

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE FARMÁCIA

DISCIPLINA DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO DE FARMÁCIA

Métodos Imunológicos Aplicados na Detecção de Micotoxinas em  
Alimentos

*Immunological assays applied to detect mycotoxins in food*

Vitória Gorini Raichle

Porto Alegre, novembro de 2015.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE FARMÁCIA

DISCIPLINA DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO DE FARMÁCIA

Métodos Imunológicos Aplicados na Detecção de Micotoxinas em  
Alimentos

*Immunological assays applied to detect mycotoxins in food*

Vitória Gorini Raichle

Prof. Dr. Alexandre Meneghello Fuentefria

Orientador

Porto Alegre, novembro de 2015.

*“Light travels faster than sound. This is  
why some people appear bright unntil  
they speak.”*

(Autor Desconhecido)

## AGRADECIMENTOS

Ao professor Dr. Alexandre Fuentefria pela disponibilidade de orientação, incentivo, confiança e dedicação.

Às professoras Grace Gosmann e Aline Zimmer e aos professores Paulo e Otávio Saraiva pelo carinho, pela ajuda, amizade e orientação acadêmica.

À profissional farmacêutica Eunice Costa e ao profissional Osmar Oliveira que me acolheram e demonstraram o quanto esta profissão pode fazer diferença na área da saúde e no cotidiano das pessoas.

As minhas colegas e amigas Chris Krebs, Franciane Lírio, Franciele Gasperin, Jéssica Lamberty, Karine Alves, Katherine Krieser, Nicolly Lopes e ao meu grande amigo Otávio Américo Augustin por todos os momentos que passamos juntos ao longo desses seis anos (sem o apoio de vocês o TCC e a Formatura não seriam possíveis).

À minha família que além de ser maravilhosa em todos os aspectos me apoiou em cada minuto dessa longa jornada.

## APRESENTAÇÃO

Os dados deste Trabalho estão apresentados na forma de artigo científico elaborado segundo as normas do *Brazilian Journal of Microbiology* (Anexo I) na qualidade de “Artigo Original”. A versão em língua inglesa será elaborada após as correções e sugestões da banca revisora.

## SUMÁRIO

1. ARTIGO CIENTÍFICO.....	7
2. ANEXO I.....	31

**MÉTODOS IMUNOLÓGICOS APLICADOS NA DETECÇÃO DE  
MICOTOXINAS EM ALIMENTOS**

*Immunological assays applied to detect mycotoxins in food*

**Vitória Raichle<sup>1</sup> & Alexandre Meneghello Fuentefria<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS - Porto Alegre (RS) - Brasil

**Detecção Imunológica de Micotoxinas em Alimentos**

**Endereço para correspondência:**

Alexandre Meneghello Fuentefria

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Laboratório de Micologia Aplicada, Departamento de Análises

Avenida Ipiranga, 2752, Bairro: Santana

CEP: 90610-000 - Porto Alegre - RS - Brasil

[E-mail: alexandre.fuentefria@ufrgs.br](mailto:alexandre.fuentefria@ufrgs.br)

## RESUMO

**Objetivo:** Sumarizar o atual conhecimento sobre a sensibilidade e especificidade dos métodos imunológicos aplicados para a detecção de micotoxinas em alimentos no Brasil e no mundo. **Síntese dos Dados:** Revisão não sistemática realizada nas bases de dados Pubmed, SciELO e Web of Science em artigos científicos relacionados com a detecção por métodos imunológicos de micotoxinas em alimentos publicados nos últimos dez anos. Os descritores utilizados foram “Mycotoxin”, “Detection”, “Incidence”, “Enzyme Immunoassay”, “Immunochromatography”, “Immunological Methods” e “Automation” individualmente ou em associação. Foram excluídos artigos que abordavam outros tipos de toxinas encontradas em alimentos e que, portanto, não apresentavam nenhuma relação com as micotoxicoses. **Resultados:** Os estudos realizados indicam que as técnicas mais prevalentes utilizadas são o enzimaímunoensaio, a imunocromatografia e a imunofluorescência. O método mais sensível e específico, a eletroquimioluminescência, mostrou-se ser também o mais caro e dispendioso. A metodologia mais barata, passível de automação e adequação a rotina laboratorial foi o enzimaímunoensaio. **Conclusão:** Apesar da elevada incidência de intoxicações decorrentes das micotoxinas nos últimos anos, a ocorrência das micotoxicoses não está completamente elucidada ainda, permanecendo a necessidade de detectar e quantificar essas substâncias tóxicas.

**Descritores:** Micotoxinas, Micotoxicoses, Detecção, Quantificação e Métodos Imunológicos.

## **ABSTRACT**

**Objective:** To summarize the current knowledge about the sensitivity and specificity of applied immunological methods for the detection of mycotoxins in food in Brazil and worldwide. **Data Synthesis:** Review not systematically conducted in Pubmed, SciELO and Web of Science for scientific articles related to detection by immunological methods of mycotoxins in foods and published in the last ten years. The descriptors used were "Mycotoxin" "Detection", "Incidence", "Enzyme Immunoassay", "Immunochromatography", "Immunological Methods" and "Automation" alone or in combination. Articles that indicated other types of toxins found in foods and did not have any relationship with the mycotoxicoses were excluded. **Results:** The studies indicate that the most prevalent techniques used are the enzyme immunoassay, immunochromatography, and the immunofluorescence. The more sensitive and specific, the electrochemoluminescence also proved to be the most expensive and costly. The cheapest method, capable of automation and fitness for routine laboratory was the enzyme immunoassay. **Conclusion:** Despite the high incidence of poisoning arising from mycotoxins in recent years, the occurrence of mycotoxicosis is not completely elucidated yet, remaining the need to detect and quantify these toxic substances.

**Keywords:** Mycotoxins, mycotoxicoses, Detection, Quantification and Immunological Methods.

## 1. INTRODUÇÃO

Micotoxinas são metabólitos secundários tóxicos produzidos por fungos filamentosos de natureza heterogênea (Hussein e Brasel, 2001; Caldas et al., 2002; Lawlor e Lynch, 2005). Essas substâncias são geradas, principalmente, por cinco gêneros distintos: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Claviceps* e *Alternaria*. A expressão desses compostos está geralmente associada a condições ambientais estressantes como variações de umidade e temperatura (Pereira et al., 2002).

O elevado consumo dessas substâncias pode provocar diferentes tipos de patologias ao organismo humano, inclusive doenças crônicas graves como o câncer e hepatopatias irreversíveis (Shephard, 2008). A severidade da doença está amplamente relacionada à toxicidade, frequência e a extensão da exposição ao composto (Bennett e Klich, 2003). As micotoxicoses mais recorrentes no Brasil são provenientes da ingestão de amendoim e derivados contaminados com aflatoxinas, milho contaminado com fumonisinas e zearalenona, café contaminado com ocratoxina A e trigo com desoxinivalenol (Leoni et al., 2001; Caldas et al., 2002; Calori-Domingues et al., 2007; Gonzalez et al., 2008).

