

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Instituto de Biologia
Departamento de Microbiologia e Parasitologia
Programa de Pós-Graduação em Microbiologia e Parasitologia

Tese



**Efeito sazonal da contaminação por aflatoxinas B₁ e M₁ em propriedades
leiteiras na região Sul do Rio Grande do Sul, Brasil**

Cristina Hallal de Freitas

Pelotas, 2020

Cristina Hallal de Freitas

**Efeito sazonal da contaminação por aflatoxinas B₁ e M₁ em propriedades
leiteiras na região Sul do Rio Grande do Sul, Brasil**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia e Parasitologia do Instituto de Biologia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Ciências Biológicas.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Patrícia da Silva Nascente

Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Giniani Carla Dors

Pelotas, 2020

Cristina Hallal de Freitas

Efeito sazonal da contaminação por aflatoxinas B₁ e M₁ em propriedades
leiteiras na região Sul do Rio Grande do Sul, Brasil

Tese aprovada, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em
Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia e Parasito-
logia, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas.

Data da defesa: 21 de fevereiro de 2020.

Banca Examinadora:

Prof.^a Dr.^a Giniani Carla Dors (Coorientadora)
Doutora em Engenharia e Ciência de Alimentos pela Universidade Federal do
Rio Grande

Prof.^a Dr.^a Helenice Gonzáles de Lima
Doutora em Zootecnia pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Dr.^a Luiza da Gama Osório
Doutora em Ciências Veterinárias pela Universidade Federal do Rio Grande do
Sul

Prof. Dr.^o Mário Carlos Araújo Meireles
Doutor em Microbiologia e Imunologia pela Universidade Federal de São Paulo

Dr.^a Priscila Tessmer Scaglioni
Doutora em Engenharia e Ciência de Alimentos pela Universidade Federal do
Rio Grande

AGRADECIMENTOS

Felizmente, não percorri esse caminho sozinha. Portanto, gostaria de agradecer a todos aqueles que estiveram comigo e tornaram possível a realização desse trabalho:

À minha mãe, Miriam, que correu a vida inteira para que eu pudesse caminhar tranquilamente em direção aos meus objetivos. Essa conquista é nossa!

À minha irmã, Carolina, que sempre esteve presente ao longo da minha vida, me apoiando, incentivando e acreditando em mim;

À minha orientadora Patrícia, por mais essa oportunidade, pela confiança de sempre, pela disponibilidade a qualquer hora e em qualquer lugar e, acima de tudo, pela cumplicidade na realização desse projeto;

À minha coorientadora Gini, por compartilhar conosco o seu conhecimento e experiência. A tua colaboração foi fundamental!

Aos meus colegas e amigos do Lab Mico, Carol e Pedro. Se não fosse vocês, o caminho até aqui não teria deixado tanta saudade;

Às estagiárias do Laboratório, Camila Madruga, Camila Quintana e Amanda, a ajuda de vocês foi muito importante para conclusão desse trabalho;

À professora Eliana Badiale-Furlong, por me receber de braços abertos no LAMCA (FURG), pelo interesse e disponibilidade para me ajudar e pelos ensinamentos que a mim concedeu. Muitíssimo obrigada!

À minha amiga Karen, que sempre esteve ao meu lado me auxiliando durante as minhas idas à FURG e me divertindo entre uma corrida e outra do cromatógrafo;

Aos demais integrantes do LAMCA (FURG), obrigada por fazerem eu me sentir “em casa”, isso foi muito importante para mim;

À Priscila, minha amiga desde os primórdios da graduação e que se tornou um exemplo de profissional para mim, obrigada por me acompanhar em mais essa trajetória; saber que tenho a ti para recorrer é essencial na minha vida!

Aos queridos professores do PPG em Microbiologia e Parasitologia, pela dedicação e doação intensa para repartir seus conhecimentos e experiências; realmente, ensinar é uma vocação de todos vocês!

Aos colegas da Pós, pela parceira nas disciplinas e por compartilharem tantos momentos, seminários, mates, materiais, dúvidas e experiências;

Às minhas colegas e amigas da Sétima Coordenadoria Regional de Saúde, Amanda, Baresi, Carla, Débora, Lisi e Rafa, pela compreensão nos meus momentos de ausência e por serem minhas doses diárias de alegria!

Aos membros da banca, pela solicitude em colaborar com o meu trabalho, muito obrigada!

Resumo

FREITAS, Cristina Hallal. **Efeito sazonal da contaminação por aflatoxinas B₁ e M₁ em propriedades leiteiras na região Sul do Rio Grande do Sul, Brasil**. 2020. 92f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Programa de Pós-Graduação em Microbiologia e Parasitologia, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2020.

Aflatoxinas são substâncias tóxicas produzidas pelo metabolismo secundário de algumas espécies fúngicas como *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus* e *A. nomius*, que contaminam produtos agrícolas bastante utilizados na alimentação humana e animal. Entre esses contaminantes estão as aflatoxinas B₁ (AFB₁), B₂ (AFB₂), G₁ (AFG₁) e G₂ (AFG₂). A aflatoxina M₁ (AFM₁) é um metabólito hidroxilado da AFB₁ e pode ser encontrada no leite proveniente de animais que ingeriram ração contaminada com AFB₁, tornando-se um risco para saúde humana uma vez que apresenta propriedades mutagênicas, teratogênicas e cancerígenas. O objetivo do trabalho foi avaliar a presença de AFB₁, AFB₂, AFG₁ e AFG₂ em amostras de ração para animais produtores de leite e de AFB₁ e AFM₁ em leite cru, analisando o efeito sazonal, além de estimar a exposição humana à aflatoxinas de acordo com a estimativa da ingestão diária através do leite. As amostras de rações foram coletadas em uma propriedade leiteira localizada na região Sul do Rio Grande do Sul, Brasil, em quatro ocasiões referentes às diferentes estações do ano. Em cada uma, amostras de leite foram coletadas individualmente de cada animal, totalizando 73 amostras (inverno, n= 15; primavera, n= 20; verão n= 16; outono, n= 22). Em outras propriedades, também localizadas na região Sul do RS, amostras de leite cru foram coletadas do tanque de refrigeração (n= 23). As amostras de rações foram encaminhadas para o Instituto SAMITEC (Soluções Analíticas, Microbiológicas e Tecnológicas) para análise da ocorrência de AFB₁, AFB₂, AFG₁ e AFG₂ por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas. As micotoxinas do leite foram extraídas pelo método de QuEChERS e quantificadas por cromatografia líquida de alta eficiência com detector de fluorescência. A partir dos dados de contaminação por aflatoxinas nas amostras de leite obtidas nesse trabalho, foi avaliada a exposição da população através da ingestão do leite. A AFB₁ foi encontrada nas rações coletadas no verão, outono e inverno, em níveis iguais a 1,0, 1,0 e 1,6 µg kg⁻¹, respectivamente, e as demais aflatoxinas não foram detectadas. Na amostra referente a primavera, não havia contaminação. Aproximadamente 95% das amostras de leite (individual e tanque) estavam contaminadas com AFM₁, em níveis que variaram de 0,2 a 1,47 µg L⁻¹, ultrapassando o limite legislado no Brasil para presença dessa aflatoxina no leite (0,5 µg kg⁻¹). A maior média de contaminação por AFM₁ das amostras de leite coletadas individualmente de cada animal foi encontrada no inverno (1,0 µg L⁻¹), enquanto que a concentração média nas demais estações foi em torno de 0,5 µg L⁻¹. AFB₁ foi encontrada em 6% (n= 6) do total de amostras de leite, em concentrações que variaram de 0,09 a 0,37 µg L⁻¹. Com base no nível médio de contaminação por AFM₁ das amostras coletadas dos tanques de refrigeração (0,63 µg L⁻¹), a estimativa da ingestão diária dessa toxina foi de 3,0 e 10,0 ng/pessoa para adultos e crianças, respectivamente. Esses resultados atentam para o risco à saúde relacionado ao leite, principalmente em relação às crianças, que consomem

grande quantidade desse produto e apresentam maior suscetibilidade à contaminações, destacando-se, assim, a importância do controle da contaminação dos produtos agrícolas destinados à alimentação animal por fungos toxigênicos a fim de evitar a produção de aflatoxinas.

Palavras-chave: Produtos agrícolas. Leite cru. Sazonalidade. Saúde pública. Exposição da população.

Abstract

FREITAS, Cristina Hallal. **Seasonal Effect of Contamination by Aflatoxins B₁ and M₁ on Dairy Farms in Southern Rio Grande do Sul, Brazil**. 2020. 92p. Doctoral dissertation (Doctoral Program in Biological Sciences) – Post-graduate Program in Microbiology and Parasitology, Biology School, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, Brazil, 2020.

Aflatoxins are toxic compounds which are yielded by the secondary metabolism of some fungal species, such as *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus* and *A. nomius*, that contaminate agricultural products which are widely used for human and animal consumption. Aflatoxins B₁ (AFB₁), B₂ (AFB₂), G₁ (AFG₁) and G₂ (AFG₂) are some of the contaminants. Aflatoxin M₁ (AFM₁), which is a hydroxylated metabolite of AFB₁, can be found in milk produced by dairy cows that have eaten feed contaminated with the latter. It poses risks to human health since it has mutagenic, teratogenic and carcinogenic properties. This study aimed at evaluating AFB₁, AFB₂, AFG₁ and AFG₂ in samples of feed eaten by dairy cows, besides AFB₁ and AFM₁ in samples of raw milk; the seasonal effect was analyzed and the estimate of human exposure to aflatoxin was based on estimates of daily intake in milk. Feed samples were collected on a dairy farm located in the south of Rio Grande do Sul (RS) state, Brazil, in four occasions that referred to the seasons of the year, when milk samples were collected from every cow. Seventy-three samples were collected (winter, n= 15; spring, n= 20; summer n= 16; fall, n= 22). Raw milk samples were collected in cold storage tanks (n= 23) on other farms which are also located in the south of RS. Feed samples were taken to the SAMITEC Institute (Analytical, Microbiological and Technological Solutions) so as to have AFB₁, AFB₂, AFG₁ and AFG₂ analyzed by Liquid Chromatography coupled with Mass Spectrometry. Mycotoxins were extracted from milk by the QuEChERS method and quantified by High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) with fluorescence detection. Resulting data on contamination by aflatoxins in milk samples led to the evaluation of population exposure as the result of milk intake. AFB₁ levels were found in feed collected in summer, fall and winter, at 1.0, 1.0 and 1.6 µg kg⁻¹, respectively, while the other aflatoxins were not detected. There was no contamination in the sample collected in spring. About 95% of milk samples (individual and tanks) were contaminated by AFM₁ in the range from 0.2 to 1.47 µg L⁻¹, which is above the limit of aflatoxin in milk issued by the Brazilian legislation (0.5 µg kg⁻¹). The highest mean of contamination by AFM₁ in milk samples collected individually from every cow was found in winter (1.0 µg L⁻¹), while mean concentration in the other seasons was around 0.5 µg L⁻¹. AFB₁ was found in 6% (n= 6) of milk samples at concentrations that ranged from 0.09 to 0.37 µg L⁻¹. Based on the mean level of contamination by AFM₁ of samples collected in cold storage tanks (0.63 µg L⁻¹), estimates of its daily intake were 3.0 ng/adult and 10.0 ng/child. These results have called people's attention to risks caused to health by milk, mainly to children, since they consume high amounts of this product and are more susceptible to contamination. Thus, the importance of controlling contamination by toxigenic fungi of agricultural products aimed at animal feed should be highlighted in order to avoid aflatoxin production.

Key words: Agricultural products. Raw milk. Seasonality. Public health. Population exposure.

Lista de Figuras

Figura 1. Estrutura química das aflatoxinas B ₁ , B ₂ , G ₁ , G ₂ , M ₁ e M ₂	22
---	----

Lista de Tabelas

Tabela 1. Composição média do leite de vaca.....	15
Tabela 2. Características físico-químicas das principais aflatoxinas.....	21
Tabela 3. Taxa de conversão de AFB ₁ em AFM ₁	26
Tabela 4. Legislação Brasileira e Internacional para AFM ₁ em leite fluído.....	28

ARTIGO II

Tabela 1. Contaminação por aflatoxinas em amostras de ração e de leite provenientes de propriedade leiteira do RS.....	54
Tabela 2. Contaminação das amostras de leite por AFM ₁ e AFB ₁ , nas quatro estações do ano.....	57

ARTIGO III

Tabela 1. Parâmetros analíticos do método de determinação das aflatoxinas.....	69
Tabela 2. Contaminação das amostras de leite por AFM ₁ e estimativa da ingestão diária da toxina pela população.....	70
Tabela 3. Contaminação das amostras de leite por AFM ₁	71

Sumário

1 Introdução	12
2 Objetivos	14
2.1 Objetivo geral	14
2.2 Objetivos específicos	14
3 Revisão Bibliográfica	15
3.1 Leite: aspectos gerais	15
3.2 Micotoxinas	18
3.2.1 Aflatoxinas	20
3.2.1.1 AFB ₁ na alimentação animal	22
3.2.1.2 Metabolismo das aflatoxinas e biotransformação de AFB ₁ em AFM ₁	25
3.2.1.3 Aflatoxinas em leite	27
3.2.1.4 Métodos analíticos para determinação de aflatoxinas	30
ARTIGO I - Aflatoxins B₁ and M₁: risks related to milk produced in Brazil	32
ARTIGO II - Determinação sazonal de aflatoxinas em propriedade leiteira no Rio Grande do Sul, Brasil	42
Resumo	43
Abstract	44
1 Introdução	45
2 Material e Método	46
2.1 Coleta das amostras	46
2.2 Reagentes e padrões	47
2.3 Determinação de AFB ₁ , AFB ₂ , AFG ₁ e AFG ₂ nas rações	47
2.4 Extração da AFM ₁ e AFB ₁ do leite	47
2.5 Quantificação da AFM ₁ e AFB ₁ no leite	48
2.6 Análise estatística	49
3 Resultados e discussão	49
4 Conclusão	58
5 Referências	58
ARTIGO III - Análise da exposição da população à aflatoxina M₁ pelo leite produzido no Sul do Rio Grande do Sul, Brasil	62

Resumo.....	63
Abstract.....	64
1 Introdução.....	65
2 Material e Métodos.....	66
2.1 Coleta das amostras de leite.....	66
2.2 Reagentes e padrões.....	66
2.3 Extração das aflatoxinas.....	67
2.4 Quantificação das aflatoxinas.....	68
2.5 Análise da exposição da população às aflatoxinas.....	69
3 Resultados e Discussão	69
4 Conclusão.....	73
5 Referências.....	74
4 Conclusão.....	77
Referências.....	78

1 Introdução

O leite é um alimento de grande valor nutritivo, que fornece macro e micronutrientes importantes para o crescimento, desenvolvimento e manutenção da saúde humana. Porém, pode ser o agente causador de diversas alterações fisiológicas nos indivíduos que o consomem, principalmente por ser veículo de contaminantes alimentares (KWIATKOWSKI; ALVES, 2007). Dentre esses, os fungos filamentosos provenientes da contaminação dos produtos agrícolas destinados à alimentação animal, destacam-se por produzirem metabólitos tóxicos que oferecem riscos para saúde humana, especialmente para crianças e bebês, uma vez que esses são mais suscetíveis aos efeitos tóxicos de contaminantes (SANTILI et al., 2015).

Micotoxinas são substâncias tóxicas resultantes do metabolismo secundário de diversas linhagens de fungos filamentosos. São de ocorrência universal, porém predominam em climas tropicais e subtropicais onde o desenvolvimento fúngico é favorecido pelas condições ambientais (LILLEJOH, 1991). A contaminação dos produtos por essas micotoxinas pode ocorrer praticamente em todas as fases de sua obtenção, desde a contaminação no campo, durante a colheita, no transporte e até no armazenamento (PITTET, 1998). Os principais produtos associados a contaminação por fungos e produção de micotoxinas são grãos armazenados e rações para alimentação animal, especialmente milho, silagem, semente de algodão, amendoim e soja (IAMANAKA et al, 2010).

As micotoxinas de maior importância em alimentos e rações são as aflatoxinas (AFB₁, AFB₂, AFG₁ e AFG₂), produzidas por espécies do gênero *Aspergillus*, principalmente *A. flavus*, *A. nomius* e *A. parasiticus* (CREPPY, 2002; MOSS, 2002). As aflatoxinas podem causar sérios danos aos seres humanos e animais devido a sua alta toxidez e ampla ocorrência, possuindo propriedades carcinogênicas, mutagênicas, teratogênicas (SYLOS; RODRIGUEZ-AMAYA, 1996) e imunossupressoras (NORDIN; LUCHESE, 1998). Quando os animais ingerem alimentos contaminados, as aflatoxinas são metabolizadas, biotrans-

formadas e transferidas para os produtos, como o leite, tornando-se, consequentemente, um risco para a saúde humana (BRUERTON, 2001).

A aflatoxina M₁ (AFM₁) é um metabólito hidroxilado da aflatoxina B₁ (AFB₁) e pode ser encontrada em leite e seus derivados provenientes de animais que ingeriram ração contaminada com AFB₁ (CREPPY, 2002). Apesar da maioria dos relatos disponíveis na literatura indicarem que a AFB₁ é completamente convertida em AFM₁, já foi demonstrado que esta conversão pode não ser completa (SCAGLIONI et al., 2014; GONÇALVES et al., 2018), o que vem a justificar o interesse da verificação também de ocorrência da AFB₁, uma vez que sua toxicidade é maior que a da AFM₁ (HUSSEIN; BRASEL, 2001; ZAIN, 2011).

O Brasil é um grande produtor de commodities, no entanto, as condições climáticas de algumas regiões do país facilitam o desenvolvimento de espécies de fungos toxigênicos, que é favorecido por fatores como umidade e temperatura elevados (LILLEJOH, 1991), possibilitando, assim, a produção de micotoxinas. Ocupando a quinta colocação entre os principais países produtores de leite de vaca do mundo, com uma produção de aproximadamente 34 bilhões de litros em 2108 (IBGE, 2019), a presença de aflatoxinas no leite produzido no Brasil causa preocupação devido ao elevado potencial tóxico dessas substâncias.

Dessa forma, pesquisas sobre a ocorrência de aflatoxinas em leite produzido no Brasil a fim de avaliar a concordância dos níveis de contaminação com a legislação vigente, determinada pela Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) nº7 de 2011, que estabelece que o valor máximo de AFM₁ no leite fluído deve ser 0,5 µg L⁻¹, tornam-se muito importantes.

2 Objetivos

2.1 Objetivo geral

Verificar a ocorrência de aflatoxinas em amostras de ração e de leite cru provenientes de propriedades localizadas na Região Sul do Rio Grande do Sul, Brasil.

2.2 Objetivos específicos

- Coletar e compilar informações presentes na literatura sobre a ocorrência de AFB₁ e AFM₁ no leite produzido no Brasil;
- Verificar a ocorrência de AFB₁, AFB₂, AFG₁ e AFG₂ em amostras de rações animais, nas diferentes estações do ano;
- Verificar a ocorrência de AFB₁ e AFM₁ em amostras de leite cru coletadas individualmente nas diferentes estações do ano, bem como de tanques de refrigeração;
- Relacionar a contaminação da ração por AFB₁ com a ocorrência de AFB₁ e AFM₁ no leite;
- Estimar o risco da exposição humana à contaminação por aflatoxinas através da avaliação de ingestão diária para indivíduos da região Sul do RS.

3 Revisão Bibliográfica

3.1 Leite: aspectos gerais

De acordo com a Instrução Normativa nº 62 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2011) *"entende-se por leite, sem outra especificação, o produto oriundo da ordenha completa e ininterrupta, em condições de higiene, de vacas sadias, bem alimentadas e descansadas. O leite de outros animais deve denominar-se segundo a espécie de que proceda"*.

O leite é uma emulsão de cor branca, obtida em circunstâncias naturais, de odor suave e sabor adocicado, e sua ingestão é indispensável nos primeiros meses de vida dos mamíferos (ALBUQUERQUE, 1997). Este é um dos alimentos mais completos para o ser humano, contendo grande variedade de proteínas e minerais. A tabela 1 apresenta a composição química média do leite de vaca.

Tabela 1. Composição centesimal média do leite de vaca

Componente	Composição (%)
Água	87,5
Lactose	4,6
Proteínas	3,3
Gordura	3,9
Minerais	0,8

Fonte: Goff (2014) *apud* EMBRAPA (2014).

A água é o elemento que se apresenta em maior proporção no leite, seguida da lactose, proteínas, gordura e sais minerais. Essa composição varia conforme a espécie do animal, raça, tipo de alimentação, período de gestação, intervalos entre ordenhas, estresse ou ação de medicamentos (FERREIRA, 2007).

