



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE
ESCOLA DE QUÍMICA E ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO

LEITE: OCORRÊNCIA DE AFLATOXINAS B1 E M1 E O USO DA PEROXIDASE
COMO ESTRATÉGIA DE MITIGAÇÃO

KAREN VANESSA MARIMÓN SIBAJA

PROF^a. DR^a. JAQUELINE GARDA-BUFFON
Orientadora

RIO GRANDE, RS

2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE
ESCOLA DE QUÍMICA E ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE ALIMENTOS

LEITE: OCORRÊNCIA DE AFLATOXINAS B1 E M1 E O USO DA PEROXIDASE
COMO ESTRATÉGIA DE MITIGAÇÃO

KAREN VANESSA MARIMÓN SIBAJA

Tese apresentada como parte
dos requisitos para obtenção
do título de doutor em
Engenharia e Ciência de
Alimentos.

PROF^a. DR^a. JAQUELINE GARDA-BUFFON
Orientadora

RIO GRANDE, RS
2019

Ficha catalográfica

M336I Marimón Sibaja, Karen Vanessa.
Leite: ocorrência de aflatoxinas B1 e M1 e o uso da peroxidase
como estratégia de mitigação / Karen Vanessa Marimón Sibaja. –
2019.
180 f.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Rio Grande –
FURG, Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de
Alimentos, Rio Grande/RS, 2019.
Orientadora: Dra. Jaqueline Garda-Buffon.

1. Aflatoxinas 2. Peroxidase 3. Mitigação 4. Leite I. Garda-Buffon,
Jaqueline II. Título.

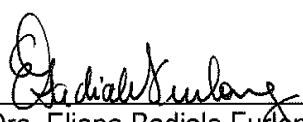
CDU 612.3:637.12

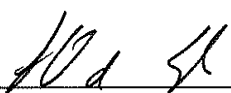
Catálogo na Fonte: Bibliotecário José Paulo dos Santos CRB 10/2344

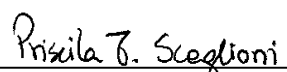
APROVAÇÃO

Tese defendida por Karen Vanessa Marimón Sibaja aprovada em 27 de fevereiro de 2019, pela Comissão Examinadora constituída pelos membros:


Profa. Dra. Jaqueline Garda Buffon - FURG


Profa. Dra. Eliana Badiale Furlong - FURG


Profa. Dra. Lucielen Oliveira dos Santos – FURG


Dra. Priscila Tessmer Scaglioni - UFPEL


Profa. Dra. Ana Carla Penteado Feltrin - Faculdades Ideau

Aos meus amáveis pais, Digna e Marco, e a minha querida irmã Grey, pelo amor e carinho diário, apoio, incentivo, pelos votos de confiança e exemplo de vida.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por todas as bênçãos que tem me proporcionado todos os dias em minha vida, e por ter me mostrado através de seus anjos o caminho certo, nos momentos difíceis.

À minha orientadora Jaqueline Garda-Buffon, pelos ensinamentos, confiança, liberdade, compreensão, pela paciência..., momentos de descontração, risadas e todo seu apoio que com certeza ajudaram no meu crescimento pessoal e profissional ao longo de todo o doutorado.

Agradeço à profe Eliana, por ser minha companhia de todos os dias, pelas conversas sem fim, amizade, conselhos, ensinamentos, risadas, caronas, puxões de orelhas... enfim profe muito obrigada por ter me acolhido como uma mais de suas filhotas e por ter tornado meus dias mais coloridos em Rio Grande. Com certeza vou sentir muitas saudades! ♥

À toda minha família que eu amo e muito..., agradeço a Pri (quem aqui a representa), pela amizade, disposição, parceria, conselhos, orientações, viagens, festas, treinos, paciência...eternamente agradecida por ter me acolhido na tua casa inúmeras vezes. Meu presente de 2016.

À toda a família LAMCA, Amiga Kelly, Anelise, Marcy, Veronica, Larine, Xicão, Elisa, Carmen, Rafaela, Eliza, Maicon, Aninha, e os meninos de iniciação científica (Dyhane, Dean e Francine) pela convivência, carinho, ajuda, momentos de descontração, companhia e pelo incentivo ao longo destes anos, em especial a nossa técnica maravilha Maristela, pela paciência de aturar todas as ‘loucurinhas’ que eu fiz. Ao Wesclen pela amizade, parceria e ajuda nas vezes que precisei. E mais que especialmente agradeço a minha neguinha que eu amo de paixão “Sabrinete” e a minha dupla fantástica, “Rafaelito e Kevincito”, irmãos que Deus me presenteou, espero que a vida nos proporcione muitos reencontros!

A Gaby por ter me recebido como companheira de apartamento no momento que mais precisei, e por todas as risadas, convivência, comidas, treinos, filmes e histórias que compartilhamos no dia a dia.

À FURG, aos professores do curso de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos.

À Organização de Estados Americanos (OEA) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de
Pessoal de nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudo.

A todos que contribuíram de alguma forma para realização desse trabalho, meus sinceros
agradecimentos.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	13
LISTA DE TABELAS	15
 CAPÍTULO I	 17
RESUMO	19
ABSTRACT	21
1 INTRODUÇÃO	23
2 OBJETIVOS	25
2.1. OBJETIVO GERAL	25
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
 CAPÍTULO II	 27
3 REVISÃO DA LITERATURA	29
3.1. LEITE: IMPORTÂNCIA NUTRICIONAL E CONTAMINAÇÃO	29
3.1.1. Pasteurização do leite	29
3.2. MICOTOXINAS	30
3.2.1. Aflatoxinas	31
3.2.2. Aflatoxinas e sua toxicidade	32
3.3. ENZIMAS	34
3.3.1. Peroxidase: características e aplicações	36
 CAPÍTULO III	 39
ARTIGO I - AVALIAÇÃO DA EXPOSIÇÃO ASSOCIADA À OCORRÊNCIA DE AFLATOXINA M1 EM LEITE E PRODUTOS LÁCTEOS DA AMÉRICA LATINA E CARIBE	41
RESUMO	43
1 INTRODUÇÃO	45
2 AFLATOXINAS	46
2.1. AFLATOXINAS NO LEITE	46
3 LEGISLAÇÃO	48
4 OCORRÊNCIA DE AFM1 NO LEITE E PRODUTOS LÁCTEOS	50
5 ESTIMATIVA DO RISCO DE EXPOSIÇÃO	54
6 CONCLUSÃO	57
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57
ARTIGO II - AFLATOXINAS M1 E B1 EM AMOSTRAS DE LEITE EM PÓ PRODUZIDAS E COMERCIALIZADAS NA COLÔMBIA: OCORRÊNCIA E RISCO DE EXPOSIÇÃO (Artigo publicado em Revista: Food Additives & Contaminants: Part B)	65

RESUMO	67
1 INTRODUÇÃO	69
2 MATERIAIS E MÉTODOS	70
2.1. AMOSTRAS DE LEITE EM PÓ.....	70
2.2. REAGENTES E PADRÃO DE MICOTOXINAS	71
2.3. ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS POR CLAE.....	71
2.3.1. Quantificação cromatográfica de AFM1 e AFB1.....	71
2.3.2. Procedimento de extração	72
2.3.3. Experimentos de validação e critérios internos de controle de qualidade..	72
2.3.4. Estimativa de exposição	74
2.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA	74
3.1. MÉTODOS ANALÍTICOS.....	75
3.2. DADOS DE EXPOSIÇÃO: OCORRÊNCIA DE AFM1 E AFB1 EM AMOSTRAS DE LEITE EM PÓ	75
3.3. ESTIMATIVA DE EXPOSIÇÃO A AFM1 A PARTIR DO CONSUMO DE LEITE EM PÓ.....	78
4 CONCLUSÃO.....	79
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	79
ARTIGO III - ENZIMAS: AÇÃO BIOLÓGICA NA DEGRADAÇÃO DE AFLATOXINAS (Artigo aceito para publicação em Revista: VETOR - Revista de Ciências Exatas e Engenharias).....	85
RESUMO	87
1 INTRODUÇÃO	89
2 AFLATOXINAS	89
3 CARACTERÍSTICAS ESTRUTURAIS E TOXICIDADE	92
4.1. BACTÉRIAS.....	93
4.2. FUNGOS	94
4.3. ENZIMAS	97
5 CONCLUSÃO.....	99
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	100
ARTIGO IV - MITIGAÇÃO DE AFLATOXINAS POR PEROXIDASE COMERCIAL E SUA APLICAÇÃO EM ALIMENTOS CONTAMINADOS (Artigo publico em Revista: Journal of Chemical Technology & Biotechnology)	109
RESUMO	111
1 INTRODUÇÃO	113
2 MATERIAIS E MÉTODOS	114
2.1. REAGENTES E AMOSTRAS	114
2.3. RECUPERAÇÃO DE AFS	115
2.4. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA	116

2.5.	MITIGAÇÃO DE AFB1 POR POD COMERCIAL	116
2.6.	CINÉTICA ENZIMÁTICA	117
2.7.	APLICABILIDADE DA POD: MITIGAÇÃO DE AFB1 EM AMOSTRAS DE LEITE	118
2.8.	ANÁLISE ESTATÍSTICA	118
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	118
3.1.	QUANTIFICAÇÃO DE AFLATOXINAS	118
3.2.	MITIGAÇÃO DE AFB1 POR AÇÃO DA POD.....	120
3.2.1.	Concentração enzimática	120
3.2.2.	Tempo de incubação	121
3.2.3.	Efeito do pH e temperatura na mitigação da AFB1 por ação da POD.....	121
3.2.4.	Cinética enzimática.....	123
3.2.5.	Aplicação de POD em alimentos	125
4	CONCLUSÃO	126
5	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	127
	ARTIGO V - PEROXIDASE COMO ESTRATÉGIA DE MITIGAÇÃO DE AFLATOXINAS EM LEITE CRU	137
	RESUMO	139
1.	INTRODUÇÃO	141
2.	MATERIAL E MÉTODOS.....	142
2.1.	LEITE	142
2.2.	REAGENTES	142
2.3.	APLICAÇÃO DE POD COMERCIAL EM LEITE CRU	143
2.4.	ANÁLISE CROMATOGRÁFICA.....	144
2.5.	EFEITO DA BIOTRANSFORMAÇÃO DE AFs POR POD NA COMPOSIÇÃO DO LEITE CRU	144
2.6.1.	Análises por RMN	145
2.6.2.	Infravermelho	145
3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	145
3.1.	EFEITO DO H ₂ O ₂ NA REAÇÃO DE MITIGAÇÃO POR POD	145
3.2.	EFEITO DE ÍONS METÁLICOS	146
3.3.	EFEITO DA MITIGAÇÃO DE AFs POR POD NA COMPOSIÇÃO DO LEITE CRU	148
4	CONCLUSÃO	150
5	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	151
	CAPÍTULO IV.....	155
	CONCLUSÃO GERAL	157

CAPÍTULO V..... 159
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 161

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO II

REVISÃO DA LITERATURA

- Figura 1** - Metabólitos resultantes da biotransformação da aflatoxina B1 no fígado..... 32
- Figura 2** - Ciclo catalítico das enzimas peroxidases mostrando as mudanças no grupo prostético heme e a possível forma de inativação da Horseradish peroxidase (HRP). As constantes k_1 , k_2 e k_3 representam a taxa de formação do composto I, taxa de redução do composto I e taxa de redução do composto II, respectivamente..... 37

CAPÍTULO III

ARTIGO IV - MITIGAÇÃO DE AFLATOXINAS POR PEROXIDASE COMERCIAL E SUA APLICAÇÃO EM ALIMENTOS CONTAMINADOS

- Figura 1** - Efeito de pH e Temperatura na mitigação de AFB1 por POD..... 123
- Figura 2** - Estrutura química e características das AFs da séries de ciclopentenona (A) e difurocumarolactona (B). Ligações coloridas indicam grupos reativos envolvidos na toxicidade das AFs. A dupla ligação que leva ao 8,9-epóxido na ativação metabólica é indicada em vermelho, enquanto a ligação lactona é indicada em azul. Tabelas mostram grupos substituintes e saturação da ligação C8-C9 em diferentes análogos de AFs..... 125

ARTIGO V - PEROXIDASE COMO ESTRATÉGIA DE MITIGAÇÃO DE AFLATOXINAS EM LEITE CRU

- Figura 1** - Espectro de RMN obtido a partir de amostra de leite cru com (azul) e sem (vermelho) tratamento com POD.....149
- Figura 2** - Espectro de RMN obtido a partir de amostra de leite cru tratada com POD..... 149
- Figura 3** - Espectro de RMN obtido a partir de amostra de leite cru tratada com POD. O espectro foi dividido em 4 partes: (A) 1. Valina 2.3-Hidroxi butirato, 3.Creatina/Fosfocreatina; (B) 4. Dimetil Sulfona C) Compostos não identificados 5. Colina/Fosfocolina (D) 6. Lactose..... 150

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO III

ARTIGO I - AVALIAÇÃO DO RISCO ASSOCIADO À OCORRÊNCIA DE AFLATOXINA M1 EM LEITE E PRODUTOS LÁCTEOS DA AMÉRICA LATINA E O CARIBE

Tabela 1 - Limites máximos permissíveis de AFM1 em leite e produtos lácteos seguidos em vários países.....	49
Tabela 2 - Ocorrência de AFM1 em leite e derivados lácteos a partir de América Latina e Caribe.....	50
Tabela 3 - Estimativa da Ingestão diária de AFM1 em países da América Latina e Caribe.....	56

ARTIGO II - AFLATOXINAS M1 E B1 EM AMOSTRAS DE LEITE EM PÓ PRODUZIDAS E COMERCIALIZADAS NA COLÔMBIA: OCORRÊNCIA E ESTIMATIVA DO RISCO DE EXPOSIÇÃO

Tabela 1 - Parâmetros de validação avaliados em CLAE-FL para aflatoxina B1 (AFB1) e aflatoxina M1 (AFM1)	75
Tabela 2 - Ocorrência de aflatoxina M1 (AFM1) em amostras leite em pó comercializadas em Colômbia.....	76
Tabela 3 - Estimativa de ingestão diária de aflatoxinas M1 (AFM1)	79

ARTIGO III - ENZIMAS: AÇÃO BIOLÓGICA NA DEGRADAÇÃO DE AFLATOXINAS

Tabela 1 - Principais características físico-químicas das AFs (Chempider).....	88
---	----

ARTIGO IV - MITIGAÇÃO DE AFLATOXINAS POR PEROXIDASE COMERCIAL E SUA APLICAÇÃO EM ALIMENTOS CONTAMINADOS

Tabela 1 - Parâmetros analíticos avaliados em CLAE-FL	119
Tabela 2 - Recuperações de aflatoxinas extraídas a partir de solução modelo e leite	119
Tabela 3 - Mitigação de AFB1 após ação da POD em solução modelo.....	120
Tabela 4 - Mitigação de AFB1 em diferentes tempos de ação da POD.....	121

ARTIGO V - PEROXIDASE COMO ESTRATÉGIA DE MITIGAÇÃO DE AFLATOXINAS EM LEITE CRU

Tabela 1 - Efeito do H ₂ O ₂ na mitigação de AFB1 e AFM1 após ação da POD em leite cru.....	146
Tabela 2 - Efeito de íons na mitigação de AFB1 e AFM1 após ação da POD em leite cru.....	147
Tabela 3 - Composição nutricional do leite cru antes e após mitigação de AFB1 e AFM1 por POD.....	148

CAPÍTULO I

RESUMO

A aflatoxina M1 (AFM1) é a micotoxina resultante da hidroxilação da aflatoxina B1 (AFB1), contaminando principalmente o leite de animais que ingeriram ração contendo sua precursora. As aflatoxinas (AFs) são tanto aguda como cronicamente tóxicas para animais e seres humanos e tem propriedades imunossupressoras, mutagênicas, teratogênicas e carcinogênicas. Logo, o leite pode representar um risco a saúde de humanos, especialmente crianças cuja exposição e sensibilidade potencialmente maior as AFs. O objetivo deste estudo foi explorar o potencial de mitigação das AFB1 e AFM1 pela ação da enzima POD visando propor seu uso como estratégia para reduzir esta contaminação em leite. Para tanto, um levantamento da ocorrência da AFM1 em leite e produtos lácteos da América Latina e Caribe reportados na literatura, assim como a estimativa do risco de exposição dessa população pela ingestão diária (ID) foi realizado. Os resultados mostraram que 70% (n=3267) e 63% (n=969) das amostras de leite e produtos lácteos analisadas nos últimos 15 anos, estavam contaminadas por AFM1, em concentrações na faixa de 0,001-23,10 $\mu\text{g L}^{-1}$ e 0,001-18,12 $\mu\text{g kg}^{-1}$, respectivamente. Além disso, os maiores valores de ID foram observados no Brasil, Costa Rica, Colômbia e México, ou seja, 0,0024, 0,0010, 0,0012 e 0,0209 $\mu\text{g kg}^{-1} \text{ mc dia}^{-1}$, respectivamente. Na sequência foi realizado um estudo em 51 amostras de leite em pó comercializadas na região Caribe da Colômbia, nas quais foi constatada a ocorrência da AFM1 em níveis variando de 0,20-1,19 $\mu\text{g kg}^{-1}$, além disso estimou-se que o nível máximo de AFM1 a ser ingerido pelo consumo de leite em pó nesta região é de 0,013 $\mu\text{g kg}^{-1} \text{ mc dia}^{-1}$, valor acima da média de consumo estimada para América Latina de acordo com o Comitê Conjunto de Especialistas da FAO/OMS (0,0058 $\mu\text{g kg}^{-1} \text{ mc dia}^{-1}$). Logo após, foi avaliado a capacidade da enzima peroxidase (POD) na redução da concentração de AFs inicialmente em solução modelo (Tampão fosfato 100 mM L^{-1}), onde foi verificado que POD (0,015 U mL^{-1}) reduz 97% de AFB1 (0,5 $\mu\text{g L}^{-1}$), na faixa de pH 7,0-8,0 e com temperaturas entre 30-40 °C, durante 8 h de incubação sob agitação orbital de 150 rpm. Nos ensaios realizados no leite cru, verificou-se 55 e 87% de mitigação das AFB1 e AFM1 respectivamente, mediante o uso de 0,0015 U de POD, 5 mM de Zn^{2+} e 0,12% de H_2O_2 , a 5 °C durante 8 h a 150 rpm. Após a mitigação o leite cru foi pasteurizado (5 s a 140 °C) visando a desnaturação da POD. Por fim, análises de RMN e citometria de fluxo, demonstraram que a qualidade do leite após a aplicação da POD não apresentou diferenças significativas ($p \geq 0,05$), quanto as suas características físico-químicas. Portanto, o emprego de POD na indústria de laticínios é uma estratégia que pode ser aplicada para mitigar o impacto das AFs em leite cru visando reduzir o risco de exposição do consumidor.

Palavras-chave: Aflatoxinas. Peroxidase. Mitigação. Leite.

MILK: AFLATOXINAS B1 E M1 OCCURRENCE AND THE USE OF PEROXIDASE AS STRATEGY OF BIOTRANSFORMATION

ABSTRACT

Aflatoxin M1 (AFM1) is the mycotoxin resulting from the hydroxylation of aflatoxin B1 (AFB1), mainly contaminating the milk of animals fed ingestion containing its precursor. Aflatoxins (AFs) are both acute and chronically toxic to animals and humans and have immunosuppressive, mutagenic, teratogenic and carcinogenic properties. Therefore, milk may pose a risk to human health, especially for children because they have a potentially higher exposure and sensitivity to AFs than adults, since milk is the main nutritional source for their development. In this context, the study aimed to reduce AFB1 and AFM1 levels in raw milk samples through the application of the peroxidase enzyme (POD) prior to the pasteurization step. Began with a survey of occurrence of AFM1 in milk and dairy products of America Latina and Caribbean, as well as the estimation of the risk of exposure of this population through daily intake (DI). The results of this study showed that 70% (n = 3267) and 63% (n = 969) of milk and milk samples analyzed during the last 15 years were contaminated by AFM1, with concentrations in the range of 0.001-23.10 $\mu\text{g L}^{-1}$ and 0.001-18.12 $\mu\text{g kg}^{-1}$, respectively. In addition, the highest DI values were obtained for the countries of Brazil, Costa Rica, Colombia and Mexico, ie 0.0024, 0.0010, 0.0012 and 0.0209 $\mu\text{g kg}^{-1} \text{bw day}^{-1}$, respectively. A study was carried out on 51 samples of milk powder marketed in the Caribbean region of Colombia, where AFM1 was observed with levels ranging from 0.20-1.19 $\mu\text{g kg}^{-1}$. In addition, it was estimated that the maximum level of AFM1 to be consumed through the consumption of milk powder in this region is 0.013 $\mu\text{g kg}^{-1} \text{bw day}^{-1}$, a value above the estimated average consumption in Latin America according to the Joint FAO/WHO (0.0058 $\mu\text{g kg}^{-1} \text{bw day}^{-1}$). Afterwards, a reduction in the concentration of AFs in the initial solution (phosphate Buffer 100 mM L^{-1}) was performed, where it was verified that POD (0.015 U mL^{-1}) reduces 97% of AFB1 (0.5 $\mu\text{g L}^{-1}$), in the range of pH 7.0-8.0 and at temperatures between 30-40 ° C, during 8.0 h of incubation under orbital shaking of 150 rpm. In the tests performed on the raw milk, 55 and 87% of the biotransformation of the AFB1 and AFM1 respectively were observed, using 0.0015 U of POD, 5 mM of Zn^{2+} and 0.012 of H_2O_2 , at 5 °C for 8 h at 150 rpm. After the biotransformation the raw milk was pasteurized (5 s 140 °C) aiming at the denaturation of the POD. Finally, NMR and flow cytometry analyzes showed that the quality of the milk after the application of POD did not show significant differences ($p \geq 0.05$), as for its physicochemical characteristics. However, the use of POD may be a strategy to mitigate the impact of AFs found in food to reduce the risk of consumer exposure.

Keywords: Aflatoxins. Biotranformation. Peroxidase. Milk.

1 INTRODUÇÃO

O leite é considerado um dos alimentos mais completos da dieta humana, pois é uma importante fonte de proteínas, lipídios, carboidratos, minerais e vitaminas, que contribuem para o desenvolvimento e manutenção da saúde humana (SHARABI; OKUN; SHPIGELMAN, 2018). No entanto, pode ser também agente causador de diversas alterações fisiológicas nos indivíduos que o consomem, por ser um alimento susceptível às mais variadas formas de contaminação, podendo ser de origem microbiológica, física e/ou química (CLAEYS et al., 2013). Dentre os possíveis contaminantes, a presença de Aflatoxinas (AFs) em leite pode ocorrer devido à ingestão de ração e/ou forragem contaminada por metabólitos de espécies fúngicas toxigênicas (FINK-GREMMELS, 2008; KAN, 2009).

A presença de AFs no leite representa grande risco para a saúde humana, em especial para crianças pelo frequente consumo e susceptibilidade à toxicidade destes compostos relacionado a efeitos imunossupressores, hepatotóxicos, carcinogênicos, teratogênicos e mutagênicos (FETAIH et al., 2014). Numerosos estudos têm demonstrado a ocorrência de AFs no leite (ASGHAR et al., 2018; GONÇALVES et al., 2018) e derivados lácteos (CHAVARRÍA et al., 2015; HASSAN et al., 2018; MOHAMMED et al., 2016). Estes enfatizam principalmente a presença de aflatoxinas M1 (AFM1) já regulamentada pela legislação internacional (EC 2006; MERCOSUL 2002). No entanto, estudos realizados por Herzallah et al. (2009), Gonçalves et al. (2018) e Scaglioni et al. (2014) relataram a presença de AFB1 em amostras de leite comercializadas na Jordânia, Cabo verde e no sul do Brasil, respectivamente, o que representa uma preocupação ainda maior, uma vez que a toxicidade da AFB1 é maior do que a da AFM1 (HUSSEIN; BRASEL, 2001; ZAIN, 2011).

Uma característica importante é a estabilidade das AFs aos tratamentos tecnológicos aos quais leites fluidos e derivados são submetidos. Em função disso, estudos têm avaliado a redução desses contaminantes em leite por diversos tratamentos. A degradação biológica de micotoxinas, empregando micro-organismos e/ou enzimas, oferece uma alternativa atraente para a eliminação ou controle de AFs, uma vez que resulta em produtos não tóxicos ou menos tóxicos mantendo o valor nutritivo e qualidade dos alimentos e rações (ADEBO; NJOBEH; MAVUMENGWANA, 2016; ALBERTS et al., 2009; SAMUEL; SIVARAMAKRISHNA; MEHTA, 2014; TAYLOR et al., 2010). Várias enzimas têm sido estudadas e identificadas na degradação destes compostos, incluindo oxidases (YEHIA, 2014), redutases (WU et al., 2015), lacases (ALBERTS et al., 2009) e peroxidases (DAS; MISHRA, 2010; FELTRIN et al., 2017; GARCIA; FELTRIN; GARDA-BUFFON, 2018; TAYLOR et al.,

2010). As peroxidases (POD) (EC 1.11.1.7) são encontradas amplamente na natureza, e devido a sua especificidade, propriedades multifuncionais e disponibilidade, sua aplicação em vários processos analíticos, industriais e bioquímicos vem sendo investigada. A POD catalisa a oxidação dos substratos orgânicos e inorgânicos utilizando peróxido de hidrogênio (VETAL; RATHOD, 2015). Estudos realizados por Doyle e Marth (1978), demonstraram a atividade da POD na degradação de AFs utilizando micélios de *Aspegillus parasiticus*, Das e Mishra (2000) comprovaram a ação da POD na degradação de AFB1 presente em farinha de amendoim, reduzindo em até 53% quando utilizada a enzima comercial. No ano de 2003, foi reportada atividade positiva da POD extraída a partir de *Pleurotus ostreatus* na degradação da AFB1 (MOTOMURA et al., 2003). Desta forma, a avaliação da ação enzimática de peroxidase na redução de AFB1 e AFM1 em leite pode contribuir com a garantia da qualidade deste produto amplamente comercializado e consumido no Brasil e no mundo.

2 OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Explorar o potencial de mitigação das AFB1 e AFM1 pela ação da enzima POD visando propor seu uso como estratégia para reduzir esta contaminação em leite.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estimar o risco da população da América Latina e Caribe associado ao consumo de AFM1 empregando de dados descritos em estudos de ocorrência desta micotoxina em amostras de leite e derivados.
- Avaliar a ocorrência de AFM1 e AFB1 em amostras de leite em pó produzidas e comercializadas na Colômbia.
- Descrever a degradação biológica de aflatoxinas pela ação de micro-organismos (bactérias e fungos) e enzimas isoladas a partir de sistemas microbianos, assim como os possíveis mecanismos de degradação.
- Padronizar as condições de ação da POD na mitigação de AFB1 em sistema modelo, considerando a concentração da enzima, tempo, pH e temperatura de reação.
- Aplicar a POD na mitigação das aflatoxinas AFB1 e AFM1 em amostras de leite cru, avaliando a qualidade nutricional do leite após a aplicação da enzima

CAPÍTULO II

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1. LEITE: IMPORTÂNCIA NUTRICIONAL E CONTAMINAÇÃO

O leite é uma fonte de nutrientes essenciais, incluindo proteínas, lipídios, carboidratos, vitaminas e minerais. É amplamente consumido em várias formas em todo o mundo e representa uma parte crucial da dieta humana (SHARABI et al., 2018). Além disso, tem aplicações industriais significativas, pois é usado para fabricar produtos lácteos e não lácteos. No entanto, o seu consumo também pode ser agente causador de diversas alterações fisiológicas nos indivíduos. Segundo Claeys et al. (2013) o elevado valor nutricional do leite, junto com seu pH neutro e a sua elevada atividade de água, faz com que este seja um excelente meio para o crescimento de diferentes micro-organismos patogênicos, tais como: toxinas microbianas (toxinas tipo B do *Clostridium botulinum*), bactérias patogênicas (*Campylobacter jejuni*, *Salmonella* spp.), vírus patogênicos (vírus da encefalite transmitida por carrapatos do complexo TBE) e parasitas patogênicos (*Cryptosporidium parvum*).

Em geral, os micro-organismos patogênicos podem contaminar o leite cru de duas maneiras: a primeira forma é uma contaminação endógena onde o leite é contaminado por transferência direta a partir do sangue (infecção sistêmica) para o leite ou através infecção no úbere chamado mastite. A segunda maneira é uma contaminação exógena, onde o leite é contaminado durante ou após a ordenha, pelas fezes, o exterior do úbere e tetas, a pele, o ambiente, entre outros (VERRAES et al., 2015).

Os riscos associados ao consumo de leite são principalmente de natureza microbiológica, no entanto o estudo da presença de resíduos e contaminantes, tais como antibióticos (QUINTANILLA et al., 2018), pesticidas (MANAV; DINÇ-ZOR; ALPDOĞAN, 2019) e micotoxinas (GONÇALVES et al., 2018), são também de grande importância devido aos efeitos adversos que podem ocasionar na saúde de humanos e de animais de criação. Dentre esses as micotoxinas têm destaque principalmente por sua presença tanto em lácteos crus como em produtos processados, já que estas são estáveis a tratamentos térmicos e a pasteurização (ASSEM et al., 2011).

3.1.1. Pasteurização do leite

A pasteurização é um tratamento térmico que aquece o leite em combinações especificadas de tempo e temperatura, com o objetivo de eliminar os micro-organismos

deteriorantes e patogênicos. Sendo um processo relativamente brando (geralmente realizado a temperatura abaixo de 100 °C), o impacto na composição do leite é mínimo (TUNICK et al., 2016). Este preserva o leite inativando enzimas e destruindo micro-organismos sensíveis ao calor, mas altera apenas ligeiramente o perfil nutritivo e as propriedades sensoriais (PEXARA; SOLOMAKOS; GOVARIS, 2018). É definido pelo Comitê do Codex Alimentarius para a Higiene Alimentar como um tratamento térmico microbicida destinado a reduzir o número de micro-organismos patogênicos no leite e produtos lácteos líquidos, se presentes, a um nível em que não constituam um risco à segurança alimentar.

Geralmente são empregados três tipos de tratamentos térmicos no leite, normalmente conhecidos pelos respectivos acrônimos em inglês, que são: LTLT baixa temperatura (62 a 63 °C) por longo intervalo (30 e 35 min); HTST alta temperatura (72 a 75 °C) por um curto intervalo (15 a 20 s); e UHT temperatura ultra alta (130 a 150 °C) por intervalo muito curto (2 a 4 s). Os dois primeiros processos classificam o leite como pasteurizados, enquanto o último como longa vida (ALEGBELEYE et al., 2018).

Após a pasteurização, o leite deve ser resfriado a temperatura de 4 °C ou inferior até o consumo. O leite longa vida por sua vez, deve ser resfriado e pode ser armazenado à temperatura ambiente. Neste âmbito, o mercado formal é majoritariamente composto por leite pasteurizado HTST e longa vida. É possível verificar se a pasteurização foi conduzida dentro das temperaturas e tempos corretos, analisando a atividade enzimática da peroxidase e fosfatase alcalina. A primeira, é uma das enzimas mais termoresistentes, logo, caso a mesma tenha sido desnaturada, há indícios de que houve excessivo tratamento térmico. Por outro lado, se comprovada a atividade enzimática da fosfatase alcalina no leite pasteurizado, há indícios de que a pasteurização não foi conduzida corretamente. Para os leites classificados como longa vida, devido a elevada temperatura empregada, ambas as atividades enzimáticas devem ser nulas (FRANCO et al., 2011).

3.2. MICOTOXINAS

As micotoxinas são metabólitos secundários produzidos por fungos, especialmente por fungos saprófitos que crescem em produtos agrícolas. Estes causam não apenas perdas econômicas, mas também representam riscos para a saúde dos seres humanos e animais, pois causam uma resposta tóxica quando são ingeridos (BHATNAGAR-MATHUR et al., 2015). *Fusarium*, *Aspergillus* e *Penicillium* são os gêneros mais abundantes que produzem

micotoxinas e contaminam alimentos e rações por meio do crescimento fúngico, antes e durante a colheita; durante o armazenamento e transporte inadequado; como também na produção, transformação e preparação de alimentos (FLORES-FLORES et al., 2015).

A exposição humana às micotoxinas ocorre diretamente através da ingestão de produtos agrícolas contaminados (cereais, milho, frutas, etc.) ou indiretamente através do consumo de produtos de origem animal (leite, ovos, etc.), preparado ou obtido a partir de animais que foram alimentados com material contaminado (SANTOS; BANDO; MACHINSKI JUNIOR, 2014). Aflatoxinas, ocratoxinas, tricotecenos, zearalenonas e as fumonisinas são os grupos de micotoxinas frequentemente detectados em gêneros alimentícios e produtos agrícolas (KUMAR et al., 2011; PEREIRA; FERNANDES; CUNHA, 2000).

3.2.1. Aflatoxinas

As aflatoxinas constituem uma importante classe de micotoxinas produzidas principalmente por espécies do gênero *Aspergillus*, incluindo *flavus* (DIENER et al., 1957), *Parasiticus* (LEONTOPOULOS; SIAFAKA; MARKAKI, 2013) e *nomius* (KURTZMAN; HORN; HESSELTINE, 1987). Os principais grupos de AFs são B e G, que se referem às suas propriedades de fluorescência, onde sob luz ultravioleta de ondas longas, as aflatoxinas B1 (AFB1) e B2 (AFB2) apresentam fluorescência azul (do inglês *blue*) e as aflatoxinas G1 (AFG1) e G2 (AFG2) apresentam fluorescência verde (do inglês *green*). Os números 1 e 2 designam a mobilidade cromatográfica, ou fator de retenção (Rt), dos compostos em placas de cromatografia em camada delgada (CCD) (BRAGA, CARDOSO; MACÊDO, 2002; GOURAMA, 1997).

As AFs são mais comumente conhecidas por causar doença hepática aguda ou crônica, mas também são consideradas imunossupressoras, hepatotóxicas, mutagênicas, teratogênicas e cancerígenas (FETAIH et al., 2014). Em animais, a exposição a AFs resulta em insuficiência hepática e ingestão de alimentos reduzida, o que também pode explicar a produção reduzida de leite em bovinos leiteiros expostos (FINK-GREMMELS, 2008). Portanto, a contaminação por micotoxinas em leite e animais não é apenas um problema de saúde humana, mas também econômico, causando perdas aos agricultores devido aos efeitos adversos das micotoxinas relacionados a baixa produtividade dos animais (GONZÁLEZ et al., 2005).

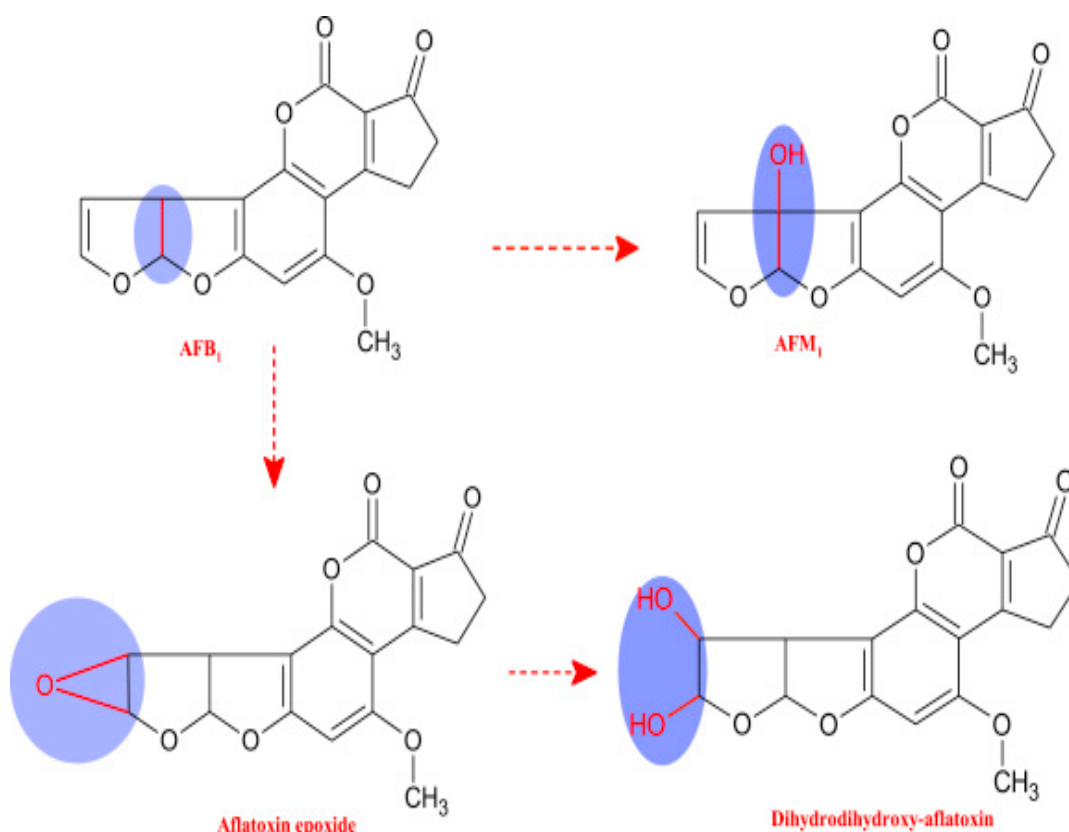
Os sintomas da aflatoxicose aguda que são normalmente observados em mamíferos incluem letargia, falta de apetite, revestimento de cabelos áspero e/ou pálido, ataxia, e fígados aumentados ou gordos (CYSEWSKI et al., 1968). Enquanto isso, os sintomas de exposição à

AFs crônica tipicamente incluem icterícia, diminuição da eficiência alimentar e da produção de leite, e perda de apetite (GAGNÉ et al., 1968). AFs também podem diminuir a resistência a doenças e interromper a imunidade induzida por vacinas (BRAGA; CARDOSO; MACÊDO, 2002).

3.2.2. Aflatoxinas e sua toxicidade

A AFB1 ingerida por mamíferos é absorvida e metabolizada a nível hepático conforme demonstra a Figura 1. Os microsossomos do sistema misto oxidase (MFO) são compostos por enzimas do citocromo P-450 e, segundo Klein et al. (2000) por 6 diferentes tipos de citocromos (citocromo P-450 1A2, 2A3, 2B7, 2K1 e 3A3/4). Estes são hemoproteínas localizadas na membrana do retículo endoplasmático dos hepatócitos e constituem parte do processo de detoxicação de xenobióticos. Estas proteínas possuem a função de converter estas moléculas em compostos mais hidrossolúveis e conjugados com o ácido glicurônico, a carbonatos e sulfatos (ROSA, 1995).