O *International Agency for Research on Cancer* (IARC) por meio de um extenso trabalho avaliou e verificou o potencial carcinogênico dessas substâncias e as classificou em quatro grupos: grupo 1, reconhecidamente cancerígeno para humanos; grupo 2, subdividido em 2A, provavelmente cancerígeno para humanos (grau de evidência suficiente em experimentos com animais); e 2B, possivelmente cancerígeno para humanos; grupo 3, condições não classificáveis quanto à carcinogenicidade em humanos; e grupo 4, provavelmente não cancerígeno para humanos.

As aflatoxinas, pertencentes ao grupo 1, podem resultar edema nos membros inferiores, insuficiência renal, necrose e carcinoma hepático (Hall e Wild, 2003; Fung e Clark, 2005). A

octratoxina A, categorizada no grupo 2B, devido a sua nefrotoxicidade também pode provocar o aparecimento de carcinoma (Jennings et al., 2012). As fumonisinas, por sua vez, classificadas como grupo 2B, estão associadas à incidência significativa do câncer de esôfago, além desenvolverem nefro e hepatotoxicidade (Peraica et al., 1999). Por fim, os tricotecenos, o desoxinivalenol e a zearalenona expressam uma significativa atividade imunossupressora, a qual gera uma deficiência na resposta imune humoral (Dawson et al., 2000; Dilkin, 2002; Iamanaka et al., 2005). O aumento da prevalência de casos agudos ou crônicos decorrente da intoxicação por micotoxinas constitui atualmente um problema de saúde pública em muitos países de economia predominantemente agrícola, devidamente ao potencial mutagênico, carcinogênico, teratogênico e imunossupressor de alguns desses componentes (Liu et al., 2012).

Métodos analíticos distintos podem ser utilizados para determinar qualitativamente e quantitativamente as micotoxinas em rações e alimentos contaminados. As técnicas de identificação utilizadas devem ser específicas, sensíveis e aplicáveis a um elevado número de amostras (Jackson e Groopman, 2002). A eletroforese capilar, cromatografia em camada delgada (CCD), cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e cromatografia gasosa (CG), sendo essas duas últimas acopladas a um espectrômetro de massas (EM), são técnicas amplamente utilizadas (Cigic e Prosen, 2009; Welke et al., 2010). No entanto, os métodos imunológicos como enzimaímunoensaio, imunocrometografia, quimioluminescência, entre outros têm se destacado, uma vez que não necessitam de um tempo de análise significativo, demonstrando praticidade, custo relativamente baixo e sensibilidade adequada para a rotina laboratorial (Gan et al., 2013; Li et al., 2012; Tang et al., 2014).

O índice significativo de micotoxinas em produtos como também seu elevado potencial tóxico sugerem a necessidade de estudos que discutam e comparem metodologias adequadas de quantificação e identificação a fim de diminuir perdas econômicas e reduzir o

desenvolvimento de patologias associadas. Este estudo tem como objetivo sumarizar o atual conhecimento sobre a sensibilidade e especificidade dos métodos imunológicos aplicados para a detecção de micotoxinas em alimentos no Brasil e no mundo.

## **2. SÍNTESE DE DADOS**

### **2.1 Métodos**

O estudo consiste em uma revisão não sistemática da literatura sobre a detecção de micotoxinas por métodos imunológicos publicada nas bases de dados Pubmed, SciELO e Web of Science. Os descritores utilizados foram “Mycotoxin”, “Detection”, “Incidence”, “Enzyme Immunoassay”, “Immunochromatography”, “Immunological Methods” e “Automation” individualmente ou em associação.

A seleção da literatura, que alcançou o N total de 62 referências, seguiu os critérios de inclusão, previamente estabelecidos: (I) artigo científico com objetivos ou resultados relacionados à micotoxinas; (II) artigos científicos com descrição da pesquisa laboratorial relacionada à micotoxinas; (III) artigos científicos com publicação no período dos últimos dez anos. Foram excluídos artigos que abordavam outros tipos de toxinas encontradas em alimentos e que, portanto, não apresentavam nenhuma relação com as micotoxicoses.

### **2.2 Métodos Imunológicos Aplicados na Detecção de Micotoxinas**

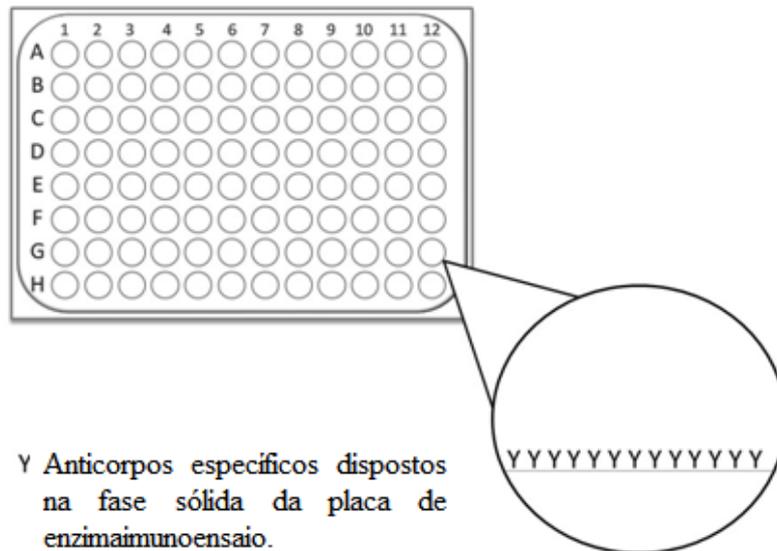
Os métodos imunoquímicos utilizados na detecção de micotoxinas variam de imunoensaios simples até técnicas altamente sofisticadas que empregam imunossensores (Meulenberg, 2012). Esses métodos se baseiam em uma ligação seletiva, reversível e não covalente entre antígenos e anticorpos, os quais devem seguir as normas ISO (*International Organization for Standardization*) previamente estabelecidas a fim de garantir um ensaio analítico adequado e de qualidade. A validação, os limites de detecção e quantificação assim como a especificidade e afinidade dos anticorpos pela micotoxina em questão são de extrema

importância a fim de se obter um resultado de confiável. A rápida detecção e, muitas vezes, quantificação como também a utilização de kits comercialmente disponíveis são fatores que possibilitaram o desenvolvimento e a utilização de diferentes métodos imunológicos.