A principal função da gordura no leite é fornecer energia. O acetato e o butirato estão entre os ácidos graxos voláteis produzidos pela fermentação ruminal, são absorvidos pela corrente sanguínea e na glândula mamária servem como precursores na síntese de gordura do leite (SANTOS; FONSECA, 2019).

A função básica das proteínas do leite é fornecer os aminoácidos essenciais e outras proteínas bioativas, como os anticorpos, aos recém-nascidos (SANTOS; FONSECA, 2007). As proteínas do leite podem ser caracterizadas em duas grandes classes: as caseínas (também chamadas de “proteína verdadeira do leite”) e as proteínas do soro (FERREIRA, 2007). A caseína é um dos componentes mais abundantes dessa composição, é formada por aminoácidos essenciais para o crescimento dos animais jovens. Essa proteína de alta qualidade é uma das razões pelas quais o leite é tão importante na alimentação humana (GONZÁLEZ, 2001). As proteínas do soro (β -lactoglobulina, α -lactalbumina, imunoglobulinas e albumina bovina sérica) são consideradas de alta qualidade nutricional e possuem propriedades funcionais, apresentando atividade imunomoduladora, antimicrobiana e antiviral e proteção ao sistema cardiovascular (FERREIRA, 2019).

A lactose é o principal carboidrato do leite e um dos principais determinantes de seu volume, representando um importante papel na regulação da pressão osmótica, pois controla a entrada de água para o interior das células epiteliais mamárias durante a síntese do leite (RODRIGUES et al., 2012). Dessa forma, quando ocorre uma redução da concentração de lactose, como em casos de mastite, ocorre uma compensação com aumento da concentração de minerais solúveis (SANTOS; FONSECA, 2007).

O leite é a melhor fonte de cálcio para o organismo, contendo 119 mg por 100 g de leite fluído, mineral que apresenta importância na formação de ossos e dentes, na coagulação sanguínea e na regulação dos batimentos cardíacos. Sua carência provoca o raquitismo, ocasionando fraturas ósseas com maior facilidade. Também possui elevado teor de fósforo, cerca de 960 mg L⁻¹, que também ajuda na formação dos ossos. Dois copos diários de leite (400mL) atendem a quase toda a recomendação, por exemplo, de manganês, nutriente importante no aproveitamento das gorduras e no funcionamento do cérebro (EMBRAPA, 2011).

A produção brasileira de leite, em 2018, foi de 33,8 bilhões de litros, 1,6% maior em relação ao ano anterior. A maior produção foi verificada na região Sul, com volume de 11,6 bilhões de litros por ano, responsável por 34,2% da produção nacional. A segunda região mais importante na produção do leite foi a Sudeste, com volume de 11,5 bilhões de litros e aumento de 0,5% em relação a 2017 (IBGE, 2018).

No mercado, estão disponíveis para consumo leites diferenciados e definidos de acordo com o processo térmico ao qual são submetidos, podendo ser classificados como, leite pasteurizado, leite ultra alta temperatura (UAT) e leite em pó. Quanto ao consumo de leites processados, destacam-se o leite UAT, tendo em vista a sua praticidade de conservação e uso e também seu longo período de vida comercial (MARTINS et al., 2008).

O leite pasteurizado é definido como o leite submetido à pasteurização a temperaturas de 72 a 75 °C durante 15 a 20 s, seguido de refrigeração a temperatura inferior a 4°C (BRASIL, 2011). O leite UAT é definido como o leite homogeneizado que foi submetido, durante 2 a 4 s, a uma temperatura de 130 °C, mediante um processo térmico de fluxo contínuo, imediatamente resfriado a uma temperatura inferior a 32 °C e envasado sob condições assépticas em embalagens estéreis e hermeticamente fechadas (BRASIL, 1997). Quando o leite for destinado a produção de derivados lácteos, pode ser adotada a pasteurização lenta, na qual são utilizadas temperaturas entre 63 ° e 65 °C durante 30 min (VIDAL, 2018).

O leite é classificado, ainda, de acordo com seus teores de gordura, como integral (mínimo 3,0 g 100 g⁻¹), semidesnatado (0,6 a 2,9 g 100 g⁻¹) e desnatado (máximo 0,5 g 100 g⁻¹) (MAPA, 2018). A indústria de laticínio também tem potencializado o valor nutritivo dos seus produtos, produzindo uma série de bebidas lácteas enriquecidas com vitaminas e minerais, assim como leites especiais para as pessoas que não conseguem digerir a lactose (EMBRAPA, 2002).

Apesar dos benefícios que esse alimento oferece, devido ao seu elevado valor nutritivo, o leite pode ser o agente causador de diversas alterações fisiológicas nos indivíduos que o consomem, principalmente por ser veículo de contaminantes ambientais e alimentares (KWIATKOWSKI; ALVES, 2007), como as micotoxinas. Esses metabólitos geram um desafio para as indústrias de processamento de leite, uma vez que são estáveis aos tratamentos tecnológicos aos quais a matéria-prima é submetida e permanecem nos leites fluidos e derivados.

No Brasil, apesar do desenvolvimento tecnológico atingido em certos laticínios, persistem, ainda, em nível de produção de leite, graves problemas que depreciam a matéria-prima e impedem seu beneficiamento ou tornam o produto beneficiado impróprio para o consumo humano, mesmo nas regiões onde a pecuária leiteira é tradicional. A presença de altos níveis de contaminação por micro-organismos e suas toxinas constituem uma causa frequente de problemas em relação à saúde dos consumidores, além de causarem grandes perdas econômicas (ARAÚJO et al., 2013).

3.2 Micotoxinas

A era de pesquisas sobre micotoxinas teve início na década de 60, como consequência direta de um surto em perus ocorrida na Inglaterra, tendo sido denominada de “Enfermidade X dos Perus”. Estudos epidemiológicos revelaram que a síndrome estava relacionada com a farinha de amendoim contida na ração das aves. Um ano depois se instituiu que o *Aspergillus flavus* era o fungo responsável por tal enfermidade, tendo sido denominadas aflatoxinas os seus metabólitos secundários responsáveis pelo quadro tóxico do surto (SPENS-

LEY, 1963). Devido a esse fato, nesta época foram iniciadas várias pesquisas em alimentos visando à detecção de fungos toxigênicos, e o período entre 1960 e 1975 foi denominado “*The mycotoxin gold rush*”, devido a grande quantidade de cientistas que se uniram em uma pesquisa sobre estes metabólitos (BENNET; KLICH, 2003).

As micotoxinas são substâncias sintetizadas sob determinadas condições durante a multiplicação dos fungos. Algumas delas permanecem restritas ao micélio fúngico, enquanto que a maior parte é secretada no substrato. Estes metabólitos constituem um grupo toxicológico e quimicamente bastante heterogêneo, sendo agrupados por apresentarem uma origem comum e pelo fato de poderem causar doença e morte em seres humanos e animais (BENNET; KLICH, 2003).

Os efeitos tóxicos mais importantes das micotoxinas relacionam-se ao desencadeamento de diversos tipos de tumores e supressão imune (IARC, 1993). Ao serem ingeridas podem se fixar aos tecidos, apesar da maior parte ser metabolizada e eliminada através de fluidos biológicos. Uma característica importante é sua capacidade de afetar órgãos específicos sem provocar alterações evidentes nos demais, e cuja gravidade depende da toxidez da micotoxina, do nível de exposição, idade, sexo, estado nutricional e dos possíveis efeitos sinérgicos com outros compostos químicos (PERAICA et al., 1999).

As doenças causadas pela ingestão de micotoxinas, denominadas micotoxicoses, podem ser categorizadas como agudas ou crônicas. A toxidez aguda apresenta um rápido aparecimento de sintomas e uma pronta resposta a exposição a toxina, enquanto que a toxidez crônica é caracterizada por uma exposição a baixas dosagens durante um longo período de tempo, resultando em tumores e outros efeitos que, de maneira geral, são irreversíveis. As principais desordens causadas por micotoxinas estão relacionadas a exposições crônicas (indução tumoral e imunossupressão); entretanto, os episódios dos quais se têm melhor conhecimento micotoxicológico foram desencadeados devido a exposições agudas, como a doença X dos perus e o ergotismo humano (IARC, 1993).

As micotoxinas mais estudadas, em virtude dos danos que causam à saúde humana ou animal e pelas perdas econômicas que desencadeiam na indústria de produção, tanto vegetal quanto animal, são as fusariotoxinas, ocratoxinas e aflatoxinas (IAMANAKA; OLIVEIRA; TANIWAKI, 2010).

3.2.1 Aflatoxinas

As aflatoxinas constituem um grupo de aproximadamente 20 substâncias que são metabólitos secundários de fungos toxigênicos, principalmente *Aspergillus flavus*, *A. nomius* e *A. parasiticus* (CREPPY, 2002; MOSS, 2002). No entanto, apesar da sua diversidade, as aflatoxinas frequentemente encontradas em alimentos são apenas de quatro tipos: B₁, B₂, G₁ e G₂ (MASSEY et al., 1995).

A produção de aflatoxinas é resultado da interação entre fungo, hospedeiro e meio ambiente, fatores que determinam o grau de colonização, o tipo e a quantidade de micotoxinas que serão produzidas (GOURAMA; BULLERMAN, 1995). O desenvolvimento de fungos aflatoxigênicos é influenciado, entre outros fatores, pela atividade de água, temperatura, grãos quebrados, aeração, inóculo fúngico, interações microbianas e presença de insetos. O controle de umidade é fator de elevada importância para evitar o acúmulo de toxinas em grãos armazenados e sementes oleaginosas. Se o produto tiver baixa atividade de água e for armazenado em condições de baixa umidade relativa, provavelmente não ocorrerá desenvolvimento de fungos e conseqüentemente de toxinas (CAST, 2003).

A temperatura ótima para a produção de aflatoxinas é entre 28 °C e 30 °C, diferindo dos 36 a 38 °C necessários para a multiplicação do microorganismo, com sua produção diminuindo com temperaturas próximas de 37 °C. O nível de produção de aflatoxinas sofre grande influência da atividade de água e do pH. A atividade de água ótima para a produção de aflatoxinas é de aproximadamente 0,99, com o mínimo em torno de 0,80 - 0,83. As aflatoxinas são produzidas em grande quantidade com altas atividades de água (0,98 - 0,99) e sofrem uma drástica redução com atividades de água próximas de 0,85. *A. flavus* e *A. parasiticus* podem crescer com pH variando de 2,0 até 10, e a

produção de aflatoxinas por *A. parasiticus* se dá em pH entre 3,0 e 8,0, com pH ótimo próximo de 6,0 (PITT; HOCKING, 1997). Em relação a composição do substrato, açúcares simples como glicose, sacarose e maltose promovem a produção de aflatoxinas, enquanto peptona ou lactose não promovem a produção (GUO et al., 2008). As quatro principais aflatoxinas são divididas nos grupos B e G, que se referem às suas propriedades de fluorescência. Sob luz ultravioleta de ondas longas as AFB₁ e AFB₂ apresentam fluorescência azul e as AFG₁ e AFG₂ apresentam fluorescência verde. Os números 1 e 2 designam a mobilidade cromatográfica ou fator de retenção (R_f) dos compostos em placas de cromatografia em camada delgada (GOURAMA; BULLERMAN, 1995; BRAGA; CARDOSO; MACÊDO, 2002). Na tabela 2 apresentam-se as principais características físicas e químicas das principais aflatoxinas.

Tabela 2. Principais características físico-químicas das principais aflatoxinas.

Aflatoxina	Fórmula Química	Massa Molecular (MM)	Cor emitida sob luz UV
AFB ₁	C ₁₇ H ₁₂ O ₆	312	Azul
AFB ₂	C ₁₇ H ₁₄ O ₆	314	Azul
AFG ₁	C ₁₇ H ₁₂ O ₇	328	Verde
AFG ₂	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	330	Verde
AFM ₁	C ₁₇ H ₁₂ O ₇	328	Violeta azulada
AFM ₂	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	330	Violeta

Fonte: Adaptado Opas, 1983.

Quimicamente, as aflatoxinas apresentam estruturas intimamente relacionadas entre si (Figura 1), formando um grupo único de compostos heterocíclicos altamente oxigenados (furocumarinas complexas). As aflatoxinas apresentam um núcleo central cumarínico ligado a uma estrutura bi-furanóide, as do grupo B apresentam anel ciclopentanona, as do grupo G apresentam anel lactona na molécula e as do grupo M consistem em derivados hidroxilados do primeiro grupo. As aflatoxinas do grupo 1 diferem das do grupo 2 por possuírem uma dupla ligação no carbono terminal do anel diidrofurano (YOUSSEF; MARTIN, 1985).

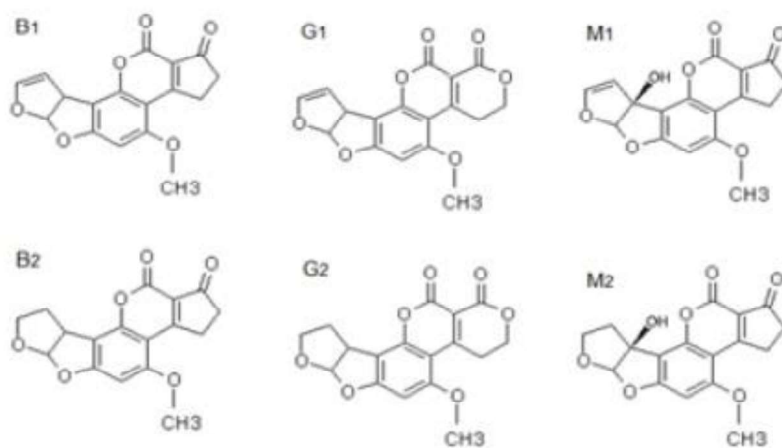


Figura 1. Estrutura química das aflatoxinas B₁, B₂, G₁, G₂, M₁ e M₂.
Fonte: Biehl e Buck (1987).

As aflatoxinas têm elevado ponto de fusão, sendo portanto estáveis ao calor, o que gera um grande desafio para as indústrias de alimentos e rações. Essas substâncias são decompostas a temperaturas de cerca de 220 °C (SCUSSEL, 1984), valor de temperatura inviável para o processamento de alimentos e rações. Desta forma, pequena ou nenhuma destruição de aflatoxinas ocorre sob condições normais de cozimento ou aquecimento durante a pasteurização (VAN EGMOND, 1989; GALVANO et al., 1996).

Entre as aflatoxinas, a AFB₁ é considerada a mais importante devido ao seu elevado potencial tóxico, sendo um potente hepatocarcinógeno conhecido em espécies animais e humanos, classificada no grupo 1 pela *International Agency for Research on Câncer*, ou seja, carcinogênica para humanos (IARC 2002). A AFM₁ possui elevada atividade genotóxica, embora seja aproximadamente dez vezes menos carcinogênica que a AFB₁, é classificada como 2B, possivelmente carcinogênica para humanos (IARC 2002), tendo a Organização Mundial de Saúde recomendado a redução dos níveis permitidos de AFM₁ ao mínimo em leite e derivados, de modo a minimizar o risco potencial que representa (LÓPEZ et al., 2001).

3.2.1.1 AFB₁ na alimentação animal

Vários produtos agrícolas utilizados na formulação de rações, tais como milho, trigo, soja e farelo de algodão, constituem substratos suscetíveis ao desenvolvimento de fungos toxigênicos e, conseqüentemente, estão sujeitos a

contaminação por aflatoxinas. De acordo com a Portaria do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento nº 7, de 18 de fevereiro de 2011, o valor máximo permitido para a soma das aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂ nas matérias-primas para composição de rações animais é 50 µg kg⁻¹ e 20 µg kg⁻¹ para amendoim e grãos de milho (BRASIL, 2011). No entanto, mesmo com uma legislação específica, o controle das matérias-primas não é devidamente realizado, tendo em vista que vários trabalhos têm demonstrado a ocorrência de AFB₁ em alimentos destinados ao consumo animal em níveis acima do permitido pela legislação no Brasil (OLIVEIRA et al., 2016; NEGRI FILHO et al., 2017).

Os alimentos que são fornecidos aos animais são produzidos nas próprias propriedades ou obtidos de indústrias produtoras de rações. Em ambos os casos, as matérias-primas podem ser armazenados em condições inapropriadas, principalmente em relação a temperatura e umidade, o que prejudica a qualidade desses produtos. A exigência de rações com baixo custo de produção faz com que, muitas vezes, o controle da produção de micotoxinas seja pequeno ou inexistente, devido ao custo que a realização desta análise agrega ao produto final (NEGRI FILHO et al., 2017).

Motta et al. (2015) analisaram 288 amostras de dieta completa (volumoso + concentrado, v/v) fornecidas aos animais de cinco fazendas produtoras de leite no estado de São Paulo, Brasil, sendo o volumoso ofertado às vacas constituído de silagem de milho, sorgo e cevada úmida e o concentrado de grãos de milho, farelo de soja e caroço de algodão e mistura mineral. Foi detectada a presença de AFB₁ em 31,4% das amostras, em teores que variaram de 1,68 a 194,51 µg kg⁻¹.

Gonçalez et al. (2004) verificaram a presença de AFB₁, AFB₂, AFG₁ e AFG₂ no farelo de algodão utilizado como complemento na alimentação de vacas lactantes, e a concentração total de aflatoxinas encontrada foi de 76,4 ng g⁻¹, correspondente a 43,5 ng g⁻¹ de AFB₁; 15,2 ng g⁻¹ de AFB₂; 9,1 ng g⁻¹ de AFG₁ e 8,6 ng g⁻¹ de AFG₂, acima do permitido pela legislação vigente. O leite das 27 vacas alimentadas por este farelo de algodão apresentou contaminação por AFM₁ em concentrações superiores a 0,5 ng mL⁻¹, demonstrando estar acima do permitido pela legislação. Além da contaminação do leite, essas ele-

vadas concentrações tiveram como consequência a queda da produção de leite de 14 L/dia para 11 L/dia durante os seis meses em que foi utilizado como complemento.

O milho é o principal ingrediente utilizado na formulação de rações destinadas à alimentação de vacas leiteiras, em razão do seu alto valor nutricional. Segundo o levantamento do USDA (United States Department of Agriculture) para a safra mundial de milho 2018/2019, o Brasil está na terceira colocação entre os países produtores deste cereal (101,0 milhões de toneladas). Quanto ao consumo, o Brasil ocupa o 4º lugar, com 66,7 milhões de toneladas, sendo que a diferença entre produção e consumo é destinada para exportação. Contudo, a riqueza nutricional do milho também o torna um substrato adequado para o desenvolvimento de micro-organismos indesejáveis, capaz de gerar riscos oriundos de metabólitos secundários e tóxicos produzidos pelos fungos da microbiota do cereal (SCAGLIONI et al., 2017).

Oliveira et al. (2016), analisaram um total de 148 amostras de milho de fazendas leiteiras localizadas no Rio Grande do Sul (n=51), Santa Catarina (n=40) e Paraná (n=57). A AFB₁ estava presente em amostras de milho de todos os Estados, sendo que em Santa Catarina foram encontrados os maiores níveis de contaminação, equivalentes a 50 µg kg⁻¹. Apesar da frequência de contaminação não ter sido elevada (Santa Catarina, 10%; Rio grande do Sul, 45%; Paraná, 19,2%) a constatação de níveis acima do limite máximo legislado é importante, uma vez que amostras de milho podem ser misturadas, produzindo um produto final de baixa qualidade.

Segundo Newman (2000), a presença de aflatoxinas em rações destinadas a alimentação de vacas leiteiras resulta em perdas econômicas significativas para os criadores, uma vez que afeta a saúde dos animais, podendo causar danos no fígado, diminuir o desempenho reprodutivo e as funções imunológicas e, conseqüentemente, reduzir a produtividade de leite.

Boas práticas agrícolas, de transporte, de manufatura e de armazenamento continuam sendo as melhores formas de prevenir a contaminação de rações por aflatoxinas e, conseqüentemente, a contaminação do leite. Assim,

estratégias e instrumentos legais são necessários na agricultura e na indústria de alimentos para assegurar a qualidade de produtos de origem animal (GONÇALEZ et al., 2004).

3.2.1.2 Metabolismo das aflatoxinas e biotransformação de AFB₁ em AFM₁

A biotransformação das aflatoxinas tem sido demonstrada como uma etapa obrigatória para o aparecimento de seus efeitos tóxicos, principalmente o carcinogênico. Após a ingestão de alimentos contaminados, a AFB₁ é absorvida pelo trato gastrointestinal e, via sistema porta, chega ao fígado, onde é biotransformada por meio de reações catalisadas por enzimas microsossomais associadas ao citocromo P450. A biotransformação da AFB₁ constitui um processo complexo, com múltiplas vias, entre as quais se destacam a epoxidação e a hidroxilação (SHUNDO, 2004).