Figura 1 – Metabólitos resultantes da biotransformação da aflatoxina B1 no fígado.



Fonte: Iqbal et al. (2015)

Entretanto, durante este mesmo processo, pelo sistema enzimático, ocorre o que se chama “ativação metabólica”, onde compostos altamente reativos e nucleofílicos, com atividade tóxica semelhante à precursora AFB1 são formados. Segundo Hussein e Brasel (2001), a forma pura da AFB1 não é mutagênica e é biotransformada, sendo quatro os metabólitos formados: AFP1; AFB1 epóxido (tóxico, mutagênico e carcinogênico); aflatoxicol e AFM1 (tóxica). A AFB1 – epóxido ao se ligar com o DNA modifica sua estrutura e sua atividade biológica desencadeando os efeitos mutagênicos e carcinogênicos da AFB1. A formação de adutos ocorre pela ligação com guaninas da molécula de DNA, na posição N7, ao nível do códon 249 do gene supressor de tumores p53 (OGIDO, 2003). Esta ocorrência é característica de vários carcinomas, sobretudo hepáticos.

A AFM1 é o metabólito principal produzido pelo CYP1A2 e é comumente detectada em humanos e animais expostos a AFB1. A AFM1 é o mais carcinogênico dos metabólitos hidroxilados que demonstraram induzir tumores em trutas arco-íris e ratos (CULLEN et al., 1987). Isto é suportado pelo efeito da ligação da AFM1 ao DNA, demonstrado em ratos, camundongos e suínos, identificado como formador de um aduto de guanina N7 semelhante ao AFB1 (EGNER et al., 2003; LUTZ et al., 1980).

A AFM1 é comumente encontrada no leite de gado leiteiro e humanos, levando a muitas rotas potenciais de exposição alimentar (GIOVATI et al., 2015). A AFM1 também é excretada na urina após a exposição a AFB1 e, assim, tornou-se um biomarcador adicional da exposição da AFB1 (ROSS et al., 1992). Aproximadamente 0,3-6,2% de AFB1 é convertida em AFM1, metabolizada e excretada no leite, dependendo de fatores como a genética dos animais, variação sazonal, processo de ordenha e condições ambientais (UNUSAN, 2006). A “Agência Internacional para Pesquisa sobre o Câncer” (IARC) classificou as AFB1 e AFM1 como agentes carcinogênicos para humanos no grupo 1 (carcinogênicos para humanos) e 2B (provalvemente carcinogênicos para humanos), respectivamente (IARC, 2002). Estudos têm demonstrado que a presença de AFM1 em leite e produtos lácteos é uma questão de saúde independente da região ou país, onde cada grupo etário consome regularmente esses produtos na sua dieta diária, especialmente para crianças, os maiores consumidores e os mais susceptíveis à ação tóxica destes compostos por ser um dos principais alimentos durante os primeiros anos de vida (FLORES-FLORES et al., 2015). Além disso, pode posteriormente contaminar outros produtos lácteos, como queijo, iogurte, e gerar problemas de saúde para os consumidores.

Considerando que a AFM1 foi incluída no primeiro grupo de carcinogenicidade e que o leite e seus derivados são consumidos diariamente, a maioria dos países criaram níveis máximos de resíduos (LMR) desta toxina no leite. A legislação comum para todos os membros

do Mercado Comum do Sul (MERCOSUL) estabelece o limite máximo de $0,5 \mu\text{g kg}^{-1}$ de AFM1 em leite líquido $5 \mu\text{g kg}^{-1}$ em leite em pó (SARIMEHMETOGLU; KUPLULU; CELIK, 2004). O LMR de AFM1 no leite varia de $0,05 \mu\text{g kg}^{-1}$ na União Europeia para $0,5 \mu\text{g kg}^{-1}$ estabelecida nos Estados Unidos.

3.3. ENZIMAS

Enzimas são catalisadores biológicos que facilitam a conversão de substratos em produtos, fornecendo condições favoráveis que reduzem a energia de ativação da reação. Uma enzima pode ser uma proteína ou glicoproteína e consiste em uma cadeia polipeptídica, ao menos. As regiões da enzima que são diretamente envolvidas no processo catalítico são chamadas de sítios ativos. Uma enzima pode ter um ou mais grupos essenciais para sua atividade catalítica associadas com os sítios ativos por ligações covalentes e não covalentes. A proteína ou glicoproteína em uma determinada enzima é chamada apoenzima, enquanto que a porção não proteica é chamada grupo prostético, a combinação da apoenzima com o grupo prostético produz a holoenzima (BOM; FERRARA; CORVO, 2008; KARIGAR; RAO, 2011; LEHNINGER; NELSON; COX, 2002).

A atividade de uma enzima é expressa em unidades (U), definida como a quantidade de enzima necessária para catalisar a transformação de $1 \mu\text{mol}$ de substrato por minuto sob condições ótimas (MOTAMED; GHAEMMAGHAMI; ALEMZADEH, 2009). Esta depende muito da estrutura da proteína do número de cadeias peptídicas dessas estruturas, da natureza do substrato ou também da natureza do grupo prostético. De acordo com a classificação da Comissão de Enzimas (EC, do inglês “Enzyme Commission”) para reações bioquímicas, a cada enzima é atribuído um número de quatro dígitos.

O primeiro critério de classificação é referente ao tipo de reação catalisada: oxidoredutases compõem a classe 1, transferases a classe 2, hidrolases a classe 3, liases a classe 4, isomerases a classe 5 e ligases compreendem a classe 6. O segundo refere-se ao grupo funcional específico influenciado pela enzima. Por exemplo, 1.1 relacionado à oxidoredutases atuantes no CH-OH grupo de doadores. O terceiro nível de classificação implica nos cofatores utilizados pela enzima. Por tanto, 1.1.1 denota oxidoredutases atuantes em grupamentos CH-OH usando NAD^+ ou NADP^+ como aceptor. O quarto nível é específico para os substratos e produtos da reação. Por exemplo, a enzima 1.1.1.1 age sobre álcoois primários (HATZIMANIKATIS et al., 2004).

A velocidade da reação catalisada por uma enzima, e como ela se altera em resposta a modificações nos parâmetros experimentais são avaliados pela cinética enzimática. Com isso, há a avaliação da influência de fatores (tempo, temperatura, pH e força iônica do meio reacional, assim como a presença de ativadores ou inibidores) que podem aumentar ou diminuir a velocidade de reação. No caso do pH, as enzimas possuem em seu sítio ativo, grupos ionizados que podem sofrer alterações em pH baixo ou elevado, provocando alterações na conformação da enzima e até sua desnaturação (LEHNINGER; NELSON; COX, 2002).

As enzimas apresentam atividade máxima, temperaturas acima ou abaixo desta podem causar a inativação ou desnaturação (CAI et al., 2012). A concentração de substrato também é um fator que influencia na atividade específica das enzimas. Em concentrações consideravelmente baixas de substrato a velocidade inicial da reação aumenta com certa linearidade com o aumento do substrato. Com o aumento das concentrações de substrato, a velocidade inicial segue aumentando, porém, de maneira cada vez menor. Em determinado momento, o aumento da concentração de substrato e a velocidade inicial seguem aumentando lentamente, essa região de velocidade inicial parecida com um platô é onde a enzima está próxima a velocidade máxima ($V_{M\acute{a}x}$) (LEHNINGER; NELSON; COX, 2002).

Para determinação dos parâmetros cinéticos K_M (constante de Michaelis-Menten) e $V_{M\acute{a}x}$ deve-se manter a proporcionalidade entre taxa de reação enzimática e concentração enzimática. Concentrações muito baixas de substrato geram um modelo cinético de primeira ordem, com K_m e $V_{M\acute{a}x}$ tendendo ao infinito, enquanto que concentrações muito altas de substrato geram um modelo de ordem zero, onde se definiria $V_{M\acute{a}x}$, mas não seria possível definir K_m . O valor de K_m corresponde à concentração de substrato necessária para atingir metade da velocidade máxima enzimática. Quanto menor o valor de K_m maior é a afinidade da enzima por seu substrato (LEHNINGER; NELSON; COX, 2002).

Todos os fatores citados acima devem ser considerados e avaliados quando se trata do emprego de uma enzima em processos de descontaminação. Além disso, os parâmetros cinéticos e termodinâmicos, relacionados com o tempo e temperatura de reação, também precisam ser avaliados. Compensações de cinética e termodinâmica vêm sendo reportadas em processos de alimentos em reações químicas, físicas e biológicas. A compensação cinética de uma reação está relacionada com a velocidade de reação, energia de ativação, tempo de meia-vida e tempo de redução decimal. Krug et al. (1976) demonstraram que a propagação de erros experimentais tende a distribuir as estimativas da compensação cinética seguindo uma relação linear que se chama compensação estatística. Com relação a compensação termodinâmica, os parâmetros (entalpia, entropia e energia livre de Gibbs) referem-se a este estágio de equilíbrio

específico entre os reagentes e o estado de transição (complexo de ativação) (IBARZ; GARVÍN; IBARZ, 2017).

3.3.1. Peroxidase: características e aplicações

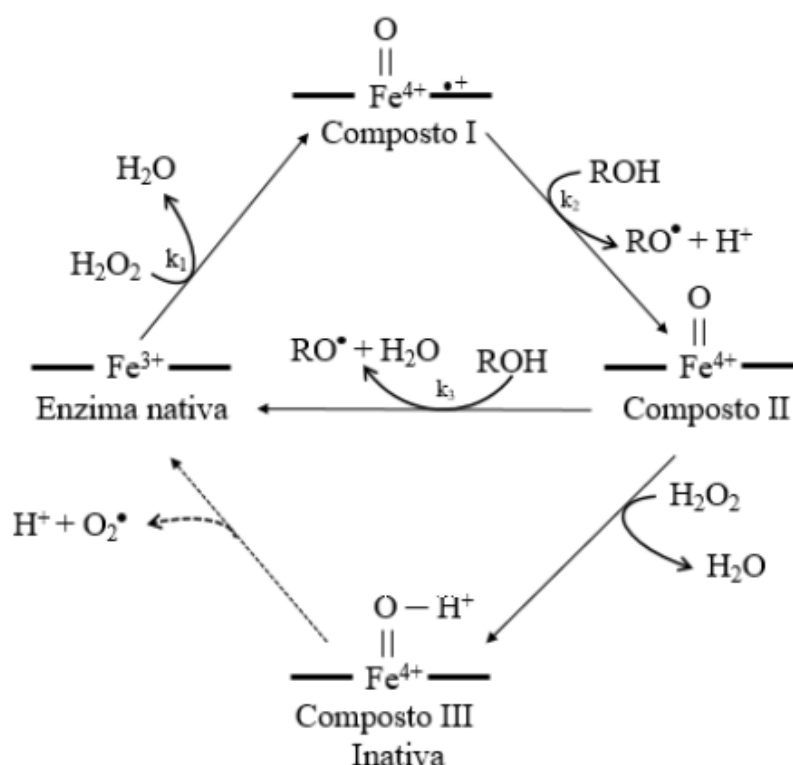
As principais classes de enzimas que vem sendo aplicadas em processos biológicos são oxidoredutases e hidrolases. As oxidoredutases clivam ligações químicas e auxiliam na transferência de elétrons de um substrato orgânico reduzido (doador) a outro composto químico (aceptor). Durante essas reações de redução e oxidação, os contaminantes são finalmente oxidados para produtos. Dentro desse grupo se encontram as peroxidases (E 1.11.1.7), que catalisam a oxidação de elétrons de uma variedade de contaminantes oxidáveis usando peróxido de hidrogênio (H_2O_2) como molécula aceptora (MATHÉ et al., 2010). Sua atividade foi identificada em plantas, micro-organismos e animais. A maioria das peroxidases estudadas são heme enzimas com grupo prostético de protoporfirina férrica IX, esse grupo heme oxida uma variedade de substratos estruturalmente diversos usando H_2O_2 , nos quais os oxidantes são reduzidos em água ou álcool. Embora a enzima catalise preferencialmente substratos com grupo fenol, ela também atua em anilinas, benzidinas e compostos heteroaromáticos por meio do ciclo catalítico típico das peroxidases (TAFAZOLI; O'BRIEN, 2005).

O ciclo catalítico de peroxidases na presença de H_2O_2 é mostrado na Figura 2, de acordo com Torres, Bustos-Jaimes e Borgne (2003) e Veitch (2004), consistindo nas seguintes etapas: (1) a enzima férrica nativa é inicialmente oxidada por H_2O_2 , gerando o composto I, deficiente em dois elétrons, sendo um elétron abstraído do íon Fe^{3+} e outro do anel porfirínico, gerando, respectivamente, Fe^{4+} e radical cátion porfirínico; (2) em seguida, o composto I oxida um substrato doador de elétron, formando o composto II, um intermediário deficiente em um elétron. Ambos, o composto I e o composto II são oxidantes fortes, com potencial de redução próximos a +1 V; (3) o composto II pode oxidar outra molécula de substrato e, com isso, a enzima retorna ao seu estado nativo.

As moléculas de substrato oxidadas (radicais fenóxi) podem, por via não enzimática, reagirem entre si com proteínas e com formaldeído formado durante a reação, para formar estruturas poliméricas insolúveis. As duas primeiras reações (enzima férrica com H_2O_2 e composto I com substrato redutor) são cerca de 10 vezes mais rápidas que a reação do composto II; (4) o composto II ainda pode reagir com H_2O_2 resultando no composto III, uma forma de peroxidase com atividade reduzida (TORRES; BUSTOS-JAIMES; BORGNE, 2003; VEITCH, 2004).

Devido à sua natureza oxidativa, há diversas áreas onde a peroxidase poderia substituir as técnicas atuais como oxidante químico (HAMID; KHALIL-UR-REHMAN, 2009). A maior parte das reações de degradação de poluentes orgânicos envolve reações de oxidação, sendo natural que o emprego de enzimas nessas reações desperte o interesse de pesquisadores. Assim, pode-se citar o potencial de degradar não apenas corantes industrialmente importantes mas também uma gama de poluentes estáveis, como fenóis e aminas aromáticas, em água e solventes orgânicos miscíveis em água, tornando-os de grande interesse para a remoção de contaminação.

Figura 2 - Ciclo catalítico das enzimas peroxidases mostrando as mudanças no grupo prostético heme e a possível forma de inativação da Horseradish peroxidase (HRP). As constantes k_1 , k_2 e k_3 representam a taxa de formação do composto I, taxa de redução do composto I e taxa de redução do composto II, respectivamente.



Fonte: Adaptado de Ely, Kempka e Skoronski (2016).

A ação da POD relacionada à degradação ou descontaminação de micotoxinas foi demonstrada por Garda-Buffon, Kupski e Badiale-Furlong (2011) durante fermentação submersa empregando os fungos *Aspergillus oryzae* e *Rhizopus oryzae* na qual foi avaliada a redução dos níveis da micotoxina deoxinivalenol (DON), os resultados mostraram que no intervalo de 48 horas de fermentação, ocorreu a maior atividade específica da enzima

peroxidase, 800 e 198 ($\Delta\text{ABS}/\text{minute} \cdot \mu\text{g} \cdot \text{protein}^{-1}$), correspondendo a maior velocidade de degradação de DON de 10,8 e 12,4 ppb/hour, respectivamente para *Rhizopus oryzae* e *Aspergillus oryzae*. O tempo de fermentação em que foi observado a maior velocidade de degradação de DON correspondeu a maior atividade da enzima POD produzida pelos micro-organismos. Em outro estudo, Feltrin et al. (2017) avaliaram a POD de *Armoracia rusticana* em solução modelo com tampão fosfato na concentração de 5 mM para redução de 55% de DON. Garcia, Feltrin e Garda-Buffon (2018) reduziram 69% de ZEA em solução modelo com POD com tampão fosfato 100 mM pH 6. Do mesmo modo, Nora (2015) utilizou as enzimas POD comercial com alto grau de purificação e a obtida de farelo de arroz para avaliar a redução dos níveis de Ocratoxina A, resultando na redução de 59 e 41%, respectivamente. Das e Mishra (2000), aplicaram peroxidase comercial de rabanete (HRP) na desintoxicação *in vitro* de AFB1, extraída a partir de *Aspergillus flavus*. As condições ótimas de reação enzimática ocorreram em solução tampão fosfato 50 mM a 20 °C, pH 6, tempo de incubação de 60 min, pressão normal, e concentração de enzima de 2 U mM⁻¹ de substrato, com resultados de 60% de redução de AFB1. Desta forma, a aplicação de POD em culturas contaminadas pode ser considerado um promissor método biológico de descontaminação.

CAPÍTULO III

**ARTIGO I - AVALIAÇÃO DA EXPOSIÇÃO ASSOCIADA À OCORRÊNCIA DE
AFLATOXINA M1 EM LEITE E PRODUTOS LÁCTEOS DA AMÉRICA LATINA E
CARIBE**

RESUMO

A aflatoxina M1 (AFM1) é um metabólito monohidroxilado da aflatoxina B1 (AFB1), secretado no leite de animais e humanos. Infelizmente, a ocorrência de aflatoxinas (AFs) no leite e produtos lácteos é quase inevitável, particularmente nos países em desenvolvimento, onde o acesso a produtos de qualidade é limitado, e as políticas necessárias para evitar a contaminação dos alimentos são escassas. Isto se torna uma grande preocupação, principalmente para os países na América Latina e Caribe, pois mesmo que em pequenas quantidades esses metabólitos podem causar graves danos à saúde humana, uma vez que a exposição a longo prazo para este tipo de produto é frequente. Com isso, um levantamento da ocorrência de AFM1 em leite e produtos lácteos da América Latina e Caribe, assim como a estimativa do risco de exposição da população por meio da ingestão diária (ID), são necessários. Os resultados desta pesquisa demonstraram que 70% (n=3267) e 63% (n=969) das amostras de leite e produtos lácteos analisadas nos últimos 15 anos, estavam contaminadas por AFM1, em concentrações na faixa de 0,001 a 23,10 $\mu\text{g L}^{-1}$ e 0,001 a 18,12 $\mu\text{g kg}^{-1}$, respectivamente. Além disso, os maiores valores de ID foram obtidos para o Brasil, Costa Rica, Colômbia e México, sendo de 2,4; 1,0; 1,2 e 20,9 ng kg^{-1} massa corporal dia^{-1} , respectivamente. Por fim, os resultados deste estudo podem servir como fonte de referência para futuros estudos realizados por instituições de pesquisa, indústrias de alimentos e agências reguladoras de saúde, para estabelecer estratégias que minimizem a contaminação por AFM1 em leite e derivados nestas regiões.

Palavras-chave: Micotoxinas. Segurança alimentar. Ingestão diária tolerável. Risco de exposição.

1 INTRODUÇÃO

A produção de leite na América Latina e Caribe, no ano 2017 foi liderada pelo Brasil (o sexto maior produtor de leite do mundo) com 34.258 toneladas, seguida pelo México (12.397 toneladas) e Argentina (10.945 toneladas) (USDOA, 2018). O setor lácteo contribui fortemente para a economia desta região, devido à produção e exportação de produtos de origem animal de alto valor nutritivo e à segurança alimentar e nutricional das comunidades urbanas e rurais. Além disso, o leite é considerado uma importante fonte de nutrição para os seres humanos, apresentando composição equilibrada em nutrientes (proteínas, cálcio, zinco, magnésio, potássio, fósforo, vitamina D e vitaminas do Complexo B), e seu consumo é recomendado em todas as etapas do desenvolvimento humano, especialmente nas etapas iniciais da vida (FLORES-FLORES et al., 2015). Os produtos lácteos em geral são comumente considerados alimentos balanceados e nutritivos, sendo frequentemente incluídos como componentes importantes de uma alimentação saudável (PEREIRA, 2014). No entanto o leite pode também ser o agente causador de diversas alterações fisiológicas nos indivíduos que o consomem; por ser veículo de contaminantes ambientais e alimentares. Dentre estes, as aflatoxinas têm destaque pela sua frequente ocorrência (GONÇALVES et al., 2018; HASSAN; Al-THANI; MIGHELI; JAOUA, 2018; IQBAL; ASI; MALIK, 2017), causando danos à saúde, principalmente para crianças e recém-nascidos, que são mais susceptíveis que os adultos aos efeitos tóxicos destes contaminantes.

A aflatoxina M1 (AFM1) é o principal metabólito hidroxilado da aflatoxina no leite de vacas leiteiras que consumiram ração contaminada com aflatoxina B1 (AFB1). Cerca de 0,3 a 6,2% da AFB1 ingerida é eliminada como AFM1 no leite (CREPPY, 2002). A Agência Internacional para Pesquisa sobre o Câncer (IARC) classificou as AFB1 e AFM1 como agentes carcinogênicos para humanos no grupo 1 e 2B, respectivamente (IARC, 2002). Battacone et al. (2003) relataram que a AFM1 pode ser encontrada no leite animal de 12 a 24 h após a primeira ingestão de AFB1, podendo ser detectada até mesmo 3 dias após a ingestão. Em humanos, também ocorre em leite de mães que amamentam e que consumiram uma dieta contaminada com AFB1 (DIAZ; SÁNCHEZ, 2015). A contaminação do leite por AFs não é apenas uma preocupação de saúde, mas também econômica, causando grandes perdas aos agricultores, devido à exposição a AFs por parte do gado leiteiro, resultando no comprometimento da função hepática dos animais e diminuição da ingestão de alimentos, fato que também poderia explicar a redução da produção leiteira. (FINK-GREMMELS, 2008a).

Neste artigo foram descritas informações sobre contaminação e incidência de AFM1 em leite e produtos lácteos bovinos da América Latina e Caribe. Além disso, considerando estes níveis de contaminação, determinou-se a estimativa do risco de exposição à AFM1 a população alvo.

2 AFLATOXINAS

As aflatoxinas (AFs) são metabólitos tóxicos produzidos principalmente pelos fungos *Aspergillus flavus*, *parasiticus* e *nomius*, que crescem especialmente em áreas com clima quente e úmido e podem ser encontradas em diversos tipos de alimentos para consumo humano e animal (FLORES-FLORES et al., 2015). Fatores como danos mecânicos, presença de dióxido de carbono e oxigênio, aplicação de pesticidas e fungicidas, variedade de plantas, infestação de insetos, tempo de colheita, condições de secagem e armazenamento, podem influenciar na produção de aflatoxinas (BRYDEN, 2012; FRISVAD, 1995; WICKLOW, 1995).

As AFs pertencem ao grupo das difuranocumarinas, a AFB1 é a mais comumente encontrada em alimentos. A exposição a AFs em humanos e animais pode ocorrer por ingestão, inalação e contato dérmico, que levam a uma ampla gama de efeitos adversos à saúde conhecidos como aflatoxicose (GIOVATI et al., 2015). Estas podem se apresentar na forma aguda ou crônica, dependendo da dose e do tempo de exposição (WILLIAMS et al., 2004). Os efeitos bioquímicos das AFs parecem ser baseados principalmente em sua bioativação para metabólitos, que podem interagir com organelas celulares e macromoléculas e induzir a modificação de processos metabólicos normais e outros processos vitais. A biotransformação pelas monooxigenases (CYP) do citocromo P450 hepático produz AFB1-8,9-epóxido, que está associada às propriedades de ligação ao DNA, propriedade relacionada à mutagenicidade e carcinogenicidade da AFB1 (BALL; COULOMBE, 1991; COULOMBE, 1993; GIOVATI et al., 2015).

2.1. AFLATOXINAS NO LEITE

A qualidade do leite e consequentemente dos produtos lácteos está diretamente relacionada com os tipos e qualidade da alimentação animal seguido do metabolismo das micotoxinas e sua posterior excreção no leite (BECKER-ALGERI et al., 2016). A excreção de micotoxinas no leite é geralmente baixa e afetada pela massa molecular e lipofilia de uma determinada micotoxina. Também é influenciado pelo gradiente de pH entre o plasma

sanguíneo e o leite, que muda de acordo com o estado de saúde do animal (KALAC, 2011; YIANNIKOURIS; JOUANY, 2002). A absorção de AFs pela glândula mamária pode ocorrer através de filtração intercelular, difusão passiva através da membrana celular ou transporte ativo (JOUANY, 2001; YIANNIKOURIS; JOUANY, 2002).

A contaminação por micotoxinas pode ser reduzida pela microbiota ruminal em animais saudáveis, reduzindo o risco de contaminação do leite (KALAC, 2011). O fluido ruminal, contendo microbiota como protozoários e bactérias do rúmen é considerado o primeiro sistema de defesa contra micotoxinas, mas é ineficaz para AFB1 (OBREMSKI et al., 2009; PRANDINI et al., 2009). No entanto, a barreira ruminal pode ser alterada por doenças dos animais, alta concentração de micotoxinas ou outras mudanças na dieta. Quando o gado, incluindo gado leiteiro, ingere AFB1 pelo consumo de ração contaminada, a micotoxina ingerida é metabolizada no fígado pela enzima citocromo P450 em vários metabólitos. Pela hidroxilação do carbono terciário do anel difuranocumarina, a AFB1 é convertida em seu principal metabólito, a AFM1 (FALETTTO et al., 1988). Devido ao grupo hidroxila, esses compostos são muito solúveis em água, permitindo sua rápida excreção através da urina, bile, fezes e leite (VAN EGMOND, 1983).

A ocorrência de AFM1 no leite é influenciada por inúmeros fatores, como espécies animais, variabilidade de indivíduos, lactação, ordenha, saúde do animal e do úbere, consumo de ração, nível de contaminação, localização geográfica e estação do ano. Portanto, a taxa de absorção de AFs e a excreção de AFM1 no leite variam entre animais, intra e entre dias e a ordenha (FINK-GREMMELS, 2008b; VIRDIS; CORGIOLU; SCARANO; PILO; DE SANTIS, 2008).

Creppy (2002) relatou que aproximadamente 0,3% a 6,2% do total de AFB1 ingerida pelos animais são geralmente transformados em AFM1 no leite. Segundo Masoero, Gallo, Moschini, Piva e Diaz (2007) a variabilidade observada na transferência de AFM1 entre animais pode estar relacionada a diferenças na atividade de degradação ruminal, na formação de aflatoxicol, no sistema de oxidação enzimática de AFB1 e na permeabilidade das glândulas mamárias. A excreção de AFM1 no leite é iniciada entre 12 a 24 horas após a ingestão de ração contaminada, atingindo altos níveis em poucos dias e desaparecendo aproximadamente 3 dias após ter sido eliminada da dieta (BATTACONE et al., 2003).

A AFM1 é termicamente resistente e não é completamente inativada pela pasteurização, esterilização ou outros processos de tratamento do leite (ASSEM et al., 2011). Embora a AFM1 seja a aflatoxina mais frequente no leite (Coffey et al., 2009), o conceito de que AFB1 é completamente convertida em AFM1 é refutado por alguns estudos. Por exemplo,

Gonçalves et al. (2018) relataram a presença de AFB1 (0,04 a 0,6 $\mu\text{g L}^{-1}$) em amostras de leite UHT do Sul do Brasil, outro estudo realizado por Scaglioni, Becker-Algeri, Drunkler e Badiale-Furlong (2014) também detectaram AFB1 em leite pasteurizado e UHT da mesma região, com média de contaminação de 1,476 e 0,690 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente. Na Jordânia, Herzallah et al. (2009) determinaram níveis de AFB1 na faixa de 0,26 a 15,23 $\mu\text{g kg}^{-1}$ em amostras de leite cru de vaca, cabra e ovelha. Como a AFB1 é mais tóxica que a AFM1 (ZAIN, 2011), a presença de AFB1 no leite também deve ser examinada. A aflatoxina M2 (AFM2), outro metabólito da AFB1, também foi investigada no leite; Sartori, Swensson de Mattos, de Moraes e da Nóbrega (2015), detectaram AFM2 em 24% das amostras de leite em pó ($> 0,08 \mu\text{g kg}^{-1}$) e em 18% das amostras de leite UHT ($> 0,009 \mu\text{g kg}^{-1}$) analisadas. Lee e Lee (2015) também relataram incidência de AFM2 em 2 e 10% das amostras de leite fluido e leite em pó coletadas de mercados comerciais em Seul, Coréia, com níveis de concentração de 20,62 e 55,67 ng kg^{-1} , respectivamente.

3 LEGISLAÇÃO

Apesar de ser difícil a remoção das AFs da dieta de humanos e animais, é possível diminuir o risco de exposição através do estabelecimento de limites regulatórios e planos oficiais de monitoramento para o controle da conformidade das matérias primas com os regulamentos, empregando métodos analíticos padronizados. Portanto, muitos países estabeleceram limites legais para o nível máximo tolerável (LMT) de AFM1 em leite e produtos lácteos (Tabela 1). Vários fatores estão envolvidos no estabelecimento do LM para micotoxinas, incluindo a disponibilidade de dados de pesquisa para os compostos tóxicos, o nível de contaminação por toxinas em várias mercadorias, assim como também os métodos de determinação do analito. A condição econômica e a situação política, como as perspectivas de negócios e a adequação da oferta de alimentos, são outros fatores que poderiam influenciar nesta determinação (ISMAIL et al., 2016).

A maioria dos países desenvolvidos estabeleceu LM para a AFM1, enquanto a maioria dos países em desenvolvimento se baseia nos limites legais estabelecidos por agências internacionais, como a Comissão do Codex Alimentarius (2001) e a Comissão Européia (2006). O limite legal para AFM1 no leite varia de 0,05 $\mu\text{g kg}^{-1}$, como adotado pela União Européia e o Codex Alimentarius, até 0,5 $\mu\text{g kg}^{-1}$, que é adotado por países como Brasil e a Sérvia. No entanto, é importante obter conhecimento adicional e extenso sobre os riscos à saúde humana relacionados à exposição de longo prazo à AFM1 mesmo em baixos níveis, fornecendo base

científica para padronizar os limites regulatórios já existentes e implementar políticas para reduzir a contaminação em países com poucos recursos.

Tabela 1 - Limites máximos permissíveis de AFM1 em leite e produtos lácteos legislados em vários países.

País	Produto	Limite máximo permitido ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
União Europeia	Leite	0,05
	Produtos Lácteos	0,05
EUA	Queijo	0,25
Itália	Alimentos para crianças	0,01
Suíça	Leite	0,05
	Whey	0,025
	Queijo	0,25
	Manteiga	0,02
	Leite em pó	0,01
Austrália	Leite	0,05
Alemanha	Leite	0,05
Bélgica	Leite	0,05
Suécia	Leite	0,05
França	Leite	0,05
	Leite para crianças <3 anos e leite em pó	0,03
Irã	Leite	0,05
	Queijo	0,20
	Manteiga	0,02
	Sorvete	0,05
China	Leite	0,50
Turquia	Leite	0,05
	Queijo	0,025
	Iogurte	0,05
Países Baixos	Manteiga	0,02
	Queijo	0,20
Brasil	Leite	0,50
	Leite em pó	5,0
	Queijo	2,5
Argentina	Leite	0,05
	Derivados de Leite	0,5
Honduras	Queijo	0,05
	Alimentos para bebês	0,25
Japão	Leite	0,50
Índia	Leite	0,50
Marrocos	Leite	0,05
	Leite em pó	0,50
Uruguai	Leite e Leite em pó	0,50
Colômbia	Leite	0,50
Mercosul	Leite	0,5
	Leite em pó	5,0

4 OCORRÊNCIA DE AFM1 NO LEITE E PRODUTOS LÁCTEOS

A ocorrência de AFM1 em leite e produtos lácteos tem sido relatada em vários países da América Latina e Caribe. Muitos destes estudos demonstram níveis de contaminação de AFM1 superiores ao LM estabelecido pela legislação da União Europeia ($0,05 \text{ ng kg}^{-1}$) (CE, 2006). No entanto, em alguns casos, os níveis reportados são inferiores aos LM estabelecidos pelas autoridades nacionais do país estudado. A Tabela 2 apresenta os estudos da ocorrência de AFM1 em leite e produtos lácteos da América Latina e Caribe nos últimos 15 anos (2003-2018). Nesta, pode ser observado o número reduzido de estudos e dados sobre a contaminação por AFM1 em países como Argentina, Peru, Equador, Venezuela, Costa Rica, El Salvador e Guatemala. Em contraste, Colômbia, México e principalmente o Brasil (44% dos estudos), mostraram o maior número de dados disponíveis sobre a ocorrência de AFM1 em leite e derivados. Isto, pode estar relacionado com o Brasil ser um dos maiores produtores de leite no mundo, e também a grande extensão deste país em relação aos países da América Latina (IBGE, 2018). Por outro lado, não foram encontrados dados sobre a ocorrência de AFM1 em leite oriundos de países da América Latina e Caribe como Uruguai, Chile, Paraguai, Bolívia, Panamá, Nicarágua, Honduras, Cuba e República Dominicana. Apesar da indústria de lácteos ter evoluído muito nos últimos anos na América Latina e Caribe no que diz respeito a produção e tecnologia, infelizmente existem poucos dados sobre a incidência de AFM1 em leite fluido, leite em pó e outros productos lácteos.

Nos últimos 15 anos, 3517 amostras de leite (leite fluido, leite em pó, leite infantil e leite materno) e 969 de derivados lácteos (iogurte, sorvete, bebida láctea, queijo parmesão, fresco, creme azedo, artesanal e queijo branco) produzidos e comercializados em países da América Latina e o Caribe, foram analisados para determinação de AFM1. Apresentando percentual de incidência e faixa de concentração de 66% e $0,001\text{-}23,10 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ para o leite e 63% e $0,001\text{-}18,12 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$ para os derivados lácteos, respectivamente. Portanto, os níveis médios de contaminação por AFM1 nas amostras de leite analisadas ($1,04 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$) estão acima do LM para AFM1 em leite estabelecido pelo Mercado Comum do Sul (MERCOSUL) ($0,5 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$) e pela Comissão Europeia ($0,05 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$) (MERCOSUL/GMC, 2002; CE, 2006). Além disso, os níveis médios de contaminação por AFM1 reportados nos derivados lácteos ($2,83 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$) também excederam o LM para AFM1 recomendado pela Comissão Europeia ($0,05 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$) (CE, 2006).

Tabela 2. Ocorrência de AFM1 em leite e derivados lácteos da América Latina e Caribe.

País	Amostras	AP/NA	I (%)	Faixa ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Media ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Referências
Argentina	Leite cru	62/160	39	0,003–0,293	0,037	(MICHLIG et al., 2016)
		68/94	64	<0,010–0,070	0,028±0,015	(ALONSO et al., 2010)
	Leite em pó	21/21	100	0,100–0,920	0,410	(GARCÍA LONDOÑO et al., 2013)
		4/5	80	0,0100–0,014	0,013±0,002	(LÓPEZ et al., 2003)
	Leite cru	6/56	11	0,012–0,030	0,016±0,007	
	Leite Pasteurizado	8/16	50	0,010–0,017	0,013±0,002	
Brasil	Leite cru	19/36	53	0,002–0,074	0,013	(PEREIRA et al., 2005)
		129/129	100	0,0002–0,106	0,020 ± 0,002	(PICININ et al., 2013)
		10/42	24	0,295–1,975	0,684	(SASSAHARA; PONTES NETTO; YANAKA, 2005)
	Leite Pasteurizado	52/52	100	0,090–3,385	NI	(GONÇALVES et al., 2017)
		35/49	71	0,040–3,670		(GONÇALVES et al., 2018)
		13/34	38	0,002–0,059	0,009	(PEREIRA et al., 2005)
		17/43	39	0,040–4,640	NI	(GONZÁLEZ et al., 2005)
		131/166	79	0,003–0,120	NI	(SHUNDO et al., 2016)
		0/82	0	<0,050	-	(SANTOS; BANDO; MACHINSKI JUNIOR, 2014)
		11/16	69	0,005–0,042	NI	(SARTORI et al., 2015)
		17/27	63	0,013–2,800	1,026	(SCAGLIONI et al., 2014)
		52/63	83	0,080–0,437	NI	(IHA et al., 2013)
	Leite UHT	30/229	13	0,300–4,600	0,300	(BECKER-ALGERI, 2016)
		133/152	87	0,002–0,121	0,020	(SILVA et al., 2015)
		23/75	31	1,000–4,100	NI	(OLIVEIRA et al., 2013)

Tabela 2. Cont. Ocorrência de AFM1 em leite e derivados lácteos da América Latina e Caribe.

Colômbia	Leite em pó	15/25	60	0,013–2,800		(GONÇALVES et al., 2018)
		9/9	100	0,100–0,810	0,34	(GARCÍA LONDOÑO et al., 2013)
		12/12	100	0,020–0,760	NI	(IHA et al., 2013)
		78/91	86	0,030–1,210		(SHUNDO et al., 2016)
		53/72	74	0,080–1,190	NI	(SARTORI et al., 2015)
		0/3	0	0	0	(SCAGLIONI et al., 2014)
	Queijo	49/58	67	0,010–0,300		
	Iogurte	50/53	72	0,010–0,529	NI	(IHA et al., 2011)
	Bebida láctea	11/12	72	0,010–0,529		
	Queijo parmesão	40/88	45	0,020–0,660	0,055	(PRADO et al., 2008)
	Leite cru	20/20	100	0,009–0,328	0,423	(VÁSQUEZ, 2006)
		40/40	100	0,097–0,110	NI	(ZAMBRANO; MARTINEZ, 2009)
		14/30	47	0,011–0,160	NI	(FRAGOSO et al., 2011)
		36/40	90	0,001–0,072	NI	(COMBITA; MILDENBERG, 2009)
	Leite integral fluido	48/48	100	0,200–1,860	NI	(HERNÁNDEZ; ABADÍA; MORENO, 2009)
	Leite pasteurizado	179/241	74	0,016–0,289	0,033	(DIAZ; ESPITIA, 2006)
	Queijos Frescos	24/24	100	0,006–0,395	NI	(ARANGUREN; ARGÜELLES, 2009)
	Leite materno	45/50	90	0,090–0,185	0,052	(DIAZ; SÁNCHEZ, 2015)
	Sorvete	7/15	47	0,050–0,500	NI	(HOYOS OSSA; HINCAPIÉ; PEÑUELA, 2015)
Costa Rica	Leite pasteurizado	67/70	96	0,019–0,629	0,135	(CHAVARRÍA et al., 2015)
	Queijo fresco	26/70	37	0,031–0,276	0,085	
	Nata	0/70	0	<0,022	–	

Tabela 2. Cont. Ocorrência de AFM1 em leite e derivados lácteos da América Latina e Caribe.

