamento da saúde e meio ambiente, Faculdade de Americana, Campus Americana, São Paulo, Brasil

<sup>IV</sup> Laboratório de Micotoxinas, Fundação Ezequiel Dias, Belo Horizonte, MG, Brasil

<sup>V</sup> Graduando do curso de Ciências Biológicas da Faculdade de Ciências da Saúde de Campos Gerais, Campos Gerais, MG, Brasil

### RESUMO

As aflatoxinas são metabólitos tóxicos produzidos principalmente pelos fungos do gênero *Aspergillus spp.*, que podem ser encontrados em vários produtos alimentícios, principalmente nos grãos, que são amplamente utilizados na fabricação de rações animais. A aflatoxina B<sub>1</sub> é a de maior poder tóxico e o seu metabólito, a aflatoxina M<sub>1</sub>, que é um produto da sua biotransformação hepática, é eliminada principalmente no leite de animais que ingerem rações contaminadas com aflatoxina B<sub>1</sub>. O objetivo do trabalho foi analisar a presença de aflatoxina M<sub>1</sub> no leite de cabra de três propriedades localizadas na cidade de Alfenas-MG e Espírito Santo do Pinhal-SP, onde foram coletadas um total de 24 amostras de leite durante o período de setembro de 2008 a fevereiro de 2009, na época de seca e chuvas. A aflatoxina M<sub>1</sub> foi analisada através do método descrito por Tuinstra et al. (1993) e a separação e quantificação da aflatoxina M<sub>1</sub> foi realizada por cromatografia líquida de alta resolução (CLAE). Em todas as amostras avaliadas, não foi detectada a presença de aflatoxina M<sub>1</sub>, demonstrando a boa qualidade do leite à contaminação da toxina em estudo.

**Palavras-chave:** micotoxinas; contaminação; fungos; caprinos

### ABSTRACT

Aflatoxins are toxic metabolites produced mainly by *Aspergillus spp.*, and can be found in many types of food, especially grains, which are widely used in the manufacture of animal feed. Aflatoxin B<sub>1</sub> is the most toxic, and its metabolite,

aflatoxin M1, which is a product of hepatic biotransformation, is eliminated mainly via the milk of animals fed an aflatoxin B1-contaminated diet. The purpose of this paper was to determine the presence of aflatoxin M1 in the goat milk from three farms in Alfenas, State of Minas Gerais, and Espírito Santo do Pinhal, State of São Paulo. Twenty-four milk samples were collected from September 2008 to February 2009, during the rainy and dry seasons. Aflatoxin M1 was analyzed by the method described by Tuinstra et al. (1993), and the separation and quantification of aflatoxin M1 was conducted by high performance liquid chromatography (HPLC). The presence of aflatoxin M1 was not detected in any of the samples, thus confirming the good quality of the milk here studied.

Keywords: mycotoxins; contamination; fungi; caprines

## **INTRODUÇÃO:**

A caprinocultura é uma atividade pecuária de grande importância no Brasil e estima-se que o efetivo de caprinos leiteiros seja de 4.500.000 animais, sendo que a produção de leite de cabra da Região Sudeste corresponde a 54,6% de todo país (12).

O leite de cabra é um alimento de alto valor nutritivo e de fácil digestão, sendo constituído principalmente por gorduras, proteínas, açúcares, vitaminas e sais minerais. A composição química deste alimento apresenta grande variabilidade, sendo influenciada por diversos fatores, tais como raça, período de lactação, tipo de alimentação, idade e estado fisiológico do animal (31). Sua composição média é comparável à do leite de vaca, apresentando um teor de gordura e proteínas ligeiramente mais elevados e menor conteúdo de água. (24).

O leite de cabra é um dos principais alimentos que existem na nutrição humana, sendo rico em extratos secos, tem pouco colesterol, serve para a fabricação dos principais queijos finos do mundo, além de outros produtos lácticos.

Evita alergias e enxaquecas provocadas pelo leite de vaca e é um fortificante, pela sua fácil digestão e composição. Portanto, é muito importante na alimentação de pessoas convalescentes de doenças como o câncer, de idosos com dificuldades digestivas e crianças, principalmente as acometidas de alergias (43).