O anticorpo constitui o componente principal das técnicas imunoquímicas, pois é o elemento que reconhece e liga-se ao composto alvo determinado antígeno, atuando ativamente no sistema imune de animais e seres humanos (Meulenberg, 2012). Esse elemento é produzido por células especializadas e compreendem inúmeras formas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM. A produção de anticorpos específicos é iniciada primeiramente com a imunização de animais experimentais, onde a micotoxina juntamente com uma proteína carreadora de elevado peso molecular é injetada, visto que essas substâncias sozinhas são incapazes de estimular o sistema imune devido a sua estrutura relativamente pequena (Linga et al., 2014). Injeções de reforço são posteriormente realizadas e após cerca de dois a seis meses, o título ou a concentração do anticorpo desejado encontra-se, em geral, suficientemente elevado para a utilização em um ensaio. As células do baço do animal imunizado são retiradas e fundidas com células de mieloma, anteriormente produzidas em cultura, propiciando o desenvolvimento de células híbridas. A célula híbrida que produz o anticorpo específico e de interesse é selecionada a fim de que ocorra uma expansão clonal e grande produção desses anticorpos (Eyer e Franek, 2012).

### **2.2.1 Enzimaimunoensaio**

O enzimaimunoensaio consiste em uma técnica onde a amostra contendo a micotoxina de interesse não necessita de uma preparação e tratamento complexos prévios a análise, estando os anticorpos específicos dispostos em uma fase sólida em uma placa como demonstrado na Figura 1 (Krska et al., 2007; Zachariasova et al., 2008; Tangni et al., 2010).



**Figura 1:** Anticorpos específicos a determinada micotoxina acoplado na fase sólida da placa de enzimaensaio para realização da técnica.

A técnica mais utilizada na determinação desses compostos é o enzimaensaio heterogêneo, o qual consiste na detecção e quantificação de micotoxinas específicas presentes em diferentes tipos de alimentos. Esse teste, geralmente realizado em placa de microtitulação, apresenta o anticorpo revestindo o suporte sólido, onde a amostra a ser analisada é aplicada e posteriormente um anticorpo marcado com uma enzima é adicionado. O cromógeno, então é inserido a fim de que ocorra a reação enzimática e a conversão do substrato em um produto colorido detectável, o qual possa ser quantificado por espectrofotometria (Meulenberg, 2012).

A potência e resistência de micotoxinas levam a perdas significativas anualmente para a saúde, economia e a comercialização de produtos alimentícios (Priyanka et al., 2014, Ramana et al., 2014). Logo, o método de enzimaensaio apresenta uma elevada aplicabilidade na rotina laboratorial (Tabela 1), visto que verifica a presença, exposição como também a ingestão e acumulação dessas substâncias tóxicas no organismo humano e animal.

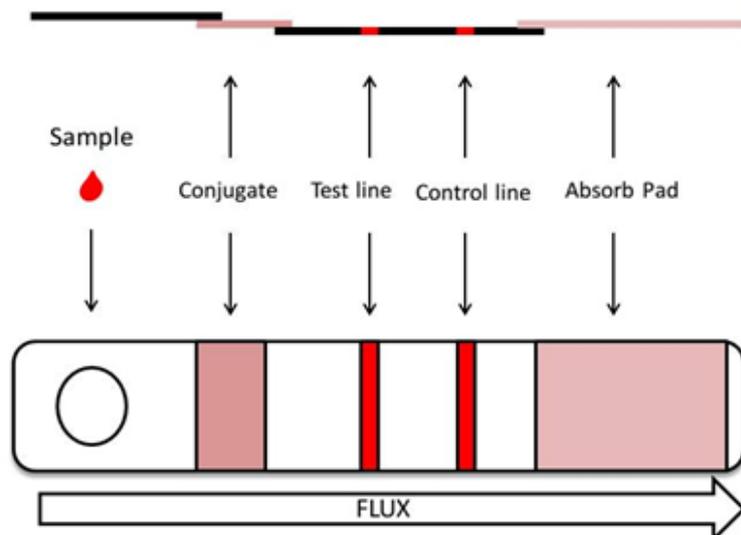
**Tabela 1:** Diferentes micotoxinas que podem ser detectadas por ensaio imunoenzimático com seus respectivos fabricantes e sensibilidades determinadas.

<b>Micotoxina</b>	<b>Marca do Fabricante</b>	<b>Sensibilidade do Método</b>	<b>Alimento</b>
Aflatoxinas	EuroProxima	Inferior a 5 ppb	Amendoim
Fumonisinás	Romer Labs	250 a 5000 ppb	Milho
Ocratoxina A	SISBIO	0,25 ng/mL a 8 ng/mL	Grãos, Vinho, Café
Zearalenona	Sigma-Aldrich	Até 10 ng/mL	Grãos e Cereais
Desoxinivalenol	Quicking Biotech Co.	Até 10 ng/mL	Grãos

### **2.2.2 Imunocromatografia**

A imunocromatografia é um teste de triagem amplamente utilizado devido a sua fácil interpretação e execução. Caso a análise qualitativa seja positiva, a amostra em questão pode ainda ser submetida a métodos de purificação e quantificação (Meulenberg, 2012).

A técnica imunocromatográfica tem sido desenvolvida e gerado um enorme interesse científico e industrial devido a sua aplicabilidade como dispositivo rápido e descartável na identificação de micotoxinas (Anfossi et al., 2013). O ensaio fundamenta-se na ligação entre o antígeno, suspenso na amostra, e o seu anticorpo específico, que reveste a membrana de nitrocelulose na linha teste. O restante desse suporte sólido é bloqueado devido à presença de uma proteína inerte. A positividade da substância de interesse é verificada pelo aparecimento de uma tira colorida na linha teste, uma vez que a negatividade é identificada pelo não aparecimento de coloração nessa mesma linha como demonstrado na Figura 2 (Anfonssi et al., 2011; Anfossi et al., 2013).



**Figura 2:** Técnica imunocromatográfica para detecção direta da micotoxina em fita de nitrocelulose. A positividade do teste é indicado pelo aparecimento de uma banda na linha teste concomitante a linha controle.

Esse método analítico demonstrou-se acessível para monitorar as principais micotoxinas em alimentos e rações em praticamente todas as fases da produção como, por exemplo, a detecção de aflatoxina M1 no leite com uma sensibilidade de 50 ppt.

### 2.2.3 Radioimunoensaio

O radioimunoensaio na detecção de micotoxinas consiste em um método onde o antígeno marcado com um isótopo radioativo compete com o antígeno (toxina de interesse) da amostra por sítios combinatórios das moléculas de anticorpos específicos fixados a uma fase sólida, em uma única etapa. Determina-se quantitativamente a concentração antigênica, a qual é inversamente proporcional a medida da radioatividade (Meulenberg, 2012).