A ativação da AFB₁ conduz à formação do derivado AFB₁ – 8,9 epóxido, originado da epoxidação da dupla ligação do éter vinílico, presente na estrutura bi-furanóide da molécula de AFB₁. A ligação da AFB₁ - epóxido com o DNA modifica quimicamente a estrutura da macromolécula, conferindo à AFB₁ efeitos genotóxicos, originando os mecanismos básicos de mutagenicidade e carcinogenicidade (NEAL et al., 1998).

A hidroxilação forma derivados menos tóxicos e hidrossolúveis, como a AFM₁ (hidroxilado irreversível), o que possibilita sua secreção através de fluidos corporais, como o leite (OLIVEIRA; GERMANO, 1997). A contaminação por micotoxinas em leite e derivados passou a ser uma preocupação em meados dos anos 60, quando foram relatados os primeiros casos de ocorrência de AFM₁ em amostras de leite. Neste período, a ingestão de ração contaminada com AFB₁ era relativamente alta, a produção de leite era baixa e os métodos analíticos pouco eficientes (PETTERSON, 1997; VAN EGMOND, 1989).

Posteriormente, mais informações tornaram-se disponíveis a respeito da taxa de conversão da AFB₁, ao mesmo tempo em que a produção de leite aumentou consideravelmente os métodos analíticos disponíveis melhoraram, tornando os resultados dos estudos mais confiáveis. A partir de então, a incidên-

cia de AFM₁ em amostras de leite cru e processados foi relatada em diferentes regiões do mundo (BILANDZIC; VARENINA; SOLOMUN, 2010; FERNANDES et al., 2012; HASSAN; KASSAIFY, 2014; LEE et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2013; PEI, et al., 2009; GONÇALVES et al., 2018; SIBAJA et al., 2019).

A excreção da toxina no leite dos animais depende de vários fatores, relacionados ao tipo da dieta ingerida, nível de contaminação com AFB₁, quantidade ingerida, raça, nível de produção do animal, fase da lactação e estado de saúde dos animais. Estudos indicam que entre 0,3 a 6,0% da AFB₁ ingerida na dieta, aparece no leite de vacas lactantes (WHO, 2011). A tabela 3 mostra diferentes valores encontrados na literatura para taxa de conversão de AFM₁ para o leite. A relação positiva entre a quantidade de AFM₁ excretada no leite e a quantidade de AFB₁ ingerida pelo animal já está elucidada na literatura (KAMKAR, 2005).

Tabela 3. Taxa de conversão de AFB₁ em AFM₁

Taxa de conversão (%) AFB ₁ para AFM ₁	Referência
6,0	EFSA (2004)
0,3	CREPPY (2002)
1,7	JONES et al. (1994)
2,2	VAN EGMOUND (1989)
1,6	FORBISCH et al. (1986)

Fonte: Adaptado Rory et al, 2009.

Britzi et al. (2013) verificaram taxas de eliminação de AFM₁ no leite de 2,5% para vacas de baixa produção e 5,4% para as vacas de alta produção, correspondendo aos resultados encontrados em estudos anteriores. As taxas de excreção mais elevadas que ocorrem em animais de grande produção são explicadas pela maior permeabilidade das membranas celulares dos alvéolos das glândulas mamárias (VELDMAN, 1992). Além disso, Veldman (1992) também indica que vacas em período inicial de lactação (duas a quatro semanas após o parto) apresentam maior taxa de conversão do que as vacas no final da

lactação (34 a 36 semanas após o parto), quando a produção de leite diminui naturalmente.

O aparecimento da AFM₁ no leite ocorre de 48 a 72 h após contínua ingestão de dietas contaminadas por AFB₁ e de dois a quatro dias para desaparecer do produto após a retirada do alimento contaminado. A administração oral da AFB₁ purificada leva à detecção de AFM₁ no leite após cinco horas, provavelmente devido à rápida passagem pelo rúmen e absorção pelo intestino delgado (POLAN et al., 1974). Battacone et al. (2009) verificaram a presença de AFM₁ no leite após seis horas de administração do alimento previamente contaminado com AFB₁.

Apesar de diversos estudos encontrados na literatura afirmarem que a AFB₁ é completamente convertida em AFM₁, já foi demonstrado que isso não é verdadeiro (SCAGLIONI et al., 2014; GONÇALVEZ et al, 2018), o que vem a justificar o interesse nela, uma vez que a toxicidade da AFB₁ é maior que a da AFM₁ (HUSSEIN; BRASEL, 2001; ZAIN, 2011). Relatos na literatura sobre a incidência de AFB₁ em leite ainda são escassos, tendo em vista que as legislações vigentes para contaminação por micotoxinas só impõe limites máximos para AFM₁ em leite e seus derivados.

3.2.1.3 Aflatoxinas em leite

Diversos países regularizam os níveis máximos permissíveis para AFM₁ em leite e seus derivados, porém, em muitos desses existem estudos revelando níveis de contaminação acima dos limites máximos estabelecidos, que são variáveis e relacionam-se a fatores como grau de desenvolvimento econômico dos países. A tabela 4 mostra os níveis de tolerância para AFM₁ em leite fluído legislados em alguns países.

Tabela 4. Legislação Brasileira e Internacional para AFM₁ em leite fluído.

País	LMT ($\mu\text{g L}^{-1}$)
União Europeia, África do Sul	0,05
Brasil e demais países do MERCOSUL, Estados Unidos, China, Rússia	0,5

Onde: LMT: Limite máximo permitido

Na literatura, existem muitos trabalho sobre a ocorrência dessa micotoxina no leite. No estudo realizado por Oliveira (2010), foi verificada ocorrência de AFM₁ em leite de vaca comercializado no Sudeste do Brasil. Os resultados encontrados mostraram uma ocorrência de positividade de 90% nas amostras de leite fluído, com contaminação média de $0,07 \mu\text{g L}^{-1}$, e 100% nas amostras de leite em pó, com média de $0,54 \mu\text{g L}^{-1}$. Em contrapartida, Scaglioni et al. (2014) encontraram AFM₁ em amostras de leite cru, pasteurizado, UAT e concentrado, produzidos no Rio Grande do Sul, em concentrações 100% acima do permitido pela legislação brasileira, sendo que somente amostras de leite em pó não apresentaram contaminação, fato que sugere a necessidade de estudo sobre as condições de processo que propiciaram esta situação de adequação para consumo.

Gonçalves et al. (2018) coletaram 62 amostras de leites desnatados, semi-desnatados e em pó em comércios locais em Rio Grande, RS, Brasil, e verificaram que 68% estavam contaminados pela AFM₁ ($40\text{-}3670 \text{ ng L}^{-1}$), com contaminação encontrada apenas em leite fluído. A alta ocorrência de AFM₁ nas amostras analisadas sugeriu que o monitoramento desta micotoxina no estado do Rio Grande do Sul deve ser um procedimento contínuo.

No Paraná, o trabalho realizado por Santos et al. (2015) apresentou 100% de frequência para ocorrência de AFM₁ em amostras de leite comercializadas em Londrina (n=42), mas nenhuma apresentou nível de contaminação acima do permitido pela legislação brasileira. Santili et al. (2015) avaliaram 635 amostras de leite cru de fazendas leiteiras de três regiões de São Paulo, e

AFM₁ foi detectada em 72,9, 56,3 e 27,5% das amostras em Bauru, Araçatuba e Vale do Paraíba, respectivamente.

Contaminação por AFM₁ também está sendo relatada em produtos que contém leite na sua composição, como por exemplo, fórmulas infantis. Em São Paulo, 38 amostras de fórmulas infantis foram avaliadas por Tonon et al. (2018) quanto a ocorrência de AFM₁, e 12 (32%) apresentaram contaminação, sendo que sete (18%) em níveis acima do limite de quantificação do método (0,067 ng mL⁻¹). Considerando os riscos associados a ingestão de micotoxinas por crianças, a União Europeia estabelece um regulamento rigoroso para a presença de AFM₁ em alimentos infantis (máximo de 0,025 ng mL⁻¹), enquanto que no Brasil o limite é limitado para leite fluído (0,5 µg L⁻¹).

Além disso, em outras localidades mundiais a contaminação do leite por AFM₁ também está sendo relatada. Asghar et al. (2018) analisaram 156 amostras de leite, coletadas em mercados locais de Karachi-Paquistão, e detectaram contaminação em 143 (91,7%) amostras, variando de 20–3090 ng L⁻¹, com um nível médio de 346,2 ng L⁻¹. Em 125 amostras (80,1%) a contaminação foi maior que o limite máximo estabelecido pela UE (50 ng L⁻¹).

Sibaja et al. (2019) verificaram 100% de frequência de contaminação do leite por AFM₁ na Colômbia (n=51), em níveis que variaram entre 0,25 a 1,2 µg L⁻¹. Na Turquia, Sahin et al. (2016) analisaram 90 amostras de leite cru e indicaram que 21,1% estavam contaminadas com AFM₁, em níveis que variaram entre 0,01 e 0,1 µg L⁻¹.

Em relação a AFB₁, existem poucos relatos na literatura sobre a contaminação em leite, visto que as legislações só impõem limites para a AFM₁. Scaglioni et al. (2014) analisaram amostras de leite produzidas no Rio Grande do Sul e verificaram incidência de AFB₁ em 5% das amostras de leite pasteurizado (n=12) e em 2% de UAT (n=15), com contaminação média de 1,5 e 0,7 µg L⁻¹, respectivamente, enquanto Gonçalves et al. (2018) detectaram contaminação em 16% das amostras (n=62), em níveis entre 0,04 a 0,6 µg L⁻¹.

3.2.1.4 Métodos analíticos para determinação de aflatoxinas

A descoberta das aflatoxinas provocou extensivas investigações para o desenvolvimento de métodos analíticos para micotoxinas (SHUNDO, 2004). Os métodos de análise devem ser sensíveis e confiáveis o suficiente para serem utilizados no controle dos limites permitidos e também proporcionar a detecção de substâncias tóxicas decorrentes de contaminação natural ou intencional, especialmente para compostos potencialmente genotóxicos ou cancerígenos (RIDGWAY et al, 2007). Para a determinação de aflatoxinas e outros compostos, algumas etapas importantes devem ser consideradas para confiabilidade dos resultados, como o preparo de amostra, a extração, a clarificação e a quantificação (KRSKA et al., 2005).

A extração de aflatoxinas requer o uso de solventes, em sua maioria, orgânicos, relativamente polares, como o metanol, acetona, clorofórmio e acetonitrila. O método de QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged e Safe) têm sido realizado para uma gama de matrizes alimentícias, incluindo o leite. Esse método apresenta como vantagem percentuais de recuperação dos analitos em torno de 100%, remoção de possíveis interferentes da amostra, boa precisão e robustez, baixo custo, rapidez, facilidade e segurança (PRESTES et al., 2009).

Vários métodos têm sido utilizados para a detecção e quantificação destes contaminantes, dentre eles destacam-se as técnicas cromatográficas. A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) propiciou grandes avanços nas análises de micotoxinas, assim como em todas as outras áreas das ciências analíticas. O desenvolvimento da CLAE em fase reversa com detecção de fluorescência tornou-se mais atrativa, tendo em vista a redução do tempo de análise e sua alta sensibilidade. Soma-se a estas características, a relativa estabilidade destas colunas e solventes e a disponibilidade de detectores para diferentes propriedades físicas e químicas (SHUNDO, 2004).

A cromatografia líquida de alta eficiência acoplada com detector de massas (LCMS/MS) também tem sido bastante empregada na identificação e detecção de aflatoxinas. Através dela é possível obter uma grande quantidade

de informação estrutural acerca dos analitos, o que assegura sua identificação com maior exatidão do que quando ela é feita apenas com base nas características de retenção dos compostos analisados. Além disso, quando existem compostos que não podem ser totalmente separados pela técnica cromatográfica empregada, usando LC-MS/MS é possível detectá-los individualmente se possuírem diferentes massas moleculares ou gerarem diferentes espectros de massas (CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008).

**ARTIGO 1 - Aflatoxins B₁ and M₁: risks related to milk produced in
Brazil**

Publicado: Annals of Microbiology, v. 68, n. 12, p. 793-802, 2018.

**ARTIGO 2 - Determinação sazonal de aflatoxinas em propriedade leiteira
no Rio Grande do Sul, Brasil**

Segundo norma da Revista Food and Chemical Toxicology

Resumo

Determinação sazonal de aflatoxinas em propriedade leiteira no Rio Grande do Sul, Brasil.

Aflatoxinas são substâncias tóxicas produzidas durante o metabolismo secundário de algumas espécies fúngicas, como *Aspergillus flavus* e *A. parasiticus*, que contaminam produtos agrícolas bastante utilizados na alimentação animal. Entre esses contaminantes estão as aflatoxinas B₁ (AFB₁), B₂ (AFB₂), G₁ (AFG₁) e G₂ (AFG₂). A aflatoxina M₁ (AFM₁) é um metabólito hidroxilado da AFB₁ que pode ser encontrado no leite proveniente de animais que ingeriram ração contaminada com AFB₁, tornando-se um risco para saúde humana uma vez que apresentam propriedades mutagênicas, teratogênicas e cancerígenas. O objetivo do trabalho foi avaliar a ocorrência de AFB₁, AFB₂, AFG₁ e AFG₂ em rações consumidas por animais produtores de leite, bem como a presença de AFB₁ e AFM₁ em leite cru. Em uma propriedade leiteira localizada na região Sul do Rio Grande do Sul, foram realizadas quatro coletas de amostras das rações que estavam sendo consumidas pelas animais no período (inverno, primavera, verão e outono) e de leite coletadas individualmente de cada animal (inverno, n= 15; primavera, n= 20; verão n= 16; outono, n= 22, totalizando 73 amostras). As amostras de rações foram encaminhadas para o Instituto SAMITEC (Soluções Analíticas, Microbiológicas e Tecnológicas) para análise da ocorrência de AFB₁, AFB₂, AFG₁ e AFG₂ por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas. As aflatoxinas foram extraídas do leite pelo método de QuEChERS e quantificadas por cromatografia líquida de alta eficiência com detector de fluorescência. As rações coletadas no verão, outono e inverno estavam contaminadas por AFB₁, respectivamente nos níveis 1,0, 1,0 e 1,6 µg kg⁻¹, enquanto que a amostra da primavera não apresentou contaminação. Todas as amostras de leite estavam contaminadas por AFM₁, sendo que 55% apresentaram níveis de contaminação maiores do que o permitido pela legislação brasileira (0,5 µg kg⁻¹) e 100% acima do nível tolerado na União Europeia (0,05 µg kg⁻¹). O maior nível médio de contaminação do leite por AFM₁ foi encontrado no inverno (1,0 µg kg⁻¹) e nas demais estações as médias foram de aproximadamente 0,5 µg kg⁻¹. Em 8% das amostras de leite foi encontrada AFB₁, detectada no inverno e na primavera, em níveis que variaram de 0,09 a 0,37 µg kg⁻¹. Esses resultados atentam para a necessidade de serem adotadas estratégias que minimizem os riscos relacionados a essas contaminações, destacando-se a importância da redução da contaminação dos produtos agrícolas destinados à alimentação animal por fungos toxigênicos, evitando, assim, a produção de aflatoxinas.

Palavras-chave: QuEChERS; aflatoxinas; ração; leite cru; HPLC-FL.

Abstract

Seasonal effect of contamination by aflatoxins on dairy farm located in the southern region of Rio Grande do Sul state, Brazil

Aflatoxins are toxic compounds which are yielded by the secondary metabolism of some fungal species, such as *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus*, that contaminate agricultural products used for feeding livestock. Aflatoxins B₁ (AFB₁), B₂ (AFB₂), G₁ (AFG₁) and G₂ (AFG₂) are some of these contaminants. Aflatoxin M₁ (AFM₁), which is a hydroxylated metabolite of AFB₁, can be found in milk produced by dairy cows that have eaten feed contaminated with the latter. It poses risks to human health since it has mutagenic, teratogenic and carcinogenic properties. This study aimed at evaluating not only AFB₁, AFB₂, AFG₁ and AFG₂ in feed eaten by dairy cows, but also AFB₁ and AFM₁ in raw cow milk. Feed samples were collected on a dairy farm located in the south of Rio Grande do Sul (RS) state, Brazil, in four occasions that referred to the seasons of the year, when milk samples were collected from every cow. Seventy-three samples were collected (winter, n= 15; spring, n= 20; summer n= 16; fall, n= 22). Feed samples were taken to the SAMITEC Institute (Analytical, Microbiological and Technological Solutions) so as to have AFB₁, AFB₂, AFG₁ and AFG₂ analyzed by Liquid Chromatography coupled with Mass Spectrometry. Aflatoxins were extracted from milk by the QuEChERS method and quantified by High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) with fluorescence detection. AFB₁ levels were found in feed collected in summer, fall and winter, at 1.0, 1.0 and 1.6 µg kg⁻¹, respectively, while the other aflatoxins were not detected. There was no contamination in the sample collected in spring. All milk samples were contaminated with AFM₁; 55% exhibited contaminant levels that were higher than the maximum contaminant level allowed by the Brazilian legislation (0.5 µg kg⁻¹), while 100% was above the contaminant level accepted by the European Union (0.05 µg kg⁻¹). The highest mean contaminant level was found in winter (1.0 µg kg⁻¹), while means in the other seasons were 0.5 µg kg⁻¹. AFB₁ was detected in winter and spring in 8% of samples, whose levels ranged from 0.09 to 0.37 µg kg⁻¹. Results highlight the need to use strategies that can minimize risks posed by this contamination, such as decrease in contamination with toxigenic fungi of agricultural products used for feeding livestock, in order to avoid aflatoxin production.

Keywords: QuEChERS; aflatoxins; agricultural products; raw milk; HPLC-FL.

1 Introdução

O leite é um alimento de elevado valor nutritivo, porém pode ser o agente causador de diversas alterações fisiológicas nos indivíduos que o consomem, principalmente por ser veículo de contaminantes alimentares. Dentre esses contaminantes as micotoxinas têm destaque por penetrar nos fluídos ou nos tecidos do hospedeiro, causando doenças graves (Kwiatkowski; Alves, 2007).

Aflatoxinas são metabólitos secundários de fungos das espécies *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus* e *A. nomius*, que contaminam produtos agrícolas como milho, amendoim e trigo, predominantemente os que são destinados à alimentação animal. Entre esses contaminantes estão as aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂. A aflatoxina M₁ (AFM₁) é um metabólito hidroxilado da AFB₁ e pode ser encontrada no leite de animais que ingeriram ração contaminada com AFB₁, tornando-se um risco para saúde humana (Creppy, 2002).

As aflatoxinas podem causar sérios danos aos seres humanos e animais, pela sua elevada toxidez e ampla ocorrência, possuindo propriedades carcinogênicas, mutagênicas, teratogênicas (Sylos; Rodriguez-Amaya, 1996) e imunossupressoras (Nordin; Luchese, 1998). Os efeitos tóxicos dessas micotoxinas têm sido extensivamente demonstrados em diversas espécies animais, sobretudo em animais jovens (Caloni et al., 2006). Há, portanto, grande preocupação em relação à saúde das crianças, devido ao alto consumo de leite e produtos derivados, o baixo peso corpóreo e a maior suscetibilidade às aflatoxinas (IARC, 2002).

O Brasil é um grande produtor de alimentos agrícolas, no entanto, as condições climáticas de algumas regiões do país facilitam o desenvolvimento de espécies de fungos toxigênicos, que é favorecido pelas condições ambientais como umidade e temperatura elevadas (Lillejoh, 1991), possibilitando a produção de micotoxinas. Ocupando a quinta colocação entre os principais países produtores de leite de vaca do mundo, com uma produção anual de aproximadamente 34 bilhões (EMBRAPA, 2018), a presença de aflatoxinas no leite produzido no Brasil causa preocupação devido ao elevado potencial tóxico dessas substâncias.

Apesar da maior parte da literatura afirmar que a AFB₁ é completamente convertida em AFM₁, já foi demonstrado que essa conversão pode não ser completa (Scaglioni et al., 2014; Gonçalves et al., 2018), o que vem a justificar o interesse nela, uma vez que a toxicidade da AFB₁ é maior que a da AFM₁ (Hussein; Brasel, 2001). Relatos na literatura sobre a incidência de AFB₁ em leite ainda são escassos, tendo em vista que as legislações dos países só impõem limites máximos para AFM₁ em leite e seus derivados.

Diante disso, investigações sobre a contaminação do leite por aflatoxinas se tornam muito prudentes. Esse estudo teve por objetivo analisar a ocorrência de AFB₁, AFB₂, AFG₁ e AFG₂ em amostras de rações e AFM₁ e AFB₁ em leite cru, provenientes de uma propriedade localizada no Sul do Rio Grande do Sul, Brasil, verificando um possível efeito sazonal.