Equador	Leite cru	0/88	0	<0,500	–	(ALVARADO, 2014)
	Leite materno	9/78	11	0,014–0,028	0,032	(BAHAMÓN, 2014)
	Queijos artesanais	7/33	21	0,040–0,080	NI	(QUISIGÜÑA, 2016)
El Salvador	Leite cru	157/215	73	0,017–0,100	0,047 ± 0,005	(PENÃ-RODAS; MARTINEZ-LOPEZ; HERNANDEZ-RAUDA, 2018)
		17/24	71	0,005–0,100	0,018	(PENÃ-RODAS; MARTINEZ-LOPEZ, ÁVILA, GÓMEZ; RAUDA, 2016)
						(VELA, 2015)
Guatemala	Leite cru	10/10	100	0,012–1,030	0,203	(BERMUDEZ, 2011)
		18/18	100	0,040–0,070	0,052	(ARAGÓN, 2014)
	Queijo	84/84	100	0,001–0,001	0,001	(REYES VELÁZQUEZ et al., 2009)
México	Leite cru	32/40	80	0,006–0,065	0,023 ± 0,016	(ORTIZ MARTINEZ et al., 2016)
		NI	27	0,030–0,060	NI	(PÉREZ et al., 2008)
		6/9	67	0,400–16,200	16,200	(LANDEROS et al., 2012)
		50/50	100	0,005–0,100	0,019	(AMANDA; GARZA, 2014)
		16/51	32	LD–0,880	0,070 ± 0,154	(REYES VELÁZQUEZ et al., 2009)
		32/40	80	0,006–0,065	0,023 ± 0,016	(AMANDA; GARZA, 2014)
	Leite pasteurizado	20/20	100	LD–0,560	0,370 ± 0,130	(AMANDA; GARZA, 2014)
		79/87	91	LD–1,170	0,280 ± 0,235	(PÉREZ et al., 2008)
	Leite UHT	12/20	60	0,200–76,600	16,100	(LANDEROS et al., 2012)
		84/84	100	0,005–0,637	0,049	(AMANDA; GARZA, 2014)
	Produtos lácteos UHT	96/105	42	LD–1.290	0,430 ± 0,300	

Tabela 2. Cont. Ocorrência de AFM1 em leite e derivados lácteos da América Latina e Caribe.

	Leite Orgânico	8/15	53	0,200–23,100	23,100	(PÉREZ et al., 2008)
		27/48	57	0,051–10,000	1,845	(VEGA et al., 2013)
	Fórmula Infantil	64/110	58	LD–0,450	0,080 ± 0,086	AMANDA; GARZA, 2014)
	Leite em pó	10/15	67	LD–0,740	0,130 ± 0,190	
	Laticínios	27/33	82	LD–1,290	0,275 ± 0,240	
	Leite materno	100/112	89	0,003–0,034	0,010	(AZARIKIA; MAHDAVI; NIKNIAZ, 2018)
	Queijo	143/153	94	0,005–0,080	0,026	(ORTIZ-MARTINEZ et al., 2014)
		39/45	87	0,006–0,080	0,010	(ORTIZ-MARTINEZ et al., 2013)
		57/90	63	0,221–18,120	NI	(URBÁN et al., 2009)
	Peru Leite	0/40	0	<LD	-	(ORTIZ, 2009)
Venezuela	Leite cru e leite pasteurizado	60/60	100	NI	0,015	(MEDINA et al., 2014)
América Latina e Caribe	Leite	2320 /3517	66	0,001–23,10	1,04	Este estudo
	Derivados Lácteos	608/969	63	0,001–18,12	2,83	Este estudo

I – Incidência; NI – Não informado no estudo; AP – Amostras positivas; NA – N° de amostras; LD – Limite de detecção (dados não mostrados no estudo); Concentração em $\mu\text{g kg}^{-1}$ para produtos lácteos.

5 ESTIMATIVA DO RISCO DE EXPOSIÇÃO

Os humanos estão constantemente expostos a várias substâncias químicas perigosas que estão presentes na dieta, portanto a avaliação dos riscos à saúde associados a esta exposição é essencial para apoiar as ações do governo destinadas a garantir um suprimento seguro de alimentos para a população. De acordo com o Comitê Conjunto de Especialistas da FAO/OMS sobre Aditivos Alimentares (JECFA), o consumo médio de AFM1 é estimado em $0,058 \text{ ng kg}^{-1}$ massa corporal dia^{-1} na América latina (JECFA, 2011). Como o consumo médio de leite na América Latina é estimado em 201, 160, 141, 212, 110, 175, 60, 124 e 80 L por pessoa em 2017 para Argentina, Brasil, Colômbia, Costa Rica, Equador, El Salvador, Guatemala, México e Peru, respectivamente (IALIMENTOS, 2018). Assim, foi calculada a

ingestão diária estimada de AFM1 em ng por dia por massa corporal (mc). Para isso, foram utilizados os dados de contaminação por AFM1 em leite e produtos lácteos reportados na Tabela 2, e assumiu-se uma massa média corporal para a população da América Latina e Caribe de 68 kg, com base em dados reportados por Walpole et al. (2012). Desta forma, a ID foi estimada através da Equação 1 (WHO, 2009).

$$ID = \left(\frac{\text{Concentração da micotoxina no alimento} * \text{Consumo do alimento}}{\text{Massa corporal}} \right) \quad (1)$$

Onde: ID – Ingestão diária (ng kg^{-1} massa corporal dia^{-1}); Concentração de micotoxina no alimento – Concentração média da AFM1 encontrada no estudo (ng L^{-1}); Consumo do Alimento – Consumo diário de leite (L dia^{-1}); Massa Corporal – Massa corporal estimada da população (kg).

A Tabela 3 resume a ingestão diária (ID) de AFM1 estimada em termos de concentração mínima, média e máxima de AFM1. Os maiores valores de ID foram encontrados no Brasil, Costa Rica, Colômbia e México, ou seja, 2,4, 1,0, 1,2 e 20,9 ng kg^{-1} mc dia^{-1} , respectivamente. Isto pode ser explicado pelos altos níveis de AFM1 encontrados nas amostras de leite em grande parte dos estudos relatados nesses países. No entanto, os valores de ID calculados para todos os países da América Latina e Caribe analisados, foram superiores aos calculados pelo JECFA (2011) para América Latina (0,058 ng kg^{-1} mc dia^{-1}). Esta estimativa de ID descrita pelo JECFA (2011) foi baseada em estudos desenvolvidos entre 1990-1999, considerando dados de contaminação por AFM1 de amostras de leite (n=1167) de apenas três países latino-americanos (Brasil, Argentina e Uruguai), sendo que a maioria das amostras eram de origem Brasileira (n=1068).

Por outro lado, embora as AFs sejam consideradas genotóxicas e carcinogênicas, as agências reguladoras como o Comitê Conjunto de Especialistas da FAO/OMS sobre Aditivos Alimentares e o Comitê Científico sobre Alimentos da Comunidade Europeia não estabeleceram a ingestão diária tolerável (IDT) para AFM1. No entanto, eles concluíram que a exposição diária, mesmo abaixo de 1 ng kg^{-1} mc, contribui para o risco de câncer de fígado e recomenda que a concentração de AFs nos alimentos deve ser tão baixa quanto possível. Portanto, mesmo em países como Argentina, Colômbia, Equador, El Salvador e Guatemala, onde os valores médios de ID obtidos estava abaixo do recomendado pelo JECFA (2011), a possibilidade de contaminação crônica por AFM1 não pode ser ignorada, dado alto consumo de leite e produtos lácteos. Além disso, os valores reportados poderiam ser subestimados devido ao fato destes estarem baseados em número reduzido de dados nos poucos relatórios sobre a

contaminação por AFM1 nesses países. Consequentemente, são necessárias informações adicionais sobre as concentrações de AFM1 no leite e produtos lácteos da Argentina, Colômbia, Equador, El Salvador e Guatemala, assim como no Uruguai, Chile, Paraguai, Bolívia, Panamá, Nicarágua, Honduras, Cuba e República Dominicana na literatura, e assim obter níveis apropriados de ocorrência de AFM1 que auxiliem na estimativa da ingestão diária em cada país, bem como em toda a região da América Latina e Caribe.

Tabela 3 - Estimativa da Ingestão diária de AFM1 em países da América Latina e Caribe

País	Ingestão Mínima de AFM1 ng kg⁻¹ mc dia⁻¹	Ingestão Média de AFM1 ng kg⁻¹ mc dia⁻¹	Ingestão Máxima de AFM1 ng kg⁻¹ mc dia⁻¹
Argentina	0,2	0,7*	1,8
Brasil	0,5	2,4*	14,8
Colômbia	0,3	1,0*	2,5
Costa Rica	0,2	1,2*	9,7
Equador	0,1	0,1*	0,2
El Salvador	0,04	0,3*	0,5
Guatemala	0,002	0,60*	2,42
México	0,50	20,9*	39,8
Media Total		3,4	

*Valores acima da média da ID para AFM1 na America Latina calculada pela JECFA: Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (0,058 ng kg⁻¹ mc dia⁻¹).

O consumo diário estimado de AFM1 neste estudo foi maior (com exceção daqueles calculados para Equador e El Salvador) que os estimados para os cidadãos espanhóis, portugueses, sérvios e brasileiros relatados por Sancho et al. (2010) (0,100-0,434 ng kg⁻¹ mc dia⁻¹), Leblanc et al. (2005) (0,09-0,22 ng kg⁻¹ mc dia⁻¹) Škrbić et al. (2014) (0,50-1,42 ng kg⁻¹ mc dia⁻¹) e Shundo et al. (2009) (0,188 ng kg⁻¹ mc dia⁻¹) respectivamente. No entanto, semelhantes aos calculados por Gonçalves et al. (2018) em Rio Grande (Brasil) e para a população adulta da cidade de Assomada (Cabo Verde) (1,70 e 2,40 ng kg⁻¹ mc dia⁻¹), assim como aos encontrados por Iqbal et al. (2017) em Punjab (Paquistão) (0,47-4,7 ng kg⁻¹ mc dia⁻¹),

Zinedine et al. (2007) em Marrocos ($3,26 \text{ ng kg}^{-1} \text{ mc dia}^{-1}$), e por Kos et al. (2014) para ingestão máxima de AFM1 em crianças de 1–5 anos de idade na Sérvia (meninos, $36,8 \text{ ng kg}^{-1} \text{ mc dia}^{-1}$ e meninas, $35,8 \text{ ng kg}^{-1} \text{ mc dia}^{-1}$).

6 CONCLUSÃO

Os dados do presente estudo demonstraram que a literatura mostra poucas informações sobre a ocorrência de AFM1 em leite e produtos lácteos na maioria dos países da América Latina e Caribe. Além disso, alguns estudos relatados nesta revisão determinaram níveis de AFM1 acima dos recomendados pela União Europeia, EUA e Mercosul, o que dificulta a comercialização de produtos no mercado internacional. A presença de AFM1 no leite e nos produtos lácteos representa uma preocupação mundial, uma vez que mesmo pequenas quantidades desse metabólito podem apresentar risco de exposição a longo prazo. Fato que demonstra a importância do controle da qualidade da ração animal para os animais lactantes, a fim de evitar a transformação de AFB1 em AFM1, e aumenta a conscientização sobre boas práticas na cadeia produtiva da nutrição animal.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALONSO, V. A.; MONGE, M. P.; LARRIESTRA, A.; DALCERO, A. M.; CAVAGLIERI, L. R.; CHIACCHIERA, S. M. Naturally occurring aflatoxin M1 in raw bulk milk from farm cooling tanks in Argentina. **Food Additives and Contaminants - Part A**, v. 27, n. 3, p.373–379, 2010.
- ARAGÓN, S.A. **Determinación de la presencia de aflatoxina M1 por el método de Elisa en queso seco y oreado que se expende en 5 mercados municipales de la ciudad capital**. 2014. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Medicina Veterinária) – Universidad de San Carlos de Guatemala, 2014.
- ARANGUREN, E. M.; ARGÜELLES, M. J. **Detección de Aflatoxina M1 en Quesos Frescos Comercializados en el Municipio de Yopal, Casanare, Mediante la Técnica de Elisa**. 2009. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Microbiologia Industrial) – Universidad Javeriana, Bogotá, 2009.
- 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, p.1856-1858, 2011.
- AZARIKIA, M.; MAHDAVI, R.; NIKNIAZ, L. Occurrence and dietary factors associated with the presence of aflatoxin B1 and M1 in breast milk of nursing mothers in Iran. **Food Control**, v. 86, p. 207–213, 2018.

BALL, R. W.; COULOMBE, R. A. Comparative Biotransformation of Aflatoxin-B1 in Mammalian Airway Epithelium. **Carcinogenesis**, v. 12, n. 2, p. 305–310, 1991.

BATTACONE, G.; NUDDA, A.; CANNAS, A.; BORLINO, A. C.; BOMBOI, G.; PULINA, G. Excretion of Aflatoxin M1 in Milk of Dairy Ewes Treated with Different Doses of Aflatoxin B1. **Journal of Dairy Science**, v. 86, n. 8, p. 2667–2675, 1 Aug. 2003.

BECKER-ALGERI, T. A.; CASTAGNARO, D.; DE BORTOLI, K.; DE SOUZA, C.; DRUNKLER, D. A.; BADIALE-FURLONG, E. Mycotoxins in Bovine Milk and Dairy Products: A Review. **Journal of Food Science**, v.81, n. 03, p. 544-552, 2016.

BERMUDEZ, R. **Determinación de la presencia de aflatoxina M1 en leche cruda proveniente de explotaciones lecheras asociadas a COOPROLECHE en la región de la costa sur de Guatemala**. 2011.134 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Medicina Veterinaria y Zootecnia) - Universidad de San Carlos de Guatemala, San Carlos, 2011.

BHAT, R.; RAI, R. V.; KARIM, A. A. Mycotoxins in Food and Feed: Present Status and Future Concerns. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 9, n. 1, p. 57–81, 2010.

BRYDEN, W. L. Mycotoxin Contamination of the Feed Supply Chain: Implications for Animal Productivity and Feed Security. **Animal Feed Science and Technology**, v. 173, n. 1–2, p. 134–158, 20 Apr. 2012.

CANO-SANCHO, G.; MARIN, S.; RAMOS, A. J.; PERIS-VICENTE, J.; SANCHIS, V. Incidencia de Aflatoxina M1 y Evaluación de La Exposición En Cataluña (España). **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 27, n. 3, p. 130–135, 2010.

CAPRIOTTI, A.L.; CARUSO, G.; CAVALIERE, C.; FOGLIA, P.; SAMPERI, R.; LAGANÀ, A. Multiclass Mycotoxin Analysis in Food, Environmental and Biological Matrices with Chromatography/mass Spectrometry. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 31, n. 4, p. 466–503, Jul. 2012.

Codex Alimentarius Commissions. (2001). Comments submitted on the draft maximum level for aflatoxin M1 in milk. Hauge, The Netherlands: Codex Committee on Food Additives and Contaminants, 33rd sessions.

COFFEY, R.; CUMMINS, E.; WARD, S. Exposure assessment of mycotoxins in dairy milk. **Food Control**, v. 20, p. 239-249, 2009.

COMBITA, A. del pilar; MILDENBERG, S. **Detección de aflatoxina M1 en leches frescas comercializadas en la zona del valle del cauca (Colombia) mediante la técnica de Elisa**. 2009. 78 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Medicina Veterinaria) - Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, 2009.

COULOMBE, R.A. Biological Action of Mycotoxins. **Journal of dairy science**, v. 76, n. 3, p. 880–91, 1993.

CREPPY, E. E. Update of Survey, Regulation and Toxic Effects of Mycotoxins in Europe. **Toxicology Letters**, v. 127, n. 1–3, p. 19–28, 2002.

DIAZ, G. J.; ESPITIA, E. Occurrence of aflatoxin M1 in retail milk samples from Bogotá, Colombia. **Food Additives and Contaminants**, v. 23, n. 8, p. 811–815, 2006.

DIAZ, G. J.; SÁNCHEZ, M. P. Determination of Aflatoxin M1 in Breast Milk as a Biomarker of Maternal and Infant Exposure in Colombia. **Food Additives & Contaminants: Part A**, v. 49, p.37–41, 2015.

European Commission. (2006). Commission Regulation (EC) 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. Official Journal of the European Union, L364, 5-24.

FALETTTO, M.B.; KOSER, P.L.; BATTULA, N; TOWNSEND, G.K., MACCUBBIN, A.E., GELBION, H.V. Cytochrome P3-450 cDNA encodes aflatoxin B1 hydroxylase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 263, p. 12187-12189, 1988.

FINK-GREMMELS, J. Mycotoxins in Cattle Feeds and Carry-over to Dairy Milk. **Food Additives and Contaminants**, v. 25, n. 2, p. 172–180, 2008a.

FINK-GREMMELS, J. The Role of Mycotoxins in the Health and Performance of Dairy Cows. **The Veterinary Journal**, v. 176, n. 1, p. 84–92, 2008b.

FLORES-FLORES, M. E.; LIZARRAGA, E.; LÓPEZ DE CERAIN, A.; GONZÁLEZ-PEÑAS, E. Presence of Mycotoxins in Animal Milk: A Review. **Food Control**, v. 53, p. 163–176, 2015.

FRAGOSO, E.; DAVID, T.; ROMERO, S.; OSPINO, H. Determination of aflatoxin M1 in raw milk by HPLC marker as evidence of cattle- food storage conditions from the herd suppliers of a dairy company in the city of Valledupar. Disponível em: <https://pdfs.semanticscholar.org/ce69/a8b36bc9a2e9868c152a2f9d011f43a097af.pdf>. Acesso em Novembro 2017.

FRISVAD, J.C., 1995. Mycotoxins and mycotoxigenic fungi in storage. In: Jayas, D.S., White, N.D.G., Muir, W.E. (Eds.), *Stored-Grain Ecosystems*. Marcel Dekker, Inc, New York, pp. 251–288.

GARCÍA LONDOÑO, V.A; BOASSO, A.C; de PAULA, M.C.; GARCIA, L.P.; SCUSSEL, V.M.; RESNIK, S.; PACÍN, A. Aflatoxin M1 survey on randomly collected milk powder commercialized in Argentina and Brazil. **Food Control**, v. 34, n. 2, p. 752–755, 2013.

AMANDA, P.; GARZA, Q. **Ocurrencia y estimación de la exposición humana a aflatoxina M1 en muestras de leche procedentes de Monterrey (México)**. 2014. 103 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidad Autonoma de Barcelona, Barcelona, 2014.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. Gateway to dairy production and products: Dairy animals. Disponível em: <<http://www.fao.org/dairy-production-products/production/dairy-animals/en/>>. Acesso em Março 2018.

GIOVATI, L.; MAGLIANI, W.; CIOCIOLA, T.; SANTINOLI, C.; CONTI, S.; POLONELLI, L. AFM1 in Milk: Physical, Biological, and Prophylactic Methods to Mitigate Contamination. **Toxins**, v. 7, n. 10, p. 4330–4349, 2015.

GONÇALVES, K. D. M.; MARIMON, K. V. M.; FELTRIN, A. C. P.; REMEDI, R. D.; DE OLIVEIRA GARCIA, S.; 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. 260–264, 2018.

GONÇALVES, L.; DALLA ROSA, A.; GONZALES, S.; FELTES, M.M., BADIALE-FURLONG, E.; DORS, G. C. Incidence of aflatoxin M1 in fresh milk from small farms. **Food Science and Technology**, v. 37, p. 11–15, 2017.

GONZÁLEZ, E.; FELICIO, M.; ROSSI, M.H.; NOGUEITA, J.H.; MANGINELLI, S. Ocorrência de aflatoxina m1 em leite comercializado em alguns municípios do estado de são paulo. *Arquivos Do Instituto Biológico*, v. 72, n. 4, p. 435–438, 2005.

HASSAN, Z. U.; AL-THANI, R. F.; MIGHELI, Q.; JAOUA, S. Detection of Toxigenic Mycobiota and Mycotoxins in Cereal Feed Market. **Food Control**, v. 84, p. 389–394, 1 Feb. 2018.

IALIMENTOS. Colombia, cuarto país con mayor consumo de leche - IAlimentos, 2018. Disponível em: <https://revistaialimentos.com/ediciones/ed-61-oportunidades-sector-lacteo/colombia-cuarto-pais-con-mayor-consumo-de-leche>. Acesso em Janeiro 2018.

IBGE. **Indicadores IBGE**. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE, p. 14–49, 2018. Disponível em: <ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Pecuaria/Fasciculo_Indicadores_IBGE/abate-leite-couro-ovos_201801caderno.pdf>. Acesso em Janeiro 2018.

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.

ISMAIL, A.; AKHTAR, S.; LEVIN, R. E.; ISMAIL, T.; RIAZ, M.; AMIR, M. Aflatoxin M1: Prevalence and Decontamination Strategies in Milk and Milk Products. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 42, n. 3, p. 418–427, 2016.

JECFA. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Disponível em: <<http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v47je02.htm>>. Acesso em Abril 2018.

KOS, J.; LEVIĆ, J.; ĐURAGIĆ, O.; KOKIĆ, B.; MILADINOVIĆ, I. Occurrence and Estimation of Aflatoxin M1 Exposure in Milk in Serbia. **Food Control**, v. 38, p. 41–46, 2014.

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.

LEE, D.; LEE, K.-G. Analysis of Aflatoxin M1 and M2 in Commercial Dairy Products Using High-Performance Liquid Chromatography with a Fluorescence Detector. *Food Control*, v. 50, p. 467–471, 2015.

MASOERO, F.; GALLO, A.; MOSCHINI, M.; PIVA, G.; DIAZ, D. Carryover of Aflatoxin from Feed to Milk in Dairy Cows with Low or High Somatic Cell Counts. **Animal**, v. 9, n. 1, p. 1344–1350, 2007.

MASOOD, M.; IQBAL, S. Z.; ASI, M. R.; MALIK, N. Natural Occurrence of Aflatoxins in Dry Fruits and Edible Nuts. **Food Control**, v. 55, p. 62–65, 2015.

OBREMSKI, K.; ZIELONKA, L.; GAJECKA, M.; JAKIMIUK, E.; GAJECKI, M. Mycotoxins - dairy cattle breeding problem. A case report. **Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy**, v. 53, p. 221-224, 2009.

OPLATOWSKA-STACHOWIAK, M.; SAJIC, N.; XU, Y.; HAUGHEY, S. A.; MOONEY, M. H.; GONG, Y. Y.; VERHEIJEN, R.; ELLIOTT, C. T. Fast and Sensitive Aflatoxin B1 and Total Aflatoxins ELISAs for Analysis of Peanuts, Maize and Feed Ingredients. **Food Control**, v. 63, p. 239–245, 1 May 2016.

ORGANIZACIÓN DE LAS NACIONES UNIDAS PARA LA ALIMENTACIÓN Y LA AGRICULTURA & FEDERACIÓN PANAMERICANA DE LECHERIA. Informe producido en el ámbito del Observatorio de la cadena láctea de América Latina y el Caribe. Disponible em: <http://www.fao.org/fileadmin/templates/est/COMM_MARKETS_MONITORING/Dairy/Documents/Paper_Lechería_AmLatina_2011.pdf>. Acesso em Abril 2018.

ORTIZ-MARTINEZ, R.; DE LUNA-LOPEZ, M.C.; VALDIVIA-FLORES, A.; QUEZADA-TRISTAN, T. Assessment of aflatoxin M1 levels in white cheese. **Toxicology Letters**, v. 229, p. S224, 2014.

ORTIZ-MARTINEZ, R.; VALDIVIA-FLORES, A.; QUEZADA-TRISTAN, T.; LUNA-LÓPEZ, M.C. Contamination of white cheese with aflatoxin M1. **Toxicology Letters**, v. 221, p. S63, 2013.

ORTIZ MARTINEZ, R.; VALDIVIA FLORES, A.G.; DE LUNA LOPEZ, M.; QUEZADA TRISTAN, T, MIRANDA CASTAÑEDA, C. A.; RANGEL MUÑOZ, E. J., CRUZ VAZQUEZ, C. Occurrence of aflatoxins in milk since dairy farms until consumers: An exploratory study. **Toxicology Letters**, v. 258, p. S87–S88, 2016.

PEREIRA, M.G.; CARVALHO, E. P; PRADO, G.; ROSA, A.R.; VELOSO, T.; SOUZA, L; RIBEIRO, J. M. Aflatoxinas em alimentos destinados a bovinos e em amostras de leite da região de Lavras, Minas Gerais - Brasil. **Ciência E Agrotecnologia**, v. 29, p. 106–112, 2005.

PEREIRA, P. C. Milk Nutritional Composition and Its Role in Human Health. **Nutrition**, v. 30, n. 6, p. 619–627, 2014.

PÉREZ, J.; GUTIÉRREZ, R.; VEGA, S.; DÍAZ, G.; URBÁN, G.; CORONADO, M.; ESCOBAR, A. Ocurrencia De Aflatoxina M1 En Leches Cruda, Ultrapasteurizada Y Orgánica Producidas Y Comercializadas En El Altiplano Mexicano. **Revista Salud Animal**, v. 30, n. 2, p. 103–109, 2008.

PICININ, L. C.; CERQUEIRA, M.P.; VARGAS, E.A.; LANA, Â. M.; TOALDO, I. M.; BORDIGNON-LUIZ, M.T. Influence of climate conditions on aflatoxin M1 contamination in raw milk from Minas Gerais State, Brazil. **Food Control**, v. 31, n. 2, p. 419–424, 2003.

PRADO, G.; OLIVEIRA, M.S.; DE, LIMA, A.S.; PAULA, A.; MOREIRA, A. Occurrence of Aflatoxin M1 in Parmesan Cheese Consumed in Minas Gerais, Brazil. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 32, n. 6, p. 1906–1911, 2008.

PRANDINI, A.; TANSINI, G.; SIGOLO, S.; FILIPPI, L.; LAPORTA, M.; PIVA, G. On the Occurrence of Aflatoxin M1 in Milk and Dairy Products. **Food and Chemical Toxicology**, v. 47, n. 5, p. 984–991, 2009.

REYES VELÁZQUEZ, W.; MARTÍNEZ, S. P.; ISAÍAS ESPINOSA, V. H.; NATHAL VERA, M. A.; DE LUCAS PALACIOS, E.; ROJO, F. Aflatoxinas totales en raciones de bovinos y AFM1 en leche cruda obtenida en establos del estado de Jalisco, México. **Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias**, v. 47 n. 2, p. 223–230, 2009.

SANTOS, A. L.; BANDO, E.; MACHINSKI JUNIOR, M. Ocorrência de aflatoxina M1 em leite bovino comercializado no estado do Paraná, Brasil. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 35, n. 1, p. 371, 2014.

SARTORI, A. V.; SWENSSON DE MATTOS, 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-High-Performance Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry. **Food Analytical Methods**, v. 8, n. 9, p. 2321–2330, 2015.

SASSAHARA, M.; PONTES NETTO, D.; YANAKA, E.K. Aflatoxin occurrence in foodstuff supplied to dairy cattle and aflatoxin M1 in raw milk in the North of Parana state. **Food and Chemical Toxicology**, v. 43, n. 6, p. 981–984, 2005.

SCAGLIONI, P. T.; BECKER-ALGERI, T.; DRUNKLER, D.; BADIALE-FURLONG, E. Aflatoxin B1 and M1 in Milk. **Analytica Chimica Acta**, v. 829, p. 68–74, 2014.

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, n. 7, p. 655–657, 2009.

SHUNDO, L.; ALMEIDA, A. P.; ALABURDA, J.; LAMARDO, C.A., NAVAS, S. A.; RUVIERI, V.; SABINO, M. Ocorrência de aflatoxina M1 em amostras de leite bovino consumido em diferentes regiões do Brasil. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, p. 1–8, 2017.

SILVA, M. V.; JANEIRO, V.; BANDO, E.; MACHINSKI Jr, M. Occurrence and estimative of aflatoxin M1 intake in UHT cow milk in Paraná State, Brazil. **Food Control**, v. 53, p. 222–225, 2015.

ŠKRBIĆ, B.; ŽIVANČEV, J.; ANTIĆ, I.; GODULA, M. Levels of Aflatoxin M1 in Different Types of Milk Collected in Serbia: Assessment of Human and Animal Exposure. **Food Control**, v. 40, n. 1, p. 113–119, 2014.

U.S. DEPARTMENT OF AGRICULTURE. ¿Cómo evolucionó la producción de leche en el mundo en los últimos años? Disponível em: <http://www.campogalego.com/es/leche/como-evoluciono-la-produccion-de-leche-en-el-mundo-en-los-ultimos-anos/>. Acesso em Fevereiro 2018.

URBÁN, G.; PÉREZ, J.; MARTÍNEZ, F.; SALAS, J.; DÍAZ, G.; RAMÍREZ, M.L.; ESCOBAR, A. Niveles De Aflatoxina M1 En Quesos Frescos Producidos En Diferentes Zonas De México. **Revista Salud Animal**, v. 31, n. 2, p. 115–121, 2009.

VAN EGMOND, H.P. Mycotoxins in Dairy Products. **Food Chemistry**, v. 11, p. 289–307, 1993.

VÁSQUEZ, P. **Evaluación de aflatoxinas en suplementos para vacas lecheras en la sabana de Bogotá, y su relación con aflatoxina M1 en leche**. 2006. 90 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Zootecnia) – Universidad de la Salle. Bogotá.

VEGA, S.; RUIZ, J.L.; YAMAZAKI, A.; RIVERA, J.G., ESCOBAR, A. Evaluación de aflatoxina M1 en leche orgánica producida en Tecpatán, Chiapas, México, **Revista de Salud Animal**, v. 35 n. 1, p. 33–37.

VELA, E. **Determinación de la presencia de aflatoxina M1 en leche cruda de vaca distribuida en un centro de acopio ubicado en la región de la costa sur de Guatemala**. 2015. 123 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Medicina Veterinaria y Zootecnia) - Universidad de San Carlos de Guatemala, San Carlos, 2015.

VIRDIS, S.; CORGIOLU, G.; SCARANO, C.; PILO, A. L.; DE SANTIS, E. P. L. Occurrence of Aflatoxin M1 in Tank Bulk Goat Milk and Ripened Goat Cheese. **Food Control**, v. 19, n. 1, p. 44–49, 1 Jan. 2008.

WALPOLE, S. C.; PRIETO-MERINO, D.; PHIL, E.; CLELAND, J.; Stevens, G.; ROBERTS, I. The Weight of Nations: An Estimation of Adult Human Biomass. **BMC Public Health**, v. 12, n. 1, p. 0–5, 2012.

WILLIAMS, J. H.; PHILLIPS, T. D.; JOLLY, P. E.; STILES, J. K.; JOLLY, C. M.; AGGARWAL, D. Human Aflatoxin in Developing Countries: A Review of Toxicology, Exposure, Potential Health Consequences, and Interventions. **American Society for Clinical Nutrition**, v. 80, n. June 2015, p. 1106–1122, 2004.

ZAIN, M. E. Impact of Mycotoxins on Humans and Animals. **Journal of Saudi Chemical Society**, v. 15, n. 2, p. 129–144, 2011.

WICKLOW, D.T., 1995. The mycology of stored grain: an ecological perspective. In: Jayas, D.S., White, N.D.G., Muir, W.E. (Eds.), *Stored-Grain Ecosystems*. Marcel Dekker, Inc, New York, pp. 197–249

WHO, World Health Organization. (2015). Food Safety. Fact Sheet N° 399. World Health Organization, Geneva. World Health Organization.

WHO, World Health Organization. (2009). Principles and Methods for the Risk Assessment of Chemicals in Food, Geneva: World Health Organization.

YIANNIKOURIS, A.; JOUANY, J. P. Mycotoxins in feeds and their fate in animals: a review. **Animal Research**, v. 51, p. 81–99, 2002.

ZAMBRANO, J.; MARTINEZ, N. **Evaluación de la reducción de aflatoxina M1 con dos**

tratamientos térmicos respecto a leche cruda en hatos de la sabana de Bogotá. 2009. 62 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Zootecnia) - Universidad de la Salle, Bogotá, 2009.

ZINEDINE, A.; GONZÁLEZ-OSNAYA, L.; SORIANO, J. M.; MOLTÓ, J. C.; IDRISSE, L.; MAÑES, J. Presence of Aflatoxin M1 in Pasteurized Milk from Morocco. **International Journal of Food Microbiology**, v. 114, n. 1, p. 25–29, 2007.

**ARTIGO II - AFLATOXINAS M1 E B1 EM AMOSTRAS DE LEITE EM PÓ
PRODUZIDAS E COMERCIALIZADAS NA COLÔMBIA: OCORRÊNCIA E RISCO
DE EXPOSIÇÃO (Artigo publicado em Revista: Food Additives & Contaminants: Part
B)**

RESUMO

A presença de Aflatoxina M1 (AFM1) e Aflatoxina B1 (AFB1) foi determinada em 51 amostras de leite em pó adquiridas em supermercados localizados na região do Caribe na Colômbia. A determinação foi realizada utilizando extração por QuEChERS e quantificação por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção de fluorescência (CLAE-FL). O método analítico apresentava faixa de recuperação entre 65%-110% e desvios padrão relativos inferiores a 20%. A AFM1 foi detectada em 100% das amostras (0,20-1,19 $\mu\text{g kg}^{-1}$), e 55% estava acima do limite máximo para AFM1 em leite (0,5 $\mu\text{g kg}^{-1}$) estabelecido pelas entidades de regulamentação Colombianas e Européias. Por outro lado, a AFB1 não foi detectada em nenhuma das amostras analisadas. Por fim, o nível máximo de AFM1 estimado, que pode ser ingerido pelo consumo de leite em pó nesta região foi 0,007-0,013 $\mu\text{g pessoa}^{-1} \text{ dia}^{-1}$, valores que estão acima da média de consumo estimado na América Latina de acordo com o Comitê Conjunto de Especialistas da FAO/OMS (0,0035 $\mu\text{g pessoa}^{-1} \text{ dia}^{-1}$).

Palavras-chave: Aflatoxina. Micotoxina. Incidência. Leite. Colômbia. Exposição

1 INTRODUÇÃO

O leite é um alimento altamente nutritivo que contém muitos macro e micronutrientes essenciais para o crescimento e manutenção da saúde humana (PICCIANO, 2001). Segundo a Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO), o leite animal pode desempenhar papel importante nas dietas das crianças em populações de acesso limitado a outros alimentos de origem animal. Um estudo recente indica que mais de 6 bilhões de pessoas em todo o mundo consomem leite e produtos lácteos, a maioria delas vive em países em desenvolvimento (FAO, 2018). Em termos de consumo nacional, no ano 2017, o consumo médio de leite na Colômbia foi 145 L por pessoa (FEDEGAN 2017a). Desta forma, a indústria de laticínios desempenha papel significativo na economia da Colômbia, influenciando a cadeia produtiva de alimentos, a criação de empregos e a renda da população. O país tem uma produção de 395.215 unidades produtoras de leite, das quais 80,7% (319.106) correspondem a pequenos produtores de leite que geram 37,0% da produção nacional. Além disso, dados de 2017 sobre a produção de leite mostraram um aumento de 7.094 milhões de litros (FEDEGAN 2017b).

No entanto, o leite pode também ser o agente causador de diversas alterações fisiológicas nos indivíduos que o consomem, principalmente por ser veículo de contaminantes ambientais e alimentares. Dentre estes, os micro-organismos e metabólitos secundários, como as aflatoxinas (AFs) (BECKER-ALGERI et al., 2016; HERZALLAH et al., 2009; SCAGLIONI et al., 2014). Estas micotoxinas estão dentre os carcinógenos genotóxicos mais importantes dos alimentos para os quais não há ingestão diária tolerável fixa. São quatro as AFs de interesse alimentar, conhecidas como B1, B2, G1 e G2, que podem contaminar diretamente alimentos e rações. O gado leiteiro que ingere dietas contaminadas com AFB1 excreta quantidades do principal metabólito 4-hidroxilado conhecido como AFM1 em leite (CREPPY 2002; PRANDINI et al., 2009).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) - Agência Internacional de Pesquisa sobre Câncer (IARC) classificou AFB1 e AFM1 como agentes carcinogênicos em humanos nos grupos 1 e 2B, respectivamente, devido a seus efeitos tóxicos e carcinogênicos comprovados (IARC 2002). Diferentes estudos mostraram a presença de AFs no leite e produtos lácteos (ASGHAR et al., 2018; CHAVARRÍA et al., 2015; GONÇALVES et al., 2018; HASSAN et al., 2018; MOHAMMED et al., 2016). Esses estudos enfatizam principalmente a presença de AFM1, que é regulamentada pela legislação internacional (CE 2006a; MERCOSUL 2002).

No entanto, estudos realizados por Herzallah et al. (2009), Scaglioni et al. (2014) e Gonçalves et al. (2018) relataram a presença de AFB1 em amostras de leite comercializadas na

Jordânia e no sul do Brasil, respectivamente. Portanto, a ocorrência de AFB1 no leite deve ser monitorada devido a toxicidade da AFB1 ser maior que a toxicidade da AFM1 (HUSSEIN; BRASEL, 2001). Além disso, condições climáticas, como altas temperaturas ou estações do ano com períodos prolongados de chuva são comuns em muitos países latino-americanos, como a Colômbia (CIAT-MADR, 2015; ESQUIVEL et al., 2018; IIZUMI et al., 2014). Essas condições favorecem o crescimento de fungos que podem contaminar as matérias-primas e ração animal com AFB1, o que pode contribuir para níveis relativamente altos de AFM1, como possível contaminação por AFB1 em leite de países com clima tropical (MARTÍNEZ et al., 2013).

A presença de AFM1 e AFB1 no leite e produtos lácteos pode ser uma ameaça potencial para a saúde humana, especialmente para bebês e crianças, decorrente do alto consumo de leite e derivados. Consequentemente, vários países em todo o mundo estabeleceram limites máximos de AFM1 para reduzir esse risco e proteger os consumidores. Esses limites em todo o mundo são influenciados por considerações econômicas e podem variar de um país para outro (STOLOFF et al., 1991). A Comissão Europeia (CE) nº 1881/2006 indicou que o limite máximo (LM) para AFM1 no leite cru e produtos lácteos não deve exceder $0,05 \mu\text{g kg}^{-1}$ (CE 2006a). O MERCOSUL (Mercado Comum do Sul) nº 56/1994 estabeleceu um LM de AFM1 em leite fluído e em pó de $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$ e $5,0 \mu\text{g kg}^{-1}$, respectivamente (MERCOSUL 2002). Na Colômbia, o Ministério da Saúde e Proteção Social (MINSALUD) nº 4506/2013 estabeleceu o LM para AFM1 de $0,5 \mu\text{g kg}^{-1}$ para o leite (MINSALUD 2013).