Estudos anteriormente realizados para verificação de ocratoxina A segundo Aalund et al. (1975), Chu et al. (1976) e Rousseau et al. (1985) apresentaram limites de detecção de 20 µg/L, 1 a 20 ng/mL e 0,5 ng/mL juntamente com um anticorpo significativamente específico,

demonstrando baixa reatividade cruzada com os compostos relacionados. Fukal e Reisnerova (1990) posteriormente utilizaram um kit a fim de avaliar a ingestão dessa substância em questão por meio da quantificação no soro, onde o limite de detecção proposto foi de 100 ng/L. Todavia, devido aos riscos dos componentes radiomarcados a saúde e a eliminação de resíduos especializados, essa técnica encontra-se em desuso propiciando a produção de marcadores alternativos.

#### **2.2.4 Imunofluorescência**

A imunofluorescência baseia-se em uma reação utilizando anticorpos específicos marcados com moléculas de fluorocromo, podendo a mesma ser evidenciada e identificada em um microscópio de fluorescência. O princípio do método consiste na capacidade do anticorpo de se ligar covalentemente ao fluorocromo sem perder sua reatividade específica com o antígeno.

As diferentes técnicas que compõem este método são, principalmente, a imunofluorescência de tempo resolvido, onde os fluorocromos apresentam um tempo de fluorescência maior eliminando a fluorescência de fundo indicando maior sensibilidade e especificidade, fato evidenciado por Huang et al. (2009) que detectou ocratoxina A e aflatoxina B1 com um limite de detecção de 0,05 ug/L para a primeira e 0,02 ug/L para a segunda, e a imunofluorescência polarizada, em que o hapteno da amostra compete com o hapteno marcado por sítios de ligação em um anticorpo específico, onde a polarização detectada é inversamente proporcional à quantidade de antígeno não marcado na amostra (Maragos, 2009), que apresenta vantagem na execução do ensaio, evitando a lavagem e separação da fração livre e ligada a exemplo do estudo realizado por Zezza et al. (2009) com limite de detecção de 0,7 ng/mL para pesquisa de ocratoxina A em amostras de vinho.

### **2.2.5 Quimioluminescência**

O princípio da quimioluminescência baseia-se na emissão de luz como resultado de uma reação química, onde compostos intermediários em um estado eletronicamente excitado ao retornarem ao estado de energia inicial, emitem luz, a qual pode ser dosada. Neste método são utilizados anticorpos ligados a um marcador luminescente resultando em uma sensibilidade elevada e eliminação de interferentes (Yu et al, 2011).

### **2.2.6 Eletroquimioluminescência**

A eletroquimioluminescência fundamenta-se em um processo de reações químicas que geram luminescência a partir de um estímulo elétrico. Complexos de rutênio e tripropilamina são amplamente utilizados nesses ensaios para se obter a emissão de luz a qual é quantificada. O método apresenta sensibilidade adequada e facilidade de controle da reação devido ao controle do impulso elétrico (Gan et. al, 2013).

Gan et. al (2013) demonstrou por meio de um estudo anteriormente realizado um limite de detecção referente a 0,3 pg/mL para a detecção de aflatoxina M1 presentes em amostras de leite. A técnica demonstrou-se rápida e com pouca elaboração na preparação da amostra, logo adequada para a identificação rastreio de micotoxinas em produtos alimentícios.

## **2.3 Perspectivas de Automação em Métodos Imunológicos**

A automação fundamenta-se na aplicação de técnicas computadorizadas ou mecânicas com o objetivo de tornar um processo mais eficiente, maximizando a produção com menor gasto e maior segurança (Campana e Oplustil, 2011). A minimização de erros e a redução dos prazos de resultados são consequências significativas e importantes desse processo.

A implementação da automação está intimamente relacionada à necessidade constante da busca pela otimização dos custos nos laboratórios. Métodos imunológicos demonstraram-se

adequados para triagem rápida de grande número de amostras assim como para a quantificação de micotoxinas, visto que além de apresentarem sensibilidade e especificidade, possuem possibilidade de adaptação a diferentes graus de automação (Uekane et al., 2010).

As técnicas mais indicadas em uma relação custo/benefício aptas ao processo de automação em diferentes etapas são o ensaio imunoenzimático colorimétrico, que constitui características como rapidez, baixo custo, simplicidade, versatilidade e objetividade de resultados, a eletroquimioluminescência, onde a rapidez é associada ao controle da reação e a um curto período de incubação, e a quimioluminescência, a qual realiza determinações quantitativas devido à elevada sensibilidade do sinal quimioluminescente que permite verificar inúmeras variações (Pereira et al., 2005). A tecnologia veiculada as diferentes metodologias analíticas reflete a necessidade de melhor assistência à saúde.

#### **2.4 Detecção de Micotoxinas em Amostras Clínicas Humanas e Veterinárias**

A contaminação de alimentos e rações por fungos e, conseqüentemente, o desenvolvimento de micotoxinas e micotoxixoses gera conseqüências econômicas graves e preocupantes como também um impacto significativo na saúde humana e animal. Portanto, a detecção e acompanhamento dessas substâncias em amostras clínicas são fundamentais a fim de se obter um monitoramento adequado.

Quando alimentos contaminados são ingeridos, as micotoxinas são rapidamente absorvidas, afetando órgãos e resultando em distúrbios metabólicos, os quais levam a alterações séricas (Tessari, 2006). A distribuição pelos tecidos varia com a via de introdução e com a perfusão sanguínea do órgão atingido (Krüger et al., 2006).

A identificação de micotoxinas pode ser realizada pela análise de alimentos, tecidos, secreções ou excreções de animais e indivíduos expostos. A amostragem, muitas vezes é o

fator limitante da sensibilidade, já que a distribuição dessas substâncias tóxicas pode ser altamente heterogênea (Coppock e Christian, 2007).

A utilização de biomarcadores, parâmetros biológicos, demonstrou-se eficaz para o monitoramento e a frequência da exposição a esses compostos, pois elucidam a relação causa/efeito e dose/efeito ajudando no diagnóstico clínico e laboratorial da micotoxicose (Bando et al., 2007). Os valores obtidos não devem constituir risco inaceitável à saúde do homem e animal. Os possíveis biomarcadores de exposição indicados em trabalhos anteriormente realizados são os metabólitos das micotoxinas ou a própria toxina, os quais podem ser quantificados na urina, no soro ou no plasma como demonstrado na Tabela 2 (Turner et al., 1999; Gilbert et al., 2001; Ianvicoli et al., 2002; Wild e Turner, 2002; Meky et al., 2003).