2 Material e Método

2.1 Coleta das amostras

As amostras de rações e de leite cru foram coletadas em uma propriedade leiteira localizada no município de Capão do Leão, interior do Rio Grande do Sul, Brasil (31°44'58.7"S 52°32'34.3"W). No período compreendido entre julho de 2017 e maio de 2018 foram realizadas quatro coletas, uma em cada estação do ano. Em todas elas foram coletados 1 kg das rações que estavam sendo consumidas pelos animais produtores de leite no período. Além da ração, havia disponibilidade de pasto nativo e outros produtos como silagem de milho, pastagem de aveia, azevem e milheto para a alimentação dos animais. A composição majoritária da ração apresentava farelo de soja, cevada, farelo de trigo e milho moído. As amostras de leites foram coletadas individualmente de cada animal em tubos tipo falcon (aproximadamente 30 mL) e armazenadas sob congelamento até o momento da extração das aflatoxinas. O número de amostras coletadas em cada estação foi: inverno (n = 15), primavera (n = 20), verão (n = 16) e outono (n = 22). Os leites foram coletados apenas de animais sadios e devidamente alimentados, uma vez que a excreção da toxina no leite depende de fatores como nível de produção e condições de saúde do animal.

2.2 Reagentes e padrões

Os padrões de AFM₁ e AFB₁ foram adquiridos na Sigma-Aldrich Chemical Company e preparados em metanol e tolueno, resultando em uma solução estoque contendo 0,1 e 0,2 µg mL⁻¹, respectivamente. Todos os solventes utilizados para a quantificação das micotoxinas possuíam pureza analítica grau HPLC e a água utilizada foi ultrapurificada em sistema purificador de água por osmose reversa (resistividade 18,2 MΩ cm). Os demais reagentes utilizados foram de grau analítico.

2.3 Determinação de AFB₁, AFB₂, AFG₁ e AFG₂ nas rações

As amostras de rações foram encaminhadas ao Instituto SAMITEC (Soluções Analíticas, Microbiológicas e Tecnológicas) para serem analisadas quanto à ocorrência de AFB₁, AFB₂, AFG₁ e AFG₂. As aflatoxinas foram extraídas das amostras de rações através de mistura de solventes de extração e analisadas por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas, de acordo com método descrito por Malachova et al. (2014).

À 5 g das amostras previamente moídas em um liquidificador, foram adicionados 20 mL da mistura de solvente de extração composta por acetonitrila/água/ácido acético (20:79:1). Após, as amostras foram agitadas em um agitador rotativo por 90 min, centrifugadas por 2 min a 3000 x *g* e 5 µL do extrato foi injetado no LC–MS/MS.

2.4 Extração da AFM₁ e AFB₁ no leite

A extração foi realizada pelo método de QuEChERS, descrito por Sartori et al. (2015), com algumas modificações. Primeiramente, os tubos contendo 30 mL de leite foram centrifugados por 5 min a 3000 x *g* para remoção da camada superior de gordura. Esse procedimento foi realizado três vezes para cada amostra. A partir disso, 5 mL de leite foram adicionados de 10 mL de hexano e 15 mL de acetonitrila acidificada (1% ácido acético, v/v) e submetidos à agitação manual durante 1 min. Após, foram adicionados à mistura 6 g de sulfato de magnésio anidro e 1,5 g de cloreto de sódio, e os tubos foram imediatamente

agitados em vórtex durante 1 min e 30 s, para, então, serem centrifugados a 2330 x g durante 7 min.

A fase orgânica contendo hexano foi removida e uma alíquota de 5 mL da fase contendo acetonitrila foi recolhida em frasco âmbar e submetida a secagem a 60°C em banho maria. Os extratos secos foram mantidos a - 4°C até o momento da quantificação das aflatoxinas. As extrações foram realizadas em triplicata para cada amostra.

A determinação da recuperação do método foi realizada fortificando as amostras de leite com os padrões de AFM₁ e AFB₁, em três níveis de fortificação (0,5; 2,5 e 5,0 µg kg⁻¹). As alíquotas dos padrões foram adicionadas aos tubos falcon, evaporadas sob fluxo de nitrogênio, e posteriormente foram adicionados 5 mL de leite e passaram pelo processo de extração descrito anteriormente. Posteriormente, foram quantificadas por cromatografia líquida de alta eficiência com detector de fluorescência, conforme descrito no item 2.5. A porcentagem de recuperação foi obtida através da equação 1:

$$\%R = \frac{(C_1 - C_2)}{C_3} \times 100 \quad (1)$$

Onde: %R = porcentagem de recuperação; C₁ = concentração determinada na amostra fortificada; C₂ = concentração determinada na amostra não fortificada e C₃ = concentração do padrão utilizado para a fortificação.

2.5 Quantificação da AFM₁ e AFB₁ no leite

A quantificação foi realizada no Laboratório de Micotoxinas e Ciências de Alimentos da Universidade Federal do Rio Grande (FURG) através da metodologia descrita por Gonçalves et al. (2018), com algumas modificações. Foi utilizado cromatógrafo líquido de alta eficiência acoplado a detector de fluorescência com derivatizador fotoquímico pós coluna (Romer Derivatization Unit RDU TM), processamento no *software* LC Solution, coluna Kromasil C18 (5 µm, 15 cm x 4,6 mm), com vazão de fase móvel de 1 mL min⁻¹ e temperatura do forno de 40°C. Os comprimentos de onda de excitação e emissão foram 370 e 410 nm, respectivamente, o volume de injeção da amostra de 20 µL e o tempo

da análise cromatográfica foi de 12 min. Os extratos foram eluídos em uma fase móvel composta por acetonitrila: metanol: água ultrapura (24:15:60, v/v). Os compostos foram identificados com base no tempo de retenção relacionando com os padrões de AFM₁ e AFB₁ (6,6 e 11,3 min, respectivamente) e, para confirmação, foi realizada co-cromatografia adicionando solução padrão à amostra, que promoveu o aumento de sinal.

Previamente, foi verificada interferência significativa quando utilizada a curva no solvente; portanto, utilizou-se a curva na matriz, construída através da fortificação das amostras de leite com seis níveis de concentrações crescentes de padrões de AFM₁ e de AFB₁, que variaram de 0,25 a 8,0 µg L⁻¹, em triplicata. Essas amostras passaram pelo mesmo processo de extração e quantificação das demais.

Para a determinação do limite de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ) foram feitas injeções de diferentes concentrações da solução padrão de trabalho, até que se obtivesse uma relação de 3:1 e 10:1, respectivamente, entre o pico do analito e o ruído da linha de base (Sibaja et al., 2019)

2.6 Análise estatística

Os resultados foram analisados através de análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Tukey, com 95% de confiança, utilizando o software Statistica 10. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

3 Resultados e discussão

Os percentuais de recuperação de aflatoxinas nas amostras de leite utilizando o método empregado foram de 80% para AFB₁ e de 103% para AFM₁, estando dentro do limite recomendado pela Comissão Europeia para ensaios de recuperação de micotoxinas (70 a 110%) (CE nº 401, 2006). Os valores de LOD (0,038 µg L⁻¹ para AFM₁ e 0,027 µg L⁻¹ para AFB₁) e LOQ (0,125 µg L⁻¹ para AFM₁ e 0,083 µg L⁻¹ para AFB₁) determinados foram considerados satisfatórios, tendo em vista que se apresentaram inferiores ao valor legislado para a AFM₁ em leite no Brasil (0,5 µg kg⁻¹). Os coeficientes de correlação das curvas analíticas foram respectivamente 0,99 e 0,98 para AFM₁ e AFB₁, garantindo a

linearidade e pouca dispersão do sinal gerado em função da variação da concentração na faixa de 0,01 a 2,0 $\mu\text{g L}^{-1}$.

As amostras de ração coletadas no verão, outono e inverno apresentaram contaminação por AFB₁ em níveis abaixo do limite de tolerância recomendado para ração animal no Brasil (50 $\mu\text{g kg}^{-1}$ – somatória de AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂) (BRASIL, 1988), sendo que as demais aflatoxinas não foram encontradas em nenhuma amostra. No verão e no outono, as rações apresentaram contaminação igual a 1,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$, e no inverno 1,6 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Esses níveis são menores que os encontrados em outros estudos realizados no Brasil, como o de Oliveira et al. (2010), que analisaram 30 amostras de ração de propriedades leiteiras localizadas na região Nordeste de São Paulo e encontraram concentrações de AFB₁ variando de 1,2 a 19,5 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (média de 8,4 $\mu\text{g kg}^{-1}$) em 40% das amostras. Na pesquisa realizada por Motta (2015), foram verificadas em duas fazendas produtoras de leite no estado de São Paulo frequências de 21,42% e 7,69% de amostras de dieta de vacas em lactação positivas para AFB₁, com níveis médios acima de 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$.

No presente trabalho, a maior concentração de AFB₁ encontrada nas amostras de rações foi referente à coletada no inverno (1,6 $\mu\text{g kg}^{-1}$), sendo essa a estação que apresentou também os maiores níveis de contaminação do leite por AFM₁ e AFB₁ (1,47 e 0,36 $\mu\text{g kg}^{-1}$, respectivamente). Essa relação diretamente proporcional entre a quantidade de AFM₁ excretada no leite e a quantidade de AFB₁ ingerida pelo animal já está elucidada na literatura (Kamkar, 2005).

Vários pesquisadores calcularam a quantidade de AFM₁ excretada no leite como uma porcentagem da AFB₁ ingerida na ração (Efsa, 2004; Creppy, 2002) e determinaram taxas que variam de 0,3 a 6,0%. Com os dados obtidos nesse trabalho, as taxas atingem até 92%, no entanto, a ração não era o único componente da dieta desses animais suscetível a contaminação por AFB₁. Nesse período os animais alimentaram-se também com silagem de milho.

O milho é o produto predominantemente presente na formulação de concentrados destinados a alimentação de vacas leiteiras, em razão do seu

alto valor nutricional. Contudo, a riqueza nutricional do milho também o torna um substrato adequado para o desenvolvimento de micro-organismos indesejáveis, capaz de gerar riscos oriundos de metabólitos secundários e tóxicos produzidos pelos fungos da microbiota do cereal (Oliveira et al., 2017).

No Brasil, a presença de aflatoxinas no milho é regulamentada pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento através da portaria de 21 de março de 1996 (BRASIL, 1996) e pela RDC nº 274 de 15 de outubro de 2002 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, estabelecendo o limite máximo de $20 \mu\text{g kg}^{-1}$ para a somatória das aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂ (BRASIL, 2002). Oliveira et al. (2017) analisaram um total de 148 amostras de milho de fazendas leiteiras localizadas no Rio Grande do Sul (n=51), Santa Catarina (n=40) e Paraná (n=57). A AFB₁ estava presente em amostras de todos os estados, sendo que em Santa Catarina foi encontrado os maiores níveis de contaminação, equivalente a $49,9 \mu\text{g kg}^{-1}$. Porém, a frequência (10%) foi inferior ao encontrado no Rio Grande do Sul (45%) e no Paraná (19,2%). Apesar da frequência de contaminação não ter sido elevada, a constatação de níveis acima do limite máximo legislado é importante, uma vez que amostras de milho podem ser misturadas, produzindo um produto final de baixa qualidade.

Todas as amostras de leite analisadas nesse estudo (n=73) estavam contaminadas por AFM₁, com os níveis variando de 0,3 a $1,47 \mu\text{g L}^{-1}$. A média de contaminação mais alta foi verificada no inverno ($1,0 \mu\text{g L}^{-1}$) e diferiu estatisticamente das médias 0,53; 0,5 e $0,45 \mu\text{g L}^{-1}$ no verão, outono e primavera, respectivamente. Resultados semelhantes foram obtidos em um trabalho recente realizado por Sibaja et al. (2019), que detectaram presença de contaminação por AFM₁ em 100% de amostras de leite (n=51) provenientes da Colômbia em níveis que variaram entre 0,2 a $1,2 \mu\text{g kg}^{-1}$.

A maioria dos países legisla os níveis máximos de AFM₁ aceitáveis no leite. Os limites variam e dependem, dentre outros fatores, do desenvolvimento econômico dos países. De acordo com o documento Bworldwide – regulamentos para micotoxinas e rações (FAO, 2004), ao final de 2003, aproximadamente 60 países haviam determinado limites para regular a contaminação do leite por AFM₁. Destes, 34 apresentaram limite máximo de

0,05 $\mu\text{g kg}^{-1}$, como, por exemplo, os países da União Europeia. O segundo limite mais adotado foi de 0,5 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (22 países), sendo esse adotado no Brasil, nos EUA e em vários países asiáticos. Esta diferença de dez vezes entre os dois limites mais prevalentes indica a necessidade de uma reavaliação do risco desta micotoxina para a saúde humana.

Os níveis de contaminação por AFM₁ em todas as amostras de leite excedem o limite permitido na União Europeia e 55% estão acima do limite permitido no Brasil e nos demais países do Mercosul (0,5 $\mu\text{g kg}^{-1}$). Incidência semelhante foi verificada por Gonçalves et al. (2018), que analisaram amostras (n=62) de leite UAT e em pó obtidas de estabelecimentos comerciais de Rio Grande, RS, Brasil, e verificaram contaminação por AFM₁ em 68% das amostras, em níveis entre 40 a 3670 ng L^{-1} . Dessas, 61% apresentaram níveis acima do permitido pela União Europeia e 42% acima do permitido pela legislação brasileira, o que demonstra que a utilização de tratamentos térmicos normalmente empregados para obtenção de leites para consumo humano não é eficaz para a detoxificação das aflatoxinas.

Oliveira (2010) validou método analítico para analisar AFM₁ e verificou sua ocorrência em leite de vaca comercializado no sul do Brasil. Os resultados encontrados mostraram uma ocorrência de positividade de 90% das 110 amostras de leite fluido, com contaminação média de 0,07 $\mu\text{g L}^{-1}$ e 100% nas amostras de leite em pó, com média de 0,54 $\mu\text{g L}^{-1}$. Em contrapartida, Scaglioni et al. (2014) encontraram níveis de AFM₁ em leite cru, pasteurizado, UAT e concentrado (n=40), obtidos no Rio Grande do Sul, 100% acima do permitido pela legislação brasileira, sendo que somente as amostras de leite em pó não apresentaram contaminação por nenhuma das aflatoxinas.

A contaminação por AFM₁ encontrada no leite variou entre 0,3 a 1,47 $\mu\text{g L}^{-1}$ e a média foi de 0,62 $\mu\text{g L}^{-1}$, estando em concordância com outros estudos realizados em diferentes estados do país, como em amostras de leite UHT provenientes do Paraná (0,34 a 4,62 $\mu\text{g L}^{-1}$) e de Santa Catarina (0,33 a 0,93 $\mu\text{g L}^{-1}$) (Becker-Algeri et al., 2020).

Alta ocorrência de AFM₁ em leite proveniente de outros países também tem sido relatada. Santini et al. (2013) realizaram um levantamento de 73 amostras de leite na Sicília (Itália) e foi detectada a presença de AFM₁ em 48% das amostras com concentrações entre 5,0 e 16,0 ng L⁻¹. Na Costa Rica, 70 amostras de leite foram coletadas no comércio local e apresentaram contaminação por AFM₁ em 96,5% com níveis entre 0,019 e 0,629 µg L⁻¹ (Chavarría et al., 2015). Outro estudo indicou que 21,1% das amostras de leite cru (n=90) coletadas na Turquia estavam contaminadas com AFM₁, variando entre 0,01 a 0,1 µg L⁻¹, com um nível médio de 0,036 µg L⁻¹ (Sahin et al., 2016). Esses níveis foram menores quando comparados com um estudo realizado na Tanzânia, onde AFM₁ foi detectada em 83,3% (n=31) das amostras de leite, variando entre 0,026 a 2,0 µg L⁻¹ (Mohammed et al., 2018) e Paquistão em 91,7% das amostras (n=143) com níveis de AFM₁ variando de 0,026 a 2,0 µg L⁻¹ (Asghar et al., 2018).

Esses resultados evidenciam a importância da revisão nos níveis permitidos pela legislação, uma vez que, em países legislados pela Comissão Europeia os dados de ocorrência são relativamente menores que no Brasil, onde o limite permitido de AFM₁ no leite é dez vezes maior.

A tabela 1 apresenta os níveis de contaminação por aflatoxinas nas amostras de ração e de leite nas quatro estações do ano.

Tabela 1. Contaminação por aflatoxinas em amostras de ração e de leite provenientes de propriedade leiteira do RS.

Estação do ano	Ração				Leite								
	AFB ₁ (µg kg ⁻¹)	AFB ₂ (µg kg ⁻¹)	AFG ₁ (µg kg ⁻¹)	AFG ₂ (µg kg ⁻¹)	AFM ₁				AFB ₁				
					NT	NC	Mín-Máx	Média ± DP	NT	NC	Mín-Máx	Média ± DP	
Verão	1,0	< LQ	< LQ	< LQ	16	16 (100%)	0,31 – 0,84	0,53 ^b ± 0,14	16	-	-	-	-
Outono	1,0	< LQ	< LQ	< LQ	22	22 (100%)	0,3 – 0,7	0,5 ^b ± 0,1	22	-	-	-	-
Inverno	1,6	< LQ	< LQ	< LQ	15	15 (100%)	0,47 – 1,47	1,0 ^a ± 0,27	15	4 (27%)	0,24-0,36	0,37 ^a ± 0,05	0,37 ^a ± 0,05
Primavera	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	20	20 (100%)	0,32 – 0,68	0,45 ^b ± 0,09	20	2 (10%)	0,09-0,23	0,17 ^b ± 0,09	0,17 ^b ± 0,09

Onde: LQ = Limite de Quantificação - AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂ (1,0 µg kg⁻¹); NT = Número total de amostras; NC = número de amostras contaminadas; Mín-Máx = menor e maior nível de contaminação, respectivamente. As concentrações estão expressas como média ± desvio padrão (µg L⁻¹); Letras iguais na mesma coluna não diferem estatisticamente segundo teste de Tukey (p<0,05).

A maior contaminação das amostras de leite por AFB₁ foi no inverno (1,47 µg L⁻¹), período em que os animais consomem mais alimentos que necessitam de armazenamento. Esse fato já foi verificado também por outros autores. Golge (2014) analisou 176 amostras de leite cru oriundas de fazendas da Turquia e observou que das 53 amostras contaminadas (30%), as maiores concentrações provinham de amostras coletadas no inverno (0,03 a 1,1 µg kg⁻¹).

A variação nos níveis de contaminação é, provavelmente, devido às características sazonais do tipo e qualidade de alimentação animal. Alimentos armazenados e concentrados, como rações e silagens, são usados mais frequentemente em períodos e regiões mais frias, enquanto que, nos períodos mais quentes, o animal se alimenta de produtos frescos tais como pastagens (Golge, 2014). Ainda, o teor de umidade (13 e 18%) e fatores ambientais, como a umidade relativa do ar (50 a 60%), relacionados à conservação da ração, favorecem o crescimento dos principais fungos responsáveis pelo desenvolvimento da AFB₁, metabólito precursor da AFM₁ (Unusan, 2006).

Em relação à ocorrência de AFB₁ no leite, essa foi detectada no inverno (26,7%) e na primavera (10,0%). De acordo com Scaglioni et al. (2014), quando o animal consome dieta com níveis de AFB₁ que ultrapassam a capacidade metabólica dos animais, a aflatoxina pode ser excretada no leite na sua forma não hidroxilada, o que justifica a destacada presença de AFB₁ nas amostras de leite do inverno, visto que foi verificada contaminação na ração. Na ração referente a primavera, não foi detectada presença dessa aflatoxina, no entanto, a ingestão da toxina pode ter sido através de outros componentes da dieta dos animais, o que justifica a contaminação do leite.

Existem poucos relatos na literatura sobre a incidência de AFB₁ em leite, tendo em vista que as legislações impõe limites máximos apenas para AFM₁ em leite e seus derivados. Scaglioni et al. (2014) detectaram presença de AFB₁ em amostras de leite pasteurizado e UAT comercializados no Rio Grande do Sul, em níveis maiores do que o limite legislado no Brasil para seu composto hidroxilado (AFM₁). Gonçalves et al. (2018) analisaram 62 amostras de leite coletadas no comércio local de Rio Grande, RS, das quais 16% estavam con-

taminadas por AFB₁, em concentrações entre 0,04 e 0,6 µg kg⁻¹. Esses resultados demonstram a necessidade de uma atenção mais rigorosa em relação a essa contaminação, uma vez que a toxicidade da AFB₁ é maior que a da AFM₁.

Além da diferença nos níveis de contaminação por AFM₁ entre as estações do ano, também foram verificadas entre as amostras, como mostram os resultados da tabela 2.

Tabela 2. Contaminação das amostras de leite por AFM₁ e AFB₁ nas quatro estações do ano.