Entretanto, a qualidade higiênica do leite depende de vários aspectos, tais como: estado sanitário dos animais, higiene e habilidade do ordenhador e limpeza de equipamentos e de todas as superfícies que entram em contato com o produto. As condições sob as quais o leite é produzido, estocado na fazenda e transportado para a usina de beneficiamento também afetam diretamente a sua qualidade higiênica (46).

As micotoxinas são metabólitos secundários tóxicos produzidos por fungos filamentosos e encontrados em alimentos, quando ingeridos causam risco potencial para a saúde do homem e do animal (28). Dentre elas, as aflatoxinas são metabólitos tóxicos produzidos por *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* e *Aspergillus nomius* (33). As principais aflatoxinas são aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub> (AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub> e AFG<sub>2</sub>), sendo a AFB<sub>1</sub> considerada como a mais tóxica e potente agente carcinogênico (13), além de produzir efeitos mutagênicos (11) e teratogênicos (51).

Dentre os produtos do metabolismo da aflatoxina B<sub>1</sub> por hidroxilação, no fígado, destaca-se a aflatoxina M<sub>1</sub>, a qual é excretada no leite de animais que ingerem alimentos contaminados (19), sendo também referida como agente carcinogênico (13). A presença dessa toxina no leite e em seus derivados constitui um dos mais sérios problemas no controle de qualidade alimentar, consistindo em fonte potencial de risco à saúde pública (21).

Tem sido observada a ocorrência de aflatoxina M<sub>1</sub> em leite de bovinos (25), de búfalos (47) e caprinos (39). No Brasil, estudos tem demonstrado a presença de aflatoxina M<sub>1</sub> principalmente no leite de bovinos (42).

Tendo em vista a escassez de trabalhos nacionais e internacionais sobre o assunto, aliado a falta de medidas preventivas para controle da aflatoxina M<sub>1</sub> em leite de cabra no Brasil, objetivou-se com este trabalho, avaliar a presença de aflatoxina M<sub>1</sub> no leite de cabra em diferentes sistemas de criação e condições climáticas de três propriedades localizadas na cidade de Alfenas-MG e Espírito Santo do Pinhal-SP.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Amostras de leite:**

Os sistemas de criação dos caprinos leiteiros são geralmente caracterizados por atividades intensivas e semi-intensivas, onde inclui-se a prática de armazenamento dos alimentos destinados as cabras.

As amostras de leite foram colhidas em três propriedades rurais, sendo duas na cidade de Alfenas - MG e uma em Espírito Santo do Pinhal - SP, durante o período de setembro de 2008 à fevereiro de 2009. O período das coletas foi determinado por época, sendo realizado quatro coletas em cada propriedade no período de seca e quatro coletas no período de chuva, totalizando oito coletas em cada propriedade.

A colheita do leite de cabra foi obtida do 'pool' do leite produzido por todas as cabras de cada propriedade, sendo realizadas 12 horas após a ingestão das

rações, sendo colhidas amostras de 150 ml de leite em frascos estéreis protegidos por papel alumínio e encaminhadas ao Laboratório de Biologia e Fisiologia de Microrganismos da Universidade José do Rosário Vellano (UNIFENAS), em Alfenas-MG, onde foram mantidas sob congelamento até o momento da análise, realizada na Fundação Ezequiel Dias, em Belo Horizonte – MG.

### **Extração, purificação e quantificação da aflatoxina M<sub>1</sub>**

O método utilizado foi o descrito por Tuinstra et al. (1993), onde transferiu-se 50 mL de leite, previamente aquecido a 37 C, centrifugado por 15 minutos a 4000 RPM e filtrado em papel Whatman n.4, para uma seringa de vidro acoplada a uma coluna de imunoafinidade (víçam G1007). Após a passagem da amostra, lavou-se a coluna com com 10 mL de água destilada e deixou-se secar completamente. Em seguida, adicionou-se 4 mL de acetonitrila., que ficou em contato por 5 minutos. Recolheu-se em seguida o eluato em um frasco âmbar de 5 mL. Seguiu-se evaporação a 50 C, sob atmosfera de nitrogênio e resuspensão imediata em i mL da fase móvel de injeção (água:acetonitrila (70:30). Agitou-se em ultrassom por 1 minuto e filtrou-se na membrana PTFE de 0,45 µm de poro. Injetou-se então, 100 µL da amostra e 100 µL de cada solução padrão de Aflatoxina M1 (0,25, 0,50, 1,00 e 2,00 ng/mL. A partir do cálculo da área do pico da aflatoxina M1 dos extratos das amostras e das soluções padrões, foi calculado o teor de aflatoxina M1 das amostras.. Todas as análises foram efetuadas em duplicata.