**Tabela 2:** Biomarcadores de micotoxinas e suas respectivas amostras clínicas para análise e diagnóstico laboratorial.

Micotoxina	Biomarcados da Micotoxina	Amostra Biológica
Aflatoxina	Aflatoxina, Aflatoxina M1; P1 e Q1	Soro e Urina
Fumonisina	Fumosina, Esfinganina e Esfingosina	Soro e Urina
Desoxinivalenol	Desoxinivalenol, Metabólito epóxido de desoxinivalenol (DOM-1) e conjugado com ácido glicurônico	Plasma e Urina
Ocratoxina A	Ocratoxina A	Soro, Plasma e Urina

Parâmetros imunológicos também podem ser avaliados, pois a contagem de células encontra-se modificada, fato evidenciado por variações nos leucócitos totais, linfócitos B, TCD4+ e TCD8+ em amostras sanguíneas segundo estudos realizados anteriormente por Chowdhury et al. (2005) e Girish et al. (2008). A alteração desses componentes celulares leva a uma suscetibilidade maior no desenvolvimento de doenças infecciosas (Girish et al., 2010)

Leite e derivados lácteos representam itens nutricionais essenciais na dieta humana e consistem em meios de exposição à micotoxinas, já que esses produtos, muitas vezes, são obtidos a partir de animais que ingeriram ração ou silagem contaminada (Carvajal et al., 2003). As amostras utilizadas, a fim de verificar a ocorrência dessas substâncias, em análises e estudos previamente realizados eram provenientes de bovinos, onde métodos imunológicos, como imunocromatografia e enzimaímunoensaio, foram utilizados (Weigel, 2007; Ghazani, 2009). O leite materno, além de seus componentes naturais, também pode conter substâncias xenobióticas, advindas do meio externo, que se presentes em quantidades elevadas, podem afetar o desenvolvimento das crianças devido à suscetibilidade infantil e efeitos tóxicos (Abdalla et al., 2002; Borchers et al., 2010).

### **3. CONCLUSÃO**

A incidência de intoxicações decorrentes da ingestão e exposição à micotoxinas vem progredindo nos últimos anos, contudo mais estudos são necessários para evidenciarmos a ocorrência de micotoxicoses no Brasil e no mundo, visto que as publicações nessa temática ainda são muito escassas. A detecção dessas substâncias é realizada principalmente por métodos imunológicos, os quais permitem uma rápida identificação associada à sensibilidade, especificidade, baixo custo, facilidade de execução e realização. As técnicas mais utilizadas consistem no enzimaímunoensaio colorimétrico e na imunocromatografia, sendo também realizados ensaios quimioluminescentes, eletroquimioluminescentes e imunofluorescentes. A capacidade de automação a diferentes etapas das metodologias é também um fator determinante na escolha analítica da detecção das micotoxinas.

#### 4. REFERÊNCIAS

1. AALUND, O.; BRANFELDT, K.; HALD, B.; KROGH, P.; POULSEN, K. A radioimmuno assay for ochratoxin A: A preliminary investigation. **Pathol Microbiol. Scand. Section C Immunol.** v.83, p.390–392, 1975.
2. ABDALLA, E. A. M. A.; ALY S. E.; NEAMAT-ALLAH, A. A. Human exposure to mycotoxins in Egypt. **Mycotoxin Research**, v.18, p. 23-30, 2002.
3. ANFOSSI, L.; BAGGIANO, C.; GIOVANNOLI, C.; D'ARCO, G.; GIANFRANCO, G. Lateral-flow immunoassays for mycotoxins and phycotoxins: a review. **Anal Bioanal Chem**, v.405, p.467–480, 2013.
4. ANFOSSI, L.; D'ARCO, G.; BAGGIANO, C.; GIOVANNOLI, C.; GIANFRANCO, G. A lateral flow immunoassay for measuring ochratoxin A: Development of a single system for maize, wheat and durum wheat. **Food Control**. v.22, p.1965– 1970, 2011.
5. BENNETT, J. W.; KLICH, M. Mycotoxins. **Clin Microbiol Rev**, v. 16, p. 497-516, 2003.
6. BORCHERS, A.; TEUBER, S. S.; KEEN, C. L.; GERSHWIN, M. E. Food Safety. **Clinic Rev Allerg Immunol**, v. 39, p. 95–141, 2010.
7. CALDAS, E. D.; SILVA S. C.; OLIVEIRA J.N. Aflatoxinas e ocratoxina A em alimentos e riscos para a saúde humana. **Revista de Saúde Pública**, v.36, p.319-32, 2002.
8. CALORI-DOMINGUES, M.A.; ALMEIDA, R.R.; TOMIWAKA, M.M.; GALLO, C.R.; GLORIA, E.M.; DIAS, C.T.S. Ocorrência de desoxinivalenol em trigo nacional e importado utilizado no Brasil. **Ciênc. Tecnol. Aliment.** v.27, p.181-185, 2007.

9. CAMPANA, G.A.; OPLUSTIL, C.P. Conceitos de automação na medicina laboratorial: revisão de literatura. *J Bras Patol Med Lab*, v. 47, n. 2, p.119-127, 2011.
10. CARVAJAL, M.; BOLANÖS, A.; ROJO, F.; MÉNDEZ, I. Aflatoxin in pasteurized and ultrapasteurized milk with different fat content in Mexico. **Journal of Food Protection, Des Moines**, v. 66, n.10, p.1885-1892, 2003.
11. CHOWDHURRY, S. R.; SMITH, T. K.; BOERMANS, H. J.; WOODWARD, B. Effects os feed-borne fusarium mycotoxins on hematology and immunology of laying hens. **Poultry Science**, v 84, p. 1841-1850, 2005.
12. CHU, F.S.; CHANG, F.C.C.; HINS DILL, R.D. Production of antibody against ochratoxin A. **Appl. Environ. Microbiol.** v.31, p.831–835, 1976.
13. CIGIC, I. K.; PROSEN, H. An Overview of Conventional and Emerging Analytical Methods for the Determination of Mycotoxins. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 10, n. 1, p. 62-115, 2009.
14. COPPOCK, R.W.; CHRISTIAN, R.G. Aflatoxins In: GUPTA, R.C. *Veterinary Toxicology – Basic and Clinical Principles*. San Diego: Academic Press, p. 939-950, 2007.
15. DAWSON, K.A.; EVANS, J.; KUDUPOJE, M. Understanding the adsorption characteristics of yeast cell wall preparations associated with mycotoxin binding. In: *Nutritional Biotechnology in Feed and Food Industries*, Lexington: Alltech, p.169-181, 2006.
16. DILKIN, P. Micotoxicose Suína: Aspectos preventivos, clínicos e patológicos. **Biológico**, v.64, n.2, p.187-191, 2002.