Apesar do risco que representam as AFM1 e AFB1 para a saúde pública da população Colombiana, poucos estudos tem sido realizados sobre a ocorrência de AFM1 no leite (DIAZ; ESPITIA, 2006; DIAZ; SÁNCHEZ 2015) e nenhum sobre a ocorrência de AFB1 e avaliação da ingestão de AFM1. Assim, os objetivos do estudo foram (i) detectar os níveis de AFM1 e AFB1 em leite em pó comercializado na região caribenha da Colômbia, (ii) comparar esses níveis com os limites máximos de AFM1 permitidos pelas organizações de saúde colombianas e Internacionais, (iii) e estimar os riscos de exposição a AFM1 na região caribenha da Colômbia relacionado a faixas etárias da população que consome o leite em pó contaminado.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. AMOSTRAS DE LEITE EM PÓ

Um total de 51 amostras de leite em pó de diferentes marcas foram coletadas aleatoriamente entre dezembro de 2017 e maio de 2018 em supermercados localizados na região

caribenha da Colômbia. Essas amostras incluíam diferentes marcas, tipos de leite e lotes de fabricação. As amostras analisadas foram leite integral (n=30), leite desnatado (n=6), leite semidesnatado sem lactose (n=9) e leite infantil (n=6). Todas as amostras avaliadas estavam dentro do prazo de validade do produto. O tamanho das embalagens variam de 0,2 kg a 0,4 kg. As amostras foram coletadas em supermercados e mercearias, segundo o método de amostragem para leite e produtos lácteos, fórmulas para lactentes e fórmulas de transição, incluindo leite para bebês e leite de transição, em conformidade com a Comissão Europeia (CE) No. 401/2006 (EC 2006b). As amostras foram transportadas para o laboratório de micotoxinas e ciência de alimentos da Universidade Federal de Rio Grande-Brasil, e armazenadas a temperatura de refrigeração (4 °C) até serem analisadas quanto ao conteúdo de AFM1 e AFB1.

2.2. REAGENTES E PADRÃO DE MICOTOXINAS

Os padrões de AFM1 (Bellefonte, PA, EUA) e AFB1 (Saint Louis, MO, EUA) foram adquiridos pela Sigma-Aldrich. A acetonitrila (MeCN), metanol (MeOH) e cloreto de sódio (pureza > 99%) foram adquiridos da J.T.Baker (Phillipsburg, NJ, EUA). O ácido acético (pureza > 99%) foi pela Vetec (Rio de Janeiro, Brasil). O Sulfato de magnésio (pureza > 95%) foi pela Caledon Laboratory (Georgetown, Canadá). Hexano (pureza > 96%) e tolueno (pureza > 99%) foram obtidos da Merck (Darmstadt, Alemanha). Água ultra purificada em sistema Direct-Q UV3 Millipore (resistividade de 18,2 MΩ cm) (Millipore, Bedford, EU). A fase móvel foi desgaseificada por 30 min antes do uso com UniQup Ultrasonic Cleaner (USC-1850 frequência US: 250 KHz, Brasil). Todas as soluções padrão de estoque e de trabalho foram armazenadas em frascos a -20 °C e armazenadas a 4 °C antes do uso, as soluções estoque de AFM1 (0,1 µg L⁻¹) e AFB1 (0,2 µg L⁻¹) foram preparadas em MeCN e Tolueno, respectivamente.

2.3. ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS POR CLAE

2.3.1. Quantificação cromatográfica de AFM1 e AFB1

A identificação e quantificação de AFM1 e AFB1 foram realizadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), utilizando sistema Class-VP (Shimadzu, Kyoto, Japão) equipado com uma bomba LC-20 AD, desgaseificador DGU-20A, um CBM-Controlador 20A, detector de fluorescência RF-20A (FL), derivatização pós-coluna

fotoquímica da Romer® Derivatization Unit (RDU™) (Romer Labs, Tulln, Áustria), injetor manual de 20 µL 7725i e coluna Phenomenex Chrom-Clone 5µMC18 (150 mm x 4,6 mm) (Allcrom, São Paulo, Brasil). Os padrões e extratos das amostras foram eluídos em fase móvel contendo água:MeCN:MeOH (60:15:25, v v⁻¹). A temperatura da coluna foi 40 °C, com taxa de fluxo de 1,0 mL min⁻¹ usando uma eluição isocrática. A detecção das micotoxinas foi realizada em comprimentos de onda de 370 nm e 410 nm para excitação e emissão, respectivamente. Os cromatogramas foram analisados por LC-Assist software (Shimadzu). O tempo da análise cromatográfica foi 12 min, e os tempos de retenção foram de 6,6 min e 11,3 min para AFM1 e AFB1, respectivamente. As micotoxinas foram identificadas com base no tempo de retenção do composto relacionado ao padrão e para confirmação foi realizada co-cromatografia adicionando soluções padrão que promoviam o aumento de sinal.

2.3.2. Procedimento de extração

A extração de AFM1 e AFB1 foi realizada de acordo com o procedimento descrito por Sartori et al. (2015), com algumas modificações. Amostras de leite em pó foram reconstituídas com água seguindo as instruções do fabricante. Para isso 2,5 g de leite em pó foram dissolvidos em 20 mL de água destilada a 40 °C, e a solução foi misturada durante 1 min. A amostra analítica (5 mL) foi transferida para tubo de centrifuga e foram adicionados 10 mL de hexano e 15 mL de MeCN (1% de ácido acético, v v⁻¹) seguido de agitação vigorosa em vortex durante 30 s. Logo, 6 g de sulfato de magnésio e 1,5 g de NaCl foram adicionados à mistura e os tubos foram agitados durante 1 min e, em seguida, centrifugados a 2253 x g durante 10 min, utilizando centrífuga CT-5000R (Cientec, Belo Horizonte, Brasil). Em seguida, uma alíquota de 5 mL da fase orgânica MeCN foi coletada em frasco âmbar, e o solvente evaporado sob corrente suave de nitrogênio. O extrato seco foi dissolvido em água:MeCN (90:10, v v⁻¹) e a solução foi centrifugada a 4506 x g por 5 min com auxílio de microcentrífuga *MiniSpin* Plus (Hauppauge, NY, EUA). Finalmente, 20 µL da solução resultante foi injetada no CLAE-FL para separação e quantificação das micotoxinas. Todas as determinações foram realizados em triplicata.

2.3.3. Experimentos de validação e critérios internos de controle de qualidade

Para assegurar a qualidade dos resultados, foram realizadas, diariamente, determinações em “branco” da matriz e da vidraria para verificar e eliminar falsos positivos por

contaminação no processo de extração, instrumento, materiais ou reagentes utilizados durante todo o processo. Além disso, durante a extração de amostras, foi realizado teste de recuperação para acompanhar a eficiência da extração. Também foram preparadas curvas analíticas para verificar a sensibilidade e linearidade na faixa de trabalho das concentrações. Assim, os erros de quantificação causados por efeitos de matriz, além de possíveis flutuações instrumentais puderam ser monitorados (CITAC, 2002).

A exatidão das determinações foi avaliada em termos de recuperação, que foi determinada em três níveis. Para isso, 5 mL de amostra (leite integral) foram fortificados com solução padrão de trabalho. Os níveis finais de concentração de AFM1 e AFB1 nas amostras foram de 0,5, 2,5 e 5,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (de acordo com os limites máximos permitidos pela regulamentação nacional e internacional). Os cálculos de recuperação foram realizados usando as áreas de cada pico, utilizando a equação (1).

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{C1-C2}{C3} \times 100 \quad (1)$$

Onde: C1=concentração da micotoxina no extrato final (5 mL de fase orgânica)
C2=concentração da micotoxina na amostra controle (amostra não fortificada com micotoxina)
e C3=concentração do padrão de micotoxina adicionado à amostra.

A precisão foi avaliada em termos de repetibilidade mediante o desvio padrão relativo (DPR) para cada nível de concentração. Os limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) foram determinados pela injeção de concentrações em ordem decrescente, até o pico do analito obter relação de 3:1 e 10:1 entre sinal e ruído, respectivamente.

A quantificação foi realizada por normalização externa de acordo com a correspondente curva de calibração, onde o sinal é a área do pico cromatográfico.

As curvas analíticas por padronização externa no solvente e superposição da matriz foram obtidas por plotagem do gráfico da área do pico *versus* a concentração do analito e realização de regressão linear. A faixa linear para AFM1 e AFB1 foi de 0,25 a 8,0 $\mu\text{g L}^{-1}$, utilizando seis níveis de concentração. As fortificações foram realizadas em triplicata.

A avaliação do efeito matriz foi realizado por meio de comparações das inclinações das curvas analíticas por padronização externa no solvente com a curva por superposição da matriz. O cálculo foi efetuado mediante a Eq (2).

$$\text{EM(\%)} = \left(\frac{\text{Inclinação X1} - \text{inclinação X2}}{\text{Inclinação X2}} \right) \times 100 \quad (2)$$

Onde: EM é o efeito de matriz; X1= inclinação da curva obtida pela injeção das soluções analíticas de cada analito, preparada no extrato da matriz e X2 = inclinação da curva obtida pela injeção das soluções analíticas de cada analito, preparada no solvente

Quando os valores encontrados para o efeito matriz estiverem entre -20 e +20%, considera-se que o efeito matriz é baixo; se estiverem entre -50 e +50% é considerado médio; e se os valores encontrados forem abaixo de -50% ou acima de +50%, o efeito matriz é considerado alto (ECONOMOU et al., 2009).

2.3.4. Estimativa de exposição

A ingestão média de AFM1 em ng kg^{-1} massa corporal dia^{-1} foi calculada usando os seguintes parâmetros: níveis de AFM1 no leite em pó (dados obtidos neste estudo), ingestão média de leite (kg) e média de massa corporal para diferentes faixas etárias (crianças, jovens e adultos). Os resultados foram expressos de acordo com a Eq (3). A massa corporal média para adultos expostos (25-64 anos) foi assumida como 72 kg para homens e 59 kg para mulheres, com base nos dados obtidos por Aristizábal et al. (2007). A massa corporal média para os jovens (13-17 anos) foi assumida como sendo de 53 kg para meninos e 51 kg para meninas e por fim 38 kg para crianças (9-12 anos) segundo Ramírez-Vélez et al. (2018).

$$ID = \left(\frac{\text{Concentração da micotoxina no alimento} \times \text{Consumo do alimento}}{\text{Massa corporal}} \right) \quad (3)$$

Onde: ID – Ingestão diária (ng kg^{-1} massa corporal dia^{-1}); Concentração da micotoxina–Concentração média da AFM1 encontrada (ng kg^{-1}); Consumo do Alimento –Consumo diário de leite (L dia^{-1}); Massa Corporal – Massa corporal estimada da população (kg).

2.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises das amostras foram realizadas em triplicata e as diferenças nos níveis de AFM1 foram analisadas usando a análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey com 95% de confiança. A incerteza das medições de AFM1 foi baseada no desvio padrão relativo (RSD) das triplicatas das análises.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. MÉTODOS ANALÍTICOS

A Tabela 1 apresenta os resultados obtidos após a validação do método. As determinações em branco de amostras mostraram que nenhum sinal interferente foi apresentado no tempo de retenção dos analitos, confirmando a especificidade do método. Curvas analíticas foram obtidas usando seis níveis de concentração do padrão na abscissa e a área dos picos dos cromatogramas como ordenadas. O desvio padrão relativo (RSD) entre as triplicatas das amostras foram inferiores ao 20% em todos os pontos da curva analítica.

Tabela 1 - Parâmetros de validação avaliados em CLAE-FL para determinação de aflatoxina B1 (AFB1) e aflatoxina M1 (AFM1)

Micotoxina	LOD ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	LOQ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	EM (%)	Recuperação (%) (RSD%)		
				Fortificação ($\mu\text{g kg}^{-1}$)		
				(0,5)	(2,5)	(5,0)
AFM1	0,038	0,125	62,0	110 $\pm$ 15	103 $\pm$ 12	97 $\pm$ 11
AFB1	0,027	0,083	39,5	65 $\pm$ 18	89 $\pm$ 15	85 $\pm$ 16

Limite de detecção (LOD); Limite de quantificação (LOQ); Efeito Matriz (SSE); Desvio padrão relativo (RSD%).

Os coeficientes de determinação (R^2) para AFM1 e AFB1 foram $>0,98$. O efeito matriz foi 39,5% e 62,0% para AFB1 e AFM1, respectivamente. De acordo com a Agência de Saúde e Segurança Alimentar da Comissão da União Europeia (Comissão Europeia, SANTE, 2015), valores superiores a 50% indicam efeito de matriz alto, e recomenda-se usar a curva na matriz, para assim garantir precisão aceitável na quantificação de qualquer substância. Assim, as curvas analíticas na matriz foram usadas para fins de quantificação. As recuperações médias ($n=3$) com curvas de calibração matriciais corresponderam a um intervalo de 65-110% (Tabela 1) com valores de RSD entre $\pm 11\%$ e $\pm 18\%$, portanto, em conformidade com o Regulamento (CE) n.º 401 da Comissão Europeia, 2006 (EC 2006b).

3.2. DADOS DE EXPOSIÇÃO: OCORRÊNCIA DE AFM1 E AFB1 EM AMOSTRAS DE LEITE EM PÓ

Das 51 amostras de leite em pó, 100% foram positivas para AFM1 (faixa de 0,20-1,19 $\mu\text{g kg}^{-1}$), com média de 0,59 $\mu\text{g kg}^{-1} \pm 11\%$, enquanto AFB1 não foi detectada em nenhuma

das amostras de leite analisadas (Tabela 2). A concentração de AFM1 em 55% das amostras foi superior ao LM para AFM1 no leite permitido pelo Regulamento Colombiano ($0,5 \mu\text{g kg}^{-1}$) e Comissão Europeia ($0,05 \mu\text{g kg}^{-1}$) (MINSALUD, 2013; CE 2006a). Além disso, nenhuma das amostras excedeu o LM para AFM1 em leite em pó recomendado pelo MERCOSUL ($5,0 \mu\text{g kg}^{-1}$) (MERCOSUL 2002).

Por outro lado, a concentração de AFM1 no leite em pó infantil (variação de 0,20 a $0,34 \mu\text{g kg}^{-1}$) foi significativamente menor ($p < 0,05$) do que nas amostras de leite sem lactose, integral, desnatado e semidesnatado. Um fato importante foi que as amostras de leite em pó infantil não excederam o LM de AFM1 em leite recomendado pela Regulamentação da Colômbia, porém excedeu o recomendado pela União Européia.

Tabela 2 - Ocorrência de aflatoxina M1 (AFM1) em amostras leite em pó comercializadas na Colômbia.

Tipos de leite	Nº de amostras	Nº amostras positivas (%)	Media ($\mu\text{g kg}^{-1}$) DPR (%) [*]	Faixa ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
Integral	30	30 (100)	$0,60 \pm 11$	0,35 – 1,19
Desnatado	6	6 (100)	$0,75 \pm 7,1$	0,46 – 1,03
Semidesnatada sem lactose	9	9 (100)	$0,70 \pm 10$	0,33 – 1,18
Fórmula infantil	6	6 (100)	$0,25 \pm 15$	0,20 – 0,34
Total	51	51 (100)	$0,59 \pm 11$	0,20 – 1,19

^{*}RSD:Desvio padrão relativo

Não há estudos publicados na literatura sobre a ocorrência de AFM1 em leite em pó produzido na Colômbia. No entanto, os dados coletados neste estudo evidenciaram níveis de AFM1 semelhantes aos valores anteriormente encontrados para estudos realizados sobre o leite fluido e laticínios produzidos neste país. Diaz e Espitia (2006), por exemplo, quantificaram níveis de AFM1 em amostras de leite obtidas de Bogotá-Colômbia (n=241), mostrando níveis de AFM1 acima de $0,010 \mu\text{g L}^{-1}$ (LOQ) em 69,2% (faixa de $0,017$ - $0,213 \mu\text{g L}^{-1}$) e 79,4% (faixa de $0,016$ - $0,289 \mu\text{g L}^{-1}$) das amostras coletadas durante 2004 e 2005, respectivamente. Hernández et al. (2009) determinaram contaminação por AFM1 na faixa de $0,20$ - $1,86 \mu\text{g L}^{-1}$ em amostras de leite integral (n=48) coletadas na região do Caribe na Colômbia. Os pesquisadores afirmaram que 8,3 % das amostras tinham níveis acima do LM recomendado pela Comissão Europeia. Diaz e Sánchez (2015) analisaram AFM1 em amostras de leite humano, reportando uma contaminação média de $0,052 \mu\text{g L}^{-1}$ em 90% das amostras positivas (n=50) e uma faixa de contaminação de $0,09$ - $0,185 \mu\text{g L}^{-1}$.

Por outro lado, estudos realizados a partir de amostras de leite fluido de outros países da América Latina, também mostraram níveis de AFM1 semelhantes aos encontrados neste estudo. Chavarria et al. (2015) analisaram amostras de leite pasteurizado ($n=70$) coletadas em supermercados locais da Costa Rica, encontrando níveis de AFM1 entre 0,019 e 0,629 $\mu\text{g L}^{-1}$ com média de contaminação de 0,136 $\mu\text{g L}^{-1}$. Não entanto, os níveis de AFM1 aqui reportados são menores quando comparados com os estudos realizados por Sahin et al. (2016) na Turquia, onde 21,1% das amostras de leite cru ($n=90$) coletadas estavam contaminadas com níveis de AFM1 que variavam de 0,011 a 0,100 $\mu\text{g L}^{-1}$, com nível médio de contaminação de 0,036 $\mu\text{g L}^{-1}$. Em Doha-Qatar, Hassan et al. (2018) também encontraram baixos níveis de AFM1 em 8% das amostras de fórmula infantil ($n=12$), na faixa de 0,010 a 0,050 $\mu\text{g L}^{-1}$. No entanto, os valores de AFM1 encontrados neste estudo foram menores do que os das amostras de leite de vaca ($n=31$) produzidas na Tanzânia, onde AFM1 foi detectada em 83,8% das amostras com níveis de 0,026 a 2,000 $\mu\text{g L}^{-1}$ (MOHAMMED et al., 2016) e Paquistão, com 91,7% das amostras de leite fresco ($n=143$) estavam contaminadas na faixa de 0,020 a 3,090 $\mu\text{g L}^{-1}$ e média de 3,462 $\mu\text{g L}^{-1}$ (MUHAMMAD et al., 2018).

Os valores de ocorrência de AFM1 obtidos neste estudo estão acima dos resultados relatados para amostras de leite em pó produzidas no Brasil. Sartori et al. (2015), por exemplo, detectaram a presença de AFM1 em 74% das amostras de leite em pó analisadas ($n=72$) em níveis de concentração variando de 0,08 a 1,19 $\mu\text{g kg}^{-1}$. García Londoño et al. (2013) mostraram incidência de 100% nas amostras de leite em pó analisadas ($n=30$) compradas nos mercados da Argentina e Brasil, em níveis que variam de 0,1 a 0,92 $\mu\text{g kg}^{-1}$ com concentração média de 0,39 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Além disso, concentrações de AFM1 abaixo das encontradas neste estudo foram reportadas por vários outros estudos.

Shundo et al. (2009), detectaram níveis de AFM1 em 96% das amostras de leite em pó ($n=75$) adquiridas na cidade de São Paulo, Brasil, em concentrações que variaram de 0,01 a 0,27 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Dados de ocorrência descritos por López et al. (2003) relataram a presença de AFM1 em 80% das amostras de leite em pó ($n=5$) adquiridas na Argentina em níveis que variaram de 0,010 a 0,014 $\mu\text{g kg}^{-1}$ com concentração média de 0,012 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Wang et al. (2012) encontraram AFM1 em 31% das amostras de leite em pó coletadas na China ($n=13$), relatando níveis de 0,086 a 0,212 $\mu\text{g kg}^{-1}$ com média de 0,141 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Beltrán et al. (2011) analisaram a presença de micotoxinas em leite de bebê em pó adquirido em diferentes supermercados e drogarias de Castellon (Espanha), detectando apenas uma amostra positiva para AFM1 (0,006 $\mu\text{g kg}^{-1}$). Ghanem e Orfi (2009) analisaram AFM1 em amostras de leite em pó do norte, sul e leste da Síria ($n = 8$), onde uma amostra foi detectada como positiva (0,0012 $\mu\text{g kg}^{-1}$). Iqbal et

al. (2017) coletaram amostras de leite em pó ($n=64$) das principais cidades de Punjab-Paquistão, encontrando uma incidência de 33% na faixa de 0,0004 a 0,28 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e concentração média de 0,077 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Lee e Lee (2015) também relataram a incidência de AFM1 em 74% das amostras de leite em pó coletadas a partir de supermercados no Sul da Coreia ($n = 50$) com valores médios de 0,27 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Por fim, Gonçalves et al. (2018) estudaram amostras de leite em pó provenientes de Assomada-Cabo Verde ($n = 50$), AFM1 foi detectado em 76% das amostras analisadas na faixa entre 0,032-28,96 $\mu\text{g kg}^{-1}$, valores superiores aos encontrados neste estudo.

3.3. ESTIMATIVA DE EXPOSIÇÃO A AFM1 A PARTIR DO CONSUMO DE LEITE EM PÓ

De acordo com o Joint FAO/WHO Expert Committee, o consumo médio de AFM1 na América Latina é estimado em 3,5 $\text{ng pessoa}^{-1} \text{dia}^{-1}$ (JECFA 2011). Considerando que o consumo médio de leite na Colômbia em 2017 foi de 145 L por pessoa, ou seja, 0,40 $\text{L pessoa}^{-1} \text{dia}^{-1}$ (FEDEGAN 2017a); a concentração mínima (0,20 $\mu\text{g kg}^{-1}$), média (0,59 $\mu\text{g kg}^{-1}$) e máxima (1,19 $\mu\text{g kg}^{-1}$) de AFM1 nas amostras de leite em pó analisadas, e a massa corporal para diferentes faixas de idade (crianças, jovens e adultos) da população que consome o leite em pó contaminado, foram determinados os valores de ID (Tabela 3). A maior ingestão alimentar estimada de AFM1 foi encontrada em amostras de leite consumidas por crianças do sexo masculino (9 a 12 anos) (13,00 $\text{ng pessoa}^{-1} \text{dia}^{-1}$). Esse valor é aproximadamente 4 vezes maior do que o consumo calculado para a América Latina, indicando que o consumo do leite analisado neste estudo pode representar um sério risco à saúde para crianças nesta faixa etária. Além disso, a possibilidade de contaminação crônica por AFM1 não pode ser ignorada, pois a exposição a outros produtos lácteos pode ser ainda maior, dado ao alto consumo de leite e laticínios para esta população.

Não foram encontrados estudos prévios sobre a estimativa da ID de AFM1 no leite produzido na Colômbia. No entanto, vários estudos estimaram a ingestão de AFM1 pelo consumo de leite em outros países. Os valores de ingestão obtidos neste estudo estão acima dos resultados relatados por Cano-Sancho et al. (2010) (0,100 a 0,434 $\text{ng kg}^{-1} \text{pessoa}^{-1} \text{dia}^{-1}$), Iqbal et al. (2017) (0,47 a 4,7 $\text{ng L}^{-1} \text{pessoa}^{-1} \text{dia}^{-1}$), Leblanc et al. (2005) (0,09 a 0,22 $\text{ng kg}^{-1} \text{pessoa}^{-1} \text{dia}^{-1}$), Škrbić et al. (2014) (0,50 a 1,42 $\text{ng kg}^{-1} \text{pessoa}^{-1} \text{dia}^{-1}$), Shundo et al. (2009) (0,188 $\text{ng kg}^{-1} \text{pessoa}^{-1} \text{dia}^{-1}$) e Zinedine et al. (2007) (3,26 $\text{ng kg}^{-1} \text{pessoa}^{-1} \text{dia}^{-1}$), mas semelhantes aos encontrados por Kos et al. (2014) para

ingestão máxima de AFM1 em crianças da Sérvia de 1-5 anos de idade, sendo de $36,8 \text{ ng kg}^{-1} \text{ pessoa}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ e $35,8 \text{ ng kg}^{-1} \text{ pessoa}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ para meninos e meninas, respectivamente. Portanto, mais estudos para avaliar o risco de exposição à saúde humana associado ao consumo de AFM1 na Colômbia são necessários.

Tabela 3 - Estimativa de ingestão diária de aflatoxinas M1 (AFM1).

Faixa etária (Anos)	Massa Corporal (kg)		Ingestão mínima de AFM1 ng kg^{-1} $\text{pessoa}^{-1} \text{ dia}^{-1}$		Ingestão média de AFM1 ng kg^{-1} $\text{pessoa}^{-1} \text{ dia}^{-1}$		Ingestão máxima de AFM1 ng kg^{-1} $\text{pessoa}^{-1} \text{ dia}^{-1}$	
	M	F	M	F	M	F	M	F
Adultos (25-64)	72	59	1,0	1,0	3,0	4,0	7,0	8,0
Jovens (13-17)	53	51	1,0	2,0	4,0	5,0	9,0	9,0
Crianças (9-12)	38	38	2,0	2,0	6,0	6,0	13,0	13,0

M:masculino; F:feminino

4 CONCLUSÃO

Todas as amostras de leite em pó da região caribenha da Colômbia, mostraram contaminação por AFM1, em níveis acima do limite máximo permitido pelo Regulamento Colombiano ($0,5 \mu\text{g kg}^{-1}$) e pela Comissão Europeia ($0,05 \mu\text{g kg}^{-1}$). A fim de reduzir o risco relacionado à presença de AFM1 no leite, mais estudos devem ser realizados para garantir a segurança do leite em pó comercializado na Colômbia. Portanto, é necessário reduzir a contaminação por AFB1 em rações destinadas a gado leiteiro, evitando o desenvolvimento fungico e a produção de AFB1 em produtos agrícolas destinados ao consumo animal. Este levantamento da contaminação por AFM1 serve como referência científica para o análise de risco e manejo do consumo regional de leite em pó. Além disso, a exposição alimentar estimada para AFM1 pelo consumo de leite em pó estava acima dos limites internacionais para ingestão diária. É necessário alertar quanto a contaminação por leite e derivados, uma vez que o presente estudo investigou apenas o consumo de leite em pó. Portanto estudos sobre a contaminação dos diferentes produtos lácteos comumente consumidos pelos Colombianos são necessários para estimar a ingestão diária de aflatoxinas.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARISTIZÁBAL, J. C.; RESTREPO, M. T.; ESTRADA, A. Evaluación de la composición corporal de adultos sanos por antropometría e impedancia bioeléctrica. **Biomédica**, v. 27, p.

216–24, 2007.

ASGHAR, M.A.; AHMED, A.; ASGHAR, M.A. Aflatoxin M1 in fresh milk collected from local markets of Karachi, Pakistan. **Food Additives and Contaminantes Part B**, v. 11, n. 3, p. 167–174, 2018.

BECKER-ALGERI, T. A.; CASTAGNARO, D.; BORTOLI, K. De; SOUZA, C. De; DRUNKLER, D. A. Mycotoxins in bovine milk and dairy products : A Review. **Journal of Food Science**, v. 81, n. 3, p. 544-552, 2016.

BELTRÁN, E.; IBÁÑEZ, M.; SANCHO, J. V.; CORTÉS, M. Á.; YUSÀ, V.; HERNÁNDEZ, F. UHPLC–MS/MS Highly sensitive determination of aflatoxins, the aflatoxin metabolite M1 and ochratoxina in baby food and milk. **Food Chemistry**, v. 126, n. 2, p. 737–744, 2011.

CALDAS, S.S.; BOLZAN, C.M.; CERQUEIRA, M.B.; TOMASINI, D.; FURLONG, E.B.; FAGUNDES, C.; PRIMEL, E.G. Evaluation of a Modified QuEChERS Extraction of Multiple Classes of Pesticides from a Rice Paddy Soil by LC-APCI-MS/MS. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n.22, p. 11918-11926, 2011.

CANO-SANCHO, G.; MARIN, S.; RAMOS, A. J.; PERIS-VICENTE, J.; SANCHIS, V. Incidencia de aflatoxina M1 y evaluación de la exposición en cataluña (españa). **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 27, n. 3, p. 130–135, 2010.

CAPDEVILLE, M.; BUDZINSKI, H. Trace-level analysis of organic contaminants in drinking waters and groundwaters. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 30, n. 4, p. 586-606, 2011.

CHAVARRÍA, G.; GRANADOS-CHINCHILLA, F.; ALFARO-CASCANTE, M.; MOLIN, A. Detection of aflatoxin M1 in milk, cheese and sour cream samples from Costa Rica using enzyme-assisted extraction and HPLC. **Food Additives and Contaminates Part B**, v. 8, n. 2, p. 128–135, 2015. 586-606, 2015.

CIAT – MADR. Logros y retos de la agricultura colombiana frente al cambio climático. 20115. Disponível em: <https://www.minagricultura.gov.co/noticias/Paginas/Foro-cambio-clim%C3%A1tico.aspx>. Acesso em Março 2018.

CREPPY, E. E. Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe. **Toxicology Letters**, v. 127, n. 1–3, p. 19–28, 2002.

DIAZ, G. J.; ESPITIA, E. Occurrence of Aflatoxin M1 in retail milk samples from Bogotá, Colombia. **Food additives and contaminants**, v. 23, n. 8, p. 811–815, 2006.

DIAZ, G. J.; SÁNCHEZ, M. P. Determination of Aflatoxin M₁ in breast milk as a biomarker of maternal and infant exposure in Colombia. **Food Additives & Contaminants: Part A**, v. 49, p.37–41, 2015.

ECONOMOU, A.; BOTITSI, H.; ANTONIOU, S.; TSIPI, D. Determination of multi-class pesticides in wines by solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, n. 31, p. 5856-5867, 2009.

European Commission. 2006a. Commission regulation 2006/1881/EC of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. Off. J. Eur. Union. 2006, L364, 25.

European Commission. 2006b. Commission regulation 401/2006/EC of 23 February 2006 Laying Down the Methods of Sampling and Analysis for the Official Control of the Levels of Mycotoxins in Foodstuffs. Off. J. Eur. Union. 2006, L70,12.

ELZUPIR, A.O.; ELHUSSEIN, A.M. Determination of aflatoxin M1 in dairy cattle milk in Khartoum State, Sudan. **Food Control**, v. 21, p. 945–946, 2010.

ESQUIVEL, A.; LLANOS-HERRERA, L.; AGUDELO, D.; PRAGER, S.D.; FERNANDES, K.; ROJAS, A.; VALENCIA, J.J.; RAMIREZ-VILLEGAS J. 2018. Predictability of seasonal precipitation across major crop growing areas in Colombia. *Clim Serv*. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2405880718300177#bb0035>. Acesso em Abril 2018.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Gateway to dairy production and products. **Dairy production and products: Products**. Disponível em: <http://www.fao.org/dairy-production-products/products/en/>. Acesso em Abril 2018.

FEDEGAN. **Consumo** | **Fedegan**. Disponível em: <http://www.fedegan.org.co/estadisticas/consumo-0>. Acesso em Novembro 2017a.

FEDEGAN. **Producción** | **Fedegan**. Disponível em: <http://www.fedegan.org.co/estadisticas/produccion-0>. Acesso em Novembro 2018b.

GARCÍA LONDOÑO, V. A.; BOASSO, A. C.; Z. DE PAULA, M. C.; GARCIA, L. P.; SCUSSEL, V. M.; RESNIK, S.; PACÍN, A. Aflatoxin M1 survey on randomly collected milk powder commercialized in Argentina and Brazil. **Food Control**, v. 34, n. 2, p. 752–755, 2013.

GHANEM, I.; ORFI, M. Aflatoxin M1 in paw, pasteurized and powdered milk available in the Syrian market. **Food Control**, v. 20, n. 6, p. 603–605, 2009.

GONÇALVES, K.; MARIMÓN, K.; ANA, F.; REMEDI, R. D.; GARCIA, S. D. O.; GARDA-BUFFON. 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. 20, p. 260-264, 2018.

HASSAN, Z.U.; THANI, R.A.; ATIA, F.A.; MEER, S.A.; MIGHELI, Q.; JAOUA, S. Co-occurrence of mycotoxins in commercial formula milk and cerealbased baby food on the Qatar market, **Food Additives and Contaminants Part B**. 11(3):191-197, 2018.

HERNÁNDEZ, J.; ABADÍA, B.; MORENO, J. Determinación de Aflatoxina M1 en leche proveniente del caribe Colombiano, empleando Cromatografía Líquida de Ultra Resolución. **Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias**, v. 22, n. 3, p. 430–437, 2009.

HERZALLAH, S.M. Determination of aflatoxins in eggs, milk, meat and meat products using HPLC fluorescent and UV detectors. **Food Chemistry**, v. 114, p. 1141–1146, 2009.

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

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.

JECFA. **Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives**. Disponível em: <http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v47je02.htm>. Acesso em Abril 2018.

KOS, J.; LEVIĆ, J.; ĐURAGIĆ, O.; KOKIĆ, B.; MILADINOVIĆ, I. Occurrence and estimation of aflatoxin M1 exposure in milk in Serbia. **Food Control**, v. 38, p. 41–46, 2014.

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.

LEE, D.; LEE, K.-G. Analysis of Aflatoxin M1 and M2 in Commercial Dairy Products Using High-Performance Liquid Chromatography with a Fluorescence Detector. **Food Control**, v. 50, p. 467–471, 2015.

IIZUMI, T.; LUO, J.; CHALLINOR, A.; SAKURAI, G.; YOKOZAWA, M.; SAKUMA, H.; BROWN, M.; YAMAGATA, T. Impacts of El Niño Southern oscillation on the global yields of major crops. **Nat Commun** 5, v. 3712, p. 1-7, 2014.

LÓPEZ, C. E.; RAMOS, L. .; RAMADÁN, S. S.; BULACIO, L. C. Presence of Aflatoxin M1 in Milk for Human Consumption in Argentina. **Food Control**, v. 14, p. 31–34, 2003.

MARTÍNEZ, M.M; VARGAS del RÍO, L.M.; GÓMEZ, V.M. Aflatoxinas: incidencia, impactos en la salud, control y prevención. **Biosalud**, v, 12 n. 2, p. 89-109, 2013.

MATUSZEWSKI, B.; CONSTANZER, M.; CHAVEZ-ENG, C. Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC–MS/MS. **Analytical Chemistry**, v. 75, n. 13, p. 3019–3030, 2003.

MERCOSUR. **MERCOSUL\GMC\RES Nº 56/94**. Disponível em:

<[https://sogi8.sogi.com.br/Arquivo/Modulo113.MRID109/Registro28781/mercosul-gmc-res nº 56-94.pdf](https://sogi8.sogi.com.br/Arquivo/Modulo113.MRID109/Registro28781/mercosul-gmc-res-nº56-94.pdf)>. Acesso em Abril. 2018.

MINSALUD. **RESOLUCIÓN NÚMERO 4506 DE 2013**. Disponível em:

<<https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/DE/DIJ/resolucion-4506-de-2013.pdf>>. Acesso em Abril 2018.

MOHAMMED, S.; MUNISSI, J.J; NYANDORO, S.S. Aflatoxin M1 in raw milk and aflatoxin B1 in feed from household cows in Singida, Tanzania. **Food Additives and Contaminants Part B**, v. 9, n. 2, p. 85–90, 2016.

PICCIANO, M. F. Nutrient composition of human milk. **Pediatric Clinics of North America**, v. 48, n. 1, p. 53–67, 2001.

PRANDINI, A.; TANSINI, G.; SIGOLO, S.; FILIPPI, L.; LAPORTA, M.; PIVA, G. On the occurrence of Aflatoxin M1 in milk and dairy products. **Food and Chemical Toxicology**, v. 47, n. 5, p. 984–991, 2009.

RAMÍREZ-VÉLEZ, R.; CORREA-BAUTISTA, J. E.; MOTA, J.; GARCIA-HERMOSO, A. Comparison of different maximal oxygen uptake equations to discriminate the cardiometabolic risk in children and adolescents. **Journal of Pediatrics**, p. 1–7, 2018.

SAHIN, H.Z; CELIK, M.; KOTAY, S.; KABAK, B. Aflatoxins in dairy cow feed, raw milk and milk products from Turkey. **Food Additives and Contaminants Part B**, v. 9, n. 2, p. 152–158, 2016.

SANTE/EU. Analytical Quality Control and Method Validation Procedures for Pesticide Residues Analysis in Food and Feed. **SANTE/11945/2015**, n. Leg Depos. 11945:1–42., 2015.

SARTORI, A. V.; SWENSSON DE MATTOS, 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-High-Performance Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry. **Food Analytical Methods**, v. 8, n. 9, p. 2321–2330, 2015.

SCAGLIONI, P. T.; BECKER-ALGERI, T.; DRUNKLER, D.; BADIALE-FURLONG, E. Aflatoxin B1 and M1 in Milk. **Analytica Chimica Acta**, v. 829, p. 68–74, 2014.

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, n. 7, p. 655–657, 2009.

ŠKRBIĆ, B.; ŽIVANČEV, J.; ANTIĆ, I.; GODULA, M. Levels of Aflatoxin M1 in different types of milk collected in Serbia: Assessment of Human and Animal Exposure. **Food Control**, v. 40, n. 1, p. 113–119, 2014.

STOLOFF, L.; VAN EGMOND, H. P.; PARK, D. L. Rationales for the establishment of limits and regulations for mycotoxins. **Food Additives and Contaminants**, v. 8, n. 2, p. 213–221, 1991.

World Health Organization; International Agency for Research on Cancer. 2002 Aflatoxins. In IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans; IARC Press: Lyon, France; Volume 82, p. 171–300.

ZINEDINE, A.; GONZÁLEZ-OSNAYA, L.; SORIANO, J. M.; MOLTÓ, J. C.; IDRISSE, L.; MAÑES, J. Presence of Aflatoxin M1 in pasteurized milk from Morocco. **International Journal of Food Microbiology**, v. 114, n. 1, p. 25–29, 2007.

**ARTIGO III - ENZIMAS: AÇÃO BIOLÓGICA NA DEGRADAÇÃO DE
AFLATOXINAS (Artigo aceito para publicação em Revista: VETOR - Revista de
Ciências Exatas e Engenharias)**

RESUMO

A presença de micotoxinas como aflatoxinas em alimentos e produtos alimentícios gera grande preocupação no Brasil e no mundo, pois essa classe de compostos representa risco à saúde de animais e humanos. Além disso, as aflatoxinas trazem enormes perdas econômicas associadas à redução da produção agrícola e, conseqüentemente, à indústria de produtos alimentícios. Assim, estratégias para eliminar ou inativar aflatoxinas em produtos destinados a alimentação humana e animal são urgentes e necessárias. Neste sentido, o emprego de métodos de descontaminação biológica torna-se uma alternativa interessante tendo como benefício a manutenção do valor nutricional e qualidade final dos alimentos. Levando em consideração o exposto, este estudo tem como objetivo descrever a atuação das enzimas na degradação de aflatoxinas, incluindo a ação enzimática pelo uso de micro-organismos (bactérias e fungos) e enzimas isoladas de microrganismos, descrevendo também possíveis mecanismos de degradação.