Estação						
Verão			Outono		Inverno	
AFM ₁	AFB ₁		AFM ₁	AFB ₁	AFM ₁	AFB ₁
0,641 ^{ab} ± 0,12	nd		0,3 ^c ± 0,02	nd	0,812 ^{abc} ± 0,01	nd
0,399 ^{ab} ± 0,15	nd		0,385 ^{bc} ± 0,04	nd	0,931 ^{abc} ± 0,1	0,369 ^a ± 0,04
0,444 ^{ab} ± 0,18	nd		0,424 ^{abc} ± 0,04	nd	1,038 ^{abc} ± 0,11	Nd
0,603 ^{ab} ± 0,05	nd		0,370 ^{bc} ± 0,03	nd	0,950 ^{abc} ± 0,02	Nd
0,650 ^{ab} ± 0,07	nd		0,456 ^{abc} ± 0,09	nd	1,377 ^{ab} ± 0,05	0,290 ^a ± 0,02
0,639 ^{ab} ± 0,22	nd		0,702 ^a ± 0,02	nd	0,687 ^{bc} ± 0,02	Nd
0,569 ^{ab} ± 0,03	nd		0,485 ^{abc} ± 0,03	nd	1,307 ^{ab} ± 0,03	0,24 ^a ± 0,08
0,629 ^{ab} ± 0,19	nd		0,394 ^{bc} ± 0,04	nd	0,691 ^{bc} ± 0,02	0,287 ^a ± 0,01
0,836 ^a ± 0,15	nd		0,496 ^{abc} ± 0,11	nd	0,885 ^{abc} ± 0,02	Nd
0,586 ^{ab} ± 0,08	nd		0,520 ^{abc} ± 0,15	nd	0,471 ^c ± 0,07	Nd
0,505 ^{ab} ± 0,02	nd		0,581 ^{abc} ± 0,08	nd	1,473 ^a ± 0,04	Nd
0,310 ^b ± 0,03	nd		0,458 ^{abc} ± 0,06	nd	0,970 ^{abc} ± 0,13	Nd
0,314 ^b ± 0,01	nd		0,653 ^{ab} ± 0,14	nd	0,771 ^{abc} ± 0,02	Nd
0,395 ^b ± 0,03	nd		0,523 ^{abc} ± 0,12	nd	1,014 ^{abc} ± 0,14	Nd
0,401 ^{ab} ± 0,15	nd		0,436 ^{abc} ± 0,09	nd	0,953 ^{abc} ± 0,1	Nd
0,530 ^{ab} ± 0,08	nd		0,492 ^{abc} ± 0,13	nd	--	--
--	--		0,378 ^{bc} ± 0,03	nd	--	0,009 ^b ± 0,01
--	--		0,549 ^{abc} ± 0,18	Nd	--	0,367 ^b ± 0,02
--	--		0,584 ^{abc} ± 0,05	Nd	--	0,344 ^b ± 0,04
--	--		0,573 ^{abc} ± 0,13	Nd	--	0,573 ^{ab} ± 0,04
--	--		0,609 ^{ab} ± 0,06	Nd	--	--
--	--		0,524 ^{abc} ± 0,08	Nd	--	--

Onde: nd = não detectado; As concentrações de AFM₁ e AFB₁ estão expressas pela média ± DP (µg kg⁻¹); Letras iguais na mesma coluna não diferem estatisticamente segundo teste de Tukey (p<0,05)

Apesar dos animais ingerirem a mesma dieta, ou seja, com o mesmo nível de contaminação por AFB₁, a quantidade ingerida é variável, o que justifica a diferença entre os níveis de contaminação das amostras. Além disso, existem outros fatores que podem influenciar na excreção da toxina no leite que estão relacionados com os animais, como a digestão alimentar, a fase de lactação, estado de saúde e idade (Rosa, 2014).

Alguns autores indicam que a raça do animal e o nível de produção influenciam a taxa de excreção de AFM₁ (Battacone et al., 2009; Volkel; Schroer-Merker; Czerny, 2011), no entanto não justifica as diferenças verificadas nesse trabalho uma vez que os animais eram todos da mesma raça e apresentavam os mesmos níveis de produção.

4 Conclusão

As amostras de rações obtidas de uma propriedade leiteira no Sul Rio Grande do Sul apresentaram contaminação por AFB₁ no verão, outono e inverno (1,0, 1,0 e 1,6 µg kg⁻¹, respectivamente). Todas as amostras de leite cru apresentaram contaminação por AFM₁ (0,53; 0,5, 1,0 e 0,45 µg L⁻¹, no verão, outono, inverno e primavera, respectivamente) e 8,0% estavam contaminadas também com AFB₁ (0,37 e 0,17 µg L⁻¹ no inverno e primavera, respectivamente). Os maiores níveis de contaminação do leite foram verificados no inverno, assim como a maior contaminação da ração por AFB₁.

5 Referências

Asghar, M.A., Ahmed, A., Asghar, M.A., 2018. Aflatoxin M₁ in fresh milk collected from local markets of Karachi, Pakistan. Food Addit Contam Part B Surveill. 11, 167-174. <https://doi.org/10.1080/19393210.2018.1446459>

Battacone, G., Nudda, A., Palomba, A., Mazzette, A., Pulina, G., 2009. The transfer of aflatoxin M₁ in milk of ewes fed diet naturally contaminated by aflatoxins and effect of inclusion of dried yeast culture in the diet. Journal of Dairy Science. 92, 4997–5004. <https://doi.org/10.3168/jds.2008-1684>

Becker-Algeri, T.A., Souza, C., Bortoli, K., Castagnaro, D., Scaglioni, P.T., Drunkler, D.A., Badiale-Furlong, E., 2020. Seasonal variation of milk quality:

Physicochemical, microbiological, and toxicological. *Journal of Food Safety*.
<https://doi.org/10.1111/jfs.12796>

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 183 de 21 de março de 1996. Diário oficial da União, Brasília, 1996.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria n. 07, de 09 de novembro de 1988. Diário Oficial da União, Brasília, 1988.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 274, de 15 de outubro de 2002. Diário Oficial da União, Brasília, 2002.

Caloni, F., Stamatl, A., Friggè, G., De Angelis, I., 2006. Aflatoxin M₁ absorption and cytotoxicity on human intestinal in vitro model. *Toxicon*. 47, 409-415.
<https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2005.12.003>

COMUNIDADE EUROPEIA. Regulamento nº 401, 2006.

Chavarría, G., Granados-Chinchilla, F., Alfaro-Cascante, M., Molina, A., 2015. Detection of aflatoxin M₁ in milk, cheese and sour cream samples from Costa Rica using enzyme-assisted extraction and HPLC. *Food Addit Contam Part B Surveill*. 8, 128-135. <https://doi.org/10.1080/19393210.2015.1015176>

Creppy, E. E., 2002. Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe. *Toxicology Letters*. 127, 19-28. [https://doi.org/10.1016/S0378-4274\(01\)00479-9](https://doi.org/10.1016/S0378-4274(01)00479-9)

EFSA, 2004. Opinion of the scientific panel on contaminants in food chain on a request from the commission related to aflatoxin B₁ as undesirable substance in animal feed. *The European Food Safety Authority Journal*. DOI: 10.2903/j.efsa.2004.73

EMBRAPA – Empresa Brasileira de pesquisa Agropecuária, 2018. ANUÁRIO leite 2018: Indicadores, tendências e oportunidades para quem vive no setor leiteiro. <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1094149/anuario-leite-2018-indicadores-tendencias-e-oportunidades-para-quem-vive-no-setor-leiteiro> (Acesso em Dezembro de 2019).

FAO - Food and Agriculture Organization, 2004. Worldwide Regulations for Mycotoxins in Food and Feed in 2003. <http://www.fao.org/3/y5499e/y5499e00.htm> (Acesso em janeiro de 2020).

Golge, O., 2014. A survey on the occurrence of aflatoxin M₁ in raw milk produced in Adana province of Turkey. *Food Control*. 45, 150-155.
<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.04.039>

Gonçalves, K.D.M., Sibaja, K.V.M., Feltrin, A.C.P., Remedi, R.D., Garcia, S.O., Garda-Buffon, J., 2018. Occurrence of aflatoxins B₁ and M₁ in milk powder and

UHT consumed in the city of Assomada (Cape Verde Islands) and southern Brazil. Food Control. 93, 160-164. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.06.010>

Hussein, H. S., Brasel, J. M., 2001. Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. Toxicology. 167, 101-134. [https://doi.org/10.1016/S0300-483X\(01\)00471-1](https://doi.org/10.1016/S0300-483X(01)00471-1)

IARC - INTERNATIONAL AGENCY OF RESEARCH ON CANCER. Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Lyon: WHO, v.82, 2002.

Kamkar, A., 2005. A study on the occurrence of aflatoxin M₁ in raw milk produced in Sarab city of Iran. Food Control. 16, 593-599. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2004.06.021>

Kwiatkowski, A.; Alves, A. P. F., 2007. Importância da detecção e do controle de aflatoxinas em alimentos. Revista de Saúde e Biologia. 2, 44-53.

Lillejoh, E.B., 1991. Aflatoxins: an ecologically elicited genetic activation signal, in: Smith, JE, Henderson S. Mycotoxins and Animal Foods. Boca Ratón: Eds. CRC Press.

Malachova, A., Sulyok, M., Beltrán, E., Berthiller, F., Krska, R., 2014. Optimization and validation of a quantitative liquid chromatography–tandem mass spectrometric method covering 295 bacterial and fungal metabolites including all regulated mycotoxins in four model food matrices. Journal of Chromatography A. 1362, 145-156. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.08.037>

Mohammed, S., Munissi, J.J.E., Nyandoro, S.S., 2018. Aflatoxins in sunflower seeds and unrefined sunflower oils from Singida, Tanzania. Food Addit Contam Part B Surveill, 11, 161-166. <https://doi.org/10.1080/19393210.2018.1443519>

Nordin, N., Luchese, R. H., 1998. Detecção de aflatoxina e zearalenona em milho (*Zea mays*), destinado à alimentação animal. Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia dos Alimentos. 32, 35-39.

Oliveira, C.A.F., Sebastião, L.S., Fagundes, H., Rosim, R.E., Fernandes, A.M., 2010. Determination of aflatoxin B₁ in animal feed and aflatoxin M₁ in milk in dairy farms of São Paulo State. Ciência e tecnologia de alimentos. 30, 221-225. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612010000500034>.

Oliveira, M.S., Rocha, A., Sulyo, K.M., Mallmann, C.A., 2017. Natural mycotoxin contamination of maize (*Zea mays* L.) in the South region of Brazil. Food Control. 73, 127-132. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.07.033>

Rosa, A.F., 2014. Ocorrência natural de aflatoxina M₁ e parâmetros de qualidade do leite em propriedades do Estado de São Paulo. 2014. 105p. Dissertação (Mestrado em produção animal sustentável) - Instituto de Zootecnia, Nova Odessa.

Sahin, H.Z., Celik, M., Kotay, S., Kabak, B., 2016. Aflatoxins in dairy cow feed, raw milk and milk products from Turkey. *Food Addit Contam Part B Surveill.* 9, 152-158. <https://doi.org/10.1080/19393210.2016.1152599>

Santini, A., Raiola, A., Ferrantelli, V., Giangrosso, G., Macaluso, A., Bognanno, M., Galvano, F., Ritieni, A., 2013. Aflatoxin M₁ in raw, UHT milk and dairy products in Sicily (Italy). *Food Addit Contam Part B Surveill.* 6, 181–186. <https://doi.org/10.1080/19393210.2013.780186>

Sartori, A.V., Swensson, J., De Moraes, M.H.P., Da Nóbrega, A.W. Determination of Aflatoxins M₁, M₂, B₁, B₂, G₁, and G₂ and ochratoxin A in UHT and powdered milk by modified QuEChERS method and ultra-highperformance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Food Anal Methods.* 8, 2321–2330. <https://doi.org/10.1007/s12161-015-0128-4>

Scaglioni, P.T., Algerl-Becker, T., Drunkler, D., Badiale-Furlong, E., 2014. Aflatoxin B₁ e M₁ in milk. *Analytica Chimica Acta.* 829, 68-74. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2014.04.036>

Sibaja, K.V., Gonçalves, K.D.M., Garcia, S.O., Feltrin, A.C., Nogueira, W.V., Badiale-Furlong, E., Garda-Buffon, J., 2019. Aflatoxin M₁ and B₁ in Colombian milk powder and estimated risk exposure. *Food Additives & Contaminants: Part B.* 12, 97-104. <https://doi.org/10.1080/19393210.2019.1567611>

Sylos, C. M., Rodriguez-Amaya, D. B., 1996. Estudo comparativo de métodos para determinação de aflatoxina M₁. *Revista do Instituto Adolfo Lutz.* 56, 87-97.

Unusan, N., 2006. Occurrence of aflatoxin M₁ in UHT milk in Turkey. *Food and Chemical Toxicology.* 44, 1897-1900. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2006.06.010>

Volkel, I., Schroer-Merker, E., Czerny, C.P., 2011. The Carry-Over of Mycotoxins in Products of Animal Origin with Special Regard to Its Implications for the European Food Safety Legislation. *Food and Nutrition Sciences.* 2, 852-867. DOI: 10.4236/fns.2011.28117

ARTIGO 3 - Análise da exposição da população à aflatoxina M₁ por amostras de leite produzido no Sul do Rio Grande do Sul, Brasil

Resumo

Análise da exposição da população à aflatoxina M₁ por amostras de leite produzido no Sul do Rio Grande do Sul, Brasil

A aflatoxina M₁ (AFM₁) é uma micotoxina resultante da hidroxilação da aflatoxina B₁ (AFB₁) que pode ocorrer no leite de animais que ingeriram ração contaminada pela sua precursora. Essas substâncias causam risco para saúde humana uma vez que apresentam propriedades mutagênicas, teratogênicas e cancerígenas. O objetivo do trabalho foi analisar a ocorrência de AFB₁ e AFM₁ em leite produzido na região Sul do Rio Grande do Sul, Brasil, e estimar a exposição da população à essa contaminação. Foram coletadas 23 amostras de leite diretamente dos tanques de refrigeração de seis propriedades leiteiras. As aflatoxinas foram extraídas das amostras de leite pelo método de QuEChERS e quantificadas por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção de fluorescência. A avaliação da exposição da população à AFM₁ foi determinada através da estimativa da ingestão diária. Foi detectada a presença de AFM₁ em 78,3% das amostras de leite analisadas, em níveis que variaram de 0,34 a 1,1 $\mu\text{g L}^{-1}$, apresentando contaminação média igual a 0,63 $\mu\text{g L}^{-1}$, sendo esse valor superior ao limite máximo permitido pela legislação brasileira para o leite fluído (0,5 $\mu\text{g kg}^{-1}$). AFB₁ não foi detectada em nenhuma das amostras analisadas. Com base nesse nível de contaminação do leite por AFM₁, a estimativa da ingestão diária desse contaminante foi de 3,0 e 10,0 ng/pessoa para adultos e crianças, respectivamente. Esses resultados atentam para um problema sério que vem sendo relacionado ao leite, principalmente em relação à saúde de crianças, que consomem grande quantidade desse produto e apresentam maior suscetibilidade à contaminações.

Palavras-chave: Saúde pública; leite cru; exposição da população; QuEChERS; HPLC-FL.

Abstract

Analysis of population exposure to aflatoxin M₁ in milk produced in the south of Rio Grande do Sul state, Brazil

Aflatoxin M₁ (AFM₁), which results from aflatoxin B₁ (AFB₁) hydroxylation, is a mycotoxin that may occur in milk produced by dairy animals after eating feed contaminated by its precursor. These compounds pose risks to human health, since they have mutagenic, teratogenic and carcinogenic properties. This study aimed at analyzing the occurrence of AFB₁ and AFM₁ in milk produced in the south of Rio Grande do Sul (RS) state and at estimating population exposure to the contamination. Twenty-three cow milk samples were collected in cold storage tanks on six dairy farms. Aflatoxins were extracted from milk samples by the QuEChERS method and quantified by High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) with fluorescence detection. Evaluation of population exposure to AFM₁ was determined by estimating its daily intake. AFM₁ was detected in 78.3% of milk samples, whose levels ranged from 0.34 to 1.1 µg L⁻¹. Mean contamination level, which was 0.6 µg L⁻¹, is higher than the maximum contaminant level allowed in fluid milk by the Brazilian legislation (0.5 µg kg⁻¹). AFB₁ was not detected in any sample under analysis. Based on the contaminant level of AFM₁ found in cow milk samples, estimates of its daily intake were 3.0 ng/adult and 10.0 ng/child. Results highlight a serious problem related to cow milk, mainly concerning children's health, since they consume high amounts of this product and are susceptible to contamination.

Keywords: Public health; raw milk; population exposure; QuEChERS; HPLC-FL.

1 Introdução

O leite é um dos alimentos mais completos, em termos nutricionais, sendo fonte vários nutrientes importantes à saúde humana (Kwiatkowski; Alves, 2007). Do ponto de vista econômico, esse alimento é de extrema importância para o Brasil, que ocupa a quinta colocação entre os principais países produtores de leite de vaca do mundo, com uma produção de aproximadamente 34 bilhões de litros em 2108, sendo a maior produção verificada na região Sul (IBGE, 2019).

Entretanto, o leite pode estar contaminado com aflatoxina M₁ (AFM₁), que é um metabólito da aflatoxina B₁ (AFB₁), representando um risco para a saúde humana, especialmente de crianças e recém nascidos, que são potencialmente mais sensíveis às toxinas e possuem uma dieta menos diversificada que os adultos. Aflatoxinas são metabólitos secundários de fungos das espécies *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus* e *A. nomius*, que contaminam produtos agrícolas como milho, amendoim e trigo, predominantemente os que são destinados a alimentação animal. Quando os animais ingerem produtos contaminados, as micotoxinas são metabolizadas, biotransformadas e transferidas para os produtos, tal como o leite ou a carne, tornando-se, conseqüentemente, um risco para a saúde humana (Bruerton, 2001).

A contaminação do leite por AFM₁ tem sido relatada por diversos autores (Scaglioni et al., 2014; Santos et al., 2015; Santili et al., 2015; Gonçalves et al., 2018; Sibaja et al., 2019), o que gera grande preocupação uma vez que essas substâncias apresentam propriedades carcinogênicas, mutagênicas, teratogênicas e imunossupressoras (Sylos; Rodriguez-Amaya, 1996). Com o objetivo de reduzir os riscos associados a AFM₁, vários países estabeleceram o limite máximo permitido para essa substância em leite, que no Brasil é de 0,5 µg L⁻¹ (ANVISA, 2011). Para a AFB₁ em leite não existem limites legislados para sua presença no leite e, embora a maioria dos relatos disponíveis na literatura indiquem que a AFB₁ é completamente convertida em AFM₁, já foi demonstrado que essa conversão pode não ser completa (Scaglioni et al., 2014; Gonçalves et al., 2018).

Por ser uma substância altamente tóxica, não é estabelecida uma dose diária de ingestão tolerável para as aflatoxinas. Apesar disso, estudos sobre a avaliação da exposição da população a AFB₁ e AFM₁ são importantes pois, mesmo em pequenas quantidades, essa substância pode causar problemas de saúde a longo prazo (Amaral et al, 2006). Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi analisar a ocorrência de AFB₁ e AFM₁ em leite produzido na região Sul do Rio Grande do Sul, Brasil, assim como estimar a exposição da população à essa contaminação.

2 Material e Métodos

2.1 Coleta das amostras de leite

As amostras de leite foram coletadas diretamente do tanque de refrigeração de seis propriedades leiteiras de pequeno porte localizadas na região Sul do Rio Grande do Sul, Brasil, no período de abril a novembro de 2017. Uma propriedade (Propriedade A) é localizada no município de Capão do Leão, enquanto as demais (Propriedades B, C, D, E e F) são assentamentos localizados no município de Arroio Grande que participaram do Núcleo de Ensino, Pesquisa e Extensão para Produção Agroecológica de Leite da UFPel (NEPEL). O número de amostras coletadas foi 12, 3, 3, 2, 2 e 1, das propriedades A, B, C, D, E e F, respectivamente, totalizando 23 amostras. Dos resfriadores, foram coletados aproximadamente 30 mL de leite em tubos tipo falcon e armazenados sob congelamento até o momento da extração.

2.2 Reagentes e padrões

Os padrões de AFB₁ e AFM₁ foram adquiridos na Sigma-Aldrich Chemical Company e preparados em metanol e tolueno, resultando em uma solução estoque com concentração de AFB₁ e AFM₁ de 0,1 e 0,2 µg mL⁻¹, respectivamente. Todos os solventes utilizados para a quantificação das micotoxinas possuíam pureza analítica grau HPLC e a água utilizada foi ultrapurificada em sistema purificador de água por osmose reversa (resistividade 18,2 MΩ cm). Os demais reagentes utilizados foram de grau analítico.