17. EYER, L.; FRANEK, M. Production of antibodies for immunoanalytical methods. In: Meulenbergh E.P., editor. *Antibodies: Applications and New Developments*. Bentham e Books; Bussum, The Netherlands: p. 29–47, 2012.
18. FUKAL, L.; REISNEROVA, H. Monitoring of aflatoxins and ochratoxin A in Czechoslovak human sera by immunoassay. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.** v.44, p.345–349, 1990.
19. FUNG, F.; CLARK, R.F. Health effects of mycotoxins: a toxicological overview. **J Toxicol Clin Toxicol.** v.42, n.2, p. 217-234, 2004.
20. GAN, N.; ZHOU, J.; XIONG, P.; HU, F.; CAO, Y., LI, T.; JIANG, Q. An ultrasensitive Electrochemiluminescent Immunoassay for Aflatoxin M1 in Milk Based on Extraction by Magnetic Graphene and Detection by Antibody-Labeled CdTe Quantum Dots-Carbon Nanotubes Nanocomposite. **Basel Toxins.** v.5, p. 865-883, 2013.
21. GHAZANI, M. H. M. Aflatoxin M1 contamination in pasteurized milk in Tabriz. **Food and Chemical Toxicology**, v. 47, n. 7, p. 1624-1625, 2009.
22. GILBERT, J.; BRERETON, P.; MACDONALD, S. Assessment of dietary exposure to ochratoxin A in the UK using a duplicate diet approach and analysis of urine and plasma samples. **Food Addit Contam.** v. 18, n. 12, p. 1088-93, 2001.
23. GIRISH, C. K.; SMITH, T. K.; BOERMANS, H. J.; KARROW, N. A. Effects of feeding blends of grains naturally contaminated with Fusarium mycotoxins on Performance, hematology, metabolism, and immunocompetence of turkeys. **Poultry science**, v. 87, p. 421-432, 2008.
24. GIRISH, C. K.; SMITH, T. K.; BOERMANS, H. J.; KUMAR, P. A.; GIRGIS, G. N. Effects of dietary Fusarium mycotoxins on intestinal lymphocyte subset populations, cell

proliferation and histological changes in avian lymphoid organs. **Food and chemical toxicology**, v. 48, p. 3000-3007, 2010.

25. GONÇALEZ, E.; NOGUEIRA, J.H.C.; FONSECA, H.; FELICIO, J.D.; PINO, F.A.; CORRÊA, B. Mycobiota and mycotoxins in Brazilian peanut kernels from sowing to harvest. **Int. J. Food Microbiol.** v.123, p.184-190, 2008.

26. GORYACHEVA I. Y.; RUSANOVA, T.Y.; BURMISTROVA N. A.; DE SAEGER S. Immunochemical methods for the determination of mycotoxins. *J Anal Chem*, v.64, p.788–806, 2009.

27. HALL, A.J.; WILD, C.P. Liver cancer in low and middle income countries. **BMJ**, v.326, p. 994-1002, 2003.

28. HUANG, B.; XIAO, H.; ZHANG, J.; ZHANG, L.; YANG, H.; ZHANG, Y.; JIN, J. Dual label time resolved fluoroimmunoassay for simultaneous detection of aflatoxin B1 and ochratoxin A. **Arch. Toxicol.** v.83, p.619–624, 2009.

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

30. IAMANAKA, B.T.; TANIWAKI, M.H.; MENEZES, H.C.; VICENTE, E.; FUNGARO, M.H.P. Incidence of toxigenic fungi and ochratoxin A in dried fruits sold in Brazil. **Food Additives and Contaminants** v.22, p.1258–1263, 2005.

31. IAVICOLI, I. et al. External and internal dose in subjects occupationally exposed to ochratoxin A. **Int Arch Occup Environ Health**, v. 75, n. 6, p. 381-6, 2002.

32. JACKSON, P. E.; GROOPMAN, J. D. Aflatoxin and liver cancer. **Baillière Clin Gastroenterol**, v. 13, n. 4, p. 545-55, 2002.

33. JENNINGS, P.; WEILAND, C.; LIMONCIEL, A.; BLOCH, K.M.; RADFORD, R.; ASCHAUER, L.; McMORROW, T.; WILMES, A.; PFALLER, W.; AHR, H.J. Transcriptomic alterations induced by ochratoxin A in rat and human renal proximal tubular *in vitro* models and comparison to a rat *in vivo* model. *Arch. Toxicol.* v.86, p. 571–589, 2012.
34. KRÜGER, C. D. Ocratoxina A em suínos abatidos no estado do Rio de Janeiro sob inspeção sanitária. I Determinação dos níveis séricos por cromatografia líquida. II Correlação com as lesões renais e hepáticas. 2006. Monografia (Mestrado). Programa de Pós Graduação em Medicina Veterinária – Universidade Federal Fluminense. Niterói. 2006.
35. KRŠKA, R.; WELZIG, E.; BOUDRA, H. Analysis of Fusarium toxins in feed. **Anim Feed Sci Technol** v.137, p. 241–264, 2007.
36. LAWLOR P.G.; LYNCH P.B. Mycotoxin management. **Afr. Farming Food Process.** v.46, p.3-12, 2005.
37. LEONI, L.A.B.; FURLANI, R.P.Z.; VALENTE SOARES, L.M.; OLIVEIRA, P.L.C. Ochratoxin A in Brazilian green coffee. **Ciênc. Tecnol. Aliment.** v.21, n.1, p.105-107, 2001.
38. LI, M.; LI, P.; WU, H.; ZHANG, Q.; MA, F.; ZHANG, Z.; DING, X.; WANG, H. An ltra-Sensitive Monoclonal Antibody-ased Competitive Enzyme Immunoassay for Sterigmatocystin in Cereal and Oil Products. **J Plos**, v.9, 2014.
39. LINGA, S.; PANGB, J.; YUB, J.; WANGA, R.; LIUA, L.; MA, Y.; ZHANGB, Y.; JINA, N.; WANGA, S. Preparation and identification of monoclonal antibody against fumonisin B1 and development of detection by Ic-ELISA. **Toxicon**, v.80, p.64-72, 2014.

40. LIU, G.; HAN, Z.; NIE, D.; YANG, J.H.; ZHAO, Z.H. Rapid and sensitive quantitation of zearalenone in food and feed by lateral flow immunoassay. **Food Control** v.27, p. 200–205, 2012.
41. MARAGOS, C. Fluorescence polarization immunoassay of mycotoxins: A review. **Toxins** . V.1, p.196–207, 2009.
42. MEKY, F.A. et al. Development of a urinary biomarker of human exposure to deoxynivalenol. **Food Chem Toxicol**, v.41, p. 265-73, 2003.
43. MEULENBERG, E.P. Immunochemical Methods for Ochratoxin A Detection: A Review. **Basel Toxins**. v.4, p. 244-266, 2012.
44. PERAICA, M.; RADIC, B.; LUCIC, A.; PAVLOVIC, M. Toxic effects of mycotoxins in humans. **B World Health Organ**. v.77, p. 754–766, 1999.
45. PEREIRA, M. M. G. Aflatoxinas em alimentos destinados a bovinos e em amostras de leite da região de Lavras, Minas Gerais – Brasil, **Ciência. Agrotec.**, v. 29, n. 1, p. 106-112, . 2005.
46. PEREIRA, M.L.G.; CARVALHO, E.P.; PRADO, G. Crescimento e produção de aflatoxinas por *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*. **B. Ceppa**. v.20, p.141-156, 2002.
47. PRIYANKA, S. R.; RAMANA, M. V.; PHANIKUAR, G.; KOTESWARARAO, V.; MURALI, H. S.; BATRA, H. V. Occurrence and molecular detection of toxigenic *Aspergillus* species from food grain samples of India. **J. Sci. Food Agric**. v.94, 537–543, 2014.
48. RAMANA, M. V.; CHANDRANAYAKA, S.; MADHUKAR, N. PHANIKUMAR, G.; NAVEENKUMAR, K.; MURALI, H. S., Mould incidence and mycotoxin contamination in freshly harvested maize kernels originated from India. **J. Sci. Food Agric**.v. 94, 2674–2683, 2014.