Palavras-chave: Aflatoxinas. Degradação microbiana. Toxicidade.

1 INTRODUÇÃO

As aflatoxinas (AFs) B1, B2, G1 e G2 são metabólitos secundários produzidos principalmente por fungos do gênero *Aspergillus* (*A. flavus*, *A. parasiticus* e *A. nomius*), que contaminam diversos tipos de alimentos e rações, desde a sua produção até as etapas de estocagem e transporte (ABRAR et al., 2013). As Afs têm propriedades mutagênicas, carcinogênicas, teratogênicas, hepatotóxicas e imunossupressoras (ALBERTS et al., 2006). A aflatoxina B1 (AFB1) é a mais tóxica entre as AFs, classificada pela “Agência Internacional de Pesquisa em Câncer” como pertencente ao grupo 1A (IARC, 1993). Além disto é caracterizada também pela frequente ocorrência em diversos tipos de alimentos (TENIOLA et al., 2005).

Vários processos vêm sendo estudados com a finalidade de reduzir ou inibir a contaminação por AFs em alimentos, entretanto a maioria deles alteram as características da matéria-prima. Outro aspecto importante em relação a descontaminação é o desenvolvimento de métodos que apresentem eficiência, especificidade e baixo custo. Para preencher esta lacuna a literatura enfatiza estudos da degradação enzimática de micotoxinas, como uma abordagem de biorremediação promissora devido à vasta gama de enzimas disponíveis, especificidade e condições brandas de reação. O uso de enzimas para a redução da contaminação de AFs em produtos destinados ao consumo humano e animal, tem sido largamente explorado principalmente através do uso de sistemas modelos (ALBERTS et al., 2009a; YEHA, 2014; WU et al., 2015). Portanto, este estudo revisa os diversos métodos biológicos empregados na degradação de AFs descritos na literatura, envolvendo o uso de enzimas na forma comercial ou isolada a partir de uma fonte vegetal ou microbiana. Essa revisão procura avaliar a ação dessas enzimas sobre a AFB1, descrevendo estudos que demonstrem o metabolismo e possíveis produtos de degradação gerados.

2 AFLATOXINAS

A palavra “aflatoxina” vem de A=*Aspergillus*, fla=*flavus*, e toxina=veneno. As aflatoxinas (AFs) são estruturas policíclicas pertencentes quimicamente à classe de compostos bishidrofurancumarinas (WILLIAMS et al., 2004) (Tabela 1), e produzidas principalmente como metabólitos secundários por pelo menos 20 espécies de três diferentes fungos do gênero *Aspergillus*, tais como: *flavi*, *nidulantes* e *ochraceorosei*. Os membros incluídos na espécie do *flavi* são: *A. arachidicola*, *A. bombycis*, *A. flavus*, *A. minisclerotigenes*, *A. nomius*, *A. novoparasiticus*, *A. parasiticus*, *A. parvisclerotigenus*, *A. pseudocaelatus*, *A. pseudonomius*, *A.*

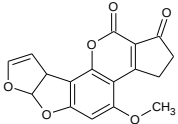
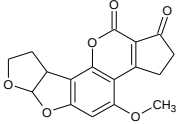
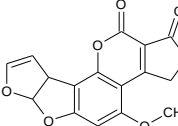
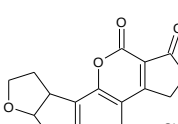
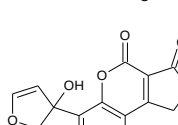
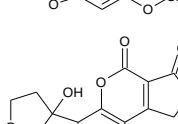
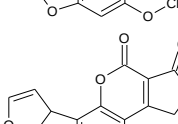
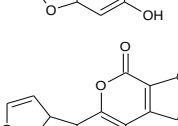
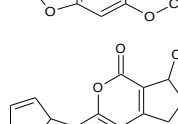
pseudotamarii, *A. togoensis*, *A. transmontanensis*, *A. mottae* e *A. sergii*. Os membros da espécie *Ochraceorosei* são: *A. ochraceoroseus* e *A. rambelii* e finalmente os membros inseridos na espécie *Nidulantes* são: *A. astellatus*, *A. olivicola* e *A. venezuelensis*. Embora todas essas espécies sejam relatadas como produtores de aflatoxinas, *A. flavus* e *A. parasiticus* são as mais comumente detectadas em alimentos (ABRAR et al., 2013).

Há cerca de 20 diferentes tipos de AFs, as mais importantes pelo seu alto potencial carcinogênico, mutagênico e teratogênico são: B1 (AFB1), B2 (AFB2), G1 (AFG1), G2 (AFG2), M1 (AFM1), M2 (AFM2), P1 (AFP1), Q1 (AFQ1) e D (AFD), sendo este último derivado da AFB₁ tratada com amoníaco. Outro metabólito tóxico da AFB₁ é o aflatoxicol (AFL) produzido através da hidroxilação (BHAT; RAI; KARIM, 2010). É importante dizer que apenas as AFB1, AFB2, AFG1 e AFG2 são sintetizadas naturalmente; as outras AFs (M1, M2, P1, Q1, G2a, B2a e AFL) são produtos hidroxilados do metabolismo animal ou microbiano. Os grupos B e G se referem, às suas propriedades químicas de fluorescência, onde sob luz ultravioleta de ondas longas, as aflatoxinas 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 (Rf), dos compostos em placas de cromatografia em camada delgada (CCD) (GOURAMA, 1997).

As AFs tem como estrutura básica, um anel dihidrodifurano ou tetrahidrodifurano ligado a um anel cumarina com cinco ou seis átomos de carbono, enquanto as AFs do tipo B estão ligadas a uma pentanona, as do tipo G estão ligadas a uma lactona de 6 membros (ABRAR et al., 2013). A AFB1 é a mais tóxica do grupo, seguida pela AFG1, AFB2 e AFG2 com toxicidade de 50%, 20% e 10% em relação à primeira, respectivamente (DILKIN et al., 2000). Aflatoxinas M1 e M2 são metabólitos hidroxilados das aflatoxinas B1 e B2 e podem ser encontrados em produtos lácteos obtidos de animais que ingeriram ração contaminada. As principais fontes de Afs em rações são amendoim, farinha de milho e farinha do caroço de algodão (CREPPY, 2002).

Estas toxinas estão em grande parte relacionadas com produtos alimentares produzidos nos trópicos úmidos e subtropicais, como os cereais (milho, sorgo, arroz e trigo) (MEDINA; RODRIGUEZ; MAGAN, 2014), oleaginosas (amendoim, soja, girassol e algodão) (LEE; LEE, 2015), especiarias (pimenta, açafrão, coentro e gengibre) (PRELLE et al., 2014), frutos de casca dura (amêndoas, castanha do Brasil, pistache, nozes, e coco) (MASOOD et al., 2015), e leite (SCAGLIONI et al., 2014).

Tabela 1 - Principais características físico-químicas das AFs (Chemspider).

Estrutura química	Composto	MM (g mol ⁻¹)	Log Kow	Solubilidade (m L ⁻¹)
	AFB1	312,27	1,23	918,3
	AFB2	314,28	1,45	585,4
	AFG1	328,27	-0,30	1,21 x 10 ⁴
	AFG2	330,28	0,71	2009
	AFM1	328,27	0,5	3,15 x 10 ⁻³
	AFM2	330,28	-0,05	2,92 x 10 ⁴
	AFP1	298,47	-1,77	4,09 x 10 ⁵
	AFQ1	328,27	-0,30	4,91 x 10 ⁴
	AFL	314,29	1,46	1866

MM = Massa molar; solubilidade a 25 °C.

Entre todas as AFs, a AFB1 é a mais comumente encontrada em alimentos, além de ser considerada a mais perigosa e tóxica isso por causa de sua associação com o carcinoma hepatocelular (câncer de fígado) (IARC, 2002).

3 CARACTERÍSTICAS ESTRUTURAIS E TOXICIDADE

A toxicidade das AFs em animais é tão diversa quanto às espécies que produzem esses compostos. Além da toxicidade aguda, a incidência de certos tipos de câncer tem sido associada a algumas micotoxinas e este aspecto tem chamado a atenção para a alimentação e segurança alimentar, especialmente no caso do leite e dos produtos lácteos (CASTEGNARO et al., 1998), onde esses compostos podem estar presentes devido a estabilidade estrutural. De acordo com Santini et al. (2013), as AFs são consideradas moléculas lipofílicas, e como o fígado é um órgão lipofílico, todos os compostos que são transportados pelo sangue são armazenados e concentrados nos hepatócitos. A alta ou contínua exposição a estes compostos podem induzir alguns tipos de câncer. Após a ingestão, AFB1 é degradada no fígado pelo sistema enzimático do citocromo P450 (ABRAR et al., 2013). As principais reações envolvidas no metabolismo da AFB1 são: hidroxilação, oxidação e desmetilação. AFB1-8,9-epóxido (AFBO) é um produto tóxico, mutagênico e carginogênico. Após degradação, AFBO pode ser ligada a macromoléculas, incluindo o material genético, tais como proteínas e DNA, formando adutos com ácidos nucleicos. Estes adutos são convertidos em um anel aberto estável derivado de formamidopirimidina, e a reparação destas lesões leva ao aparecimento de mutações genéticas e câncer (MURPHY et al., 2006).

Metabólitos hidroxilados e outras AFs que ocorrem naturalmente, não são substratos para a reação de epoxidação e, portanto, são menos mutagênicas e carcinogênicas (BARTOSZEK, 2006). A excreção de alguns destes compostos na urina de indivíduos infectados fornece um biomarcador confiável para exposição a AFB1 (MURPHY et al., 2006). AFM1 também é altamente tóxica, possuindo alta atividade genotóxica, embora seja aproximadamente 10 vezes menos carcinogênica que AFB1. Aflatoxinas P1, Q1 ou B2a são relativamente não tóxicas e são formadas nas vias metabólicas (WU et al., 2009).

Por este mecanismo de ação, a ingestão de AFs por longo período, mesmo em concentrações muito baixas, compromete a saúde de humanos e animais. Devido a essas considerações, as concentrações de AFs têm sido amplamente controladas em alimentos e rações por muitos países (WU; GUCLU, 2012).

4 BIODEGRADAÇÃO DE AFLATOXINAS

Métodos físicos e químicos, têm sido desenvolvidos para a degradação de AFs em alimentos e rações. No entanto, estas medidas de degradação tem uma série de limitações, pois

não garantem total eficácia, conveniência e segurança. A biodegradação de AFs utilizando micro-organismos oferece uma alternativa atrativa para o controle ou eliminação destes contaminantes de alimentos e rações, resguardando sua qualidade e segurança. A biodegradação de AFs utilizando micro-organismos oferece uma alternativa atrativa para o controle ou eliminação destas de alimentos e rações, resguardando sua qualidade e segurança (ALBERTS et al., 2006), além de poder ser utilizada com um apelo “natural”, tendo em vista o aumento da resistência do consumidor a processos químicos (WU et al., 2009). Tomando como base o efeito de enzimas sobre algumas substâncias, vários estudos vêm propondo a possível degradação de AFB1. Assim, este artigo visa relacionar a atividade das enzimas na biodegradação ou transformação que estas, obtidas de diferentes fontes, podem realizar na molécula de AFB1.

4.1. BACTÉRIAS

Desde o final dos anos 60, muitos estudos tem demonstrado que AFB₁ pode ser biologicamente degradada por diversas espécies de micro-organismos, incluindo bactérias das classes *Actinobactérias* (Gram positivas), *Bacillus* (Gram positivo) e α ou β -*Proteobactérias* (Gram negativas). Guan et al. (2008), utilizaram uma cumarina como a única fonte de carbono para avaliar a capacidade de isolados bacterianos na redução de AFB1. *Stenotrophomonas maltophilia* 35-3, isolado de fezes de anta, reduziu AFB1 em 82,5% após incubação em meio líquido NB (3,0 g de extrato de levedura, 5,0 g de peptona, 6,0 g de glicose, 10,0 g de NaCl por litro) pH 7,0 mantido a 37 °C por 72 h. Durante o cultivo, as frações (células, extratos de células e sobrenadante de cultura) foram avaliadas quanto a capacidade de degradar AFB1, o sobrenadante de cultura contendo enzimas foi eficiente (87,7% de redução), enquanto que as células viáveis e os extratos celulares não apresentaram a mesma eficiência (17,5 e 9,6% de redução, respectivamente). Para confirmar a ação de enzimas na degradação de AFB1 por *S. maltophilia* 35-3 foram realizados tratamentos com proteinase K, e proteinase K aliada a dodecil sulfato de sódio (SDS) e aquecimento. Como esperado foi observado redução significativa (23,8%) ou total da habilidade de degradação da micotoxina pelo sobrenadante da cultura.

Estudos realizados por Taylor et al. (2010) identificaram nove enzimas de *Mycobacterium smegmatis* que utilizaram o cofator deazaflavina F₄₂₀H₂ envolvido no mecanismo de degradação das AFs. A catálise enzimática envolveu inicialmente uma reação que catalisou a redução da porção α , β -insaturada do éster das AFs, ativando as moléculas por hidrólise espontânea e detoxificação. Estas enzimas pertenciam a duas famílias F₄₂₀H₂

dependente redutase (FDR-A e -B). Em outro estudo, Lapalikar et al. (2012) indicaram que a atividade degradadora das enzimas FDR-A foram até 100 vezes maiores do que as enzimas FDR-B, isoladas a partir de *Mycobacterium smegmatis*. Os autores também testaram outras dez enzimas FDR-A produzidas por outros -*pActinomycetales*, onde nove também apresentaram capacidade de reduzir AFB1 e AFG1, indicando que a atividade de redução das AFs pode ser generalizada para esta família de enzimas.

4.2. FUNGOS

Cole, Kirksey e Blankenship (1972) verificaram a formação de dois metabólitos fluorescentes de AFB1 acumulados durante a degradação por *R. stolonifer*, *R. arrhizus* e *R. oryzae*, foram identificados como isômeros estéricos hidroxilados derivados da redução da função cetona no anel de ciclopentano de AFB1. De acordo com Kusumaningtyas, Widiastuti e Maryam (2006), *R. oligosporus* (F0216) foi capaz de inibir a síntese ou degradar AFB1, os autores sustentaram estes resultados de degradação devido à possível ação de enzima lacase, já que alguns fungos de podridão branca apresentam elevada atividade dessa enzima. A ação desta enzima produzida por *Peniophora* e *Pleurotus ostreatus*, fungos de podridão branca, também foi avaliada por Alberts et al. (2009) em relação a AFB1, resultando em 35,9% de degradação com 416,39 U L⁻¹ e 40,5% com 496 U L⁻¹.

Condições ambientais que afetam a degradação das AFs por micélio de *A. parasiticus* foram descritas por Doyle e Marth (1978b) e Doyle e Marth (1979), sugerindo que tais degradações foram resultado de ação enzimática. De acordo com Doyle e Marth (1978c), as condições ótimas de ação enzimática foram quando o fungo foi cultivado a 28 °C em pH 6,5 por 96 h. Os autores relataram que nesta condição 30% ou mais da quantidade de AFB1 e AFG1 presente foi degradada pelo micélio. No estudo de Doyle e Marth (1978d), a capacidade de degradação de AFs por micélios de *A. parasiticus* foi avaliada sob três condições: aquecimento dos micélios, monitoramento do substrato sobre o qual os micélios foram cultivados (determinando a possível presença de uma enzima extracelular degradante de AFs), e por último a avaliação de micélios filtrados após homogeneização. A degradação de AFB1 e AFG1 obtida pelo micélio tratado com calor foi muito baixa, enquanto que 6% de AFB1 e 4,5% de AFG1 foram degradadas a cada intervalo de 24 h por micélios não aquecidos. Estes dados indicaram que o aquecimento altera substancialmente a capacidade do micélio na degradação das AFs. No entanto, filtrados do substrato de crescimento que permaneceram após o micélio ser removido de culturas com 8 a 15 dias, não degradaram quantidades substanciais de AFB1 e AFG1,

enquanto que os micélios produzidos originalmente nestes filtrados degradaram quantidades substanciais de ambas as AFs. Desta forma, os autores sugeriram que constituintes intracelulares do micélio podem ter atuado no processo de degradação. Por outro lado, AFs foram degradadas pelos fluidos sobrenadantes de homogeneizados miceliais, o que suporta a hipótese de que o fator degradante tem natureza enzimática.

Estudos realizados por Huynh, Gerdes e Lloyd (1984), também demonstraram a degradação de AFs por ação de enzimas presentes em culturas de *A. parasiticus*. Neste estudo, o principal produto de degradação da AFB1 foi isolado e confirmado como sendo: não-fluorescente, não mutagênico e não-tóxico para filhotes de pato. Os resultados mostraram por meio de análise de espectro de infravermelho do produto principal de degradação, que a proteína micelial dialisada destruiu a AFB1 por degradação da porção ciclopentenona, principalmente do anel lactona. Os autores associaram o envolvimento da enzima peroxidase, com a diminuição dos níveis de AFB1 na cultura e na alteração da toxicidade e mutagenicidade ao caracterizar o extrato proteico do micélio de *A. parasiticus*.

Hamid e Smith (1987) demonstraram a degradação de AFB1 e AFG1 por *A. flavus* a partir de micélios intactos assim como extratos isentos de células obtidos de cultivos de 6, 8, 10 e 12 dias. Estes extratos foram adicionados a solução tampão fosfato 0,067 M (pH 6,9) contendo 100 µg de AFB1 ou 100 µg de AFG1, e incubadas a 25 °C sob agitação orbital durante 48 h. A degradação obtida a partir de cultura com micélios intactos cultivados durante 10 dias foi significativamente maior, obtendo 23% de redução para AFB1 e 24,5% para AFG1. Os extratos isentos de células dos cultivos de 6 a 12 dias também foram capazes de degradar as AFB1 e G1. No entanto, uma diferença significativa entre os extratos de cultura de 6 dias de cultivo e os de micélios intactos foram observados, porém as culturas contendo micélios foram as de maior capacidade de degradação das AFs adicionadas, sendo 16,8% e 18,6% para AFB1 e AFG1, respectivamente. Em geral, a capacidade degradativa dos extratos isentos de células foi significativamente menor do que a dos micélios intactos.

Neste mesmo estudo, os autores também avaliaram o efeito de alguns inibidores (cicloheximida, SKF 525A e metopirone), resultando na inibição quase completa da degradação endógena das AFs quando aplicados nos cultivos com tempo de 6 e 8 dias. Extratos isentos de células de culturas de 10 dias também mostraram degradação de AFB1 e AFG1 muito reduzida na presença de SKF 525-A e metopirone, 3,5% e 12,2%, e, 3,8% e 6,2% respectivamente, confirmando a natureza enzimática da degradação das AFs. O uso de SKF 525-A, e metopirone neste estudo proporcionou melhor compreensão no tipo de enzimas envolvidas na degradação, uma vez que estes compostos são inibidores clássicos das enzimas monooxigenases do

citocromo P-450, as quais servem como substratos alternativos combinando-se com o sítio ativo da enzima. Estes dados permitiram concluir que a capacidade desses compostos de inibir a degradação da aflatoxina no micélio intacto e em extratos sem células sugere fortemente que as enzimas envolvidas na degradação das AFs por *A. flavus* pertencem ao sistema de enzimas monooxigenase do citocromo P-450.

Por outro lado, a adição de NADPH ou NaIO₄ aos extratos isentos de células, resultou em maior degradação da aflatoxina, em particular, o NaIO₄ aumentou a degradação da AFB1 e AFG1, comparado com os valores do controle, passando de 19,0% e 22,0% para 45,8% e 47,8%, respectivamente. O efeito inibitório da cicloheximida confirmou que a atividade degradativa foi de natureza enzimática, pois a reação de hidroxilação que é suportada na presença deste agente oxidante, indica a natureza hemoproteica da enzima, o que é típico do sistema dependente do citocromo P-450 (HAMID; SMITH, 1987).

Nakazato et al. (1990) investigaram o efeito do período de cultivo na conversão de AFB1 em AFL por quatro estirpes de fungos, *A. niger*, *Eurotium herbariorum*, *Rhizopus* sp. e *A. flavus* não produtor de aflatoxina, que poderiam converter AFB1 para AFL, e também poderiam reconverter AFL para AFB1. O acúmulo de AFL nas culturas iniciou-se no 2º dia de cultivo, aumentou rapidamente entre 6º e 8º dias, e depois diminuiu gradualmente até o 15º dia, final do período de cultivo. A interconversão de AFB1 à AFL e de AFL à AFB1 foi observada durante a proliferação dos fungos. Essas reações foram observadas em sistemas sem células, obtidos a partir de micélios rompidos de *A. flavus* e *Rhizopus* sp., mas não foram observados em filtrados de cultura de micélios intactos das mesmas cepas, assim como nos sistemas sem células pré-aquecidas a 100 °C. A partir destes dados, os autores concluíram que a interconversão de AFB₁ em AFL foi mediada por enzimas intracelulares de *A. flavus* e *Rhizopus* sp.

Yao et al. (1998), fizeram *screening* de fungos que tinham atividade multienzima na detoxificação de AFB1, avaliando as condições adequadas para o desenvolvimento dos fungos, assim como as melhores condições para sua ação na detoxificação. Além disso, foi avaliado *in vivo* as diferenças na patologia do fígado de três grupos de ratos: (1) grupo de controle normal: injetados com 0,2 mL de sulfóxido de dimetilo; (2) grupo de teste: injetados com 200 µg de AFB1 e pré-tratados com o sistema multienzima; (3) grupo controle AFB1: injetados com 200 µg de AFB1 e pré-tratados com tampão fosfato de sódio. Os resultados demonstraram que de todos os 20 sistemas multienzima testados, só o sistema obtido de *Armillariella tabescens* apresentou atividade definida na desintoxicação em relação à AFB1. Para este sistema multienzima a maior atividade de desintoxicação, representada pela atividade

do sistema multienzimático (uma unidade de atividade multienzimática foi definida como 1 nM de decrescimento de AFB1 por min) foi alcançada quando a fonte de nitrogênio, carboidrato e meio foram: suco de batata ($0,278 \text{ U mL}^{-1}$), lactose ($1,040 \text{ U mL}^{-1}$) e fosfato de potássio com pH 6,0. Os autores relataram que o tempo apropriado para o crescimento fungico foi de 4 a 5 semanas, e temperatura de 28°C ($2,22 \text{ U}$). Por outro lado, as investigações patológicas do fígado de ratos mostraram que as ultraestruturas do grupo teste foram semelhantes ao grupo de controle normal, no entanto, no grupo controle AFB1, danos típicos foram encontrados nas células e no tecido hepático. Com esses resultados, os autores sugeriram que o sistema multienzima de *Armillariella tabescens* tem atividade de detoxificação catalítica.

Shantha (1999) comprovou que várias culturas de fungos *Phoma* sp., *Mucor* sp., *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma* sp. 639, *Rhizopus* sp. 663, *Rhizopus* sp. 710, *Rhizopus* sp. 668, *Alternaria* sp., e algumas cepas pertencentes ao grupo *Sporotrichum*, são capazes de impedir a biossíntese de AFB1 e degradar a toxina pré-formada. Entre estes, *Phoma* sp. foi a cepa em que se observou a degradação com maior eficiência, registrando inibição de cerca de 99% da AFB1. Além disso, quando a mistura reacional contendo extratos livres de células de *Phoma* sp. e AFB1 foram incubadas durante 5 dias, com e sem aquecimento em água fervente durante 10 min, foi observada degradação significativa de 90% e 95% respectivamente, sugerindo a possível ação para uma enzima termoestável na degradação.

Zhang et al. (2014) rastrearam uma estirpe de *A. niger* (ND-1) que degradou 58,2% de AFB1 após 48 h de fermentação. A atividade de degradação de *A. niger* foi significativamente maior no sobrenadante da cultura do que nas células e extratos celulares. A atividade também foi afetada por tratamento térmico, pH e íons metálicos, indicando que a reação de degradação foi enzimática e este processo ocorre principalmente no ambiente extracelular.

4.3. ENZIMAS

Doyle e Marth (1978) estudaram a degradação de AFs por ação da lactoperoxidase em três concentrações de enzima: 5, 50, e 500 U mL^{-1} de meio reacional, contendo $225 \mu\text{M}$ de NaCl e $50 \mu\text{M}$ de H_2O_2 a 28°C . Os resultados mostraram que o aumento na quantidade de enzima de 50 para 500 U mL^{-1} resultou no aumento da taxa de degradação (no período de 24 h) de 3,6 para 5,1% para AFB1 e de 4,6 para 7,2% para AFG1, respectivamente. Além disso, verificou-se que a concentração inicial das AFs não influenciou no percentual de degradação e que a velocidade de degradação da AFG1 foi aproximadamente 1,5 vezes maior que da AFB1.

Esses resultados suportam a hipótese que peroxidases presentes nos micélios estão envolvidas na degradação.

A degradação enzimática de AFB1 foi proposta por Das e Mishra (2000b), onde foi comprovada a ação da peroxidase (POD) na degradação de AFB1 presente em farelo de amendoim, alcançando degradações de até 53% usando POD comercial. POD de rabanete (200 U mg^{-1}) e POD parcialmente purificada também de rabanete com 20, 30 e $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ de proteína foram utilizadas na degradação de AFB1 presente em farinha de amendoim desengordurada finamente pulverizada. As degradações obtidas foram 53, 35 e 41%, respectivamente. Para otimizar as condições experimentais, concentrações de enzima (2 – 16 U) e AFB1 (0,4 - 2 mM) em 100 g de amostra foram testadas sob temperatura ambiente e condições normais de pressão durante um tempo de incubação de 24 h. O percentual de conversão do substrato tornou-se relativamente constante a partir de 1,4 mM de AFB1 em todos os casos testados, além disso, um aumento acentuado da velocidade de degradação foi evidente em todos os casos quando em até 8 U, depois de 10 U de concentração enzimática, a conversão percentual atingiu um nível estável. Portanto, as condições ótimas de reação foram observadas quando 10 U de enzima dissolvida em tampão de fosfato 50 mM a pH 6 foram homogeneizadas com 100 g de farelo de amendoim contendo 1,4 mM AFB1 a 20 °C e pressão normal durante um período de incubação de 24 h.

Motomura et al. (2003), também reportaram a atividade da POD extraída a partir de *Pleurotus ostreatus* na degradação da AFB1 tendo como característica a purificação de 148 vezes com 50% de rendimento. AFB1 ($5 \mu\text{g mL}^{-1}$) foi incubada durante 1 h em 500 μL de mistura contendo 0,1 M de tampão acetato de sódio e 445 μL de fração da enzima purificada a partir de cultura de *Pleurotus ostreatus*. A temperatura ótima para a atividade enzimática foi determinada na faixa de 20 a 45 °C em intervalos de 5 °C, e o pH ótimo na faixa de 4,0 a 10,0 utilizando acetato de sódio 50 mM, fosfato de sódio ou tampões de hidróxido de sódio glicina. A máxima atividade de degradação das AFs apresentou-se na faixa de pH de 4,0 a 5,0 e temperatura de 25 °C. Além disso, a presença de H_2O_2 na atividade de degradação de AFB1 foi testada, mediante mudanças da absorvância a 25 °C, resultando na degradação pela enzima purificada tanto na ausência (50%) ou presença de H_2O_2 , porém a atividade foi maior neste último caso (54%). Com base nestes dados, os autores sugeriram a POD como enzima com atividade de degradação de AFs.

Alberts et al. (2009), utilizaram um tipo de lacase pura obtida a partir de *Trametes versicolor* (1 U mL^{-1}) na degradação de AFB1, alcançando degradação de até 87,3% após 72 h de incubação. Neste estudo, valores de pH (2,5 a 7) e temperaturas (5 a 65 °C) foram estudados

com 80 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de AFB1 e 30 U mL^{-1} da enzima. O pH ótimo foi 4,5 e a temperatura ótima foi 35 °C.

A enzima MADE (Myxobacteria enzima de degradação de aflatoxinas) obtida a partir do sobrenadante de uma cultura de bactéria *M. fulvus* ANSM068 também foi avaliada quanto a degradação de AFs. A enzima foi purificada 166 vezes com recuperação de 57% utilizando precipitação com etanol e cromatografia em DEAE-Sepharose e Superdex 75, apresentando uma atividade específica final de $569,44 \times 10^{-3} \text{ U mg}^{-1}$, e massa molecular aparente de 32 kDa. Esta enzima demonstrou alta atividade de degradação de AFs na faixa de pH entre 5,0 e 7,0, e temperaturas entre 30 e 45 °C, obtendo degradações de 96,9% e 95,8% para AFG1 e AFM1, respectivamente, após o tratamento com MADE pura (100 U mL^{-1}) durante 48 h de incubação (ZHAO et al., 2010).

Wang et al. (2011), empregaram a Manganês peroxidase (MnP) purificada a partir de *Phanerochaete sórdida* YK-624, encontrando que a MnP pode catalisar a conversão de 86% de AFB1 (50 mg L^{-1}) em período de incubação de 48 h a 30 °C, oxidando primeiro a AFB1 para AFB1-8,9-epóxido e depois hidrolisando a molécula para AFB1-8,9-dihidrodiol. Resultados similares foram encontrados por Yehia (2014), que utilizou uma enzima da classe das MnP com 42 kDa. A proteína, obtida de cogumelo comestível branco *P. ostreatus*, alcançou a maior redução (90%) após 48 h de incubação com $1,5 \text{ U mL}^{-1}$ de atividade enzimática. O efeito do pH sobre a atividade da enzima purificada de MnP mostrou valores ótimos de pH na faixa de 4,0 a 5,0. A atividade da enzima diminuiu a medida que o pH aumentou. Por outro lado, a temperatura ótima de acordo com os autores foi 25 °C.

Em um estudo mais recente realizado por Zeinvand-Lorestani et al. (2015), os autores enfatizaram as condições ótimas de ação da lacase a partir *Trametes versicolor* sobre a degradação da AFB₁, indicando que a mesma ocorreu em 0,1 M de tampão citrato, contendo 20% de dimetilsulfóxido (DMSO) a 35 °C, em pH de 4,5 e atividade de lacase de 30 U mL^{-1} , alcançando 67% de redução.

5 CONCLUSÃO

Os altos percentuais de degradação obtidos por diversos estudos, assim como uma diversidade de condições de reação para a degradação, sugerem uma aplicação potencial e promissora para a degradação de AFs em alimentos e rações. Tendo em vista a aplicação de enzimas na indústria alimentícia, sejam elas obtidas de micro-organismos ou outras fontes, algumas limitações devem ser observadas, principalmente quanto a sua aplicabilidade aos

processos produtivos, considerando o alto custo de produção e purificação e, estabilidade a amplas faixas de temperatura e pH. Mas, apesar dessas limitações, as potencialidades do uso de enzimas continuam generalizadas. A sua aplicação é versátil, uma vez que podem ser utilizadas nas formas livre ou imobilizada e facilmente aplicadas em processos industriais bem estabelecidos (fermentação, amadurecimento, fabricação de cerveja ou produção de queijos, produção de alimentos e bioenergia). Para sua utilização é de grande interesse desenvolver estudos que facilitem sua aplicação diretamente nos alimentos ou processos, contribuindo assim com a garantia da qualidade dos alimentos produzidos e comercializados.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAR, M.; ANJUM, F. M.; BUTT, M. S.; PASHA, I.; RANDHAWA, M. A.; SAEED, F.; WAQAS, K. Aflatoxins: Biosynthesis, Occurrence, Toxicity, and Remedies. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 53, n. 8, p. 862–874, 2013.
- ADEBO, O. a; NJOBEH, P. B.; GBASHI, S.; NWINYI, O. C.; MAVUMENGWANA, V. Review on Microbial Degradation of Aflatoxins. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 1040–8398, n. November, p. 1549–7852, 2015.
- ALBERTS, J. F.; ENGELBRECHT, Y.; STEYN, P. S.; HOLZAPFEL, W. H.; VAN ZYL, W. H. Biological Degradation of Aflatoxin B1 by *Rhodococcus Erythropolis* Cultures. **International Journal of Food Microbiology**, v. 109, n. 1–2, p. 121–126, 2006.
- ALBERTS, J. F.; GELDERBLUM, W. C. A.; BOTHA, A.; ZYL, W. H. Van. Degradation of Aflatoxin B1 by Fungal Laccase Enzymes. **International Journal of Food Microbiology**, v. 135, p. 47–52, 2009a.
- ALBERTS, J. F.; GELDERBLUM, W. C. a; BOTHA, a.; VAN ZYL, W. H. Degradation of Aflatoxin B1 by Fungal Laccase Enzymes. **International Journal of Food Microbiology**, v. 135, n. 1, p. 47–52, 2009b.
- ALONSO, V. A.; MONGE, M. P.; LARRIESTRA, A.; DALCERO, A. M.; CAVAGLIERI, L. R.; CHIACCHIERA, S. M. Naturally Occurring Aflatoxin M1 in Raw Bulk Milk from Farm Cooling Tanks in Argentina. **Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment**, v. 27, n. 3, p. 373–379, 2010.
- AMANDA, P.; GARZA, Q. **Ocurrencia y estimación de la exposición humana a aflatoxina M 1 en muestras de leche procedentes de Monterrey (México).** 2014. Universidad Autonoma de Barcelona, 2014.
- ARAGÓN, S. **Determinación de la presencia de aflatoxina M1 por el método de Elisa en queso seco y oreado que se expende en 5 mercados municipales de la ciudad capital.** 2014. Universidad de San Carlos de Guatemala, 2014. Disponível em: <[http://www.repositorio.usac.edu.gt/1834/1/Tesis Med Vet Juan C Dubon.pdf](http://www.repositorio.usac.edu.gt/1834/1/Tesis%20Med%20Vet%20Juan%20C%20Dubon.pdf)>. Acesso em Maio 2017.
- ARANGUREN, E. M.; ARGÜELLES, M. J. **Detección de Aflatoxina M1 en Quesos Frescos Comercializados en el Municipio de Yopal, Casanare, Mediante la Técnica de**

Elisa. 2009. Trabajo de Conclusão de Curso (Graduação em Microbiologia Industrial) – Universidad Javeriana, Bogotá, 2009.

AZARIKIA, M.; MAHDAVI, R.; NIKNIAZ, L. Occurrence and Dietary Factors Associated with the Presence of Aflatoxin B1 and M1 in Breast Milk of Nursing Mothers in Iran. **Food Control**, v. 86, p. 207–213, 2018.

BAUER, J. I.; GROSS, M.; GOTTSCHALK, C.; USLEBER, E. Investigations on the Occurrence of Mycotoxins in Beer. **Food Control**, v. 63, p. 135–139, 2016.

BERMUDEZ, R. **Determinación de la presencia de aflatoxina M1 en leche cruda proveniente de explotaciones lecheras asociadas a COOPROLECHE en la región de la costa sur de Guatemala.** 2011.134 p. Trabajo de Conclusão de Curso (Medicina Veterinaria y Zootecnia) - Universidad de San Carlos de Guatemala, San Carlos, 2011.

BHAT, R.; RAI, R. V.; KARIM, A. A. Mycotoxins in Food and Feed: Present Status and Future Concerns. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 9, n. 1, p. 57–81, 2010.

BHATNAGAR-MATHUR, P.; SUNKARA, S.; BHATNAGAR-PANWAR, M.; WALIYAR, F.; SHARMA, K. K. Biotechnological Advances for Combating Aspergillus Flavus and Aflatoxin Contamination in Crops. **Plant Science**, v. 234, p. 119–132, 2015.

CAI, F.; OUYANG, C.; DUAN, P.; GAO, S.; XU, Y.; CHEN, F. Purification and Characterization of a Novel Thermal Stable Peroxidase from Jatropha Curcas Leaves. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 77, p. 59–66, 2012.

CLAEYS, W. L.; CARDOEN, S.; DAUBE, G.; DE BLOCK, J.; DEWETTINCK, K.; DIERICK, K.; DE ZUTTER, L.; HUYGHEBAERT, A.; IMBERECHTS, H.; THIANGE, P.; VANDENPLAS, Y.; HERMAN, L. Raw or Heated Cow Milk Consumption: Review of Risks and Benefits. **Food Control**, v. 31, n. 1, p. 251–262, 2013.

COLE, R. J.; KIRKSEY, J. W.; BLANKENSHIP, B. R. Conversion of Aflatoxin B1 to Isomeric Hydroxy Compounds by Rhizopus Spp. **J. Agric. Food Chem.**, v. 20, n. 6, p. 1100–1102, 1972.

COMBITA, A. del pilar; MILDENBERG, S. **Detección de aflatoxina M1 en leches frescas comercializadas en la zona del valle del cauca (Colombia) mediante la técnica de Elisa.** 2009. 78 p. Trabajo de conclusão de Cruso (Medicina Veterinaria). Pontificia Universidad Javeriana, 2009. Bogotá.

CREPPY, E. E. Update of Survey, Regulation and Toxic Effects of Mycotoxins in Europe. **Toxicology Letters**, v. 127, n. 1–3, p. 19–28, 2002.

DAS, C.; MISHRA, H. N. In Vitro Degradation of Aflatoxin B1 in Groundnut (*Arachis Hypogea*) Meal by Horse Radish Peroxidase. **LebensmWiss Technol**, v. 33, n. 4, p. 308–312, 2000a.

DAS, C.; MISHRA, H. N. In Vitro Degradation of Aflatoxin by Horse Radish Peroxidase. **Food Chemistry**, v. 68, n. 4, p. 309–313, 2000b.

DIAZ, G. J.; ESPITIA, E. Occurrence of Aflatoxin M1 in Retail Milk Samples from Bogotá, Colombia. **Food additives and contaminants**, v. 23, n. 8, p. 811–815, 2006.

DIAZ, G. J.; SÁNCHEZ, M. P. Determination of Aflatoxin M₁ in Breast Milk as a Biomarker of Maternal and Infant Exposure in Colombia. **Food Additives & Contaminants: Part A**, v. 49, n. May 2015, p. 150511035939005, 2015.

DIENER, U. L.; COLE, R. J.; SANDERS, T. H.; PAYNE, G. A.; LEE, L. S.; KLICH, M. A. Epidemiology of Aflatoxin Formation by *Aspergillus Flavus**. **Annual Review of Phytopathology**, v. 25, n. 1, p. 249–270, 1987.