### **Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)**

A separação e quantificação da aflatoxina M<sub>1</sub> foi conduzida em um sistema de cromatografia *Shimadzu* com detector de fluorescência (excitação: 366nm e emissão: 428nm) e com coluna *Shim-pack* CLC-ODS RP-18, 5 µm 4,6 x 250mm, precedida de pré-coluna *Shim-pack* G-ODS 5 µm 4 x 10mm. A coluna foi eluída isocraticamente com água:isopropanol:acetonitrila (80:12:8) a um fluxo de 1mL/min. Todos os solventes que foram utilizados são os recomendados para cromatografia líquida e a água será purificada pelo sistema de ultrafiltração (Barnstead). Durante toda análise foi borbulhado gás hélio na fase móvel. O limite de detecção do método é 2 ng/L e o limite de quantificação 6,0 ng/L.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO:**

O leite de cabra é rico em extratos secos, tem pouco colesterol, alivia alergias e enxaquecas provocadas pelo leite de vaca e é um fortificante, pela sua fácil digestão e composição. Portanto é muito importante na alimentação de pessoas convalescentes de doenças como o câncer, de idosos com dificuldades digestivas e crianças, principalmente as acometidas de alergias (43).

A caprinocultura leiteira vem apresentando considerável crescimento no Brasil, pois o leite de cabra é frequentemente utilizado na alimentação humana, devido suas características nutricionais.

A aflatoxina M<sub>1</sub> é um produto da biotransformação da aflatoxina B<sub>1</sub>, sendo que sua conversão ocorre no fígado e é excretada no leite de animais que ingeriram alimentos contaminados com aflatoxina B<sub>1</sub> (9).

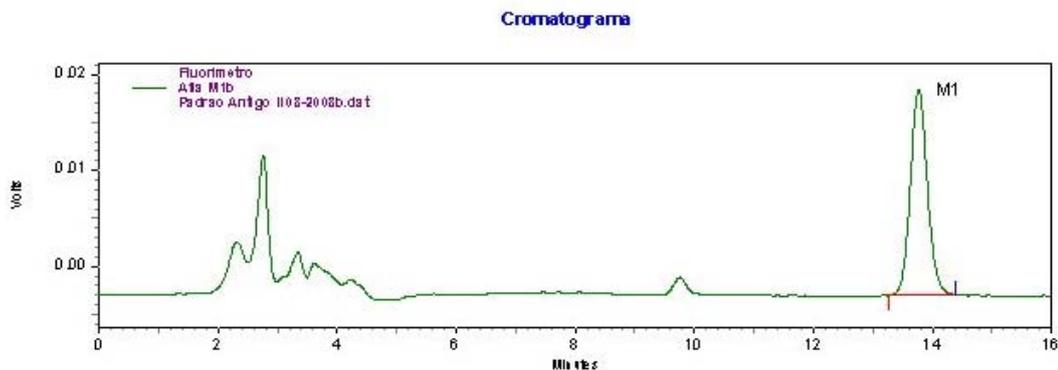
Os resultados da análise de AFM<sub>1</sub> nas amostras de leite de cabra avaliadas pelo método descrito por Tuinstra et al. (1993), não revelaram a presença

da toxina. Provavelmente o resultado decorreu da utilização de rações de boa qualidade cujo acondicionamento era realizado em recipientes fechados e mantidos em depósitos em bom estado de conservação e arejamento e em curto período de dias, em torno de uma a duas semanas.

O regulamento técnico do MERCOSUL sobre os limites máximos de aflatoxinas estabeleceu os níveis de 0,5 µg/L e 5,0 µg/L para leite fluido e em pó, respectivamente, (7), que são os limites utilizados pelo Brasil (6), sendo que a União Européia adotou o limite máximo de tolerância de 0,05 µg/L (10).

A FIG.1 demonstra a análise de leite de cabra de uma das 24 amostras coletadas. A Figura A é o resultado da cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) de uma amostra padrão de leite enriquecida com aflatoxina M1, onde o pico dessa toxina aparece em um tempo de retenção à 14 minutos. A Figura B é o resultados de CLAE da amostra de leite de cabra da propriedades 1, onde não se observa o pico de aflatoxina M1 no tempo de retenção à 14 minutos, indicando a não detecção da toxina em estudo na amostra considerada.