49. ROUSSEAU, D.M.; SLEGGERS, G.A.; VAN PETEGHEM C.H. Radioimmunoassay of ochratoxin A in barley. **Appl. Environ. Microbiol.** v.50, p.529–531, 1985.
50. SHEPHARD, G.S. Impact of mycotoxins on human health in developing countries. **Food Add. Contam.** v.25, p.146–151, 2008.
51. TANG, X.Q.; LI, X.; LI, P.W. ZHANG, Q.; LI, R. Development and application for an immunoaffinity column enzyme immunoassay for mycotoxin zearalenone in complicated samples. **J PloS**, v.9, p. 1-6, 2014.
52. TANGNI E. K.; MOTTE J. C.; CALLEBAUT, A.; PUSSEMIER, L. Crossreactivity of antibodies in some commercial deoxynivalenol test kits against some fusariotoxins. **J Agric Food Chem**, v.58, p.12625–12633, 2010.
53. TESSARI, E.N.C.; OLIVEIRA, A.A.F.; CARDOSO, A.L.S.P.; LEDOUX, D.R.; ROTTIN GHAUS, G.E. Effects of aflatoxin B1 and fumonisin B1 on body weight, and histology of broiler chicks. **British Poultry Science**, v.47, n.3, p.357-364, 2006.
54. TURNER, P.C.; NIKIEMA, P.; WILD, C.P. Fumonisin contamination of food: progress in development of biomarkers to better assess human health risks. **Mut Res**, v. 443, p. 81-93, 1999.
55. UEKANE, T.M.; BANDEIRA, R.D.C.C.; SILVA, M.C. Comparação de Métodos de Análise para Ocratoxina A no Café: Uma Revisão. **Perspectiva da Ciência e Tecnologia**, v. 2, n.1, p.44-54, 2010.
56. WEIGEL, M. Avaliação da contaminação por aflatoxina M1 em leite cru e UHT. 2007. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

57. WELKE, J. E.; HOELTZ, M.; DOTTORI, H. A.; NOLL, I. B. Determination of ochratoxin A in wine by high-performance thin-layer chromatography using charged coupled device. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 21, n. 3, p. 441-446, 2010.
58. WILD, C.P.; TURNER, P.C. The toxicology of aflatoxins as a basis for public health decisions. **Mutagen**, v. 17, n. 6, p. 471-81, 2002.
59. YU, F.Y.; VDOVENKO, M.M.; WANG, J.J.; SAKHAROV, I.Y. Comparison of enzyme-linked immunosorbent assays with chemiluminescent and colorimetric detection for the determination of ochratoxin A in food. **J. Agric. Food Chem.** v.59, p.809–813, 2011.
60. ZACHARIASOVA, M.; HAJŠLOVA, J.; KOSTELANSKA, M.; POUŠTKA, J.; KRPLOVA, A.; CUHRA, P.; HOCHÉL, I. Deoxynivalenol and its conjugates in beer: a critical assessment of data obtained by enzyme-linked immunosorbent assay and liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. **Anal Chim Acta**, v.625, p.77–86, 2008.
61. ZEZZA, F.; LONGOBARDI, F.; PASCALE, M.; EREMIN, S.A.; VISCONTI, A. Fluorescence polarization immunoassay for rapid screening of ochratoxin A in red wine. **Anal. Bioanal. Chem.** v.395, p.1317-1323, 2009.
62. ZHANG, A.H.; MA, Y.N.; FENG, L.L.; WANG, Y.; HE, C.H.; Development of a sensitive competitive indirect ELISA Method for determination of ochratoxin A levels in cereals originating from Nanjing, China. **Food Control**, v.22, p. 1723–1728, 2011.

**ANEXO I – NORMAS PARA PUBLICAÇÃO NO *BRAZILIAN JOURNAL OF*  
*MICROBIOLOGY***

O Artigo deverá ser submetido como um único arquivo em WORD. Este arquivo deve conter texto, figuras, tabelas, etc. Serão aceitas apenas submissões de artigos redigidos em inglês.

Para **artigos de revisão**, o arquivo em **WORD** deve conter:

- Título
- Título resumido
- Resumo (200 palavras)
- 3 a 5 palavras-chave
- Texto
- Agradecimentos (opcional)
- Referências

Os artigos devem ser digitados com espaço duplo, margens de 3 cm e numerados seqüencialmente. As linhas das páginas do artigo devem ser numeradas. Os editores recomendam que antes da submissão o artigo seja lido de forma crítica por alguém fluente em língua inglesa. Os artigos escritos com inglês de baixa qualidade não serão aceitos.

*Artigos Originais e Artigos de revisão* deverão conter até, no máximo, 20 páginas, incluindo referências tabelas e figuras.

Abreviaturas e símbolos devem seguir as recomendações da IUPAC-IUB *Comission on Biochemical Nomenclature, Amendments and Corrections*. As unidades de medida devem seguir o Sistema Internacional de Unidades.

## **ORGANIZAÇÃO**

O **Título** deve ser conciso, não conter abreviações e indicar claramente o tema do artigo.

Expressões como "Effects of", "Influence of", "Study on", etc, devem ser evitadas. Os cuidados na escolha das palavras do título são importantes, pois são usadas em sistemas eletrônicos de busca.

O **Resumo** deve resumir o conteúdo básico do artigo. Ele deve ser representativo do texto. Não deve conter referências, tabelas nem abreviações pouco usuais. São de grande importância, pois serão lidos por muitas pessoas que não têm acesso ao artigo completo.

A **Introdução** deve oferecer informações que possibilitem ao leitor avaliar adequadamente os resultados apresentados no artigo sem que obrigatoriamente tenha que recorrer à literatura corrente. No entanto, a introdução não deve ser uma extensa revisão de literatura. Deve informar claramente as justificativas e os objetivos do artigo.