DILKIN, P.; MALLMANN, C. A.; SANTURIO, J. M.; HICKMANN, J. L. Classificação Macroscópica, Identificação ea Microbiota Fúngica e Produção de Aflatoxinas em Híbridos de Milho. **Ciência Rural**, v. 30, n. 1, p. 137–141, 2000.

DOYLE, M. P.; MARTH, E. H. Degradation of Aflatoxin by Lactoperoxidase. **Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung**, v. 166, n. 5, p. 271–273, 1978a.

DOYLE, M. P.; MARTH, E. H. Aflatoxin Is Degraded by Fragmented and Intact Mycelia of *Aspergillus Parasiticus* Grown 5 to 18 Days with and without Agitation. **Journal of Food Protection**, v. 41, n. 7, p. 549–555, 1978b.

DOYLE, M. P.; MARTH, E. H. Aflatoxin Is Degraded at Different Temperatures and pH Values by Mycella of *Aspergillus Parasiticus*. **European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 6, n. 1, p. 95–100, 1978c.

DOYLE, M. P.; MARTH, E. H. Aflatoxin Is Degraded by Heated and Unheated Mycelia, Filtrates of Homogenized Mycelia and Filtrates of Broth Cultures of *Aspergillus Parasiticus*. **Mycopathologia**, v. 64, n. 1, p. 59–62, 1978d.

DOYLE, M. P.; MARTH, E. H. Peroxidase Activity in Mycelia of *Aspergillus Parasiticus*. **European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 7, p. 211–217, 1979.

FELTRIN, A. C. P.; GARCIA, S. D. O.; CALDAS, S. S.; PRIMEL, E. G.; BADIALE-FURLONG, E.; GARDA-BUFFON, J. Characterization and Application of the Enzyme Peroxidase to the Degradation of the Mycotoxin DON. **Journal of Environmental Science and Health, Part B**, v. 1234, n. September, p. 1–7, 2017.

FETAIH, H. A.; DESSOUKI, A. A.; HASSANIN, A. A. I.; TAHAN, A. S. Toxopathological and Cytogenetic Effects of Aflatoxin B1 (AFB1) on Pregnant Rats. **Pathology Research and Practice**, v. 210, n. 12, p. 1079–1089, 2014.

FINK-GREMMEIS, J. The Role of Mycotoxins in the Health and Performance of Dairy Cows. **The Veterinary Journal**, v. 176, n. 1, p. 84–92, 2008.

FLORES-FLORES, M. E.; LIZARRAGA, E.; LÓPEZ DE CERAIN, A.; GONZÁLEZ-PEÑAS, E. Presence of Mycotoxins in Animal Milk: A Review. **Food Control**, v. 53, p. 163–176, 2015.

FRAGOSO, E.; DAVID, T.; ROMERO, S.; OSPINO, H. Determination of aflatoxin M1 in raw milk by HPLC marker as evidence of cattle- food storage conditions from the herd suppliers of a dairy company in the city of Valledupar. Disponível em: <https://pdfs.semanticscholar.org/ce69/a8b36bc9a2e9868c152a2f9d011f43a097af.pdf>. Acesso em Novembro 2017.

GARCIA, S. O.; FELTRIN, A. C. P.; GARDA-BUFFON, J.; GARCIA, S. O.; FELTRIN, A. C. P.; GARDA-BUFFON, J. Zearalenone Reduction by Commercial Peroxidase Enzyme and Peroxidases from Soybean Bran and Rice Bran. v. 35, n. 9, p. 1819–1831, 2018.

- GARCÍA LONDOÑO, V. A.; BOASSO, A. C.; Z. DE PAULA, M. C.; GARCIA, L. P.; SCUSSEL, V. M.; RESNIK, S.; PACÍN, A. Aflatoxin M1 Survey on Randomly Collected Milk Powder Commercialized in Argentina and Brazil. **Food Control**, v. 34, n. 2, p. 752–755, 2013.
- GIOVATI, L.; MAGLIANI, W.; CIOCIOLA, T.; SANTINOLI, C.; CONTI, S.; POLONELLI, L. AFM1 in Milk: Physical, Biological, and Prophylactic Methods to Mitigate Contamination. **Toxins**, v. 7, n. 10, p. 4330–4349, 2015.
- GONÇALVES, K.; MARIMÓN, K.; ANA, F.; REMEDI, R. D.; GARCIA, S. D. O.; GARDA-BUFFON. 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. 20, p. 260–264, 2018.
- GONÇALVES, L.; DALLA ROSA, A.; GONZALES, S.; FELTES, M. M.; BADIALE-FURLONG, E.; DORS, G. C. Incidence of Aflatoxin M1 in Fresh Milk from Small Farms. **Food Science and Technology**, v. 37, n. spe, p. 11–15, 2017.
- GONZÁLEZ, E.; FELICIO, M. .; ROSSI, M, H.; NOGUEITA, J. H. .; MANGINELLI, S. Ocorrência de Aflatoxina M1 em Leite Comercializado em Alguns Municípios do Estado de São Paulo. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 72, n. 4, p. 435–438, 2005.
- GOURAMA, H. Inhibition of Growth and Mycotoxin Production of *Penicillium* By *Lactobacillus* Species. **Food Science & Technology-Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie**, v. 30, n. 3, p. 279–283, 1997.
- GRENIER, B.; BRACARENSE, A. P. F. L.; SCHWARTZ, H. E.; TRUMEL, C.; COSSALTER, A. M.; SCHATZMAYR, G.; KOLF-CLAUW, M.; MOLL, W. D.; OSWALD, I. P. The Low Intestinal and Hepatic Toxicity of Hydrolyzed Fumonisin B1 Correlates with Its Inability to Alter the Metabolism of Sphingolipids. **Biochemical Pharmacology**, v. 83, n. 10, p. 1465–1473, 2012.
- GUAN, S.; JI, C.; ZHOU, T.; LI, J.; MA, Q.; NIU, T. Aflatoxin B 1 Degradation by *Stenotrophomonas Maltophilia* and Other Microbes Selected Using Coumarin Medium. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 9, n. 8, p. 1489–1503, 2008.
- HAMID, M.; KHALIL-UR-REHMAN. Potential Applications of Peroxidases. **Food Chemistry**, v. 115, n. 4, p. 1177–1186, 2009.
- HAMID, A. Bin; SMITH, J. E. Degradation of Aflatoxin by *Aspergillus Flavus*. **Journal of General Microbiology**, v. 4, n. 133, p. 2023–2029, 1987.
- HERNÁNDEZ, J.; ABADÍA, B.; MORENO, J. Determinación de Aflatoxina M1 En Leche Proveniente Del Caribe Colombiano, Empleando Cromatografía Líquida de Ultra Resolución. **Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias**, v. 22, n. 3, p. 430–437, 2009.
- HOYOS OSSA, D. E.; HINCAPIÉ, D. A.; PEÑUELA, G. A. Determination of Aflatoxin M1 in Ice Cream Samples Using Immunoaffinity Columns and Ultra-High Performance Liquid Chromatography Coupled to Tandem Mass Spectrometry. **Food Control**, v. 56, p. 34–40, 2015.
- 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.

HUYNH, V. L.; GERDES, R. G.; LLOYD, A. B. Synthesis and Degradation of Aflatoxins by *Aspergillus Parasiticus*. II. Comparative Toxicity and Mutagenicity of Aflatoxin B1 and Its Autolytic Breakdown Products. **Australian Journal of Biological Sciences**, v. 37, n. 3, p. 123–129, 1984.

IHA, M. H.; BARBOSA, C. B.; OKADA, I. A.; TRUCKSESS, M. W. Occurrence of Aflatoxin M1 in Dairy Products in Brazil. **Food Control**, v. 22, n. 12, p. 1971–1974, 2011.

IHA, M. H.; BARBOSA, C. B.; OKADA, I. A.; TRUCKSESS, M. W. Aflatoxin M1 in Milk and Distribution and Stability of Aflatoxin M1 during Production and Storage of Yoghurt and Cheese. **Food Control**, v. 29, n. 1, p. 1–6, 2013.

IQBAL, S. Z.; JINAP, S.; PIROUZ, A. A.; FAIZAL, A. R. A. Aflatoxin M1 in Milk and Dairy Products, Occurrence and Recent Challenges: A Review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 46, p. 110–119, 2015.

KAN, C. A. Transfer of Toxic Substances from Feed to Food. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 38, n. SUPPL. 1, p. 423–431, 2009.

KUMAR, R.; SINGH, K. A.; SINGH, V. K.; JAGANNADHAM, M. V. Biochemical Characterization of a Peroxidase Isolated from Caribbean Plant: *Euphorbia Cotinifolia*. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 6, p. 1350–1357, Jun. 2011.

KURTZMAN, C. P.; HORN, B. W.; HESSELTINE, C. W. *Aspergillus Nomius*, a New Aflatoxin-Producing Species Related to *Aspergillus Flavus* and *Aspergillus Tamaritii*. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 53, n. 3, p. 147–158, 1987.

KUSUMANINGTYAS, E.; WIDIASTUTI, R.; MARYAM, R. Reduction of Aflatoxin B1 in Chicken Feed by Using *Saccharomyces Cerevisiae*, *Rhizopus Oligosporus* and Their Combination. **Mycopathologia**, v. 162, n. 4, p. 307–311, 2006.

LANDEROS, P.; NOA, M.; LÓPEZ, Y.; GONZÁLEZ, D. G.; NOA, E.; REAL, M.; JUÁREZ, C.; MEDINA, M. S. Niveles de Aflatoxina M1 En Leche Cruda y Pasteurizada Comercializada en ea Zona Metropolitana de Guadalajara, México Aflatoxin M1 Levels in Raw and Pasteurized Milk Produced in Guadalajara, Mexico. **Rev. Salud Anim**, v. 34, n. 1, p. 40–45, 2012.

LAPALIKAR, G. V.; TAYLOR, M. C.; WARDEN, A. C.; SCOTT, C.; RUSSELL, R. J.; OAKESHOTT, J. G. F 420H 2-Dependent Degradation of Aflatoxin and Other Furanocoumarins Is Widespread throughout the Actinomycetales. **PLoS ONE**, v. 7, n. 2, 2012.

LEONTOPOULOS, D.; SIAFAKA, A.; MARKAKI, P. Black Olives as Substrate for *Aspergillus Parasiticus* Growth and Aflatoxin B1 Production. **Food Microbiology**, v. 20, n. 1, p. 119–126, 1 Feb. 2003.

LÓPEZ, C. E.; RAMOS, L. ; RAMADÁN, S. S.; BULACIO, L. C. Presence of Aflatoxin M1 in Milk for Human Consumption in Argentina. **Food Control**, v. 14, p. 31–34, 2003.

MASOOD, M.; IQBAL, S. Z.; ASI, M. R.; MALIK, N. Natural Occurrence of Aflatoxins in Dry Fruits and Edible Nuts. **Food Control**, v. 55, p. 62–65, 2015.

MICHLIG, N.; SIGNORINI, M.; GAGGIOTTI, M.; CHIERICATTI, C.; BASÍLICO, J. C.; REPETTI, M. R.; BELDOMENICO, H. R. Risk Factors Associated with the Presence of

Aflatoxin M1 in Raw Bulk Milk from Argentina. **Food Control**, v. 64, p. 151–156, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.12.025>>.

MOTOMURA, M.; TOYOMASU, T.; MIZUNO, K.; SHINOZAWA, T. Purification and Characterization of an Aflatoxin Degradation Enzyme from *Pleurotus Ostreatus*. **Microbiological research**, v. 158, n. 3, p. 237–242, 2003.

NAKAZATO, M.; MOROZUMI, S.; SAITO, K.; FUJINUMA, K.; NISHIMA, T.; KASAI, N. Interconversion of Aflatoxin B1 and Aflatoxicol by Several Fungi. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, n. 5, p. 1465–1470, 1990.

NORA, N. (FURG). **Redução dos níveis de Ocratoxina A por ação enzimática.pdf**. 2015. 165 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciencia de Alimentos). Escola de Química e Alimentos. Universidade Federal de Rio Grande. Rio Grande, 2015.

OLIVEIRA, C. P. De; SOARES, N. D. F. F.; OLIVEIRA, T. V. De; BAFFA JÚNIOR, J. C.; SILVA, W. A. Da. Aflatoxin M1 Occurrence in Ultra High Temperature (UHT) Treated Fluid Milk from Minas Gerais/Brazil. **Food Control**, v. 30, n. 1, p. 90–92, 2013.

ORTIZ-MARTINEZ, R.; DE LUNA-LOPEZ, M. C.; VALDIVIA-FLORES, A.; QUEZADA-TRISTAN, T. Assessment of Aflatoxin M1 Levels in White Cheese. **Toxicology Letters**, v. 229, p. S224, 10 Sep. 2014.

ORTIZ-MARTINEZ, R.; VALDIVIA-FLORES, A.; QUEZADA-TRISTAN, T.; LUNA-LÓPEZ, M. C. De. Contamination of White Cheese with Aflatoxin M1. **Toxicology Letters**, v. 221, p. S63, 28 Aug. 2013.

ORTIZ MARTINEZ, R.; VALDIVIA FLORES, A. G.; DE LUNA LOPEZ, M.; QUEZADA TRISTAN, T.; MIRANDA CASTAÑEDA, C. A.; RANGEL MUÑOZ, E. J.; CRUZ VAZQUEZ, C. Occurrence of Aflatoxins in Milk since Dairy Farms until Consumers: An Exploratory Study. **Toxicology Letters**, v. 258, p. S87–S88, 16 Sep. 2016.

PEREIRA, M. M. G.; CARVALHO, E. P. De; PRADO, G.; ROSA, C. A. D. R.; VELOSO, T.; SOUZA, L. A. F. De; RIBEIRO, J. M. M. Aflatoxinas em Alimentos Destinados a Bovinos e em Amostras de Leite da Região de Lavras, Minas Gerais - Brasil. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 29, p. 106–112, 2005.

PEREIRA, V. L.; FERNANDES, J. .; CUNHA, S. . Micotoxinas Em Portugal : Ocorrência E Toxicidade. **Acta Farmacologica Portuguesa**, v. II, n. 1, 2000.

PÉREZ, J.; GUTIÉRREZ, R.; VEGA, S.; DÍAZ, G.; URBÁN, G.; CORONADO, M.; ESCOBAR, A. Ocurrência de Aflatoxina M1 En Leches Cruda, Ultrapasteurizada y Orgánica Producidas y Comercializadas en el Altiplano Mexicano. **Revista Salud Animal**, v. 30, n. 2, p. 103–109, 2008.

PICININ, L. C. A.; CERQUEIRA, M. M. O. P.; VARGAS, E. A.; LANA, Â. M. Q.; TOALDO, I. M.; BORDIGNON-LUIZ, M. T. Influence of Climate Conditions on Aflatoxin M1 Contamination in Raw Milk from Minas Gerais State, Brazil. **Food Control**, v. 31, n. 2, p. 419–424, 2013.

PRADO, G.; OLIVEIRA, M. S. De; LIMA, A. S.; PAULA, A.; MOREIRA, A. Occurrence of Aflatoxin M1 in Parmesan Cheese Consumed in Minas Gerais, Brazil. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 32, n. 6, p. 1906–1911, 2008.

REYES VELÁZQUEZ, W.; MARTÍNEZ, S. P.; ISAÍAS ESPINOSA, V. H.; NATHAL VERA, M. A.; DE LUCAS PALACIOS, E.; ROJO, F. Aflatoxinas Totales En Raciones de Bovinos Y AFM1 En Leche\rcruda Obtenida En Establos Del Estado de Jalisco, México. **Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias**, v. 47 (2), n. 2, p. 223–230, 2009.

SANTOS, A. L.; BANDO, E.; MACHINSKI JUNIOR, M. Ocorrência de Aflatoxina M1 Em Leite Bovino Comercializado No Estado Do Paraná, Brasil. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 35, n. 1, p. 371, 2014..

SARIMEHMETOGLU, B.; KUPLULU, O.; CELIK, H. . Detection of Aflatoxin M 1 in Cheese Samples by ELISA. **Food Control**, v. 15, p. 45–49, 2004.

SARTORI, A. V.; SWENSSON DE MATTOS, 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-High-Performance Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry. **Food Analytical Methods**, v. 8, n. 9, p. 2321–2330, 2015.

SASSAHARA, M.; PONTES NETTO, D.; YANAKA, E.K. Aflatoxin occurrence in foodstuff supplied to dairy cattle and aflatoxin M1 in raw milk in the North of Parana state. **Food and Chemical Toxicology**, v. 43, n. 6, p. 981–984, 2005.

SCAGLIONI, P. T.; BECKER-ALGERI, T.; DRUNKLER, D.; BADIALE-FURLONG, E. Aflatoxin B1 and M1 in Milk. **Analytica Chimica Acta**, v. 829, p. 68–74, 2014.

SHANTHA, T. Fungal Degradation of Aflatoxin B1. **Natural Toxins**, v. 7, n. January 1999, p. 175–178, 1999.

SHUNDO, L.; ALMEIDA, A. P. de; ALABURDA, J.; LAMARDO, L. C. A.; NAVAS, S. A.; RUVIERI, V.; SABINO, M. Occurrence of Aflatoxin M1 in Bovine Milk Samples Consumed in Different Regions of BrazilOcorrência de Aflatoxina M1 Em Amostras de Leite Bovino Consumido Em Diferentes Regiões Do Brasil. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, n. July 2017, p. 1–8, 2016.

SIGMA CHEMICAL COMPANY. **Commercial Peroxidase Enzyme Specifications (Peroxidase from horseradish)**. Disponível em:

<<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/substance/peroxidasefromhorseradish12345900399011?lang=pt®ion=BR>>. Acesso em abril 2018.

SILVA, M. V.; JANEIRO, V.; BANDO, E.; MACHINSKI JR, M. Occurrence and Estimative of Aflatoxin M1 Intake in UHT Cow Milk in Paraná State, Brazil. **Food Control**, v. 53, p. 222–225, 2015.

TAYLOR, M. C.; JACKSON, C. J.; TATTERSALL, D. B.; FRENCH, N.; PEAT, T. S.; NEWMAN, J.; BRIGGS, L. J.; LAPALIKAR, G. V.; CAMPBELL, P. M.; SCOTT, C.; RUSSELL, R. J.; OAKESHOTT, J. G. Identification and Characterization of Two Families of F420H2-Dependent Reductases from Mycobacteria That Catalyse Aflatoxin Degradation. **Molecular Microbiology**, v. 78, n. 3, p. 561–575, 2010.

TENIOLA, O. D.; ADDO, P. A.; BROST, I. M.; FÄRBER, P.; JANY, K. D.; ALBERTS, J. F.; VAN ZYL, W. H.; STEYN, P. S.; HOLZAPFEL, W. H. Degradation of Aflatoxin B1 by Cell-Free Extracts of *Rhodococcus Erythropolis* and *Mycobacterium Fluoranthenivorans* Sp. Nov. DSM44556T. **International Journal of Food Microbiology**, v. 105, n. 2, p. 111–117,

2005.

UNUSAN, N. Occurrence of Aflatoxin M1 in UHT Milk in Turkey. **Food and Chemical Toxicology**, v. 44, p. 1897–1900, 2006.

URBÁN, G.; PÉREZ, J.; MARTÍNEZ, F.; SALAS, J.; DÍAZ, G.; RAMÍREZ, M. L.; CASTRO, G.; VEGA, S.; GUTIÉRREZ, R.; ESCOBAR, A. Niveles De Aflatoxina M1 en Quesos Frescos Producidos en Diferentes Zonas de México. **Revista Salud Animal**, v. 31, n. 2, p. 115–121, 2009.

VÁSQUEZ, P. **Evaluación de aflatoxinas en suplementos para vacas lecheras en la sabana de Bogotá, y su relación con aflatoxina M1 en leche**. 2006. 90 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Zootecnia) – Universidad de la Salle. Bogotá.

VEGA, S.; RUIZ, J. L.; YAMAZAKI, A.; RIVERA, J. G.; ESCOBAR, A. Evaluación de Aflatoxina M1 en Leche Orgánica Producida en Tecpatán, Chiapas, México. **Revista Salud Animal**, v. 35, n. 1, p. 33–37, 2013.

VELA, E. **Determinación de la presencia de aflatoxina M1 en leche cruda de vaca distribuida en un centro de acopio ubicado en la región de la costa sur de Guatemala**. 2015. 123 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Medicina Veterinaria y Zootecnia) - Universidad de San Carlos de Guatemala, San Carlos, 2015.

VERRAES, C.; VLAEMYNCK, G.; VAN WEYENBERG, S.; DE ZUTTER, L.; DAUBE, G.; SINDIC, M.; UYTENDAELE, M.; HERMAN, L. A Review of the Microbiological Hazards of Dairy Products Made from Raw Milk. **International Dairy Journal**, v. 50, p. 32–44, 2015.

VETAL, M. D.; RATHOD, V. K. Three Phase Partitioning a Novel Technique for Purification of Peroxidase from Orange Peels (*Citrus Sinenses*). **Food and Bioproducts Processing**, p. 3–8, 2014.

WANG, J.; OGATA, M.; HIRAI, H.; KAWAGISHI, H. Detoxification of Aflatoxin B1 by Manganese Peroxidase from the White-Rot Fungus *Phanerochaete Sordida* YK-624. **FEMS Microbiology Letters**, v. 314, n. 2, p. 164–169, 2011.

WILLIAMS, J. H.; PHILLIPS, T. D.; JOLLY, P. E.; STILES, J. K.; JOLLY, C. M.; AGGARWAL, D. Human Aflatoxin in Developing Countries: A Review of Toxicology, Exposure, Potential Health Consequences, and Interventions. **American Society for Clinical Nutrition**, v. 80, n. June 2015, p. 1106–1122, 2004.

WU, Y. Z.; LU, F. P.; JIAN, H. L.; TAN, C. P.; YAO, D. S.; XIE, C. F.; LIU, D. L. The Furofuran-Ring Selectivity, Hydrogen Peroxide-Production and Low Km Value Are the Three Elements for Highly Effective Detoxification of Aflatoxin Oxidase. **Food and Chemical Toxicology**, v. 76, p. 125–131, 2015.

YAO, D.; LIANG, R.; LIU, D.; GU, L.; MA, L.; CHEN, W. Screening of the Fungus Whose Multienzyme System Has Catalytic Detoxification Activity towards Aflatoxin B1 (Part I). **ANNALS NEW YORK ACADEMY OF SCIENCES**, v. 864, n. 1, p. 579–585, 1998.

YEHIA, R. S. Aflatoxin Detoxification by Manganese Peroxidase Purified from *Pleurotus Ostreatus*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 45, n. 1, p. 127–133, 2014.

ZAMBRANO, J.; MARTINEZ, N. **Evaluación de la reducción de aflatoxina M1 con dos**

tratamientos térmicos respecto a leche cruda en hatos de la sabana de Bogotá. 2009. 62 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Zootecnia) - Universidad de la Salle, Bogotá, 2009.

ZEINVAND-LORESTANI, H.; SABZEVARI, O.; SETAYESH, N.; AMINI, M.; NILI-AHMADABADI, A.; FARAMARZI, M. A. Comparative Study of in Vitro Prooxidative Properties and Genotoxicity Induced by Aflatoxin B1 and Its Laccase-Mediated Detoxification Products. **Chemosphere**, v. 135, p. 1–6, 2015.

ZENGİN, B.; UCKAYA, F.; DURMUS, Z. International Journal of Biological Macromolecules Chitosan and Carboxymethyl Cellulose Based Magnetic Nanocomposites for Application of Peroxidase Purification. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 96, p. 149–160, 2017.

ZHANG, W.; XUE, B.; LI, M.; MU, Y.; CHEN, Z.; LI, J.; SHAN, A. Screening a Strain of *Aspergillus Niger* and Optimization of Fermentation Conditions for Degradation of Aflatoxin B1. **Toxins**, v. 6, p. 3157–3172, 2014.

ZHAO, L. H.; GUAN, S.; GAO, X.; MA, Q. G.; LEI, Y. P.; BAI, X. M.; JI, C. Preparation, Purification and Characteristics of an Aflatoxin Degradation Enzyme from *Myxococcus Fulvus* ANSM068. **Journal of Applied Microbiology**, v. 110, n. 1364–5072, p. 147–155, 2010.

**ARTIGO IV - MITIGAÇÃO DE AFLATOXINAS POR PEROXIDASE COMERCIAL
E SUA APLICAÇÃO EM ALIMENTOS CONTAMINADOS (Artigo publico em
Revista: Journal of Chemical Technology & Biotechnology)**

RESUMO

A aflatoxina B1 (AFB1) é a mais comum e a mais tóxica de todas as aflatoxinas (AFs). É responsável pelo câncer de fígado em animais e é classificada como carcinógeno do Grupo I pela Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer. Assim, a busca por métodos de descontaminação que apresentem eficiência, especificidade e custo-benefício se faz necessária. Este estudo avaliou os efeitos da concentração de enzima, pH, temperatura e tempo de reação na mitigação de AFB1 pela peroxidase comercial (POD) em solução modelo (tampão fosfato 100 mM). Quando 0,015 U mL⁻¹ foram usadas para tratar 0,5 µg L⁻¹ de AFB1, a pH 7,0-8,0 e 30-40 °C, durante 8,0 h, a mitigação de AFB1 atingiu seu máximo (97%). O valor de K_m da POD para a mitigação de AFB1 foi 0,0160 µM (5 µg L⁻¹) com V_{Máx} de 6,4 µM min⁻¹, os quais foram determinados com base no gráfico de Lineweaver-Burk. Por fim, a POD (0,015 U mL⁻¹) efetivamente reduz a AFB1 (97%) e M1 (65%) em amostras de leite UHT adquiridas nos mercados de Rio Grande-RS (Brasil). Portanto, o emprego de POD na indústria alimentícia pode ser uma estratégia que visa mitigar o impacto das AFs encontradas em alimentos, reduzindo o risco de exposição do consumidor.

Palavras-chave: Aflatoxina. Degradação. cinética enzimática. Leite.

1 INTRODUÇÃO

As aflatoxinas (AFs) são consideradas as micotoxinas mais importantes, produzidas como metabólitos secundários principalmente dos fungos *Aspergillus flavus* (DIENER et al., 1987), *parasiticus* (LEONTOPOULOS; SIAFAKA; MARKAKI, 2003) e *nomius* (KURTZMAN; HORN; HESSELTINE, 1987). A ingestão de alimentos contaminados por AFs está ligada a uma grande variedade de efeitos tóxicos agudos e crônicos, os quais podem ser carcinogênicos, mutagênicos, teratogênicos ou genotóxicos (FETAIH et al., 2014).

Embora seja difícil remover as AFs da dieta de humanos e animais, é possível estabelecer estratégias para reduzir a exposição alimentar à Aflatoxina B1 (AFB1), a mais potente das AFs, conservando a qualidade nutritiva e a palatabilidade dos alimentos tratados. Apesar de muitos esforços terem sido realizados para eliminar ou reduzir essas toxinas dos alimentos, os métodos aplicados apresentam limitações quanto à eficácia, segurança e palatabilidade alimentar (GRENIER et al., 2012). A descontaminação biológica de micotoxinas, utilizando micro-organismos e enzimas, oferece uma alternativa atraente para a eliminação ou controle de AFs, uma vez que proporciona como resultado produtos não tóxicos ou menos tóxicos mantendo o valor nutritivo e qualidade dos alimentos e rações (ADEBO et al., 2015).

O uso de enzimas, incluindo oxidases (YEHA, 2014), redutases (WU et al., 2015), lacases (ALBERTS et al., 2009a), e peroxidases (PODs) (DAS; MISHRA, 2000a, 2000b; FELTRIN et al., 2017; TAYLOR et al., 2010), tem demonstrado a degradação de AFs em meio aquoso. No entanto, o mecanismo de degradação da AF catalisada por enzimas e a cinética da reação entre PODs comerciais e AFs permanecem desconhecidos. Além disso, a potencial aplicação de PODs comerciais na indústria alimentícia ainda não foi estudada, provavelmente devido à não adaptação aos processos alimentares disponíveis, longo tempo de incubação necessário para a degradação e processos de degradação ineficientes (GIOVATI et al., 2015).

PODs são oxidoreduases produzidas por numerosos micro-organismos e plantas, com ampla especificidade de substrato e propriedades multifuncionais. A ampla disponibilidade e aplicação dessas enzimas em vários processos analíticos, industriais e bioquímicos, dependem de sua capacidade de catalisar a oxidação de substratos orgânicos e inorgânicos utilizando peróxido de hidrogênio (H_2O_2) como cofator (HAMID; KHALIL-UR-REHMAN, 2009; VETAL; RATHOD, 2014). A atividade enzimática está fortemente correlacionada com sua estrutura. O sítio ativo contém grupos ionizáveis e são sensíveis a mudanças de pH e temperatura, causando alterações na conformação da enzima e, conseqüentemente, aumento ou

diminuição da taxa de reação (CAI et al., 2012). A ausência de dados na literatura sobre a aplicação da POD comercial na mitigação da AFB1 em alimentos comumente consumidos no mundo, como o leite, ressalta a importância desta pesquisa.

Neste contexto, a aplicação de PODs na degradação de micotoxinas requer o estabelecimento das condições de reação para atingir a máxima eficiência de degradação, como concentração de enzima, pH, tempo e temperatura de incubação. O presente estudo avaliou os efeitos da concentração de enzima, pH, temperatura e tempo de reação na mitigação de AFB1 por POD comercial, em solução modelo (tampão fosfato 100 mM) e em amostras de leite UHT visando à futura aplicação da enzima.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. REAGENTES E AMOSTRAS

A enzima peroxidase comercial POD tipo VI obtida de raiz forte (HRP) foi adquirida da Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, EUA). Os padrões de micotoxina Aflatoxina M1 (AFM1) (Bellefonte, PA, USA) e AFB1 (Saint Louis, MO, USA) foram adquiridos da Sigma-Aldrich Chemical Company. Acetonitrila (MeCN), metanol (MeOH) e Cloreto de sódio (purity >99%) (todos de grau CLAE) foram adquiridos da J.T.Baker (Trinidad e Tobago). Ácido acético (pureza >99%) foi obtida da Tedia (Fairfield, OH, USA). Sulfato de magnésio anidro (pureza >95%) foi adquirido da Caledon Laboratory (Georgetown, Ontario, Canada). O Hexano (purity >96%) foi obtido da Merck (Darmstadt, Germany). A água foi purificada no Millipore Direct-Q 3 UV em 18,2 MΩ cm, USA. A fase móvel foi desgaseificada durante 30 min antes de ser utilizada com Ultrason UniQup (USC-1850 freq US: 250 KHz, Brasil). As soluções tampão fosfato foram preparadas com fosfato de sódio monobásico e fosfato de sódio dibásico (Vetec, Duque de caxias RJ, Brasil) em água destilada. As soluções foram estocadas em frascos âmbar até o uso. As amostras de leite com tratamento de ultra alta temperatura (UHT) (três amostras) foram coletadas nos supermercados de Rio Grande (RS).

2.2. CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS PARA A QUANTIFICAÇÃO DE AFS POR CLAE-FL

A identificação e quantificação da AFs foram realizadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), utilizando um sistema de Classe-VP (Shimadzu, Kyoto, Japão)

equipado com uma bomba LC-20 AD, desgaseificador DGU-20As, CBM-20A, detector de fluorescência FL-20A, derivatizador fotoquímico pós-coluna RDUTM, injetor manual de 20 μL 7725i, software de Solução LC-Shimadzu e uma coluna Kromasil 100-5C18 (150 mm x 4,6 mm). Os padrões e extratos das amostras foram eluídos na fase móvel contendo água:acetonitrila:metanol (60:15:25 v v⁻¹ v⁻¹) em volume isocrático, temperatura de coluna de 40 °C com vazão de 1,0 mL min⁻¹. A detecção de micotoxinas foi realizada em comprimentos de onda de 370 nm a 410 nm para absorção e emissão. Os cromatogramas foram analisados por LC solution LC-Assist software (Shimadzu) e a quantificação da aflatoxina foi calculada pela área do pico de acordo com a curva de calibração correspondente. Duas curvas analíticas foram construídas uma utilizando solução padrão de AFB1, que foi diluída em água:acetonitrila (90:10, v v⁻¹), com concentrações crescentes. A outra curva foi realizada a partir da fortificação (em triplicata) de amostras de leite com oito concentrações crescentes de soluções padrão de AFB1 e AFM1 (AFM1 também foi determinada, porque as amostras de leite estavam naturalmente contaminadas com esta micotoxina).

Essas amostras passaram pelo mesmo processo de extração que as demais, conforme procedimento descrito por Gonçalves et al. (2018) e subsequentemente quantificadas por CLAE-FL. A curva de calibração construída em solvente foi utilizada para a determinação nos extratos das amostras em solução modelo, pois não foram observados efeitos de matriz. No entanto, os extratos de amostras de leite foram determinados utilizando a curva de calibração na matriz do leite. Os parâmetros de qualidade analítica analisados foram: faixa de linearidade, curva analítica, coeficiente de correlação, limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) (SANTE/EU, 2015), efeito da matriz, precisão e exatidão (COMISSÃO EUROPEIA, 2016). Todos foram determinados para validação do método instrumental. O LOD e LOQ foram verificados por injeção de concentrações em ordem decrescente, até o pico de analito obter uma razão de 3:1 e 10:1 entre o sinal e ruído da linha de base, respectivamente. A precisão (repetibilidade) foi demonstrada pelo desvio padrão relativo (RSD) de experimentos de recuperação em triplicata (COMISSÃO EUROPEIA, 2016).

2.3. RECUPERAÇÃO DE AFS

A extração por partição líquido-líquido (PLL) foi utilizada para extrair a AFB1 da solução modelo (tampão fosfato 100 mM) empregada no estudo de mitigação, de acordo com o método proposto por Bauer et al. (2016). A extração foi realizada em triplicata, da seguinte forma: 1 mL de clorofórmio (CH_3Cl) foi adicionado a 1 mL de solução modelo (tampão fosfato

100 mM) e a mistura foi agitada em vortex (30 s) e sonicada em banho ultra-sônico (3 min). O sobrenadante foi recolhido e evaporado até secagem sob fluxo suave de nitrogênio. O extrato seco foi diluído com água:MeCN (90:10 v v⁻¹) e analisado por CLAE-FL. A porcentagem de recuperação foi estimada a partir da relação entre a concentração de AFB1 encontrada e a concentração esperada.

Para as amostras de leite, AFM1 e AFB1 foram extraídas conforme descrito por Gonçalves et al. (2018). A recuperação e a repetibilidade do método analítico para determinar AFs no leite foram validadas usando amostras enriquecidas com AFB1 e AFM1 (apenas para amostras de leite). Todas as medidas foram avaliadas em triplicata em três níveis na faixa de 1 a 10 ng L⁻¹, com base na ocorrência de AFs no leite e cereais no Brasil, assim como do K_m obtido a partir da cinética enzimática avaliada neste estudo.

2.4. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

A atividade de POD foi determinada de acordo com os protocolos emitidos pela Sigma Chemical Company (2017), medindo a formação de compostos oxidados a 470 nm (Biospectro SP220 spectrophotometer, São Paulo, Brazil). Os ensaios foram realizados a 30 °C usando guaiacol como substrato específico da enzima, o meio reacional foi constituído por 340 µL de água destilada, 250 µL de tampão fosfato (100 mM pH 6,0), 80 µL de guaiacol, 170 µL de H₂O₂ e 170 µL de POD, a formação dos produtos foi monitorada por 15 min. Uma unidade da atividade da POD representa a quantidade de enzima que catalisa a oxidação de 1 µmol de guaiacol por minuto, como descrito por Zengin, Uckaya, e Durmus (2017), usando a equação (1):

$$\frac{U}{mL} = \frac{Abs \times V_r \times FD}{\epsilon \times V_a \times d \times t_r} \times 10^3 \quad (1)$$

Onde, U mL⁻¹:unidade de atividade da peroxidase por mL de extrato; Abs:absorvância; FD:fator de diluição (diluição do extrato bruto enzimático); V_r:volume total do tubo de reação (mL); 10³:conversão de mol para µmol; ε:absortividade molar do tetraguaiacol (26,600 L mol⁻¹cm⁻¹); V_a:volume de extrato enzimático utilizado (mL); d:tamanho horizontal da cubeta (cm) e t_r:tempo de reação (min).

2.5. MITIGAÇÃO DE AFB1 POR POD COMERCIAL

A mitigação de AFB1 por POD comercial foi conduzida em solução modelo. A solução padrão de micotoxina foi adicionada ao reator, o solvente foi seco sob corrente de

nitrogênio suave e solubilizada na solução modelo utilizando vórtex (30 s) seguido de banho ultrassom (3 min). A solução modelo (1 mL) foi constituída por 0,08% de H₂O₂ e POD em tampão fosfato 100 mM para obtenção de uma concentração final de micotoxinas de 0,5 µg L⁻¹. As condições da reação enzimática (concentração da enzima, tempo de reação, pH e temperatura) foram avaliadas para determinar as condições ótimas de reação para a atividade da enzima.

Este estudo foi realizado utilizando o método de um fator por vez, em três etapas. Uma variável independente foi investigada em cada etapa, e o tratamento com os melhores resultados de mitigação foi selecionado para a próxima etapa. Na primeira etapa, a solução modelo foi incubada com diferentes concentrações enzimáticas (0,015; 0,032; 0,063; 0,125; 0,250; 0,500 e 1.000 U mL⁻¹) a 30 °C, pH 6 por 4 h com agitação orbital (150 rpm). Sob as mesmas condições de reação, experimentos incubados sem POD foram considerados como o controle. A concentração residual de AFB1 na solução modelo foi quantificada como descrito na Eq. (2).

Na segunda etapa foi avaliado o tempo de reação (0, 15, 30, 60, 90, 120 e 160 min) a 30 °C, pH 6,0. Na última etapa, as temperaturas (20, 25, 30, 35 e 40 °C) e o pH (4,5; 5,0; 5,5; 6,0; 6,5; 7,0; 7,5 e 8,0) de incubação foram estudadas. Após a incubação, o AFB1 foi extraída e quantificada por CLAE, como descrito anteriormente por Bauer et al. (2017). A concentração de AFB1 remanescente após a atividade enzimática foi estimada para determinar a porcentagem de micotoxina biotransformada. Todos os experimentos foram realizados e analisados em triplicata, e a porcentagem de mitigação foi determinada pela diferença entre a concentração inicial e a concentração residual da micotoxina, conforme a equação (2):

$$\text{Mitigação (\%)} = 1 - \frac{\text{AFB1}_{\text{final}}}{\text{AFB1}_{\text{inicial}}} \times 100 \quad (2)$$

Onde: AFB1_{inicial} é a concentração inicial de AFB1 (µg L⁻¹) e AFB1_{final} é a concentração final de AFB1 (µg L⁻¹) calculada de acordo com uma curva analítica da micotoxina.