**A)**



**B)**



Figura 1. Cromatografia de leite de cabra. (A) Leite de cabra enriquecido com aflatoxina M<sub>1</sub> (amostra padrão). (B) Amostra de leite de cabra da sexta coleta

Sassahara et al (42), relataram a presença de aflatoxina M<sub>1</sub> principalmente em leite de bovino.

A ocorrência de aflatoxina M<sub>1</sub>, no Brasil, tem sido verificada principalmente no leite bovino, evidenciando níveis de contaminação superiores a 0,5 µg/L, limite estabelecido pela legislação brasileira (42).

Relatos sobre a ocorrência de aflatoxina M<sub>1</sub> em leite de cabra são escassos no Brasil, o monitoramento desta micotoxina foi realizado na Bahia por BOTURA (5), cujos resultados estão de acordo com essa pesquisa.

Os resultados obtidos mostram que a ausência de aflatoxina M<sub>1</sub> no leite de cabra na região de Alfenas - MG e Espírito Santo do Pinhal - SP, é um ponto favorável para a produção de leite de cabra nessas regiões. Entretanto, por se tratar de um problema de saúde pública, é necessário o constante monitorando da ocorrência desta toxina no leite de cabra, a fim de alcançar uma visão mais complexa.

## **CONCLUSÕES**

A aflatoxina M<sub>1</sub> não foi detectada no leite de cabras pertencentes a propriedades que praticam boas práticas de manejo na região de Alfenas-MG e ESP - SP, garantindo a boa qualidade do produto.

## **AGRADECIMENTOS**

Os autores agradecem a FAPEMIG ( Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais), pelo apoio financeiro.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:**

1. ALLCROFT, R.; CARNAGHAN, R.B.A .roundmet toxicity *Aspergillus flavus* toxin (aflatoxin) in animal products. Prelimimenary communications. **Vet.Rec**, v.74, p.863-864,1962.

2. ALVES, S.F.; XIMENES, L.J.F. Valores químicos e bioquímicos do leite de cabra e sua importância para nutrição humana. **Rev Cient Rural**, v. 4, n. 2, p. 188-193, 1999.
3. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALITICAL CHEMISTS - AOAC. **Official methods of analysis**. 12.ed. Washington, D.C.: Association of Analytical Chemistry. 1975. 1094p.
4. BORGES, WG. Utilização do leite de cabra em crianças com alergia ao leite de vaca. **Rev Bras Alergia Immunopatol**, v. 2, n. 18, p. 46-49, 1995.
5. BOTURA, M. B. Otimização por metodologia de CCD para determinação de aflatoxina M<sub>1</sub> em leite de cabra e investigação de sua ocorrência no estado da Bahia. **Rev.Inst. Adolfo Lutz**, v. 64, n. 2, p. 193-199, 2005.
6. BRASIL. Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária. Gabinete do Ministro. Portaria nº 183, de 21 de março de 1996. Adota Regulamento Técnico MERCOSUL sobre seus limites máximos admissíveis no leite, amendoim e milho. **Diário Oficial da União, Poder Executivo**, Brasília, DF, 25 de março de 1996. Seção Suplemento, pág. 42.

7. BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Resolução – RDC nº 274, de 15 de outubro de 2002. Aprova o Regulamento Técnico sobre limites máximos de aflatoxinas admissíveis no leite, no amendoim e no milho. **Diário Oficial da União, Poder Executivo**, Brasília, DF, 16 de outubro de 2002.
8. CARVALHO ECQ. Micotoxinas e alimentos: implicações na saúde humana e animal. **R Brás Ci Vet**, v.2, n.1, p. 27-31, 1995.
9. CAST (Council of Agricultural Science and Technology). **Mycotoxins**: risks in plant, animal and human systems. Task Force Report, EUA: CAST, n.139, 2003.
10. CE – Comunidades Européias. **Regulamento CE nº 1525/98. Jornal Oficial das Comunidades Européias**. [s.l : s.n.], 1998. (Diretiva das Comunidades Européias).
11. CHAN, K.; HSIEH, D.P.H.; LUNG, M.L. In vitro aflatoxin B<sub>1</sub>-induced p53 mutations. **Cancer Lett**, v. 199, p. 1-7, 2003.
12. COSTA, A.L. Leite caprino: um novo enfoque de pesquisa. 2006. Disponível em: <<http://www.cnpc.embrapa.br/artigo-4.htm>>. Acesso em: 01 de julho de 2006.
13. CREPPY, E. E. Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe. **Toxicology Letters**. Amsterdam, v. 127, p. 19-28, 2002.