2.3 Extração das aflatoxinas

Utilizou-se o método de QuEChERS, descrito por Sartori et al. (2015) com algumas modificações. Os tubos contendo 30 mL de leite foram centrifugados três vezes por 5 min a 3000 x g para remoção da camada superior de gordura. A partir disso, 5 mL de leite foram adicionados de 10 mL de hexano e 15 mL de acetonitrila acidificada (1% ácido acético, v/v) e submetidos à agitação manual durante 1 min. Após, foram adicionados à mistura 6 g de sulfato de magnésio anidro e 1,5 g de cloreto de sódio, e os tubos foram imediatamente agitados em vórtex durante 1 min e 30 s, para, então, serem centrifugados a 2330 x g durante 7 min. Alíquotas de 5 mL da fase contendo acetonitrila (2ª fase) de cada amostra foram recolhidas em frascos âmbar e submetidas a secagem a 60°C em banho maria. Os extratos secos foram mantidos a -4 °C até o momento da quantificação das aflatoxinas. As extrações foram realizadas em triplicata para cada amostra.

A determinação da recuperação do método foi realizada fortificando as amostras de leite com os padrões em três níveis (0,5; 2,5 e 5,0 µg kg⁻¹). As alíquotas dos padrões foram adicionadas a tubos falcons, evaporadas sob fluxo de nitrogênio, e posteriormente foram adicionados 5 mL de leite e passaram pelo processo de extração descrito anteriormente. Após, foram quantificadas por cromatografia líquida de alta eficiência com detector de fluorescência. A porcentagem de recuperação foi obtida através da equação 1:

$$\%R = \frac{(C_1 - C_2)}{C_3} \times 100 \quad (1)$$

Onde: %R = porcentagem de recuperação; C₁ = concentração determinada na amostra fortificada; C₂ = concentração determinada na amostra não fortificada e C₃ = concentração do padrão utilizado para a fortificação.

2.4 Quantificação das aflatoxinas

A quantificação das aflatoxinas foi realizada no Laboratório de Micotoxinas e Ciência de Alimentos da Universidade Federal do Rio Grande (FURG). Os extratos foram ressuspensos em 1 mL de água ultrapura: acetonitrila (90:10, v/v), e centrifugados a $4506 \times g$ por 5 min. A quantificação foi realizada conforme método descrito por Gonçalves et al. (2018), com modificações. Foi utilizado um cromatógrafo líquido de alta eficiência acoplado a detector de fluorescência com derivatizador fotoquímico pós coluna (Romer Derivatization Unit RDU TM) e processamento no *software* LC Solution. A análise cromatográfica foi realizada em coluna Kromasil C18 (5 μ m, 15 cm x 4,6 mm), com vazão de fase móvel de 1 mL min⁻¹ e temperatura do forno de 40°C. Os comprimentos de onda de excitação e emissão foram 370 e 410 nm, respectivamente, o volume de injeção da amostra foi de 20 μ L e o tempo da análise cromatográfica foi de 12 min. Os extratos foram eluídos em uma fase móvel composta por acetonitrila: metanol: água ultrapura (24:15:60, v/v). O composto foi identificado com base no tempo de retenção relacionando com os padrões de AFB₁ e AFM₁ (6,6 e 11,3 min, respectivamente) e, para confirmação, foi realizada co-cromatografia adicionando solução padrão à amostra, que promoveu o aumento de sinal.

Foi construída a curva na matriz para evitar interferência como foi previamente verificado na curva com solvente. A curva foi construída fortificando as amostras de leite com seis níveis de concentrações crescentes de padrões, que variaram de 0,25 a 8,0 μ g kg⁻¹, em triplicata. Essas amostras passaram pelo mesmo processo de extração e quantificação das demais.

Para determinação do limite de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ) foram feitas injeções de diferentes concentrações da solução padrão de trabalho, até que se obtivesse uma relação de 3:1 e 10:1, respectivamente, entre o pico do analito e o ruído da linha de base (Sibaja et al., 2019)

2.5 Análise da exposição da população às aflatoxinas

A partir dos dados de ocorrência de aflatoxinas nas amostras de leite obtidos nesse trabalho, foi avaliada a exposição da população através da ingestão de leite (Equação 2). Para o cálculo, foram considerados os valores de consumo de leite por faixa etária e peso descrito por Santili et al. (2015), que são: 400 mL/dia para crianças (23 kg) e 350 mL/dia para adultos (60 kg).

$$EID = \frac{(CmAFM \times CD)}{PC} \quad (2)$$

Onde: EID = Estimativa de ingestão diária de AFM (ng/pessoa/dia); CmAFM = concentração média de AFM obtida nesse estudo (ng L⁻¹); CD = Consumo diário de leite (kg) e PC = Peso corporal (kg).

3 Resultados e Discussão

Os parâmetros de validação do método para determinação de AFB₁ e AFM₁ estão na tabela 1. Os percentuais de recuperação de aflatoxinas estão dentro do limite recomendado pela Comissão Europeia para ensaios de recuperação de micotoxinas (70 a 110%) (CE nº 401, 2006). Os valores de LD e LQ foram considerados adequados uma vez que são menores que o limite máximo permitido para AFM₁ pela legislação brasileira (0,5 µg kg⁻¹). Além disso, os coeficientes de correlação das curvas analíticas foram próximos de 0,98, garantindo a linearidade e pouca dispersão do sinal gerado em função da variação da concentração na faixa de 0,01 a 2,0 µg L⁻¹.

Tabela 1. Parâmetros analíticos do método para determinação das aflatoxinas

Parâmetros	AFM ₁	AFB ₁
Curva analítica	y= 58636x-15880	y= 13214x-7530,1
R ²	0,99	0,98
Recuperação (%)	103	80
LD (µg L ⁻¹)	0,038	0,027
LQ (µg L ⁻¹)	0,125	0,083

Onde: R² = coeficiente de determinação; LD = limite de detecção; LQ = limite de quantificação

A AFB₁ não foi detectada em nenhuma das amostras analisadas. Essas análises são de extrema importância uma vez que a toxicidade da AFB₁ é maior que a da AFM₁ (Hussein; Brasel, 2001). No entanto, existem poucos relatos na literatura sobre a ocorrência dessa aflatoxina no leite (Scaglioni et al., 2014; Gonçalves et al., 2018).

Sibaja et al. (2019) investigaram a presença de AFB₁ em 51 amostras de leite em pó de diferentes tipos (integral, desnatado, semidesnatado, sem lactose e fórmulas infantis) na Colômbia e não detectaram a incidência dessa aflatoxina, mas 100% apresentaram contaminação por AFM₁, em níveis entre 0,2 a 1,19 µg kg⁻¹.

A frequência de amostras de leite positivas para AFM₁ obtida nesse trabalho foi de 78,3%, como apresenta a tabela 2. Na literatura há muitos trabalhos que determinaram frequências semelhantes ou até superiores para amostras de leites no Brasil. Santos et al. (2015) analisaram 42 amostras de leite comercializadas em Londrina, Paraná, quanto a contaminação por AFM₁ e verificaram que 100% estavam contaminadas. No trabalho recente realizado por Gonçalves et al. (2018), 68% das amostras de leite (n=62) obtidas do comércio de Rio Grande, Rio Grande do Sul, estavam contaminadas com AFM₁, em níveis que variaram entre 40 a 3670 ng L⁻¹.

Tabela 2. Contaminação das amostras de leite por AFM₁ e estimativa da ingestão diária da toxina pela população.

N	Positivo (%)	Média ± DP (µg L ⁻¹)	Mín-Máx (µg L ⁻¹)	> Limite (%)	EID criança (ng/pessoa/dia)	EID adulto (ng/pessoa/dia)
23	18 (78,3)	0,63 ± 0,2	0,34 – 1,1	12 (66,7)	10,0	3,0

Onde: n = número total de amostras de leite analisadas; EID = estimativa de ingestão diária
Limite = limite máximo permitido pela legislação brasileira (0,5 µg kg⁻¹).

A Resolução da Diretoria Colegiada nº 7 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, de 2011, limita o valor máximo para contaminação do leite por AFM₁ em 0,5 µg kg⁻¹. No entanto, mesmo com uma legislação específica, os níveis de contaminação verificados em vários estudos excedem esse limite. No presente trabalho, o nível médio de contaminação foi de 0,63 µg L⁻¹, sendo que

o nível mais elevado ($1,1 \mu\text{g L}^{-1}$) excede mais de 100% o limite máximo permitido pela legislação brasileira. Resultado semelhante foi relatado por Scaglioni et al. (2014), que analisaram 27 amostras de leite pasteurizado e UHT produzidos no Rio Grande do Sul e verificaram que as sete (26%) que apresentaram contaminação por AFM₁ continham níveis 100% acima do valor legislado.

Esses relatos devem constituir um alerta à saúde pública tendo em vista a elevada toxicidade da AFM₁, que está classificada no grupo 2B pela *International Agency for Research on Cancer*, ou seja, possivelmente carcinogênica para humanos (IARC, 2002), tendo a Organização Mundial de Saúde recomendado a redução dos níveis permitidos de AFM₁ ao mínimo em leite e derivados, de modo a minimizar o risco potencial que representa (López et al., 2001).

Elevada ocorrência e elevados níveis de contaminação do leite por AFM₁ também são constatadas em outros países, como por exemplo na Itália, onde Santini et al (2013) realizaram um levantamento de 73 amostras de leite na Sicília e detectaram a presença de AFM₁ em 48% das amostras, em concentrações entre $5,0$ e $16,0 \text{ ng L}^{-1}$ e na Costa Rica, em que 70 amostras de leite foram coletadas no comércio local e apresentaram contaminação por AFM₁ em 96,5%, em níveis entre $0,019$ e $0,629 \mu\text{g L}^{-1}$ (Chavarría et al, 2015).

Os níveis de contaminação das amostras apresentaram diferenças em relação as propriedades onde foram coletadas. As amostras da propriedade A apresentaram a menor média e diferiu estatisticamente das demais, com exceção da propriedade F, enquanto as demais propriedades não apresentaram diferenças entre si, conforme mostra a tabela 3.

Tabela 3. Contaminação das amostras de leite por AFM₁ considerando diferentes locais de coleta.

Propriedade	NT	NC (%)	Média ($\mu\text{g L}^{-1}$) $\pm$ DP
A	12	7 (58,3)	$0,435^b \pm 0,09$
B	3	3 (100)	$0,838^a \pm 0,2$
C	3	3 (100)	$0,713^a \pm 0,12$
D	2	2 (100)	$0,736^a \pm 0,12$
E	2	2 (100)	$0,789^a \pm 0,16$
F	1	1 (100)	$0,723^{ab} \pm 0,13$

Onde: NT= número total de amostras coletadas na propriedade; NC= número de amostras contaminadas por AFM₁. Letras iguais na mesma coluna não diferem estatisticamente segundo teste de Tukey ($p < 0,05$).

O controle das condições de armazenamento dos alimentos ingeridos pelos animais é fundamental para prevenir a contaminação do leite por AFM₁ (Rosa, 2014). As propriedades referentes aos assentamentos (B, C, D, E e F) não apresentam condições adequadas para armazenamento dos produtos, o que favorece o desenvolvimento de fungos toxigênicos e justifica a elevada ocorrência e níveis de contaminação verificados nesse trabalho.

A AFM₁ é estável, não sendo afetada por pasteurização ou tratamento por UHT (*ultra-high temperature*) (Galvano et al., 1996). Portanto, como medida de controle da contaminação do leite por AFM₁ deve-se reduzir a contaminação por AFB₁ em alimentos destinados a alimentação dos animais, principalmente através da adoção de condições ideais de temperatura e umidade durante o armazenamento desses produtos (Creppy, 2002).

A estimativa da ingestão diária (EID) de AFM₁ através do leite foi de 3 ng/pessoa para os adultos (Tabela 2), estando de acordo com a estimativa indicada pelo comitê de especialistas da FAO/OMS, que aponta que a ingestão média de AFM₁ por dia da população da América Latina é de 3,5 ng (JECFA, 2011). Para crianças, a EID determinada foi de 10 ng/pessoa, ou seja, aproximadamente três vezes maior que o consumo dos adultos, representando um sério problema à saúde pública uma vez que essa população é mais suscetível aos efeitos adversos de micotoxinas (Sylos; Rodriguez-Amaya; 1996). A capacidade de biotransformação de carcinógenos das crianças é geralmente mais lenta que em adultos, logo o efeito cumulativo de exposições repetidas, por longos períodos, a pequenas doses, é um fator preocupante (López et al., 2002).

Por ser uma substância carcinogênica, não é estabelecida uma dose diária de ingestão tolerável para a AFM₁, no entanto, na literatura há vários estudos que estimaram a ingestão dessa micotoxina. Santili et al. (2015), determinaram a EID de AFM₁ da população através da análise de contaminação do leite em diferentes regiões de São Paulo, Brasil, e determinaram valores de 0,358 e 0,120 ng para crianças e adultos, respectivamente. Outros trabalhos realizados no Brasil também determinaram valores de EID menores que os obtidos no presente estudo. Shundo et al. (2009) estimaram a ingestão diária de

AFM₁ através de dados de contaminação do leite em São Paulo, sendo o valor médio diário de 0,08 ng para adultos. Gonçalves et al. (2018), avaliaram a exposição da população à AFM₁ através de amostras de leite positivas obtidas em Rio Grande, RS, Brasil, e indicaram que a ingestão diária dos adultos é de 1,7 ng. Esses relatos com valores de ingestão diário mais baixos não devem ocasionar despreocupação, uma vez que a população está exposta a outras fontes de contaminação por AFM₁, como produtos a base de leite e produtos lácteos (Sibaja et al., 2019).

Na Colômbia, Sibaja et al. (2019) estimaram a ingestão diária de AFM₁ através de amostras de leite contaminadas em níveis maiores que os obtidos nesse trabalho, de até 8,0 e 13,0 ng para adultos e crianças, respectivamente. Outros trabalhos em diversos países determinaram a EID de AFM₁ através do leite em valores bastante variáveis, como exemplo: 0,09 ng na França (LeBlanc et al., 2005); 1,42 ng na Sérvia (Skrbic et al., 2014); 3,42 ng no Paquistão (Iqbal et al., 2017) e 0,107 ng no Irã (Nejad et al., 2019).

De acordo com Oliveira et al. (2006), para estes compostos, recomenda-se o menor grau de exposição possível, principalmente de crianças, as quais são consideravelmente mais sensíveis aos efeitos tóxicos de compostos químicos veiculados pelos alimentos.

4 Conclusão

Esse trabalho demonstrou elevada ocorrência (78,3%) de contaminação por AFM₁ no leite produzido na região Sul do Rio Grande do Sul, com níveis que variaram entre 0,34 a 1,1 $\mu\text{g L}^{-1}$ e média de 0,63 $\mu\text{g L}^{-1}$.

Apesar de não ser estabelecido um valor de ingestão tolerável para AFM₁, as doses estimadas nesse trabalho (10,0 e 3,0 ng/pessoa/dia para crianças e adultos, respectivamente) devem alertar para os riscos que essa contaminação pode acarretar a saúde da população, principalmente em relação às crianças, tendo em vista que os resultados demonstraram maiores níveis de ingestão diária por esta parte da população.

5 Referências

- Amaral, K.A.S., Nascimento, G.B., Seikiyama, B.L., Janeiro, V., JR, M., 2006. Aflatoxinas em produtos à base de milho comercializados no Brasil e riscos para a saúde humana. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 26, n.2, 336-342. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612006000200016>.
- ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC nº 07 - Dispõe sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos, 2011.
- Bruerton, K. Finding practical solutions to mycotoxins in commercial production: a nutritionist's perspective. In: ALLTECH'S 17TH ANNUAL SYMPOSIUM, 2001. Proceedings... 2001. p.161-168, 2001.
- COMUNIDADE EUROPEIA. Regulamento nº 401, 2006.
- Chavarría, G., Granados-Chinchilla, F., Alfaro-Cascante, M., Molina, A., 2015. Detection of aflatoxin M₁ in milk, cheese and sour cream samples from Costa Rica using enzyme-assisted extraction and HPLC. *Food Addit Contam Part B Surveill.* 8, 128-135. <https://doi.org/10.1080/19393210.2015.1015176>
- Creppy, E. E., 2002. Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe. *Toxicology Letters*. 127, 19-28. [https://doi.org/10.1016/S0378-4274\(01\)00479-9](https://doi.org/10.1016/S0378-4274(01)00479-9)
- Galvano, F., Galofaro, V., Galvano, G., 1996. Occurrence and Stability of Aflatoxin M₁ in Milk and Milk Products: a Worldwide Review. *J. of Food Prot.*, 59, 1079-90. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-59.10.1079>
- Gonçalves, K.D.M., Sibaja, K.V.M., Feltrin, A.C.P., Remedi, R.D., Garcia, S.O., Garda-Buffon, J., 2018. Occurrence of aflatoxins B₁ and M₁ in milk powder and UHT consumed in the city of Assomada (Cape Verde Islands) and southern Brazil. *Food Control*. 93, 160-164. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.06.010>
- Hussein, H. S., Brasel, J. M., 2001. Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. *Toxicology*. 167, 101-134. [https://doi.org/10.1016/S0300-483X\(01\)00471-1](https://doi.org/10.1016/S0300-483X(01)00471-1)
- IARC - INTERNATIONAL AGENCY OF RESEARCH ON CANCER. Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Lyon: WHO, v.82, 2002.
- IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. IBGE, Diretoria de Pesquisas, Coordenação de Agropecuária, Pesquisa da Pecuária Municipal, disponível em: <<https://www.ibge.gov.br/>>. Acesso em: 18 mar. 2019.

Iqbal, S.Z., Asi, M.R., Malik, N., 2017. The seasonal variation of aflatoxin M1 in milk and dairy products and assessment of dietary intake in Punjab, Pakistan. *Food Control*, 79, 292–296. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.04.015>

JECFA. Joint FAO/WHO expert committee on food additives. Saf eval certain mycotoxins food, n° 47, 2011. Disponível em <http://www.inchem.org/documents/jecfa/jec>, acesso em outubro de 2019.

Kwiatkowski, A.; Alves, A. P. F., 2007. Importância da detecção e do controle de aflatoxinas em alimentos. *Revista de Saúde e Biologia*.2, 44-53.

Leblanc, J. C., Tard, A., Volatier, J. L., Verger, P., 2005. Estimated dietary exposure to principal food mycotoxins from the first French total diet study. *Food Additives and Contaminants*, 22, 652–672. <https://doi.org/10.1080/02652030500159938>

López, C., Ramos, L., Ramadán, S., Bulacio, L., Perez, J., 2001. Distribution of aflatoxin M1 in cheese obtained from milk artificially contaminated. *International Journal of Food Microbiology*, 64, 211-215. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(00\)00444-X](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00444-X)

Nejad, A.S.M., Heshmati, A., Ghiasvand, T., 2019. The Occurrence and Risk Assessment of Exposure to Aflatoxin M1 in Ultra-High Temperature and Pasteurized Milk in Hamadan Province of Iran. *Osong Public health and Research Perspectives*, 10, 228-233. <https://doi.org/10.24171/j.phrp.2019.10.4.05>

Rosa, A.F., 2014. Ocorrência natural de aflatoxina M₁ e parâmetros de qualidade do leite em propriedades do Estado de São Paulo. 2014. 105p. Dissertação (Mestrado em produção animal sustentável) - Instituto de Zootecnia, Nova Odessa.

Oliveira, C.A.F., Rosmaninho, J., Rosim, R., 2006. Aflatoxin M1 and Cyclopiazonic Acid in Milk Commercially Traded in São Paulo, SP, Brazil. *Food and Additive Contaminants*, 55-59. <https://doi.org/10.1080/02652030500398379>

Santili, A.B., De Camargo, A.C., Nunes, R.S., Da Gloria, E.M., Machado, P.F., Cassoli, L.D., Calori-Domingues, M.A., 2015. Aflatoxin M1 in raw milk from different regions of São Paulo state--Brazil. *Food Addit Contam Part B Surveill*, 8, 2007-2014. <https://doi.org/10.1080/19393210.2015.1048538>

Santini, A., Raiola, A., Ferrantelli, V., Giangrosso, G., Macaluso, A., Bognanno, M., Galvano, F., Ritieni, A., 2013. Aflatoxin M₁ in raw, UHT milk and dairy products in Sicily (Italy). *Food Addit Contam Part B Surveill*. 6, 181–186. <https://doi.org/10.1080/19393210.2013.780186>

Santos, J. S., França, V.R., Katto, S., Santana, E.H., 2015. Aflatoxin M₁ in pasteurized, UHT milk and milk powder commercialized in Londrina, Brazil and estimation of exposure. *Archivos latinoamericanos de nutricion*, 65, 181–185.