2.6. CINÉTICA ENZIMÁTICA

O K_m e V_{Máx} foram determinados utilizando as condições de reação estabelecidas utilizando as diferentes concentrações de AFB1 (0,10; 0,25; 0,50; 1,00; 2,00; 4,00; 6,00; 10,00 e 20,00 µg L⁻¹). Todos os ensaios foram realizados em triplicata e comparadas com o controle (sem tratamento com POD). A afinidade da enzima pela AFB1 foi descrita pelo K_m, utilizando-se a plotagem linearizada dupla recíproca (Lineweaver–Burk), onde os valores de K_m e V_{Máx}

foram calculados com base no coeficiente angular e linear, respectivamente, como descrito na equação (3).

$$v = \frac{V_{M\acute{a}x} \times S}{K_m + S} \quad (3)$$

Onde: v é a taxa de utilização de substrato, $V_{M\acute{a}x}$ é a taxa máxima de utilização de substrato, S é a concentração de substrato, e K_m é a constante de Michaelis-Menten.

2.7. APLICABILIDADE DA POD: MITIGAÇÃO DE AFB1 EM AMOSTRAS DE LEITE

As amostras de leite com tratamento de ultra alta temperatura (UHT) (três amostras) foram coletadas nos supermercados de Rio Grande (RS). Os níveis de micotoxinas nas amostras foram mitigados usando POD sob as condições ótimas de reação obtidas neste estudo (0,015 U mL⁻¹ POD, 0,08% H₂O₂, 30 °C por 8 h a 150 rpm). Para isso, 5 mL de leite UHT foram adicionados a 5 µg L⁻¹ de AFB1 e AFM1 (somente para leite UHT). A concentração de fortificação foi escolhida, considerando o K_m obtido no estudo cinético. Após o tratamento enzimático, determinou-se a concentração de AFs remanescente.

2.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os experimentos foram realizados em triplicada. Para definir as condições ótimas de reação na solução modelo fortificada, o efeito dos experimentos enzimáticos na mitigação de AFs foi analisado estatisticamente mediante análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey ao nível de 95% de confiança.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. QUANTIFICAÇÃO DE AFLATOXINAS

Curvas analíticas, assim como seus parâmetros (Tabela 1), mostraram que o procedimento foi adequado para a quantificação de AFB1 e AFM1. Os parâmetros cumpriram as recomendações de confiabilidade de análise estabelecidas pela Comissão Europeia (2006) e as diretrizes da União Europeia (SANTE/EU, 2015).

Tabela 1 - Parâmetros analíticos avaliados em CLAE-FL.

Parâmetros analíticos	AFM1	AFB1
Curva	$y = 30970x - 4657$	$y = 17294x - 7989$
Linearidade ($\mu\text{g L}^{-1}$)	0,36-5	0,14-2,06
Coefficiente de determinação	0,980	0,983
Coefficiente de correlação	0,998	0,998
LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	0,05	0,1
LOQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	0,15	0,3
Curva na Matrix Leite	$y = 14284x - 1764$	$y = 27226x - 1784$
Linearidade ($\mu\text{g L}^{-1}$)	0,25-10	0,25-10
Coefficiente de determinação	0,998	0,998
Coefficiente de correlação	0,998	0,998
LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	0,07	0,1
LOQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	0,21	0,3

LOD: limite de detecção; LOQ: limite de quantificação

Os percentagens de recuperação da AFB1 estiveram na faixa de 93–116% na solução modelo, e 110–139% para amostras de leite de vaca UHT (Tabela 2). Portanto, as recuperações na solução modelo estavam dentro dos níveis aceitáveis estabelecidos pela Comissão Europeia, 2016. No entanto, para as recuperações nas amostras de leite UHT, o nível mais baixo ($1 \mu\text{g L}^{-1}$) apresentou percentagens acima do valor recomendado. De acordo com SANTE/EU (2015), a limitação dos ensaios de recuperação deriva do fato de que a substância adicionada não é necessariamente igual a substância presente em forma nativa na amostra. Isso poderia explicar a maior detecção na presença de substâncias adicionais. Portanto, é necessário considerar que as recuperações determinadas podem ser superestimadas a baixo nível de fortificação.

Tabela 2 - Recuperações de aflatoxinas extraídas a partir de solução modelo e leite UHT.

Meio	Micotoxina	Nível de fortificação ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Recuperação (%) (DPR %)
Solução modelo	AFB1	0,25	116 (5,4)
		1,0	103 (2,6)
		5,0	93 (0,3)
Leite	AFM1	1,0	160 (0,1)
		5,0	111 (0,1)
		10,0	110 (0,1)
	AFB1	1,0	136 (0,1)
		5,0	117 (0,3)
		10,0	105 (1,3)

AFB1-aflatoxina B1, AFM1-aflatoxina M1, Desvio padrão relativo (DPR%).

3.2. MITIGAÇÃO DE AFB1 POR AÇÃO DA POD

3.2.1. Concentração enzimática

A concentração é um fator limitante para o uso de enzimas em processos comerciais devido ao seu alto custo. Os resultados mostraram que a mitigação de AFB1 pela atividade de POD em solução modelo variaram entre 26 e 69% para 1,0 e 0,015 U mL⁻¹, respectivamente. A Tabela 3 revela que à medida que a concentração de enzima diminui, o percentual de mitigação de AFB1 aumenta, mostrando que a concentração de enzima influencia na eficiência do processo. Esse comportamento pode ser explicado pelo esgotamento rápido de H₂O₂ na mistura de reação com altas concentrações de enzima, não mais disponíveis para atuar como co-fator na mitigação da micotoxina (ALNEYADI; ASHRAF, 2016). Embora o percentual de mitigação de AFB1 tenha sido influenciado pela concentração de POD utilizada na reação, não houve diferenças significativas quando comparada a concentração entre 0,030 e 0,015 U mL⁻¹, por apresentar um menor custo, a concentração de 0,015 U mL⁻¹ foi escolhida para os experimentos seguintes (tempo de incubação e efeito do pH e temperatura na mitigação de AFB1 pela atividade da POD).

Tabela 3 - Mitigação de AFB1 após ação da POD em solução modelo.

Concentração da enzima (U mL ⁻¹)	Mitigação de AFB1 (%) (DPR%)
0,015	69 (15,0) ^a
0,031	66 (11,0) ^a
0,063	51 (17,0) ^b
0,125	36 (4,1) ^d
0,25	44 (0,9) ^c
0,5	36 (3,3) ^d
1,0	26 (5,5) ^e

Desvio padrão relativo (DPR%). Letras minúsculas iguais indicam que não há diferença significativa entre as médias pelo teste de Tukey (p < 0,05).

Esses dados discordam de outros estudos que encontraram correlações positivas entre concentração de enzima e mitigação de AFB1. Doyle e Marth (1978) estudaram a degradação de AFs por lactoperoxidase a 5, 50 e 500 U mL⁻¹ em meio reacional contendo 225 µM NaCl e 50 µM H₂O₂ a 28 °C durante 24 h e demonstraram que a taxa de degradação aumentou de 3,6 para 5,1 % e de 4,6 a 7,2% para AFB1 e AFG1, respectivamente, quando a quantidade de enzima aumentou de 50 para 500 U mL⁻¹. A biodegradação enzimática de AFB1 também foi proposta por Das e Mishra (2000), onde diferentes concentrações de POD (2–16 U)

avaliadas na degradação de AFB1 (3,2 µg) resultaram em aumento na taxa de reação nos experimentos usando de 2 a 8 U, porém, acima de 10 U, a porcentagem de degradação atingiu nível estável (60%). Portanto, o presente estudo demonstra alta mitigação utilizando baixa concentração de enzima quando comparado com outros estudos. Outro fator importante que deve ser enfatizado é a fonte da enzima, que pode influenciar na especificidade e afinidade enzimática.

3.2.2. Tempo de incubação

A Tabela 4 mostra a mitigação de AFB1 pela atividade de POD obtida na avaliação do tempo de incubação na solução modelo. A concentração de AFB1 diminuiu gradualmente na presença de POD, atingindo decréscimo máximo de 68,1% após 8 h de reação. Nenhuma diminuição adicional na concentração de micotoxinas ocorreu após 24 h. Portanto, 8 h (480 min) foi considerado o melhor tempo de incubação.

Tabela 4 - Mitigação de AFB1 em diferentes tempos de ação da POD.

Tempo (min)	Mitigação de AFB1 (%) (DPR%)
0	0 (0,0) ^f
30	3,8 (4,0) ^e
60	33 (5,2) ^d
120	47 (6,8) ^c
240	53 (10,2) ^b
480	68 (5,6) ^a
1440	67 (8,1) ^a

Desvio padrão relativo (DPR%). Letras minúsculas iguais indicam que não há diferença significativa entre as médias pelo teste de Tukey (p <0,05).

3.2.3. Efeito do pH e temperatura na mitigação da AFB1 por ação da POD

A atividade enzimática é incrementada com o aumento da temperatura devido ao aumento da energia cinética envolvida no sistema, enzima e substrato, o que possibilita o maior contato entre eles até que a temperatura limiar seja atingida, na qual a enzima mostra atividade máxima. Com o aumento da temperatura acima deste limiar, a atividade da enzima começa a diminuir possivelmente devido à desnaturação da enzima, que provoca alterações na estrutura tridimensional da enzima e muitas vezes no sítio ativo, impedindo sua interação com o substrato (GRAHAME; BRYKSA; YADA, 2015). Por outro lado, as enzimas agem por interações com o substrato em seu sítio ativo, por isso, a preservação da forma do sítio ativo é

de vital importância. O pH do meio é outro fator que pode ocasionar alterações na forma do sítio ativo das enzimas, alterando o estado iônico dos aminoácidos, tornando a enzima ineficaz (NOUREN; BHATTI, 2015).

A mitigação da AFB1 foi verificada em todas as temperaturas testadas (Figura 1). Pode ser observado que para obter a maior mitigação é indicado o emprego de pH entre 7-8 e temperaturas entre 30 e 40 °C. Além disso, a mitigação foi também obtida a valores de pH 5,0-6,5 e temperaturas de 30 e 35 °C. No entanto, para emprego de pH 4,5, recomenda-se a utilização de temperatura de 30 °C para a mitigação ser eficiente. Além disso, a 35 °C a mitigação da AFB1 foi constante independentemente do pH da solução modelo, alcançando percentual maior que 80% para pH variando de 5 a 8, faixa de pH que corresponde à maior parte dos alimentos e processos.

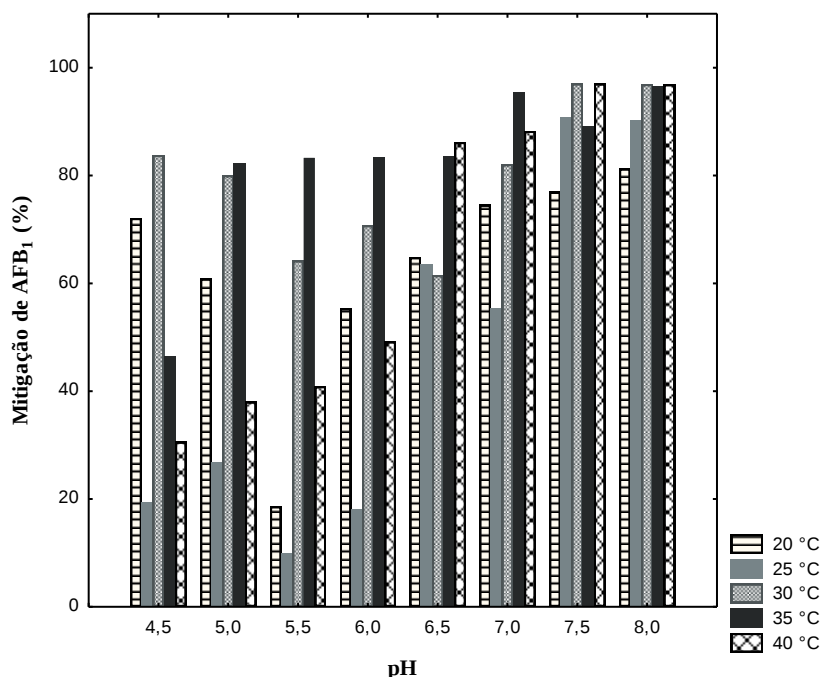
Portanto, este estudo mostrou que a temperatura e o pH afetam a taxa na qual AFB1 é biotransformada pela atividade da POD. Os maiores percentuais de mitigação de AFB1 pela atividade de POD em solução modelo (tampão fosfato 100 mM) ocorreram nas condições de 0,015 U mL⁻¹ de POD, pH 7,0 a 8,0, temperatura de 30 a 40 °C e tempo de incubação de 8 h. Esses resultados mostram que o uso de POD na mitigação de AFs representa uma solução interessante para a indústria de alimentos, uma vez que a maior parte do pH dos alimentos está na faixa de pH onde as maiores bioransformações de AFB1 foram obtidas.

Motomura et al. (2003) descreveram condições ótimas de degradação da AFB1 pela POD extraída de *Pleurotus ostreatus*, quando a enzima foi incubada em solução tampão de acetato de sódio, fosfato de sódio e hidróxido de sódio a pH 4 a 5 e 25 °C. Utilizando manganês peroxidase, também obtida de *P. ostreatus*, Yehia (2104) afirmou que a atividade da enzima na degradação de AFB1 diminuiu com o aumento do pH, e que a temperatura e o pH ótimos foram 25 °C e 4-5, respectivamente.

O uso de outro tipo de enzima na degradação de AFs também foi relatado na literatura. Na degradação enzimática de AFB₁ pela atividade de lacase, uma faixa de valores de pH (2.5–7.0) e temperaturas (5–65 °C) foram avaliadas para 80 µg mL⁻¹ de AFB₁ e 30 U mL⁻¹ de enzima, resultando em um pH e temperatura ótimo de 4,5 e 35 °C, respectivamente (ZEINVAND-LORESTANI et al., 2015). A enzima MADE (myxobacteria aflatoxina degradação enzima), da bactéria *Myxococcus fulvus*, demonstrou alta atividade em ampla faixa de pH (5–7) e temperaturas (30–45 °C), obtendo 96,0 and 95,8% de degradação para AFG1 e AFM1 respectivamente, após tratamento com MADE purificada (100 U mL⁻¹) por 48 h (ZHAO et al., 2010). Portanto, os resultados obtidos neste estudo estão na faixa de valores encontrados em alguns relatos da literatura, com pequenas variações devido à pureza, fonte e tipos de

enzima, e as diferentes condições utilizadas no sistema de reação durante a mitigação das micotoxinas.

Figura 1- Efeito de pH e Temperatura na mitigação de AFB₁ por POD



3.2.4. Cinética enzimática

O K_m é um parâmetro cinético essencial que reflete a intensidade da afinidade de ligação de uma enzima a um substrato específico. Com base em os resultados obtidos, o valor otimizado de K_m da POD para a mitigação de AFB₁ foi 0,0160 μM (5 $\mu\text{g L}^{-1}$) com $V_{\text{Máx}}$ de 6,4 $\mu\text{M min}^{-1}$, que foi determinado pelas equações representadas no gráfico duplo recíproco (Lineweaver-Burk) da atividade enzimática. Até onde se sabe, não existem estudos prévios sobre os valores cinéticos para o POD usando AFs. No entanto, estudos prévios estabeleceram valores de K_m para vários outros compostos orgânicos: 22,9 μM para o tricosan (LE et al., 2016), 15,7 μM para compostos de desregulação endócrina (ZHENG; COLOSI, 2011), 9,049 μM para bisfenol A (JIANG et al., 2017), 8,41 mM para fenol (KIM et al., 2012), 13,9 μM para hidrocarbonetos de petróleo (SHEKOOHIYAN; MOUSSAVI; NADDAFI, 2017), 7,32 mM para rutin (SAVIC et al., 2013) e 0,288 mM para guaiacol (SUZUKI et al., 2006). Além disso, a afinidade entre o POD comercial e outras micotoxinas foi verificada pelos parâmetros K_m e $V_{\text{Máx}}$, resultando em 39,51 μM e 0,170 $\mu\text{M min}^{-1}$, respectivamente, para Zearalenona (GARCIA et al., 2018), 0,173 μM e 5,02 $\mu\text{M min}^{-1}$, para 3-ADON, 0,0486 μM e 9,43 $\mu\text{M min}^{-1}$ para Toxina T-2, assim como 0,27 μM e 0,015 $\mu\text{M min}^{-1}$ para Ocratoxina.

Os resultados mostram que, embora a AFB1 não seja um substrato ideal para a POD, a enzima possui afinidade por essa toxina. Portanto, a POD comercial tem potencial para ser aplicada aos processos de mitigação da AFB1, uma vez que o K_m encontrado por este estudo é menor do que o encontrado em outros estudos (0,288-22,9 mM) (GARCIA et al., 2018; JIANG et al., 2017; KIM et al., 2012; LE et al., 2016; SAVIC et al., 2013; SHEKOOHIYAN; MOUSSAVI ; NADDAFI, 2017; SUZUKI et al., 2006; ZHENG; COLOSI, 2011).

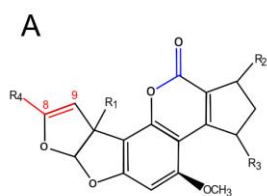
Embora os diversos efeitos tóxicos e a detecção desses compostos em alimentos de alto consumo, a tecnologia ainda não consegue garantir que alimentos e rações estejam completamente livres de AFs. Até o momento, várias enzimas de várias fontes, como fungos, bactérias e plantas, foram relatadas como capazes de degradar AFs. No entanto, poucos autores mencionaram os mecanismos de degradação ou desintoxicação. Existem dois sítios ativos toxicológicos na AFB1, um é a ligação 8,9 insaturada no anel de furano, que está envolvida nas interações AF-DNA e AF-proteína, e a outra é no anel lactona na porção cumarina (Agência Internacional para Pesquisa sobre Câncer [IARC], 2000) (Figura 2). Portanto, atacar qualquer desses sítos é o principal objetivo da desintoxicação.

Quimicamente, AFs são derivados de difuranocumarina compostos de dois anéis difurano, ligados entre si a uma porção cumarina. Os anéis de furano e cumarínico estão dispostos em uma configuração planar, que é responsável pela conjugação que leva à fluorescência típica das AFs. Estas micotoxinas são classificados em dois grupos principais, de acordo com sua estrutura química: o grupo difurocumarociclopentenona inclui AFB1, AFB2, AFB2a, AFM1, AFM2, AFQ1 e aflatoxicol, e o grupo difurocumarolactona compreende AFG1, AFG2 e AFG2a (Figura 2).

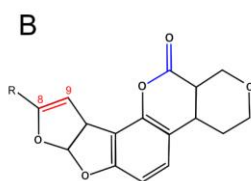
PODs (EC 1.11.1.7) são oxidorreduases produzidas por micro-organismos e plantas. Essas enzimas catalisam uma variedade de reações na presença de peróxidos, como o H_2O_2 . As POD tem o potencial de degradar não apenas os corantes industrialmente importantes, mas também quimicamente estáveis, como fenóis e aminas aromáticas, em água e solventes orgânicos miscíveis em água, tornando-os de grande interesse para a remoção da contaminação ambiental (HAMID; KHALIL-UR-REHMA, 2009). O presente estudo revelou que o POD comercial pode oxidar a AFB1. O mecanismo de mitigação proposto por este estudo foi baseado em POD que afeta as propriedades de fluorescência de AFB1, indicando que a conjugação entre a fração cumarina e o anel lactona foi rompida pela ação da enzima. Essa hipótese, embora ainda não verificada experimentalmente, está relacionada com a redução da mutagenicidade e toxicidade dos produtos de degradação mostrados por Taylor et al. (2010) e Wang, Ogata, Hirai e Kawagishi (2011), que também utilizaram PODs na degradação de AFs. Embora os resultados

encontrados neste trabalho mostrem potencial para a mitigação da AFB1, estudos adicionais são necessários para avaliar os metabólitos formados após a reação enzimática, uma vez que estes devem ser caracterizados em termos de sua estrutura química e toxicidade residual.

Figura 2 - Estrutura química e características das AFs da séries de ciclopentenona (A) e difurocumarolactona (B). Ligações coloridas indicam grupos reativos envolvidos na toxicidade das AFs. A dupla ligação que leva ao 8,9-epóxido na ativação metabólica é indicada em vermelho, enquanto a ligação lactona é indicada em azul. Tabelas mostram grupos substituintes e saturação da ligação C8-C9 em diferentes análogos de AFs.



	AFB ₁	AFB ₂	AFB _{2a}	AFM ₁	AFM ₂	AFL	AFQ ₁
R1	-H	-H	-H	-OH	-OH	-H	-H
R2	=O	=O	=O	=O	=O	-OH	=O
R3	-H	-H	-H	-H	-H	-OH	-H
R4	-H	-H	-OH	-H	-H	-H	-H
C ₈ -C ₉ bond	unsaturated	unsaturated	unsaturated	unsaturated	unsaturated	unsaturated	unsaturated



	AFG ₁	AFG ₂	AFG _{2a}
R	-H	-H	-OH
C ₈ -C ₉ bond	unsaturated	saturated	unsaturated

Fonte: Adaptado de Loi et al. (2017).

3.2.5. Aplicação de POD em alimentos

O método de mitigação de AFs proposto neste estudo foi aplicado em amostras de leite UHT, utilizando as condições ótimas de mitigação obtidas em solução modelo (tampão fosfato 100 mM). A POD comercial foi mais efetiva na mitigação de AFB1 ($97\% \pm 2,6$) do que em AFM1 ($65\% \pm 1,5$) nas amostras de leite UHT, pois, a complexidade da matriz comparada à solução modelo também pode ter afetado a ação da enzima da POD comercial.

Nenhum estudo prévio na literatura avaliou a mitigação de AFs em leite por ação da POD. No entanto, investigações anteriores estudaram métodos de degradação para AFM1 em leite e produtos lácteos. Vários estudos relataram que a degradação de AFM1 pelo emprego de calor tem sido ineficaz (DUA et al., 2012; GOVARIS et al., 2001; SADEGHI et al., 2013; SMAJLOVIC et al., 2012). Carraro et al. (2014) demonstraram a eficiência da bentonita rica em

saponita na remoção de AFM1 (65%) em leite cru. Por outro lado, as bactérias ácido lácticas (BAL) são os agentes ligantes da AFM1 mais frequentemente empregados no leite, devido ao seu status geralmente reconhecido como seguro (GRAS), alta capacidade de ligação e ampla distribuição na natureza (ISMAIL et al., 2016). *Lactobacillus bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus* reduziram os níveis de AFM1 em amostras de leite em 29% (KHOURY; ATOUI; YAGHI, 2011).

Corassin et al. (2013) estudaram três linhagens de BAL tratadas por calor (*Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus delbrueckii* spp. *Bulgaricus* e *Bifidobacterium lactis*) e a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, para remover AFM1 em amostras de leite desnatado UHT com $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$ de AFM1, onde a *Saccharomyces cerevisiae* obteve a maior capacidade de remover AFM1 (92,7%). Quando uma combinação das estirpes de BAL foi estudada, foi observado aumento significativo ($p < 0,05$) no percentual de ligação da AFM1 (100,0%). Além disso, vários estudos evidenciaram o poder da POD na degradação de AFs em sistemas tampão (DAS; MISHRA, 2000a; DAS; MISHRA, 2000b; DOYLE; MARTH, 1978; YEHIA, 2014; MOTOMURA et al, 2003), mas os valores de redução relatados foram iguais ou inferiores aos obtidos neste estudo.

A exposição alimentar a AFs via alimentos, como o leite (BOGALHO et al., 2018; SCAGLIONI et al, 2014) representam grande risco para a saúde humana. Portanto, todas as ferramentas possíveis para alcançar a segurança dos produtos alimentícios devem ser desenvolvidas, e os resultados obtidos neste estudo mostram possível aplicação da POD para a mitigação de AFs no leite como uma solução alternativa para este problema inevitável e prejudicial para a economia e a segurança de alimentos no mundo.

Na indústria de laticínios, o tratamento com POD pode ser realizado em leite cru, seguido de pasteurização, para que o leite tratado possa ser usado como material de base para preparação de produtos lácteos. Isso garante a inativação da enzima e evita a presença de compostos do escurecimento enzimático. No entanto, essas aplicações devem ser otimizadas para garantir a desintoxicação necessária e a preservação das propriedades nutricionais e sensoriais desses alimentos. Outras investigações experimentais e de plantas-piloto devem ser realizadas no futuro para verificar a confiabilidade industrial deste tratamento.

4 CONCLUSÃO

A POD comercial reduziu a AFB1 (97%) quando condições que afetam o meio foram otimizadas, tais como: atividade enzimática (0,015 U), pH (7,0-8,0) e temperatura (30-

40 °C). Os resultados demonstraram que os processos enzimáticos são uma abordagem viável para a mitigação de AFB1 em soluções aquosas, particularmente quando as condições apropriadas do processo (por exemplo, pH e tempo de reação) são selecionadas. No entanto, a identificação e caracterização dos produtos de degradação são necessárias para entender o mecanismo de mitigação. Os níveis de AFs no leite UHT foram substancialmente degradados em 97 e 65% para AFB1 e AFM1 respectivamente.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAR, M.; ANJUM, F. M.; BUTT, M. S.; PASHA, I.; RANDHAWA, M. A.; SAEED, F.; WAQAS, K. Aflatoxins: Biosynthesis, Occurrence, Toxicity, and Remedies. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 53, n. 8, p. 862–874, 2013.
- ADEBO, O. a; NJOBEH, P. B.; GBASHI, S.; NWINYI, O. C.; MAVUMENGWANA, V. Review on Microbial Degradation of Aflatoxins. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 1040–8398, n. November, p. 1549–7852, 2015.
- ALBERTS, J. F.; ENGELBRECHT, Y.; STEYN, P. S.; HOLZAPFEL, W. H.; VAN ZYL, W. H. Biological Degradation of Aflatoxin B1 by *Rhodococcus Erythropolis* Cultures. **International Journal of Food Microbiology**, v. 109, n. 1–2, p. 121–126, 2006.
- ALBERTS, J. F.; GELDERBLOM, W. C. A.; BOTHA, A.; ZYL, W. H. Van. Degradation of Aflatoxin B1 by Fungal Laccase Enzymes. **International Journal of Food Microbiology**, v. 135, p. 47–52, 2009a.
- ALBERTS, J. F.; GELDERBLOM, W. C. a; BOTHA, a.; VAN ZYL, W. H. Degradation of Aflatoxin B1 by Fungal Laccase Enzymes. **International Journal of Food Microbiology**, v. 135, n. 1, p. 47–52, 2009b.
- ALONSO, V. A.; MONGE, M. P.; LARRIESTRA, A.; DALCERO, A. M.; CAVAGLIERI, L. R.; CHIACCHIERA, S. M. Naturally Occurring Aflatoxin M1 in Raw Bulk Milk from Farm Cooling Tanks in Argentina. **Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment**, v. 27, n. 3, p. 373–379, 2010.
- AMANDA, P.; GARZA, Q. **Ocurrencia y estimación de la exposición humana a aflatoxina M1 en muestras de leche procedentes de Monterrey (México)**. 2014. 103 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidad Autonoma de Barcelona, Barcelona, 2014.
- ARAGÓN, S. **Determinación de la presencia de aflatoxina M1 por el método de Elisa en queso seco y oreado que se expende en 5 mercados municipales de la ciudad capital**. 2014. 95 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Engenharia de Alimentos) - Universidad de San Carlos de Guatemala, San Carlos, 2014.
- ARANGUREN, E. M.; ARGÜELLES, M. J. **Detección de Aflatoxina M1 en Quesos Frescos Comercializados en el Municipio de Yopal, Casanare, Mediante la Técnica de Elisa**. 2009. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Microbiologia Industrial) – Universidad Javeriana, Bogotá, 2009.

AZARIKIA, M.; MAHDAVI, R.; NIKNIAZ, L. Occurrence and Dietary Factors Associated with the Presence of Aflatoxin B1 and M1 in Breast Milk of Nursing Mothers in Iran. **Food Control**, v. 86, p. 207–213, 2018.

BAUER, J. I.; GROSS, M.; GOTTSCHALK, C.; USLEBER, E. Investigations on the Occurrence of Mycotoxins in Beer. **Food Control**, v. 63, p. 135–139, 2016.

BERMUDEZ, R. **Determinación de la presencia de aflatoxina M1 en leche cruda proveniente de explotaciones lecheras asociadas a COOPROLECHE en la región de la costa sur de Guatemala**. 2011.134 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Medicina Veterinaria y Zootecnia) - Universidad de San Carlos de Guatemala, San Carlos, 2011.

BHAT, R.; RAI, R. V.; KARIM, A. A. Mycotoxins in Food and Feed: Present Status and Future Concerns. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 9, n. 1, p. 57–81, 2010.

BHATNAGAR-MATHUR, P.; SUNKARA, S.; BHATNAGAR-PANWAR, M.; WALIYAR, F.; SHARMA, K. K. Biotechnological Advances for Combating Aspergillus Flavus and Aflatoxin Contamination in Crops. **Plant Science**, v. 234, p. 119–132, 2015.

CAI, F.; OUYANG, C.; DUAN, P.; GAO, S.; XU, Y.; CHEN, F. Purification and Characterization of a Novel Thermal Stable Peroxidase from Jatropha Curcas Leaves. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 77, p. 59–66, 2012.

CLAEYS, W. L.; CARDOEN, S.; DAUBE, G.; DE BLOCK, J.; DEWETTINCK, K.; DIERICK, K.; DE ZUTTER, L.; HUYGHEBAERT, A.; IMBERECHTS, H.; THIANGE, P.; VANDENPLAS, Y.; HERMAN, L. Raw or Heated Cow Milk Consumption: Review of Risks and Benefits. **Food Control**, v. 31, n. 1, p. 251–262, 2013.

COLE, R. J.; KIRKSEY, J. W.; BLANKENSHIP, B. R. Conversion of Aflatoxin B1 to Isomeric Hydroxy Compounds by *Rhizopus* Spp. **J. Agric. Food Chem.**, v. 20, n. 6, p. 1100–1102, 1972.

COMBITA, A. del pilar; MILDENBERG, S. **Detección de aflatoxina M1 en leches frescas comercializadas en la zona del valle del cauca (Colombia) mediante la técnica de Elisa**. 2009. 78 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Medicina Veterinaria) - Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, 2009.

CREPPY, E. E. Update of Survey, Regulation and Toxic Effects of Mycotoxins in Europe. **Toxicology Letters**, v. 127, n. 1–3, p. 19–28, 2002.

DAS, C.; MISHRA, H. N. In Vitro Degradation of Aflatoxin B1 in Groundnut (*Arachis Hypogaea*) Meal by Horse Radish Peroxidase. **LebensmWiss Technol**, v. 33, n. 4, p. 308–312, 2000a.

DAS, C.; MISHRA, H. N. In Vitro Degradation of Aflatoxin by Horse Radish Peroxidase. **Food Chemistry**, v. 68, n. 4, p. 309–313, 2000b.

DIAZ, G. J.; ESPITIA, E. Occurrence of Aflatoxin M1 in Retail Milk Samples from Bogotá, Colombia. **Food additives and contaminants**, v. 23, n. 8, p. 811–815, 2006.

DIAZ, G. J.; SÁNCHEZ, M. P. Determination of Aflatoxin M₁ in Breast Milk as a Biomarker of Maternal and Infant Exposure in Colombia. **Food Additives & Contaminants: Part A**, v. 49, n. May 2015, p. 150511035939005, 2015.

- DIENER, U. L.; COLE, R. J.; SANDERS, T. H.; PAYNE, G. A.; LEE, L. S.; KLICH, M. A. Epidemiology of Aflatoxin Formation by *Aspergillus Flavus**. **Annual Review of Phytopathology**, v. 25, n. 1, p. 249–270, 1987.
- DILKIN, P.; MALLMANN, C. A.; SANTURIO, J. M.; HICKMANN, J. L. Classificação Macroscópica, Identificação Da Microbiota Fúngica E Produção de Aflatoxinas Em Híbridos de Milho. **Ciência Rural**, v. 30, n. 1, p. 137–141, 2000.
- DOYLE, M. P.; MARTH, E. H. Degradation of Aflatoxin by Lactoperoxidase. **Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung**, v. 166, n. 5, p. 271–273, 1978a.
- DOYLE, M. P.; MARTH, E. H. Aflatoxin Is Degraded by Fragmented and Intact Mycelia of *Aspergillus Parasiticus* Grown 5 to 18 Days with and without Agitation. **Journal of Food Protection**, v. 41, n. 7, p. 549–555, 1978b.
- DOYLE, M. P.; MARTH, E. H. Aflatoxin Is Degraded at Different Temperatures and pH Values by Mycelia of *Aspergillus Parasiticus*. **European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 6, n. 1, p. 95–100, 1978c.
- DOYLE, M. P.; MARTH, E. H. Aflatoxin Is Degraded by Heated and Unheated Mycelia, Filtrates of Homogenized Mycelia and Filtrates of Broth Cultures of *Aspergillus Parasiticus*. **Mycopathologia**, v. 64, n. 1, p. 59–62, 1978d.
- DOYLE, M. P.; MARTH, E. H. Peroxidase Activity in Mycelia of *Aspergillus Parasiticus*. **European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 7, p. 211–217, 1979.
- FELTRIN, A. C. P.; GARCIA, S. D. O.; CALDAS, S. S.; PRIMEL, E. G.; BADIALE-FURLONG, E.; GARDA-BUFFON, J. Characterization and Application of the Enzyme Peroxidase to the Degradation of the Mycotoxin DON. **Journal of Environmental Science and Health, Part B**, v. 1234, n. September, p. 1–7, 2017.
- FETAH, H. A.; DESSOUKI, A. A.; HASSANIN, A. A. I.; TAHAN, A. S. Toxopathological and Cytogenetic Effects of Aflatoxin B1 (AFB1) on Pregnant Rats. **Pathology Research and Practice**, v. 210, n. 12, p. 1079–1089, 2014.
- FINK-GREMMELS, J. The Role of Mycotoxins in the Health and Performance of Dairy Cows. **The Veterinary Journal**, v. 176, n. 1, p. 84–92, 2008.
- FLORES-FLORES, M. E.; LIZARRAGA, E.; LÓPEZ DE CERAIN, A.; GONZÁLEZ-PEÑAS, E. Presence of Mycotoxins in Animal Milk: A Review. **Food Control**, v. 53, p. 163–176, 2015.
- FRAGOSO, E.; DAVID, T.; ROMERO, S.; OSPINO, H. Determination of aflatoxin M1 in raw milk by HPLC marker as evidence of cattle- food storage conditions from the herd suppliers of a dairy company in the city of Valledupar. Disponível em: <https://pdfs.semanticscholar.org/ce69/a8b36bc9a2e9868c152a2f9d011f43a097af.pdf>. Acesso em Novembro 2017.
- GARCIA, S. O.; FELTRIN, A. C. P.; GARDA-BUFFON, J.; GARCIA, S. O.; FELTRIN, A. C. P.; GARDA-BUFFON, J. Zearalenone Reduction by Commercial Peroxidase Enzyme and Peroxidases from Soybean Bran and Rice Bran. v. 35, n. 9, p. 1819–1831, 2018.
- GARCÍA LONDOÑO, V. A.; BOASSO, A. C.; Z. DE PAULA, M. C.; GARCIA, L. P.; SCUSSEL, V. M.; RESNIK, S.; PACÍN, A. Aflatoxin M1 Survey on Randomly Collected Milk Powder Commercialized in Argentina and Brazil. **Food Control**, v. 34, n. 2, p. 752–755,

2013.

GIOVATI, L.; MAGLIANI, W.; CIOCIOLA, T.; SANTINOLI, C.; CONTI, S.; POLONELLI, L. AFM1 in Milk: Physical, Biological, and Prophylactic Methods to Mitigate Contamination. **Toxins**, v. 7, n. 10, p. 4330–4349, 2015.

GONÇALVES, K.; MARIMÓN, K.; ANA, F.; REMEDI, R. D.; GARCIA, S. D. O.; GARDA-BUFFON, J. Accepted Manuscript. 2018.

GONÇALVES, L.; DALLA ROSA, A.; GONZALES, S.; FELTES, M. M.; BADIALE-FURLONG, E.; DORS, G. C. Incidence of Aflatoxin M1 in Fresh Milk from Small Farms. **Food Science and Technology**, v. 37, n. spe, p. 11–15, 2017.

GONZÁLEZ, E.; FELICIO, M. .; ROSSI, M, H.; NOGUEITA, J. H. .; MANGINELLI, S. Ocorrência de Aflatoxina M1 em Leite Comercializado em Alguns Municípios do Estado de São Paulo. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 72, n. 4, p. 435–438, 2005.

GOURAMA, H. Inhibition of Growth and Mycotoxin Production of *Penicillium* By *Lactobacillus* Species. **Food Science & Technology-Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie**, v. 30, n. 3, p. 279–283, 1997.

GRENIER, B.; BRACARENSE, A. P. F. L.; SCHWARTZ, H. E.; TRUMEL, C.; COSSALTER, A. M.; SCHATZMAYR, G.; KOLF-CLAUW, M.; MOLL, W. D.; OSWALD, I. P. The Low Intestinal and Hepatic Toxicity of Hydrolyzed Fumonisin B1 Correlates with Its Inability to Alter the Metabolism of Sphingolipids. **Biochemical Pharmacology**, v. 83, n. 10, p. 1465–1473, 2012.

GUAN, S.; JI, C.; ZHOU, T.; LI, J.; MA, Q.; NIU, T. Aflatoxin B 1 Degradation by *Stenotrophomonas maltophilia* and Other Microbes Selected Using Coumarin Medium. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 9, n. 8, p. 1489–1503, 2008.

HAMID, M.; KHALIL-UR-REHMAN. Potential Applications of Peroxidases. **Food Chemistry**, v. 115, n. 4, p. 1177–1186, 2009.

HAMID, A. Bin; SMITH, J. E. Degradation of Aflatoxin by *Aspergillus Flavus*. **Journal of General Microbiology**, v. 4, n. 133, p. 2023–2029, 1987.