Os **Materiais e Métodos** devem proporcionar informações suficientes para que outros pesquisadores possam reproduzir o trabalho. A repetição de detalhes de procedimentos que já

tenham sido publicados em outros artigos deve ser evitada. Se um método publicado for modificado, tais modificações devem estar claras no artigo. Fontes de reagentes, meios de cultura e equipamentos (empresa, cidade, estado e País) devem ser mencionadas no texto. Nomes que são marcas registradas devem ser claramente indicados. Subtítulos podem deixar este tópico mais fácil de ler e entender.

Os **Resultados** devem, por meio de texto, tabela e/ou figuras dar os resultados dos experimentos. Se o item **Discussão** for incluído, evite interpretações extensas dos resultados, pois isto deverá ser feito na discussão. Se os **Resultados e Discussões** forem redigidos concomitantemente, então os resultados devem ser discutidos no local mais apropriado do texto. Tabelas e figuras devem ser numeradas em algarismos arábicos. Todas as tabelas e figuras devem ser mencionadas no texto.

O local aproximado das tabelas e figuras no texto deve ser indicado.

O item **Discussão** deve discutir os resultados em função da literatura citada.

As **Referências** devem ser redigidas em ordem alfabética e começar pelo último nome do primeiro autor. Todos os autores devem ser citados. As citações no texto devem ser escritas pelo último nome do primeiro autor, seguido pelo ano de publicação. Como exemplo, tem-se: "... while Silva and Pereira (1987) observed that resistance depended on soil density" ou "It was observed that resistance depended on soil density (Silva and Pereira, 1987)." Para a citação de dois ou mais artigos do mesmo autor, liste em ordem cronológica sendo que os anos devem ser separados por vírgula (exemplo: Freire-Maia et al., 1966a, 1966b, 2000; Hene 2010; Padonou et al., 2012). Os nomes dos periódicos devem ser abreviados de acordo com o *BIOSIS*. Todas as referências incluídas na lista final devem ter sido citadas no texto e todas as referências mencionadas no texto devem aparecer na lista final.

Exemplos:

a. **Artigos de Periódicos**  
Brito DVD, Oliveira EJ, Darini ALC, Abdalla VOS, Gontijo-Filho PP (2006) Outbreaks associated to bloodstream infections with *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative *Staphylococcus* spp in premature neonates in a university hospital from Brazil. Braz J Microbiol 37:101-107.

b. **Artigos ou Capítulos de Livro**  
Franco BDGM, Landgraf M, Destro MT, Gelli DS, (2003) Foodborne diseases in Southern South America. In: Miliotis, M.D., Bier, J.W.(eds). International Handbook of Foodborne Pathogens. Marcel Dekker, New York, USA, 733-743.

c. **Livros**  
Montville TJ, Matthews KR (2005) Food Microbiology - an introduction. ASM Press, Washington, D.C.

d. **Patentes**  
Hussong RV, Marth EH, Vakaleris DG. January 1964. Manufacture of cottage cheese. U.S. Pat. 3, 117, 870.

e. **Teses e Dissertações**  
Santos MVB (2005) O papel dos anticorpos contra os componentes da parede celular de *Paracoccidioides brasiliensis* na evolução da doença experimental. São Paulo, Brasil, 110p. (M.Sc. Dissertation. Instituto de Ciências Biomédicas. USP).

f. **Comunicações em Eventos (Simpósios, Conferências, etc)**  
Silveira TS, Martins JL, Abreu FA, Rosado AS, Lins UGC (2005) Ecology of magnetotactic multicellular organisms in microcosms. XXIII Congresso Brasileiro de Microbiologia, Santos, SP, p. 272.

g. **Publicações na Web**  
Abdullah MAF, Valaitis AP, Dean DH (2006) Identification of a *Bacillus thuringiensis* Cry11Ba toxin-binding aminopeptidase from the mosquito *Anopheles quadrimaculatus*. *BMC Biochemistry*. <http://www.biomedcentral.com/1471-2091/7/16>

h. **Webpage**

U.S. Food and Drug Administration. 2006. Enjoying Homemade Ice Cream without the Risk of *Salmonella* Infection. Available at: <http://www.cfsan.fda.gov/~dms/fs-eggs5.html>. Accessed 26 May 2006.

As citações do tipo "personal communication" ou "unpublished data" devem ser evitadas, embora se reconheçam que, eventualmente, elas possam ser usadas. Nestes casos, elas devem ser citadas no texto e não na lista final de referências. As referências que consistem de artigos que foram "aceitos para publicação" ou "no prelo" são aceitáveis. No entanto, as referências dos artigos que são "submetidos" ou "em preparação" não são aceitas.

**AGRADECIMENTOS:** Esta seção é opcional. Ela reconhece a assistência financeira e pessoal recebida para execução do trabalho.

**TABELAS:** devem ser inseridas no texto de acordo com que são citadas e numeradas seqüencialmente por algarismos arábicos. O título deve ser colocado acima da tabela e deve ser curto, porém representativo, com descrição completa da informação contida na tabela. Cabeçalhos e rodapés devem ser concisos, com colunas e linhas cuidadosamente centralizadas. Devem ter qualidade suficiente para garantir boa reprodução. Por favor, abra o link abaixo para ver os requisitos necessários para se obter a resolução adequada. ([http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/about/image\\_quality\\_table.html](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/about/image_quality_table.html))

**FIGURAS:** devem ser inseridas no texto de acordo com que são citadas e numeradas seqüencialmente por algarismos arábicos. Os dados que foram apresentados em tabelas não devem ser repetidos na forma de figuras. As legendas devem ser colocadas abaixo das figuras. Devem ter qualidade suficiente para garantir boa reprodução. Por favor, abra o link abaixo para ver os requisitos necessários para se obter a resolução adequada. ([http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/about/image\\_quality\\_table.html](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/about/image_quality_table.html))

**FOTOGRAFIAS:** Devem ter qualidade suficiente para garantir boa reprodução. Por favor, abra o link abaixo para ver os requisitos necessários para se obter a resolução adequada. ([http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/about/image\\_quality\\_table.html](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/about/image_quality_table.html))

### **Conflitos de Interesses**

É política do periódico *Brazilian Journal of Microbiology* que qualquer pessoa envolvida no processo de publicação (autores, revisores, membros do corpo editorial e assistentes) deve estar isenta de conflitos de interesses que possam influenciar negativamente o parecer, a objetividade e a lealdade a seus autores. O BJM reconhece que qualquer conflito de interesse detectado deve ser prontamente comunicado e rapidamente resolvido. Conflitos de interesses em publicações podem ser definidos como condições nas quais um indivíduo possui conflito ou competição de interesses que podem resultar em decisões editoriais tendenciosas. Os

conflitos de interesses podem ser potenciais, percebidos ou factuais. Considerações pessoais, políticas, financeiras, acadêmicas ou religiosas podem afetar a objetividade de diferentes formas.