Sartori, A.V., Swensson, J., De Moraes, M.H.P., Da Nóbrega, A.W. Determination of Aflatoxins M₁, M₂, B₁, B₂, G₁, and G₂ and ochratoxin A in UHT and powdered milk by modified QuEChERS method and ultra-highperformance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Food Anal Methods*. 8, 2321–2330. <https://doi.org/10.1007/s12161-015-0128-4>

Scaglioni, P.T., Algerl-Becker, T., Drunkler, D., Badiale-Furlong, E., 2014. Aflatoxin B₁ e M₁ in milk. *Analytica Chimica Acta*. 829, 68-74. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2014.04.036>

Shundo, L., Navas, S.A., Lamardo, L.C.A., Ruvieri, V., Sabino, M., 2009. Estimate of aflatoxin M₁ exposure in milk and occurrence in Brazil. *Food Control*, 20, 6550-6557. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2008.09.019>

Sibaja, K.V., Gonçalves, K.D.M., Garcia, S.O., Feltrin, A.C., Nogueira, W.V., Badiale-Furlong, E., Garda-Buffon, J., 2019. Aflatoxin M₁ and B₁ in Colombian milk powder and estimated risk exposure. *Food Additives & Contaminants: Part B*. 12, 97-104. <https://doi.org/10.1080/19393210.2019.1567611>

Skrbić, B., Zivancev, J., Antić, I., Godula, M., 2014. Levels of aflatoxina M₁ in different types of milk collected in Serbia: assessment of human and animal exposure. *Food Control*, 40, 113–119. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.11.039>

Sylos, C. M., Rodriguez-Amaya, D. B., 1996. Estudo comparativo de métodos para determinação de aflatoxina M₁. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*. 56, 87-97.

4 Conclusão

As amostras de leite cru analisadas nesse trabalho, coletadas individualmente e dos tanques de refrigeração, apresentaram elevada ocorrência de AFM₁ (94,8%), em níveis superiores ao limite máximo permitido no Brasil para presença dessa aflatoxina no leite (0,5 µg kg⁻¹). O nível mais elevado foi encontrado no inverno (1,47 µg kg⁻¹), estação em que os animais consomem mais alimentos que necessitam de armazenamento, como rações, sendo que falhas nas condições dessa etapa acarreta a contaminação dos produtos por fungos toxigênicos, possibilitando, assim, a produção de micotoxinas.

Incidência de AFB₁ foi detectada em 6,25% do total de amostras de leite, o que causa preocupação uma vez que a toxicidade é maior que a da AFM₁. Nas amostras de ração, essa aflatoxina foi detectada no período do verão, outono e inverno (1,0; 1,0 e 1,6 µg kg⁻¹), e, embora os níveis estejam dentro do permitido pela legislação brasileira, deve-se ressaltar que os animais consomem outros produtos suscetíveis à contaminação por aflatoxinas, o que justifica elevados índices de contaminação do leite por AFM₁.

As estimativas de ingestão diária de AFM₁ através dos níveis de contaminação obtidos nesse trabalho foram de 3,0 e 10,0 ng/pessoa para adultos e crianças, respectivamente. Apesar de não ser estabelecido um valor de ingestão tolerável para AFM₁, as doses estimadas nesse trabalho devem alertar para os riscos que essa contaminação pode acarretar a saúde da população, principalmente em relação às crianças, que consomem grande quantidade desse produto e apresentam maior suscetibilidade à contaminações.

Referências

- ABBAS, Hamed. **Aflatoxin and food safety**. Boca Raton: CRC Press, 2005. 616 p.
- ALBUQUERQUE, L. C. O leite em suas mãos, v.3, Juiz de Fora: Concorde Editora Gráfica, 1997.
- ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC nº 07 - Dispõe sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos, 2011.
- AMARAL, K.A.S.; NASCIMENTO, G.B.; SEIKIYAMA, B.L.; JANEIRO, V.; JR, M. Aflatoxinas em produtos à base de milho comercializados no Brasil e riscos para a saúde humana. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.26, n.2, p.336-342, 2006. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0101-20612006000200016>. Disponível em: https://www.scielo.br/scielo.php?pid=S010120612006000200016&script=sci_abstract&tlng=pt. Acesso em: 18 mai. 2018.
- ARAUJO, A.P.; OLIVEIRA, V.J.; SIQUEIRA, J.V.; MOUSQUER, C.J.; FREIRIA, L.B.; SILVA, M.R.; FERREIRA, V.B.; SILVA-FILHOS, A.S.; SANTOS, C.M. Qualidade do leite na bovinocultura leiteira. **PUBVET**, v.7, n.22, 2013. Disponível em: <https://www.pubvet.com.br/artigo/787/qualidade-do-leite-na-bovinocultura-leiteira>. Acesso em: 25 mar. 2019.
- ASGHAR, M.A.; AHMED, A.; ASGHAR, M.A. Aflatoxin M₁ in fresh milk collected from local markets of Karachi, Pakistan. **Food Addit Contam Part B**. v.11,n.3, p. 167-174, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1080/19393210.2018.1446459>. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/19393210.2018.1446459?journalCode=tfab20>. Acesso em: 21 jan. 2020.
- ASSEM, E.; MOHAMAD, A.; OULA, E. A. A survey on the occurrence of aflatoxin M₁ in raw and processed milk samples marketed in Lebanon. **Food Control**, v. 22, n. 12,p. 1856-1858, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.04.026>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0956713511001745>. Acesso em: 18 jan. 2020.
- BATTACONE, G.; NUDDA, A.; PALOMBA, A.; MAZZETTE, A.; PULINA, G. The transfer of aflatoxin M₁ in milk of ewes fed diet naturally contaminated by aflatoxins and effect of inclusion of dried yeast culture in the diet. **Journal of Dairy Science**, v. 92, n. 10, p. 4997–5004, 2009. DOI: <https://doi.org/10.3168/jds.2008-1684>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S002203020970832X>. Acesso em: 15 dez. 2018.

BECKER-ALGERI, T.A.; CASTAGNARO, D.; DE BORTOLI, K.; DE SOUZA, C.; BADIALE-FURLONG, E. Mycotoxins in Bovine Milk and Dairy Products: A Review. **J. Food Sci**, v. 8, p. 544-552, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1111/1750-3841.13204>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/1750-3841.13204>. Acesso em: 25 jun. 2019.

BECKER-ALGERI, T.A.; SOUZA, C.; BORTOLI, K.; CASTAGNARO, D.; SCAGLIONI, P.T.; DRUNKLER, D.A.; BADIALE-FURLONG, E. Seasonal variation of milk quality: Physicochemical, microbiological, and toxicological. **Journal of Food Safety**, 2020. DOI: 10.1111/jfs.12796. DOI: <https://doi.org/10.1111/jfs.12796>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/jfs.12796>. Acesso em: 24 mai. 2020.

BECKER-ALGERI. **Ação de micro-organismos probióticos na composição nutricional E nos níveis de micotoxinas em leite**. 2016. 209f. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Escola de Química e Alimentos. Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2016.

BENNETT, J.W.; KLICH, M. Mycotoxins. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 16, n. 3, p. 497–516, 2003.

BEZZERA, L.R.; MENDONÇA, M.F.F.; SILVA, L.B.; SILVA, F.R.O. Características de Produção, Composição e Contagem de Células Somáticas de Leite Bovino Ecológico e Convencional: Revisão. **Revista Agropecuária Científica no Semiárido**. v. 8, n. 1, p. 07-17, 2012.

BIEHL, M. L.; BUCK, W. B. Chemical contaminants: their metabolism and their residues. **Journal of Food and Nutrition**, v.50, p.1058-1073, 1987. DOI: <https://doi.org/10.4315/0362-028X-50.12.1058>. Disponível em: <https://meridian.allenpress.com/jfp/article/50/12/1058/104409/Chemical-Contaminants-Their-Metabolism-and-their>. Acesso em: 21 jan. 2020.

BILANDZIC, N; VARENINA, I; SOLOMUN, B. Aflatoxin M₁ in raw milk in Croatia. **Food Control**, v. 21, p. 1279–128, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2010.03.003>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0956713510000812>. Acesso em: 15 ago. 2019.

BRAGA, S. M. L. F. M.; CARDOSO, M. A. A.; MACÊDO, R. O. Micotoxinas em produtos naturais: alguns aspectos e perspectivas. **Revista Brasileira de Toxicologia**, v.15, n.1, p.53-68, 2002.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC nº 274, de 15 de outubro de 2002**. Diário Oficial da União, Brasília, 2002.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Portaria n. 07, de 09 de novembro de 1988**. Diário Oficial da União, Brasília, 1988.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Portaria nº 183 de 21 de março de 1996**. Diário oficial da União, Brasília, 1996.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº 62 de 29 de dezembro de 2011**. Diário oficial da União, Brasília, 2011.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº 76 de 26 de novembro de 2018**. Diário oficial da União, Brasília, 2018.

BRITO, Gatto Luciana et al. **Avaliação da qualidade composicional e da saúde da glândula mamária de rebanhos bovinos localizados na bacia leiteira de Ji Paraná e Rolim de Moura**. Rondônia: Embrapa, 2011. 6 p.

BRITZI, M.; FRIEDMAN, S.; MIRON, J.; SOLOMON, R.; CUNEAH, O.; SHIMSHONI, J.Á.; SOBACH, S.; ASHKENAZI, R.; ARMER, S.; SHLOSBERG, A. Carry-over of aflatoxin B₁ to aflatoxin M₁ in high yielding israeli cows in mid- and late-lactation. **Toxins**, v. 5, p.173–183, 2013. DOI: <https://doi.org/10.3390/toxins5010173>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3564076/>. Acesso em: 12 jan. 2020.

BRUERTON, K. Finding practical solutions to mycotoxins in commercial production: a nutritionist's perspective. In: **ALLTECH'S 17TH ANNUAL SYMPOSIUM, 2001**. Proceedings... 2001. p.161-168, 2001.

CALONI, F.; STAMMATI, A.; FRIGGÈ, G.; DE ANGELIS, I. Aflatoxin M₁ absorption and cytotoxicity on human intestinal *in vitro* model. **Toxicon**, v. 47, p. 409-415, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2005.12.003>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0041010105004228?via%3DIhub>. Acesso em: 08 set. 2018.

CAST - COUNCIL FOR AGRICULTURAL SCIENCE AND TECHNOLOGY. Mycotoxins: Risks in Plant, Animal and Human Systems. **Task Force Report**, n. 139, 2003.

COMUNIDADE EUROPEIA. **Regulamento nº 401**, 2006.

CHAVARRÍA, G.; GRANADOS-CHINCHILLA, F.; ALFARO-CASCANTE, M.; MOLINA, A. Detection of aflatoxin M₁ in milk, cheese and sour cream samples from Costa Rica using enzyme-assisted extraction and HPLC. **Food Addit Contam Part B Surveill**, v.8, n.2, p. 128-135, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1080/19393210.2015.1015176>. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/19393210.2015.1015176>. Acesso em: 21 jan. 2020.

CHIARADIA, M.C.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F. O estado da arte da cromatografia associada à espectrometria de massas acoplada à espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos em alimentos. **Química nova**, v.31, n.3, p. 623-636, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422008000300030>. Disponível em: https://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-40422008000300030&script=sci_abstract&tlng=pt. Acesso em: 14 fev. 2018.

CREPPY, E. E. Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe. **Toxicology Letters**, v.127, p.19-28, 2002. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0378-4274\(01\)00479-9](https://doi.org/10.1016/S0378-4274(01)00479-9). Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0378427401004799?via%3Dihub>. Acesso em: 15 jan. 2020.

EFSA. Opinion of the scientific panel on contaminants in food chain on a request from the commission related to aflatoxin B₁ as undesirable substance in animal feed. **The European Food Safety Authority Journal**, v. 39, p. 1–27, 2004.

EMBRAPA – Empresa Brasileira de pesquisa Agropecuária- Sistema de Produção de Leite (2002). Disponível em: <https://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Leite/LeiteCerrado/introducao.html>. Acesso em: 22 dez. 2019.

EMBRAPA - Empresa Brasileira de pesquisa Agropecuária - Qualidade físico-química, higiênico-sanitária e composicional do leite cru (2014). Disponível em <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/125963/1/Doc-158-leite.pdf>. Acesso em: 15 mar. de 2020.

EMBRAPA – Empresa Brasileira de pesquisa Agropecuária. ANUÁRIO leite 2018: Indicadores, tendências e oportunidades para quem vive no setor leiteiro (2018). Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1094149/anuario-leite-2018-indicadores-tendencias-e-oportunidades-para-quem-vive-no-setor-leiteiro>. Acesso em: 08 dez. 2019.

FAO - Food and Agriculture Organization (2004). Worldwide Regulations for Mycotoxins in Food and Feed in 2003. Disponível em: <http://www.fao.org/3/y5499e/y5499e00.htm>. Acesso em: 21 jan. 2020.

FERNANDES, A.M.; CORRÊA, B; ROSIM, R.E.; KOBASHIGAWA, E.; OLIVEIRA, C.A.F. Distribution and stability of aflatoxin M₁ during processing and storage of Minas Frescal cheese. **Food Control**, v.24, p.104–108, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.09.010>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956713511003653>. Acesso em: 21 jan. 2020.

FERREIRA, M. A. **Controle de qualidade físico-químico em leite fluído**. Dossiê Técnico. Serviço Brasileiro de Respostas Técnicas – SBRT. Disponível em: <http://www.sbrt.ibict.br>, 2007. Acesso em: 21 abr. 2020.

FILTENBORG, O.; FRISVAD, J.C.; THRANE, U. Moulds in food spoilage. **International Journal of Food Microbiology**, v. 33, p. 85-102, 1996.

FOOD INGREDIENTS BRASIL. **As micotoxinas**, nº7, 2009.

GOFF, D. Dairy Chemistry and Physics. In: GOFF, D. The Dairy Science and Technology eBook. [Guelph: University of Guelph, 2014]. Disponível em: <https://www.uoguelph.ca/foodscience/book-page/dairy-chemistry-and-physics>. Acesso em: 23 mar. 2020.

GOLGE, O. A survey on the occurrence of aflatoxin M₁ in raw milk produced in Adana province of Turkey. **Food Control**, v. 45, p. 150-155, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.04.039>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0956713514002369>. Acesso em 02 nov. 2018.

GALVANO, F.; GALOFARO, V.; GALVANO, G. Occurrence and Stability of Aflatoxin M₁ in Milk and Milk Products: a Worldwide Review. **J. of Food Prot.**, v.59, n.10, p.1079-90, 1996. DOI: <https://doi.org/10.4315/0362-028X-59.10.1079>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31195471/>. Acesso em: 21 jun. 2019.

GONÇALEZ, E.; PINTO, M.M.; MANGINELLI, S.; FELICIO, J. Intoxicação de vacas leiteiras por farelo de algodão na naturalmente contaminado com aflatoxinas. **Cienc Rural**, v.34, p.171–174, 2004. Disponível em: <https://www.scielo.br/pdf/cr/v34n1/a26v34n1.pdf>. Acesso em: 21 jan. 2020.

GONÇALEZ, E.; PINTO, M. M.; FELICIO, J. D. **Análise de micotoxinas no Instituto Biológico de 1989 a 1999**. Divulgação Técnica do Instituto Biológico, Centro de Sanidade Animal, São Paulo, v.63, n12, p.15-19, 2001.

GONÇALVES, K.D.M.; SIBAJA, K.V.M.; FELTRIN, A.C.P.; REMEDI, R.D.; GARCIA, S.O.; GARDA-BUFFON, J. Occurrence of aflatoxins B₁ and M₁ in milk powder and UHT consumed in the city of Assomada (Cape Verde Islands) and southern Brazil. **Food Control**, v.93, p. 160-164, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.06.010>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0956713518302998?via%3Dihub>. Acesso em: 12 dez. 2019.

GONZÁLEZ, F.H.D. (2001). Composição bioquímica do leite e hormônios da lactação. In: Uso do leite para monitorar a nutrição e o metabolismo de vacas leiteiras. Gráfica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

GOURAMA, H.; BULLERMAN, L. B. *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*: aflatoxigenic fungi of concern in foods and feeds. **Journal of Food Protection**, v.58, n.12, p.1395-1404, 1995. DOI: <https://doi.org/10.4315/0362-028X-58.12.1395>.

GUO, B.; CHEN, Z. Y.; LEE, R. D.; SCULLY, B. T. Drought stress and preharvest aflatoxin contamination in agricultural commodity: genetics, genomics and proteomics. **J. Integr. Plant Biol.**, v. 50, n. 10, p. 1281–1291, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1744-7909.2008.00739.x>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1744-7909.2008.00739.x>. Acesso em: 22 out. 2019.

GURBAY, A., SABUNCUOGLU, S.A.; GIRGIN, G.; YIGIT, S.; YURDAKOK, M.; TEKINALP. Exposure of newborns to aflatoxin M₁ and B₁ from mothers' breast milk in Ankara, Turkey. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, n.1, p. 314-319, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2009.10.016>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0278691509004773?via%3Dihub>. Acesso em: 21 jan. 2020.

HUSSEIN, H. S.; BRASEL, J. M. Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. **Toxicology**, v.167, n.2, p.101-134, 2001. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0300-483X\(01\)00471-1](https://doi.org/10.1016/S0300-483X(01)00471-1). Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0300483X01004711>. Acesso em: 14 ago. 2019.

IAMANAKA, B.T.; OLIVEIRA, I.S.; TANIWAKI, M.H. Micotoxinas em alimentos. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica**, v.7, p.138-161, 2010.

IARC - INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. Some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. **IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risk to humans**. Geneva, IARC, v. 56, p. 489-521 1993

IARC - INTERNATIONAL AGENCY OF RESEARCH ON CANCER. Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Lyon: WHO, v.82, 2002.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. IBGE, Diretoria de Pesquisas, Coordenação de Agropecuária, Pesquisa da Pecuária Municipal. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/>. Acesso em: 18 mar. 2019.

IQBAL, S.Z.; ASI, M.R.; MALIK, N. The seasonal variation of aflatoxin M₁ in milk and dairy products and assessment of dietary intake in Punjab, Pakistan. **Food Control**, v.79, p. 292–296, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.04.015>. Acesso em: 21 jan. 2020.

JAGER, A.V.; TEDESCO, M.P.; SOUTO, P.C.M.C.; OLIVEIRA, C.A.F. Assessment of aflatoxin intake in São Paulo, Brazil. **Food Control**, v.33, p. 87–92, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.02.016>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956713513000923>. Acesso em: 21 jan. 2020.

JECFA. Joint FAO/WHO expert committee on food additives. Saf eval certain mycotoxins food, n° 47, 2011. Disponível em: <http://www.inchem.org/documents/jecfa/jec>. Acesso em: 14 out. 2019.

KAMKAR, A. A study on the occurrence of aflatoxin M₁ in raw Milk produced in Sarab city of Iran. **Food Control**, v. 16, n. 7, p. 593-599, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2004.06.021>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0956713504001410>. Acesso em: 25 abr. 2019.

KRSKA, R.; WELZIG, E.; BERTHILLER, F.; MOLINELLI, A.; MIZAIKOFF, B. Advances in the analysis of mycotoxins and its quality assurance. **Food Additives and Contaminants**, v. 22, n. 4, p. 345–353, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1080/02652030500070192>. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/02652030500070192>. Acesso em: 14 abr. 2020.

KWIATKOWSKI, A.; ALVES, A. P. F. Importância da detecção e do controle de aflatoxinas em alimentos. **Revista de Saúde e Biologia**, v.2, p.44-53, 2007.

LEBLANC, J. C.; TARD, A.; VOLATIER, J. L.; VERGER, P. Estimated dietary exposure to principal food mycotoxins from the first French total diet study. **Food Additives and Contaminants**, v.22, n. 7, p. 652–672, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1080/02652030500159938>. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/02652030500159938>. Acesso em: 14 jan. 2020.

LEE, J.E.; KWAK, B.M.; AHN, J.H.; JEON, T.H. Occurrence of aflatoxin M₁ in raw milk in South Korea using an immunoaffinity column and liquid chromatography. **Food Control**, v.20, p. 136–138, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2008.03.002>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0956713508000698>. Acesso em: 30 nov. 2018.

LILLEJOH, E.B. Aflatoxins: an ecologically elicited genetic activation signal. In: Smith, JE, Henderson S. **Mycotoxins and Animal Foods**. Boca Ratón: Eds. CRC Press, 1991.

LÓPEZ, C.; RAMOS, L.; RAMADÁN, S.; BULACIO, L.; PEREZ, J. Distribution of aflatoxin M₁ in cheese obtained from milk artificially contaminated. **International Journal of Food Microbiology**, v. 64, n. 1-2, p. 211-215, 2001. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(00\)00444-X](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00444-X). Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S016816050000444X?via%3Dihub>. Acesso em: 15. Jan. 2020.