14. D'MELLO, J.P.F.; MAC DONALD, A.M.C. Mycotoxins. ***Anim Feed Sci Technol***, v. 69, p. 155-166, 1997.
15. DENISSENKO, M.F. et al. Quantitation and mapping of aflatoxin B<sub>1</sub>- induced DNA damage in genomic DNA using aflatoxin B<sub>1</sub>-8,-epoxide and microsomal activation systems. ***Mutat Res***, v. 425, p. 205-211, 1999.
16. DINIZ, S.P.S.S. ***Micotoxinas***. Rio de Janeiro: Editora Rural, 2002.
17. FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). Global Livestock Production and Health Atlas. 2004. Disponível em: <<http://www.fao.org/ag/aga/glipha/index.jsp>>. Acesso em: 01 jul. 2006.
18. FREMY, J.M. et al. Evaluation de la contamination en Aflatoxine M<sub>1</sub> dans le lait en poudre par H.P.L.C. pour phase inversée. ***Ann. Fals. exp. Chim.***, v. 74, p. 547-554, 1981.
19. FURTADO, M.M.; WOLFSCHOON-POMBO, A.F. Leite de cabra: composição e industrialização. ***Rev ILCT***, v. 33, n. 198, p. 15-17, 1978.
20. FURTADO, M.M. Leite de cabra: características especiais. Seu uso na alimentação. Intolerância. ***Rev ILCT***, v. 36, n. 214, p. 31-37, 1981.

21. GALVANO F, GALOFARO V, GALVANO G. Occurrence and stability of aflatoxin M<sub>1</sub> in milk and milk products: a worldwide review. **J Food Protec**, v. 59, n. 10, p. 1079-1090, 1996.
22. HSIEH, D.P.H.; WONG, J.J. Pharmacokinetics and Excretion of Aflatoxins. In: EATON, D.L.; GROOPMAN, J.P. **The Toxicology of Aflatoxins**. London: Press, 1994. p. 73-85.
23. IARC (International Agency for Research on Cancer). Some naturally occurring substances: **Food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins**, v. 56, 1993.
24. JENNESS R. Composition and characteristics of goat milk: review 1968-1979. **J Dairy Sci**, v. 63, n. 10, p. 1605-1630, 1980.
25. KAMKAR A. Study of the occurrence of aflatoxin M<sub>1</sub> in raw milk produced in Sarab city of Iran. **Food Control**, v. 16, p. 593-599, 2005.
26. KIHARA, T. et al. Effects of prenatal aflatoxin B<sub>1</sub> exposure on behaviors of rat offspring. **Toxicol Sci**, v. 53, p. 392-399, 2000.
27. LAZZARI, F.A. **Umidade, Fungos e Micotoxinas na Qualidade de Sementes, Grãos e Rações**. Curitiba: Pallotti, 1993. p. 73-81.

28. LENMOS, E. Micotoxinas: prejuízo na produção e riscos para a saúde. **Balde Branco**, p. 32-35, fev. 2001.
29. LOSTE, A.; SÁEZ, T.J.J.; RAMOS FERNÁNDEZ, A. Principales Micotoxicosis en el Ganado Ovino. **Pequeños rumiantes**, v. 3, n. 3, p. 8-13, 2002.
30. MARTINS, J.L.S.; MARTINS, I.S. Aflatoxina M1 no leite tipo "B" comercializado no Município de São Paulo, SP (Brasil). **Rev. Saúde Pública**, v. 20, n. 4, p. 303-308, 1986.
31. MEDEIROS, L.P. et al. Leite de cabra: sua importância e aspectos nutritivos. In: **Caprinos: princípios básicos para sua exploração**. Brasília: Embrapa-SPI, p. 90-94, 1994.
32. MERCOSUL – Mercado Comum do Cone Sul. *Regulamento técnico sobre limites máximos de aflatoxinas*. Resolução nº 56/94. [s.n.1.], 1994. (Publicação avulsa MERCOSUL).
33. MIDIO, A.F; MARTINS, D.I. **Toxicologia de Alimentos**. São Paulo: Varela, 2000. p. 64-78.
34. OLIVEIRA, C. A. F.; GERMANO, P. M. L. Aflatoxina M<sub>1</sub> em leite e derivados: ocorrência no Brasil e aspectos relativos à legislação. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 11, n. 48, p. 22-25, 1997.