MALACHOVA, A.; Sulyok, M.; Beltrán, E.; Berthiller, F.; Krska, R. Optimization and validation of a quantitative liquid chromatography–tandem mass spectrometric method covering 295 bacterial and fungal metabolites including all regulated mycotoxins in four model food matrices. **Journal of Chromatography A**, v. 1362, p. 145-156, 2014. DOI:

<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.08.037>. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021967314012850?via%3Dihub>. Acesso em: 21 jan. 2020.

Maggon, K.K.; Gupta, S.K.; Venkitasubramanian, T.A. Biosynthesis of aflatoxins. **Bacteriology Reviews**, v41, p. 822–855, 1977.

Martins, A. M. C. V.; Rossi Jr, O. D.; Salotti, B. M.; Burger, K. P.; Cortez, A. L. L.; Cardozo, M. V. Efeito do processamento UAT (Ultra Alta Temperatura) sobre as características físico-químicas do leite. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.28, n. 2; p. 295-298, 2008. Disponível em: <https://www.scielo.br/pdf/cta/v28n2/a05v28n2.pdf>. Acesso em: 24 mar. 2019.

Masoero, F.; Gallo, A.; Moschini M.; Piva, G.; Diaz, D. Carryover of aflatoxins from feed to milk in dairy cows with low or high somatic cell counts. **Animal**, v.1, n.9, p. 1344-1350, 2007.

DOI:<https://doi.org/10.1017/S1751731107000663>. Disponível em:

<https://www.cambridge.org/core/journals/animal/article/carryover-of-aflatoxin-from-feed-to-milk-in-dairy-cows-with-low-or-high-somatic-cell-counts/304420A85FE1E489C03155F973281955>. Acesso em: 14 jan. 2020.

Massey, T.E.; Stewart, R.K.; Daniels, J.M.; Liu, L. Biochemical and molecular aspects of mammalian susceptibility to aflatoxin B₁ carcinogenicity. **Proceeding of the Society for Experimental Biology Medicine**, v.208, p.213-27, 1995. DOI: <https://doi.org/10.3181/00379727-208-43852A>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7878060/>. Acesso em: 10 jan. 2020.

Modesto, E. C.; Santos, G. T.; Damasceno, J. C.; Cecato, U.; Vilela, D.; Silva, D. C.; Souza, N. E.; Matsushita, M. Inclusão de silagem de rama de mandioca em substituição à pastagem na alimentação de vacas em lactação: produção, qualidade do leite e da gordura. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.61, n.1, p.174-181, 2009. Disponível em: <https://www.scielo.br/pdf/abmvz/v61n1/v61n1a25.pdf>. Acesso em: 21 jan. 2020.

Mohammed, S.; Munissi, J.J.E.; Nyandoro, S.S. Aflatoxins in sunflower seeds and unrefined sunflower oils from Singida, Tanzania. **Food Addit Contam Part B Surveill**, v. 11, n. 3, p. 161-166, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1080/19393210.2018.1443519>. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/19393210.2018.1443519?journalCode=tfab20>. Acesso em: 14 ago. 2019.

MOSS, M. O. Mycotoxin review: *Aspergillus* and *Penicillium*. **Mycologist**, v.16, n.3, p.116-119, 2002. DOI: [https://doi.org/10.1017/S0269-915X\(02\)00301-4](https://doi.org/10.1017/S0269-915X(02)00301-4). Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0269915X02003014>. Acesso em: 23 set. 2018.

MOTTA, T.P.; FRIZZARIN, A.; MARTINS, T.; MIRANDA, S.M.; ARCARO, J.R.P.; AMBRÓSIO, L.A.; POZZI, C.R. Estudo sobre a ocorrência de fungos e aflatoxinas B₁ na dieta de bovinos leiteiros em São Paulo. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 35, p. 23–28, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2015000100006>. Disponível em: https://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-736X2015000100023&script=sci_abstract&lng=pt. Acesso em: 28 jun. 2019.

NEAL, G. E.; EATON, D. L.; JUDAH, D. J.; VERMA, A. Metabolism and toxicity of aflatoxinas M₁ and B₁ in human-derived in vitro systems. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v.151, n.1, p.152-158, 1998. DOI: <https://doi.org/10.1006/taap.1998.8440>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0041008X9898440X?via%3Dihub>. Acesso em: 21 jan. 2020.

NEGRI, FILHO, L.C.; PINTO, D.N.A.; ROMAGNOLI, A.V.; VIEIRA, M.V.; VERONEZ, J.V.; SILVA, D.A.; RODRIGUES, S.M.; SILVA, C.B.; SANTOS, M.M.; OKANO, W. Ocorrência de micotoxicose devido à aflatoxina e desoxinivalenol em rebanho leiteiro no município de Arapongas/ PR – relato de caso. **Rev Acad Ciênc Anim**, v.15, p. 417–418, 2017. Disponível em: <https://periodicos.pucpr.br/index.php/cienciaanimal/article/view/17580/16860>. Acesso em: 24 fev. 2019.

NEJAD, A.S.M.; HESHMATI, A.; GHIASVAND, T. The Occurrence and Risk Assessment of Exposure to Aflatoxin M₁ in Ultra-High Temperature and Pasteurized Milk in Hamadan Province of Iran. **Osong Public health and Research Perspectives**, v. 10, n.4, p.228-233, 2019. DOI: <https://doi.org/10.24171/j.phrp.2019.10.4.05>. Disponível em: <https://ophrp.org/journal/view.php?doi=10.24171/j.phrp.2019.10.4.05>. Acesso em: 21jan. 2020.

NEWMAN, K. (2000) The biochemistry behind esterified glucomannans – titrating mycotoxins out of the diet. Disponível em: <https://en.engormix.com/mycotoxins/articles/finding-practical-solutions-mycotoxins-t33488>. Htm: Acesso em: 12 mar. 2018

NORDIN, N.; LUCHESE, R. H. Detecção de aflatoxina e zearalenona em milho (*Zea mays*), destinado à alimentação animal. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia dos Alimentos**, v.32, n.1, p.35-39, 1998. Disponível em: http://www.biologico.sp.gov.br/uploads/docs/arq/v76_3/almeida1.pdf. Acesso em: 21 jan. 2020.

ROSMANINHO, J.F.; OLIVEIRA, C.A.F.; REIS, T.A.; CORRÊA, B. Aflatoxin M₁ and Cyclopiazonic Acid in Milk Commercially Traded in São Paulo, SP, Brazil. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 3, p. 55-59, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1080/02652030500398379>. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/02652030500398379>. Acesso em: 24 jan. 2019.

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

OLIVEIRA, C.A.F.; SEBASTIÃO, L.S.; FAGUNDES, H.; ROSIM, R.E.; FERNANDES, A.M. Determination of aflatoxin B₁ in animal feed and aflatoxin M₁ in milk in dairy farms of São Paulo State. **Ciência e tecnologia de alimentos**, v. 30, p. 221-225, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0101-20612010000500034>. Disponível em: https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-20612010000500034. Acesso em: 14 ago. 2019.

OLIVEIRA, C.P.; SOARES, N.F.F.; OLIVEIRA, T.V.; JÚNIOR, J.C.B.; SILVA, W.A. Aflatoxin M₁ occurrence in ultra high temperature (UHT) treated fluid milk from Minas Gerais/Brazil. **Food Control**, v. 30, p. 90–92, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.07.026>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0956713512004227>. Acesso em: 21 jan. 2020.

OLIVEIRA, M.S.; ROCHA, A.; SULYO, K.M.; MALLMANN, C.A. Natural mycotoxin contamination of maize (*Zea mays* L.) in the South region of Brazil. **Food Control**, v. 73, p. 127-132, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.07.033>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956713516304030>. Acesso em: 21 jan. 2020.

OPAS - ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD. Micotoxinas, 1983. Organization, Geneva

PARK, D. L.; LIANG, B. Perspectives on aflatoxin control for human food and animal feed. **Trends in Food Science & Technology**, v.41, p.334-342, 1993. DOI: [https://doi.org/10.1016/0924-2244\(93\)90104-I](https://doi.org/10.1016/0924-2244(93)90104-I). Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/092422449390104I>. Acesso em: 23 jun. 2019.

PEI, S.C.; ZHANG, Y.Y.; EREMIN, A.S.; LEE, W.J. Detection of aflatoxina M₁ in milk products from China by ELISA using monoclonal antibodies. **Food Control**, v.20, p.1080–1085, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2009.02.004>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0956713509000450>. Acesso em: 21 jan. 2020.

PERAICA, M.; RADIC, B.; LUCIC, A.; PAVLOVIC, M. Toxic effects of mycotoxins in humans. **Bulletin of World Health Organization**, v. 77, n. 9, p. 754-766, 1999. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2557730/>. Acesso em: 02 fev. 2020.

PETTERSON, H. Carry-over of aflatoxin from feedingstuffs to milk. Swedish derogations from EC legislation in the area of feedingstuffs. Report 2. Undersirable substances and products. Stockholm: Ministry of Agriculture 23–27, 1997.

PITT, J.I.; HOCKING, A.D. Fungi and food spoilage. **London : Blackie Academic & Professional**, 1997.

PITTET, A. Natural occurrence of mycotoxins in foods and feeds – an updated review. **Revue de Médecine Vétérinaire**, v. 149, p. 479-492, 1998.

POLAN, C.E.; HAYES, J.R.; CAMPBELL, T.A. Consumption and fate of aflatoxin B₁ by lactating cows. **L Agric Food Chem**, v. 22, p.635–638, 1974. DOI: <https://doi.org/10.1021/jf60194a027>. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf60194a027>. Acesso em: 14 jan. 2020.

PRESTES, O.D.; FRIGGI, C.A.; ADAIME, M.B.; ZANELLA, R. QuEChERS - Um método moderno de preparo de amostra para determinação multirresíduo de pesticidas em alimentos por métodos cromatográficos acoplados à espectrometria de massas. **Química nova**, v.32, n.6, p.1629-1634, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422009000600046>. Disponível em: https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422009000600046. Acesso em: 21 jan. 2020.

REIS, R.L.; LEÃO, N.S.R.; SOUZA, A.F.; SILVA, G.K.; LUNA, M.A.C.; SILVA, C.A.; OKADA, K. Evaluation of biotechnological potential of *Aspergillus parasiticus* UCP 1281 in the wastewater biotreatment of dairy industry and lipids production. **E-xacta**, v.8, n.1, p.31-42, 2015.

RIDGWAY, K.; LALLJIE, S.P.D.; SMITH, R.M. Sample preparation techniques for determination of trace residues and contaminants in foods. **Journal of Chromatography A**, v.1153, n. 1, p.36-53, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.01.134>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S002196730700218X?via%3Dihub>. Acesso em: 21 jan. 2020.

RODRIGUES, A.L.; SOUZA, B.B.; PEREIRA FILHO, J.M.; MARQUES, B.A.A.; BEZZERA, L.R.; MENDONÇA, M.F.F.; SILVA, L.B.; SILVA, F.R.O. Características de Produção, Composição e Contagem de Células Somáticas de Leite Bovino Ecológico e Convencional: Revisão. **Revista Agropecuária Científica no Semiárido**. v. 8, n. 1, p. 07-17, 2012.

RORY, C.; ENDA, C.; SHANE, W. Exposure assessment of mycotoxins in dairy milk. **Food control**, v. 20, p. 239–249, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2008.05.011>. Disponível em: 21 jan. 2020.

ROSA, A.F. **Ocorrência natural de aflatoxina M₁ e parâmetros de qualidade do leite em propriedades do Estado de São Paulo**. 2014. 105p. Dissertação (Mestrado em produção animal sustentável) - Instituto de Zootecnia, Nova Odessa, 2014.

SAHIN, H.Z.; CELIK, M.; KOTAY, S.; KABAK, B. Aflatoxins in dairy cow feed, raw milk and milk products from Turkey. **Food Addit Contam Part B Surveill**, v. 9, n. 2, p. 152-158, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1080/19393210.2016.1152599>. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/19393210.2016.1152599>. Acesso em: 24 nov. 2019.

SANTILI, A.B.; DE CAMARGO, A.C.; NUNES, R.S.; DA GLORIA, E.M.; MACHADO, P.F.; CASSOLI, L.D.; CALORI-DOMINGUES, M.A. Aflatoxin M₁ in raw milk from different regions of São Paulo state--Brazil. **Food Addit Contam Part B Surveill**, v. 8, p. 2007-2014, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1080/19393210.2015.1048538>. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/19393210.2015.1048538?journalCode=tfab20>. Acesso em: 24 nov. 2019.

SANTINI, A.; RAIOLA, A.; FERRANTELLI, V.; GIANROSSO, G.; MACALUSO, A.; BOGNANNO, M.; GALVANO, F.; RITIENI, A. 2013 Aflatoxin M₁ in raw, UHT milk and dairy products in Sicily (Italy). **Food Addit Contam Part B Surveill**, v. 6, p. 181–186, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1080/19393210.2013.780186>. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/19393210.2013.780186>. Acesso em: 24 nov. 2019.

SANTOS, J. S.; FRANÇA, V.R.; KATTO, S.; SANTANA, E.H. Aflatoxin M₁ in pasteurized, UHT milk and milk powder commercialized in Londrina, Brazil and estimation of exposure. **Archivos latinoamericanos de nutrición**, v. 65, n. 3, p. 181–185, 2015. Disponível em: http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-06222015000300007. Acesso em: 21 out. 2019.

SANTOS, M.V.; FONSECA, L.F.L. **Controle da mastite e qualidade do leite: desafios e soluções**. [S.l: s.n.], 2019.

SARTORI, A.V.; SWENSSON, J.; DE MORAES, M.H.P.; DA NÓBREGA, A.W. Determination of Aflatoxins M₁, M₂, B₁, B₂, G₁, and G₂ and ochratoxin A in UHT and powdered milk by modified QuEChERS method and ultra-highperformance liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Food Anal Methods**, v. 8, p. 2321–2330, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12161-015-0128-4>. Acesso em: 21 out. 2019.

SCAGLIONI, P.T. **Impacto da aplicação de extratos fenólicos microalgais na contaminação por fungos do complexo *fusarium* e na produção de micotoxinas em campos de trigo e milho**. 2017, 163p. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Escola de Química e Alimentos. Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2017.

SCAGLIONI, P.T.; ALGERI-BECKER, T.; DRUNKLER, D.; BADIALE-FURLONG, E. Aflatoxin B₁ e M₁ em leite. **Analytica Chimica Acta**, v. 829, p. 68-74, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aca.2014.04.036>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0003267014004905?via%3Dihub>. Acesso em: 17 jun. 2018.

SCUSSEL, V.M., SOARES, L. V., SAAD, P.C. Incidência de micotoxinas em alimentos comercializados na cidade de Campinas à partir de 1980. In: ENCONTRO NACIONAL DE MICOTOXINAS, 5. São Paulo, SP. 16-18 maio, 1988. **Resumos...** São Paulo, Instituto Adolfo Lutz, 1988. p. 28.

SHIMSHONI, J.Á.; SOBACK, S.; ASHKENAZI, R.; ARMER, S.; SHLOSBERG, A. Carry-over of aflatoxin B₁ to aflatoxin M₁ in high yielding israeli cows in mid- and late-lactation. **Toxins**, v. 5, p.173–183, 2013. DOI: <https://doi.org/10.3390/toxins5010173>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3564076/>. Acesso em: 21 jan. 2020.

SHUNDO, L. Otimização da determinação de aflatoxina M₁ em leite por coluna de imunoafinidade, cromatografia em camada delgada e sua ocorrência. 2004. 74f. Dissertação (mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Infecções e Saúde Pública da Coordenação dos Institutos de Pesquisa da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, 2004.

SHUNDO, L.; NAVAS, S.A.; LAMARDO, L.C.A.; RUVIERI, V.; SABINO, M. Estimate of aflatoxin M₁ exposure in milk and occurrence in Brazil. **Food Control**, v.20, p.6550-657, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2008.09.019>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0956713508002673>. Acesso em: 21 jan. 2020.

SIBAJA, K.V.; GONÇALVES, K.D.M.; GARCIA, S.O.; FELTRIN, A.C.; NOGUEIRA, W.V.; BADIALE-FURLONG, E.; GARDA-BUFFON, J. Aflatoxin M₁ and B₁ in Colombian milk powder and estimated risk exposure. **Food Additives & Contaminants: Part B**, v. 12, n.2, p. 97-104, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1080/19393210.2019.1567611>. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/19393210.2019.1567611>. Acesso em: 20 dez. 2019.

SKRBIĆ, B.; ZIVANCEV, J.; ANTIĆ, I.; GODULA, M. Levels of aflatoxina M₁ in different types of milk collected in Serbia: assessment of human and animal exposure. **Food Control**, n. 40, p. 113–119, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.11.039>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S095671351300621X>. Acesso em: 21 jan. 2020.

SPENSLEY, P.C. Aflatoxin, the active principle in turkey "X" disease. **Endeavour**, v. 22, p. 75-79, 1963. DOI: 10.1016/0160-9327(63)90097-8. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/13990050/>. Acesso em: 24 mar. 2019.

SYLOS, C. M.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Estudo comparativo de métodos para determinação de aflatoxina M₁. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v.56, p.87-97, 1996. Disponível em: http://www.ial.sp.gov.br/resources/insituto-adolfo-lutz/publicacoes/rial/90/rial_561_1996/801.pdf. Acesso em: 24 fev. 2019.

TONON, K.M.; SAVI, G.D.; SCUSSEL, V.M. Application of a LC-MS/MS method for multi-mycotoxin analysis in infant formula and milk-based products for young children commercialized in Southern Brazil. **Journal of Environmental Science and Health Part B**, v.53, n.10, p.685-691, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1080/03601234.2018.1474560>. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/03601234.2018.1474560?journalCode=lesb20>. Acesso em: 21 jan. 2020.

UNUSAN, N. Occurrence of aflatoxin M₁ in UHT milk in Turkey. **Food and Chemical Toxicology**, v. 44, n. 11, p. 1897-1900, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2006.06.010>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0278691506001682?via%3Dihub>. Acesso em: 21 jan. 2020.

VAN EGMOND, H.P. The effect of processing on the aflatoxin M₁ content of milk and milk products. **Arch Inst. Pasteur Tunis**, v. 54, p. 381-90, 1977.

VAN EGMOND, H.P. Aflatoxins in milk. In: EATON, D.L.; GROOPMAN, J.D. ed. The Toxicology of Aflatoxins: Human Health, Veterinary and Agricultural Significance. **Academic Press**, p.365-81, 1994.

VELDMAN, V.A.; MEIJS, J.A.C.; BORGGREVE, G.J.; HEERS VAN DER TOL, J.J. Carry-over of aflatoxin from cow's food to milk. **Animal Production**, v.55, p.163-168, 1992. DOI: <https://doi.org/10.1017/S0003356100037417>. Disponível em: <https://www.cambridge.org/core/journals/animal-science/article/carryover-of-aflatoxin-from-cows-food-to-milk/D4ECDB39A930B19CFE89BC30D369EEC5>. Acesso em: 21 jan. 2020.

VOLKEL, I.; SCHROER-MERKER, E.; CZERNY, C.P. The Carry-Over of Mycotoxins in Products of Animal Origin with Special Regard to Its Implications for the European Food Safety Legislation. **Food and Nutrition Sciences**, v.2, p. 852-867, 2011. DOI: 10.4236/fns.2011.28117. Acesso em: 21 jan. 2020.

WALSTRA, P.; JENNESS, R. **Dairy chemistry and physics**. New York: John Wiley & Sons, 1984.

WHO EXPERT COMMITTEE ON FOOD ADDITIVES (2011) Safety evaluation of certain food additives and contaminants. World Health Organization, Geneva.

YOUSEF, A. E.; MARTH, E. H. Degradation of aflatoxin M₁ in milk by ultraviolet energy. **Journal of Food Protection**, v.48, p.697-698, 1985. DOI: <https://doi.org/10.4315/0362-028X-48.8.697>. Disponível em: <https://meridian.allenpress.com/jfp/article/48/8/697/195645/Degradation-of-Aflatoxin-M1-in-Milk-by-Ultraviolet>. Acesso em: 21 jan. 2020.

ZAIN, M.E. Impact of mycotoxins on humans and animals. **Journal of Saudi Chemical Society**, v. 15, p.129-144, 2011. DOI:<https://doi.org/10.1016/j.jscs.2010.06.006>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1319610310000827> .Acesso em: 24 out. 2018.

ZORZETE, P.; REIS, T.A.; FELÍCIA, J.D.; BAQUIÃO, A.C.; MAKIMOTO, P.; CORREA, B. Fungi, mycotoxins and phytoalexin in peanut varieties during plant growth in the field. **Food Chemistry**, v. 29, p. 957-964, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.05.053>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0308814611007424?via%3Dihub>. Acesso em: 20 jan. 2020.