35. PEREIRA, M. M.G. et al. Aflatoxinas em alimentos destinados a bovinos e em amostras de leite da região de Lavras, Minas Gerais – **Brasil. Ciênc. Agrotec.**, Lavras, v. 29, n. 1, p. 106-112, 2005.
36. PRADO, G.; NICÁCIO, M.A.S.; LARA, M.A. Incidência de aflatoxina M<sub>1</sub> em leite cru e em pó no estado de Minas Gerais. **Higiene Alimentar**, v. 8, p. 34-36, 1994.
37. RAPER, K.B.; Fennell, D.I. **The Genus Aspergillus**. Baltimore : MD: Willians e Wilkins, 1965.
38. RIBEIRO, E.L.A.; RIBEIRO, H.J.S.S. Uso nutricional e terapêutico do leite de cabra. **Semina**, v. 22, n. 2, p. 229-235, 2001.
39. ROUSSI V, VARAGOULI A, BOTSOGLOUS N A. Occurrence of aflatoxin M1 in raw Milk and market Milk commercialized in Greece. **Food Addit Contam** , v. 19, n.9, p. 863-868, 2002.
40. SAMARAJEewa, U.; ARSECULERATNE, S.N.; TENEKOON, G.E. Spontaneous and experimental aflatoxicosis in gotas. **Res Vet Sci**, v. 19, n. 3, p. 269-277, 1975.
41. SANTURIO, J.; SANTOS, I. Cerco às micotoxinas. **Alimentação Animal**. São Paulo, v. 6, n.21, p. 8-9, jan/mar. 2001.

42. SASSAHARA M, NETTO DP, YANAKA EK. Aflatoxin occurrence in foostuff supplied to Dairy cattle and aflatoxina M1 in raw milk in the north of Paraná state. **Food Chem Toxicol**, v. 43, n. 6, p. 981-984,2005.
43. SILVA, R.O.C; SILVA, J.W. Leite de cabra: ou começa... ou acaba! **O Berro**, n. 74, p. 19-25, fev. 2005.
44. SOARES, M.L.V.; RODRIGUES-AMAYA, D.B. Survey of aflatoxins, ochratoxin A, zearalenone, and sterigmatocystinin, some Brazilian foodsby using multi-toxin thin-layer chromatographic method. **J.Assoc.Off.Anal.Chem**, v. 72, p. 2-26, 1989.
45. SYLOS, C.M. **Avaliação dos métodos de determinação e incidência de aflatoxina M<sub>1</sub>, patulina e ácido ciclopiazônico em alguns alimentos brasileiros**. 1994. (Doutorado em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
46. TEIXEIRA, S.R. **Pagamento do leite pela qualidade: estudo de caso**. 78 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Produção). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 1993.
47. TIWARI, V.; CHAUHAN, R.K.S. Aflatoxin detection in milk samples of cattle. **Sci Lett**, v. 14, n. 10, p. 391-392, 1991.
48. TUINSTRA, L. G. M.; ROOS, A. H.; TRIJP, J. M. P. Liquid chromatographic determination of aflatoxin M<sub>1</sub> in milk powder using immunoaffinity columns for cleanup: interlaboratory study. **Food Biol. Contam.**, v. 76, n. 6, p. 1248-1254, 1993.

49. VAN EGMOND, H.P. Aflatoxins in milk. In: EATON, D.L.; GROOPMAN, J.D. (Ed.) ***The toxicology aflatoxins: human health, veterinary, and agricultural significance***. San Diego: Academic Press, 1994. cap. 17, p. 365-381.
50. VAN EGMOND, H.P.; DEKKER, W.H. Worldwide regulations for mycotoxins in 1994. ***Natural Toxins***, v. 3, p. 332-336, 1995.
51. WANGIKAR, P.B.; DIVED, P. SINHA, N. SHARMA, A.K.; TELANGA, A.G. Effects of aflatoxin B1 on embryo fetal development in rabbits. ***Food Chem Toxicol***, v. 43, p. 607-615, 2005.