HERNÁNDEZ, J.; ABADÍA, B.; MORENO, J. Determinación de Aflatoxina M1 en Leche Proveniente del Caribe Colombiano, Empleando Cromatografía Líquida de Ultra Resolución. **Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias**, v. 22, n. 3, p. 430–437, 2009.

HOYOS OSSA, D. E.; HINCAPIÉ, D. A.; PEÑUELA, G. A. Determination of Aflatoxin M1 in Ice Cream Samples Using Immunoaffinity Columns and Ultra-High Performance Liquid Chromatography Coupled to Tandem Mass Spectrometry. **Food Control**, v. 56, p. 34–40, 2015.

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.

HUYNH, V. L.; GERDES, R. G.; LLOYD, A. B. Synthesis and Degradation of Aflatoxins by *Aspergillus Parasiticus*. II. Comparative Toxicity and Mutagenicity of Aflatoxin B1 and Its Autolytic Breakdown Products. **Australian Journal of Biological Sciences**, v. 37, n. 3, p. 123–129, 1984.

- IHA, M. H.; BARBOSA, C. B.; OKADA, I. A.; TRUCKSESS, M. W. Occurrence of Aflatoxin M1 in Dairy Products in Brazil. **Food Control**, v. 22, n. 12, p. 1971–1974, 2011.
- IHA, M. H.; BARBOSA, C. B.; OKADA, I. A.; TRUCKSESS, M. W. Aflatoxin M1 in Milk and Distribution and Stability of Aflatoxin M1 during Production and Storage of Yoghurt and Cheese. **Food Control**, v. 29, n. 1, p. 1–6, 2013.
- IQBAL, S. Z.; JINAP, S.; PIROUZ, A. A.; FAIZAL, A. R. A. Aflatoxin M1 in Milk and Dairy Products, Occurrence and Recent Challenges: A Review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 46, p. 110–119, 2015.
- KAN, C. A. Transfer of Toxic Substances from Feed to Food. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 38, n. SUPPL. 1, p. 423–431, 2009.
- KUMAR, R.; SINGH, K. A.; SINGH, V. K.; JAGANNADHAM, M. V. Biochemical Characterization of a Peroxidase Isolated from Caribbean Plant: Euphorbia Cotinifolia. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 6, p. 1350–1357, Jun. 2011.
- KURTZMAN, C. P.; HORN, B. W.; HESSELTINE, C. W. *Aspergillus Nomius*, a New Aflatoxin-Producing Species Related to *Aspergillus Flavus* and *Aspergillus Tamaris*. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 53, n. 3, p. 147–158, 1987.
- KUSUMANINGTYAS, E.; WIDIASTUTI, R.; MARYAM, R. Reduction of Aflatoxin B1 in Chicken Feed by Using *Saccharomyces Cerevisiae*, *Rhizopus Oligosporus* and Their Combination. **Mycopathologia**, v. 162, n. 4, p. 307–311, 2006.
- LANDEROS, P.; NOA, M.; LÓPEZ, Y.; GONZÁLEZ, D. G.; NOA, E.; REAL, M.; JUÁREZ, C.; MEDINA, M. S. Niveles de Aflatoxina M1 en Leche Cruda y Pasteurizada Comercializada en la Zona Metropolitana de Guadalajara, México Aflatoxin M1 Levels in Raw and Pasteurized Milk Produced in Guadalajara, Mexico. **Rev. Salud Anim**, v. 34, n. 1, p. 40–45, 2012.
- LAPALIKAR, G. V.; TAYLOR, M. C.; WARDEN, A. C.; SCOTT, C.; RUSSELL, R. J.; OAKESHOTT, J. G. F 420H 2-Dependent Degradation of Aflatoxin and Other Furanocoumarins Is Widespread throughout the Actinomycetales. **PLoS ONE**, v. 7, n. 2, 2012.
- LEONTOPOULOS, D.; SIAFAKA, A.; MARKAKI, P. Black Olives as Substrate for *Aspergillus Parasiticus* Growth and Aflatoxin B1 Production. **Food Microbiology**, v. 20, n. 1, p. 119–126, 1 Feb. 2003.
- LÓPEZ, C. E.; RAMOS, L. .; RAMADÁN, S. S.; BULACIO, L. C. Presence of Aflatoxin M1 in Milk for Human Consumption in Argentina. **Food Control**, v. 14, p. 31–34, 2003.
- MASOOD, M.; IQBAL, S. Z.; ASI, M. R.; MALIK, N. Natural Occurrence of Aflatoxins in Dry Fruits and Edible Nuts. **Food Control**, v. 55, p. 62–65, 2015.
- MICHLIG, N.; SIGNORINI, M.; GAGGIOTTI, M.; CHIERICATTI, C.; BASÍLICO, J. C.; REPETTI, M. R.; BELDOMENICO, H. R. Risk Factors Associated with the Presence of Aflatoxin M1 in Raw Bulk Milk from Argentina. **Food Control**, v. 64, p. 151–156, 2016.
- MOTOMURA, M.; TOYOMASU, T.; MIZUNO, K.; SHINOZAWA, T. Purification and Characterization of an Aflatoxin Degradation Enzyme from *Pleurotus Ostreatus*. **Microbiological research**, v. 158, n. 3, p. 237–242, 2003.

NAKAZATO, M.; MOROZUMI, S.; SAITO, K.; FUJINUMA, K.; NISHIMA, T.; KASAI, N. Interconversion of Aflatoxin B1 and Aflatoxicol by Several Fungi. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, n. 5, p. 1465–1470, 1990.

NORA, N. (FURG). **Redução dos níveis de Ocratoxina A por ação enzimática.pdf**. 2015. 165 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciencia de Alimentos). Escola de Química e Alimentos. Universidade Federal de Rio Grande. Rio Grande, 2015.

OLIVEIRA, C. P. De; SOARES, N. D. F. F.; OLIVEIRA, T. V. De; BAFFA JÚNIOR, J. C.; SILVA, W. A. Da. Aflatoxin M1 Occurrence in Ultra High Temperature (UHT) Treated Fluid Milk from Minas Gerais/Brazil. **Food Control**, v. 30, n. 1, p. 90–92, 2013.

ORTIZ-MARTINEZ, R.; DE LUNA-LOPEZ, M. C.; VALDIVIA-FLORES, A.; QUEZADA-TRISTAN, T. Assessment of Aflatoxin M1 Levels in White Cheese. **Toxicology Letters**, v. 229, p. S224, 10 Sep. 2014.

ORTIZ-MARTINEZ, R.; VALDIVIA-FLORES, A.; QUEZADA-TRISTAN, T.; LUNA-LÓPEZ, M. C. De. Contamination of White Cheese with Aflatoxin M1. **Toxicology Letters**, v. 221, p. S63, 28 Aug. 2013.

ORTIZ MARTINEZ, R.; VALDIVIA FLORES, A. G.; DE LUNA LOPEZ, M.; QUEZADA TRISTAN, T.; MIRANDA CASTAÑEDA, C. A.; RANGEL MUÑOZ, E. J.; CRUZ VAZQUEZ, C. Occurrence of Aflatoxins in Milk since Dairy Farms until Consumers: An Exploratory Study. **Toxicology Letters**, v. 258, p. S87–S88, 16 Sep. 2016.

PEREIRA, M. M. G.; CARVALHO, E. P. De; PRADO, G.; ROSA, C. A. D. R.; VELOSO, T.; SOUZA, L. A. F. De; RIBEIRO, J. M. M. Aflatoxinas Em Alimentos Destinados a Bovinos e em Amostras de Leite da Região de Lavras, Minas Gerais - Brasil. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 29, p. 106–112, 2005.

PEREIRA, V. L.; FERNANDES, J. .; CUNHA, S. . Micotoxinas Em Portugal : Ocorrência E Toxicidade. **Acta Farmacologica Portuguesa**, v. II, n. 1, 2000.

PÉREZ, J.; GUTIÉRREZ, R.; VEGA, S.; DÍAZ, G.; URBÁN, G.; CORONADO, M.; ESCOBAR, A. Ocurrência De Aflatoxina M1 en Leches Cruda, Ultrapasteurizada y Orgánica Producidas y Comercializadas en el Altiplano Mexicano. **Revista Salud Animal**, v. 30, n. 2, p. 103–109, 2008.

PICININ, L. C. A.; CERQUEIRA, M. M. O. P.; VARGAS, E. A.; LANA, Â. M. Q.; TOALDO, I. M.; BORDIGNON-LUIZ, M. T. Influence of Climate Conditions on Aflatoxin M1 Contamination in Raw Milk from Minas Gerais State, Brazil. **Food Control**, v. 31, n. 2, p. 419–424, 2013.

PRADO, G.; OLIVEIRA, M. S. De; LIMA, A. S.; PAULA, A.; MOREIRA, A. Occurrence of Aflatoxin M1 in Parmesan Cheese Consumed in Minas Gerais, Brazil. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 32, n. 6, p. 1906–1911, 2008.

REYES VELÁZQUEZ, W.; MARTÍNEZ, S. P.; ISAÍAS ESPINOSA, V. H.; NATHAL VERA, M. A.; DE LUCAS PALACIOS, E.; ROJO, F. Aflatoxinas Totales en Raciones de Bovinos y AFM1 en Leche\rcruda Obtenida En Establos del Estado de Jalisco, México. **Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias** , v. 47 (2), n. 2, p. 223–230, 2009.

SANTOS, A. L.; BANDO, E.; MACHINSKI JUNIOR, M. Ocorrência de Aflatoxina M1 Em Leite Bovino Comercializado No Estado Do Paraná, Brasil. **Semina: Ciências Agrárias**, v.

35, n. 1, p. 371, 2014.

SARIMEHMETOGLU, B.; KUPLULU, O.; CELIK, H. . Detection of Aflatoxin M 1 in Cheese Samples by ELISA. **Food Control**, v. 15, p. 45–49, 2004.

SARTORI, A. V.; SWENSSON DE MATTOS, 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-High-Performance Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry. **Food Analytical Methods**, v. 8, n. 9, p. 2321–2330, 2015.

SASSAHARA, M.; PONTES NETTO, D.; YANAKA, E. K. Aflatoxin Occurrence in Foodstuff Supplied to Dairy Cattle and Aflatoxin M1 in Raw Milk in the North of Parana State. **Food and Chemical Toxicology**, v. 43, n. 6, p. 981–984, 2005.

SCAGLIONI, P. T.; BECKER-ALGERI, T.; DRUNKLER, D.; BADIALE-FURLONG, E. Aflatoxin B1 and M1 in Milk. **Analytica Chimica Acta**, v. 829, p. 68–74, 2014.

SHANTHA, T. Fungal Degradation of Aflatoxin B1. **Natural Toxins**, v. 7, n. January 1999, p. 175–178, 1999.

SHUNDO, L.; ALMEIDA, A. P. de; ALABURDA, J.; LAMARDO, L. C. A.; NAVAS, S. A.; RUVIERI, V.; SABINO, M. Ocorrência de Aflatoxina M1 em Amostras de Leite Bovino Consumido em Diferentes Regiões do Brasil. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, n. July 2017, p. 1–8, 2016.

SIGMA CHEMICAL COMPANY. **Commercial Peroxidase Enzyme Specifications (Peroxidase from horseradish)**. Disponível em: <<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/substance/peroxidasefromhorseradish12345900399011?lang=pt®ion=BR>>. Acesso abril 2018.

SILVA, M. V.; JANEIRO, V.; BANDO, E.; MACHINSKI JR, M. Occurrence and Estimative of Aflatoxin M1 Intake in UHT Cow Milk in Paraná State, Brazil. **Food Control**, v. 53, p. 222–225, 2015.

TAYLOR, M. C.; JACKSON, C. J.; TATTERSALL, D. B.; FRENCH, N.; PEAT, T. S.; NEWMAN, J.; BRIGGS, L. J.; LAPALIKAR, G. V.; CAMPBELL, P. M.; SCOTT, C.; RUSSELL, R. J.; OAKESHOTT, J. G. Identification and Characterization of Two Families of F420H2-Dependent Reductases from Mycobacteria That Catalyse Aflatoxin Degradation. **Molecular Microbiology**, v. 78, n. 3, p. 561–575, 2010.

TENIOLA, O. D.; ADDO, P. A.; BROST, I. M.; FÄRBER, P.; JANY, K. D.; ALBERTS, J. F.; VAN ZYL, W. H.; STEYN, P. S.; HOLZAPFEL, W. H. Degradation of Aflatoxin B1 by Cell-Free Extracts of *Rhodococcus Erythropolis* and *Mycobacterium Fluoranthenivorans* Sp. Nov. DSM44556T. **International Journal of Food Microbiology**, v. 105, n. 2, p. 111–117, 2005.

UNUSAN, N. Occurrence of Aflatoxin M1 in UHT Milk in Turkey. **Food and Chemical Toxicology**, v. 44, p. 1897–1900, 2006.

URBÁN, G.; PÉREZ, J.; MARTÍNEZ, F.; SALAS, J.; DÍAZ, G.; RAMÍREZ, M. L.; CASTRO, G.; VEGA, S.; GUTIÉRREZ, R.; ESCOBAR, A. Niveles De Aflatoxina M1 En Quesos Frescos Producidos En Diferentes Zonas De México. **Revista Salud Animal** , v. 31, n. 2, p. 115–121, 2009.

- VÁSQUEZ, P. **Evaluación de aflatoxinas en suplementos para vacas lecheras en la sabana de Bogotá, y su relación con aflatoxina M1 en leche.** 2006. 90 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Zootecnia) – Universidad de la Salle. Bogotá.
- VEGA, S.; RUIZ, J. L.; YAMAZAKI, A.; RIVERA, J. G.; ESCOBAR, A. Evaluación de Aflatoxina M1 en Leche Orgánica Producida en Tecpatán, Chiapas, México. **Revista Salud Animal**, v. 35, n. 1, p. 33–37, 2013.
- VELA, E. **Determinación de la presencia de aflatoxina M1 en leche cruda de vaca distribuida en un centro de acopio ubicado en la región de la costa sur de Guatemala.** 2015. 123 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Medicina Veterinaria y Zootecnia) - Universidad de San Carlos de Guatemala, San Carlos, 2015.
- VERRAES, C.; VLAEMYNCK, G.; VAN WEYENBERG, S.; DE ZUTTER, L.; DAUBE, G.; SINDIC, M.; UYTENDAELE, M.; HERMAN, L. A Review of the Microbiological Hazards of Dairy Products Made from Raw Milk. **International Dairy Journal**, v. 50, p. 32–44, 2015.
- VETAL, M. D.; RATHOD, V. K. Three Phase Partitioning a Novel Technique for Purification of Peroxidase from Orange Peels (*Citrus Sinenses*). **Food and Bioproducts Processing**, p. 3–8, 2014.
- WANG, J.; OGATA, M.; HIRAI, H.; KAWAGISHI, H. Detoxification of Aflatoxin B1 by Manganese Peroxidase from the White-Rot Fungus *Phanerochaete Sordida* YK-624. **FEMS Microbiology Letters**, v. 314, n. 2, p. 164–169, 2011.
- WILLIAMS, J. H.; PHILLIPS, T. D.; JOLLY, P. E.; STILES, J. K.; JOLLY, C. M.; AGGARWAL, D. Human Aflatoxin in Developing Countries: A Review of Toxicology, Exposure, Potential Health Consequences, and Interventions. **American Society for Clinical Nutrition**, v. 80, n. June 2015, p. 1106–1122, 2004.
- WU, Y. Z.; LU, F. P.; JIAN, H. L.; TAN, C. P.; YAO, D. S.; XIE, C. F.; LIU, D. L. The Furofuran-Ring Selectivity, Hydrogen Peroxide-Production and Low Km Value Are the Three Elements for Highly Effective Detoxification of Aflatoxin Oxidase. **Food and Chemical Toxicology**, v. 76, p. 125–131, 2015.
- YAO, D.; LIANG, R.; LIU, D.; GU, L.; MA, L.; CHEN, W. Screening of the Fungus Whose Multienzyme System Has Catalytic Detoxification Activity towards Aflatoxin B1 (Part I)a. **ANNALS NEW YORK ACADEMY OF SCIENCES**, v. 864, n. 1, p. 579–585, 1998.
- YEHA, R. S. Aflatoxin Detoxification by Manganese Peroxidase Purified from *Pleurotus Ostreatus*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 45, n. 1, p. 127–133, 2014.
- ZAMBRANO, J.; MARTINEZ, N. **Evaluación de la reducción de aflatoxina M1 con dos tratamientos térmicos respecto a leche cruda en hatos de la sabana de Bogotá.** 2009. 62 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Zootecnia) - Universidad de la Salle, Bogotá, 2009.
- ZEINVAND-LORESTANI, H.; SABZEVAR, O.; SETAYESH, N.; AMINI, M.; NILI-AHMADABADI, A.; FARAMARZI, M. A. Comparative Study of in Vitro Prooxidative Properties and Genotoxicity Induced by Aflatoxin B1 and Its Laccase-Mediated Detoxification Products. **Chemosphere**, v. 135, p. 1–6, 2015.
- ZENGİN, B.; UCKAYA, F.; DURMUS, Z. International Journal of Biological

Macromolecules Chitosan and Carboxymethyl Cellulose Based Magnetic Nanocomposites for Application of Peroxidase Purification. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 96, p. 149–160, 2017.

ZHANG, W.; XUE, B.; LI, M.; MU, Y.; CHEN, Z.; LI, J.; SHAN, A. Screening a Strain of *Aspergillus Niger* and Optimization of Fermentation Conditions for Degradation of Aflatoxin B1. **Toxins**, v. 6, p. 3157–3172, 2014.

ZHAO, L. H.; GUAN, S.; GAO, X.; MA, Q. G.; LEI, Y. P.; BAI, X. M.; JI, C. Preparation, Purification and Characteristics of an Aflatoxin Degradation Enzyme from *Myxococcus Fulvus* ANSM068. **Journal of Applied Microbiology**, v. 110, n. 1364–5072, p. 147–155, 2010.

**ARTIGO V - PEROXIDASE COMO ESTRATÉGIA DE MITIGAÇÃO DE
AFLATOXINAS EM LEITE CRU**

RESUMO

O leite e seus derivados são frequentemente incluídos como alimentos importantes em uma dieta saudável e balanceada, pois fornecem toda a energia e nutrientes necessários para garantir o adequado crescimento e desenvolvimento de humanos que os consomem. No entanto, estudos demonstram a incidência de aflatoxinas M1 (AFM1) e B1 (AFB1) neste tipo de alimento. Estas micotoxinas, foram classificadas pela Organização Mundial da Saúde (OMS) - Agência Internacional de Pesquisa sobre Câncer (IARC) como agentes carcinogênicos em humanos nos grupos 1 e 2B, respectivamente, devido a seus efeitos tóxicos e carcinogênicos comprovados. Neste contexto, este estudo avaliou a aplicação da enzima peroxidase (POD) em leite cru na mitigação da AFB1 e AFM1, determinando a influência da concentração de H_2O_2 , e a presença de íons metálicos (Mg^{2+} (MgCl_2), K^+ (KCl), NaCl^+ (NaCl), Ca^{2+} (CaCl_2), Fe^{3+} (FeCl_3), Zn^{2+} (ZnSO_4) na ação da enzima. Além disso, foi avaliado o efeito da aplicação do processo de mitigação com POD na qualidade nutricional do leite cru. Os maiores valores de mitigação das micotoxinas (55% e 87% para AFM1 e AFB1 respectivamente) foram alcançados quando 0,0015 U de POD, 5 mM de Zn^{2+} e 0,12% de H_2O_2 , foram incubados com 5 mL de amostra de leite cru a 5 °C durante 8 h a 150 rpm. As determinações de ressonância magnética nuclear (RMN) e espectroscopia de infravermelho, indicaram que não houveram alterações significativas ($p > 0,05$) nas propriedades físico químicas entre amostras tratadas e não tratadas com POD, em relação ao perfil metabólico, proteína, gordura e lactose. Assim, a POD é uma alternativa viável para a bioremediação da AFM1 e AFB1 em leite cru na temperatura de refrigeração.

Palavras chave: Bioremediação. Peroxidase. Cofatores enzimáticos. Leite. Qualidade nutricional.

1. INTRODUÇÃO

As aflatoxinas (AFs) são estruturas policíclicas pertencentes às bishidrofuranocumarinas (WILLIAMS et al., 2004), e constituem uma importante classe de micotoxinas produzidas principalmente por fungos das espécies, *Aspergillus flavus* (DIENER et al., 1987), *nomius* (KURTZMAN; HORN; HESSELTINE, 1987) e *parasiticus* (LEONTOPOULOS; SIAFAKA; MARKAKI, 2003). Estas são consideradas contaminantes de uma grande variedade de produtos alimentares, como cereais (MEDINA; RODRIGUEZ; MAGAN, 2014), frutos de casca dura (MASOOD et al., 2015), oleaginosas (LEE; LEE, 2015), especiarias (PRELLE et al., 2014), entre outros. Em particular a aflatoxina M1 (AFM1) é considerada um contaminante presente no leite e derivados lácteos, e sua ocorrência tem sido reportada em vários países do mundo inteiro, como Turquia (UNUSAN, 2006), Espanha (CANO-SANCHO et al., 2010), China (WANG et al., 2012), Itália (SANTINI et al., 2013), Sérvia (KOS et al., 2014), Colômbia (MARIMÓN et al., 2019), Brasil e Cabo Verde (GONÇALVES et al., 2018). A AFM1 é o principal metabólito da aflatoxina hidroxilada no leite de animais que consumiram alimentos contaminados com sua precursora.

Segundo Creppy (2002), cerca de 0,3 a 6,2% da AFB1 ingerida é eliminada como AFM1 no leite. Devido a seus efeitos tóxicos, a Agência Internacional para Pesquisa sobre o Câncer (IARC) classificou as AFB1 e AFM1 como agentes carcinogênicos para humanos no grupo 1 e 2B, respectivamente (Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer, 2002). Neste contexto, a mitigação do teor de AFs no leite é definitivamente uma tarefa importante para a pesquisa científica, por ser considerada uma importante fonte de nutrição para os seres humanos, apresentando composição equilibrada em macro e micronutrientes (proteínas, cálcio, zinco, magnésio, potássio, fósforo, vitamina D e vitaminas do Complexo B (SHARABI; OKUN; SHPIGELMAN, 2018). Além disso, seu consumo é recomendado em todas as etapas do desenvolvimento humano, especialmente nas etapas iniciais de vida (FLORES-FLORES et al., 2015).

Estudos para reduzir ou inibir a contaminação por AFs em leite e derivados têm sido reportados na literatura, os quais se baseiam em métodos físicos (GOVARIS et al., 2001; DUA et al., 2012; SMAJLOVIC et al., 2012; SADEGHI et al., 2013; CARRARO et al., 2014) e biológicos (EL KHOURY; ATOUI; YAGHI, 2011; CORASSIN et al., 2013; ISMAIL et al., 2016). Os métodos biológicos têm destaque pelo baixo impacto ambiental e condições moderadas de operação. Porém o uso de micro-organismos, como fungos e bactérias na degradação de AFs em alimentos pode trazer desvantagens quanto o seu uso potencial na

indústria, pois o organismo não só utiliza o alimento para o seu crescimento, mas também pela possibilidade de liberação de compostos indesejáveis, além do longo tempo de incubação necessário para a degradação (mais de 72 h) (DAS; MISHRA, 2000; GUAN et al., 2008; GIOVATI et al., 2015). Portanto, o uso de enzimas capazes de biotransformar AFs em qualquer produto não tóxico ou menos tóxico, mantendo o valor nutritivo e a aparência do alimento, seria uma abordagem eficaz. Estudos realizados por Marimón et al. (2018), demonstraram a eficácia da enzima peroxidase comercial (POD) na mitigação de AFs ($0,5 \mu\text{g L}^{-1}$) em amostras de leite UHT, utilizando condições otimizadas ($0,015 \text{ U mL}^{-1}$, 150 rpm e 35°C , durante 8 h de incubação), alcançando percentual de mitigação de 97% e 65% para AFB1 e AFM1, respectivamente.

O leite, por ser uma matéria prima muito perecível, rica em nutrientes que facilitam o desenvolvimento de micro-organismos patogênicos naturalmente presentes, requer a sua manutenção a temperaturas baixas, fator fundamental para sua qualidade microbiológica, e assim garantir um alimento seguro, que não represente riscos à saúde dos consumidores (CASTANHEIRA; NEVES, 2018). Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar a aplicação da enzima peroxidase comercial (POD) na mitigação das aflatoxinas AFM1 e AFB1 em amostras de leite cru refrigeradas, verificando a influência da concentração de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), e íons metálicos (Mg^{2+} (MgCl_2), K^+ (KCl), NaCl^+ (NaCl), Ca^{2+} (CaCl_2), Fe^{3+} (FeCl_3), Zn^{2+} (ZnSO_4)) sobre a atividade da enzima, bem como o processo de mitigação das AFs na qualidade nutricional do leite.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. LEITE

O leite utilizado nesse estudo foi obtido no mês de novembro de 2018, a partir de fazendas produtoras de leite cru do município de Rio Grande – RS. As amostras foram acondicionadas em caixas isotérmicas com gelo e encaminhadas ao Laboratório de Micotoxinas e Ciência de Alimentos da Universidade Federal de Rio Grande – FURG, Rio Grande – RS, e armazenadas sob refrigeração (4°C) até o momento da análise.

2.2. REAGENTES

Os padrões das micotoxinas AFM1 (Bellefonte, PA, USA) e AFB1 (Saint Louis, MO, USA) foram adquiridos da Sigma-Aldrich Chemical Company. A enzima peroxidase

comercial POD tipo VI obtida de raiz forte (HRP) foi adquirida da Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, EUA). Acetonitrila (MeCN), metanol (MeOH) e Cloreto de sódio (purity >99%) (todos de grau cromatografico) foram adquiridos da J.T.Baker (Trinidad e Tobago). Ácido acético (pureza >99%) foi obtida da Tedia (Fairfield, OH, USA). Sulfato de magnésio anidro (pureza >95%) foi adquirido da Caledon Laboratory (Georgetown, Ontario, Canada). O Hexano (purity >96%) foi obtido da Merck (Darmstadt, Germany). A água foi purificada num Millipore Direct-Q 3 UV em 18,2 MΩ cm, USA. A fase móvel foi desgaseificada durante 30 min antes de ser utilizada com Ultrason UniQup (USC-1850 freq US: 250 KHz, Brasil). Os sais (KCl, NaCl, FeCl₃, ZnSO₄) e o (MgCl₂, CaCl₂) foram adquiridos da LABSYnth (São Paulo, Brazil), Vetec e a Sigma-Aldrich Chemical Company (Rio de Janeiro, Brazil), respectivamente.

2.3. APLICAÇÃO DE POD COMERCIAL EM LEITE CRU

A mitigação de AFM1 e AFB1 por POD comercial foi conduzida sob as condições de reação descritas segundo Marimón et al. (2018), os experimentos foram realizados utilizando 5 mL de leite cru fortificados com 0,5 µg L⁻¹ de ambas as micotoxinas, AFM1 e AFB1. Para isso, a solução padrão de micotoxina foi adicionada ao reator e o solvente foi seco sob corrente de nitrogênio suave. O leite cru foi adicionado e os padrões solubilizados utilizando vórtex (30 s) seguido de banho ultrasonico (3 min). Com o objetivo de maximizar a atividade da enzima na temperatura de refrigeração do leite (5 °C), foram avaliadas as condições da reação enzimática (concentração de H₂O₂ (0,08%; 0,12%; 0,16% e 0,20%); e presença de íons metálicos (5 mM de Mg²⁺ (MgCl₂), K⁺ (KCl), NaCl⁺ (NaCl), Ca²⁺ (CaCl₂), Fe³⁺ (FeCl₃), Zn²⁺ (ZnSO₄)) foram avaliadas, sob um tempo de incubação de 8 h e 150 rpm de agitação orbital. Após a incubação, as micotoxinas foram extraídas e quantificadas por CLAE-FL. As concentrações de AFM1 e AFB1 remanescentes após a atividade enzimática foram estimadas para determinar o percentual de micotoxina biotransformada. Todos os experimentos foram realizados e analisados em triplicata, e o percentual de mitigação foi determinado pela diferença entre a concentração inicial e a concentração residual da micotoxina, conforme a seguinte equação:

$$\text{Mitigação (\%)} = 1 - \frac{\text{AFB1}_{\text{final}}}{\text{AFB1}_{\text{inicial}}} \times 100 \quad (1)$$

Onde: AFB1_{inicial} é a concentração inicial de AFB1 (µg L⁻¹) e AFB1_{final} é a concentração final de AFB1 (µg L⁻¹) calculada de acordo com uma curva analítica da micotoxina.

2.4. ANÁLISE CROMATOGRÁFICA

As amostras de leite foram extraídas conforme procedimento descrito por Gonçalves et al. (2018), onde a amostra analítica (5 mL) foi transferida para tubo de centrifugação, foram adicionados 10 mL de hexano e 15 mL de MeCN (1% de ácido acético, v v⁻¹) seguido de agitação vigorosa em vórtex durante 30 s. Em seguida, 6 g de sulfato de magnésio e 1,5 g de NaCl foram adicionados à mistura e os tubos foram agitados durante 1 min e, em seguida, centrifugados a 2253 x *g* durante 10 min, utilizando centrífuga CT-5000R (Cientec, Belo Horizonte, Brasil). Em seguida, uma alíquota de 5 mL da fase orgânica MeCN foi coletada em frasco âmbar, e o solvente evaporado sob corrente suave de nitrogênio. O extrato seco foi dissolvido em água:MeCN (90:10, v v⁻¹) e, a solução foi centrifugada 4506 x *g* por 5 min com auxílio de microcentrífuga *MiniSpin* Plus (Hauppauge, NY, EUA).

Finalmente, 20 µL da solução resultante foi injetada no CLAE-FL e analisada, utilizando um sistema de Classe-VP (Shimadzu, Kyoto, Japão) equipado com uma bomba LC-20 AD, degaseificador DGU-20As, CBM-20A, detector de fluorescência RF-20A, derivatizador fotoquímico pós-coluna RDUTM, injetor manual de 20 µL 7725i, software de Solução LC-Shimadzu e uma coluna Kromasil 100-5C18 (150 mm x 4.6 mm). Os padrões e extratos das amostras foram eluídos na fase móvel contendo água:acetonitrila:metanol (60:15:25, v v⁻¹ v⁻¹) em volume isocrático, temperatura de coluna de 40 °C com vazão de 1,0 mL min⁻¹. A detecção de micotoxinas foi realizada em comprimentos de onda de 370 nm a 410 nm para absorção e emissão. Os cromatogramas foram analisados por LC solution LC-Assist software (Shimadzu) e a quantificação da aflatoxina foi calculada pela área do pico de acordo com a curva de calibração correspondente. Duas curvas analíticas foram construídas, uma utilizando solução padrão de AFB1 a AFM1, que foi diluída em água:acetonitrila (90:10, v v⁻¹), com concentrações crescentes (0,5 – 8 ng mL⁻¹). A outra curva foi realizada a partir da fortificação (em triplicata) de amostras de leite com seis concentrações crescentes de soluções padrão de AFB1 e AFM1.

2.5. EFEITO DA BIOTRANSFORMAÇÃO DE AFs POR POD NA COMPOSIÇÃO DO LEITE CRU

Os níveis de AFs em 50 mL de amostras de leite cru foram mitigados usando POD sob as condições ótimas de reação obtidas neste estudo (0,015 U mL⁻¹ POD, 0,16% H₂O₂, 5 mM de ZnSO₄ a 5 °C, 150 rpm durante 8 h de incubação). Amostras não tratadas com POD foram

consideradas como controle. Logo após, com a finalidade de inativar a enzima, todas as amostras de leite cru (50 mL) com e sem tratamento com POD, foram submetidas a tratamento térmico - HTST (72 a 75°C/ 15 a 20 s/ Resfriamento a 4°C). Em seguida, foi avaliada a qualidade físico química por RMN e por Infravermelho, como descrito a seguir.

2.6.1. Análises por RMN

A análise por Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de próton, RMN ^1H , foi realizada nas amostras controle (sem tratamento com POD) e com aplicação do processo de mitigação com a enzima para avaliar possíveis alterações no perfil metabólico. Para isso, 1 mL de amostra de leite cru foi dissolvida utilizando D_2O (100 mM) e as amostras foram centrifugadas ($19,954 \times g$, 5 min). O sobrenadante foi introduzido em tubo de 5 mm de diâmetro para gravação de espectros de RMN ^1H . Os espectros foram obtidos em um espectrômetro Bruker Ascend, com um magneto de 9,4 T (frequência de 400 MHz para ^1H), 32 varreduras, 2 s de tempo entre os pulsos, 64 K de memória, e ângulo de 45°.

2.6.2. Infravermelho

As análises físico-químicas (gordura, proteína, lactose, contagem de células somáticas e sólidos totais) foram realizadas por Infravermelho segundo o método da Instrução Normativa 62/2011 – Mapa (Internacional IDF Standart 141C;2000).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. EFEITO DO H_2O_2 NA REAÇÃO DE MITIGAÇÃO POR POD

O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é um co-fator da enzima peroxidase que, participa do seu ciclo catalítico oxidando a enzima nativa para formar um intermediário que subsequentemente aceita a molécula de corante (composto aromático) para realizar sua oxidação e convertê-la em uma forma de radical livre. Com isso, o H_2O_2 se torna um dos fatores mais críticos nas reações mediadas por PODs, já que seu uso é indispensável para a atividade da enzima. No entanto, a quantidade excessiva deste reagente na mistura de reação inibe a atividade da enzima e, quando presente em pequena quantidade, limita a taxa de reação (NOUREN; BHATTI, 2015).

O efeito da concentração de H_2O_2 na atividade da POD na mitigação das micotoxinas no leite cru é apresentado na Tabela 1. O maior valor de mitigação por POD foi observado com a concentração de H_2O_2 de 0,12%, seguida de declínio quando a concentração aumentou para 0,16%. Isto pode ser devido a peroxidase ser primeiro oxidada por dois elétrons a partir de H_2O_2 para formar o composto I, então um elétron é removido por um substrato redutor alterando o composto I para o composto II. O composto II é ainda mais reduzido pelo restante da enzima por outro elétron do substrato redutor. Em uma concentração mais elevada de H_2O_2 , reage com o composto II para formar um composto relativamente inativo III, diminuindo a atividade de POD (KUMAR et al., 2011). Este comportamento foi similar ao encontrado por Gholami-Borujeni et al. (2011), os que avaliaram a aplicação de POD imobilizada na remoção dos corantes AO-7 e AB-25 em meio aquoso, onde a atividade da enzima diminuiu com o acréscimo da concentração de H_2O_2 . Reforçando esses dados, o aumento nas concentrações de H_2O_2 também inibiu a atividade da POD extraída de Planta do caribe: *Euphorbia cotinifolia* (KUMAR et al., 2011) e peroxidase de corpinus (IKEHATA et al., 2005).

Tabela 1 - Efeito do H_2O_2 na mitigação de AFB1 e AFM1 após ação da POD em leite cru.

Concentração de H_2O_2 (%)	Mitigação de AFM1 (%) (DPR%)	Mitigação de AFB1 (%) (DPR%)
0,04	22 (14,0) ^b	58 (13,0) ^b
0,08	13 (8,90) ^a	53 (17,0) ^a
0,12	48 (11,0) ^d	72 (4,10) ^c
0,16	39 (13,9) ^c	76 (5,9) ^{cd}

Desvio padrão relativo (DPR%) Letras minúsculas iguais indicam que não há diferença significativa entre as médias pelo teste de Tukey (p <0,05).

3.2. EFEITO DE ÍONS METÁLICOS

O efeito dos íons metálicos na mitigação de AFs no leite, se empregado como cofator da enzima foi avaliado devido a estes inibir as reações enzimáticas, através de mudanças na conformação do sítio ativo (KURADE; WAGHMODE; GOVINDWAR, 2011).

Na Tabela 2 pode se observar que os íons metálicos testados na concentração de 5 mM exerceram influência positiva no processo de mitigação das AFs, sendo o Zn^{2+} quem alcançou máxima mitigação entre eles, 55% e 87% para AFM1 e AFB1, respectivamente. Por outro lado, o K^+ mostrou leve inibição da mitigação para AFM1 (8%), em relação ao controle (13%).

Os resultados inferem que os íons testados podem atuar como ativadores enzimáticos, estabilizadores de membrana e com isso ajudar a manter a integridade estrutural das proteínas. No entanto, o K^+ pode causar uma alteração na conformação da enzima para uma forma com menor afinidade pela degradação das AFs, ou também inativando a enzima (D'SOUZA; BRACKETT, 1998).

Tabela 2 – Efeito de íons na mitigação de AFB1 e AFM1 após ação da POD em leite cru.

Íons (5 mM)	Mitigação de AFM1 (%) (DPR%)	Mitigação de AFB1 (%) (DPR%)
Controle	13 (3,7) ^b	53 (13,0) ^a
K^+	8,0 (4,2) ^a	56 (3,1) ^a
Na^+	16 (10,2) ^{bc}	62 (5,2) ^b
Ca^{2+}	33 (0,4) ^d	71 (4,6) ^c
Mg^{2+}	47 (4,9) ^e	80 (12,9) ^d
Fe^{3+}	49 (8,6) ^{ef}	75 (0,6) ^e
Zn^{2+}	55 (10,7) ^g	87 (3,6) ^f

Desvio padrão relativo (DPR%) Letras minúsculas iguais indicam que não há diferença significativa entre as médias pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

O efeito de íons metálicos na degradação de AFs em meio aquoso mediante o emprego de micro-organismos tem sido descrito anteriormente por vários autores. Semelhante aos resultados encontrados neste estudo, D'souza e Brackett (2000), relataram que incubar células de *Flavobacterium aurantiacum* com 0,1 mM de Ca^{2+} e Mg^{2+} aumenta significativamente a degradação da AFB1 em 11,8% e 13,8% respectivamente.

Da mesma forma, Guan et al. (2008) estudaram a degradação de AFB1 por *Stenotrophomonas maltophilia*, onde os íons Mg^{2+} e Cu^{2+} na concentração de 10 mM mostraram aumento na degradação de AFB1 de 85,4% e 85,0%, respectivamente em relação ao controle (78,7%). Raksha Rao et al. (2017) reportaram, também, o aumento no percentual de degradação de AFB1 com a adição de íons metálicos ao sobrenadante da cultura (*Bacillus licheniformis* CFR1) sendo de 5 e 10% para Mg^{2+} e Cu^{2+} , respectivamente em relação ao controle.

Por outro lado, os nossos resultados diferem dos obtidos por Zhao et al. (2010), que avaliaram o efeito de 10 mM L⁻¹ dos metais ($MgCl_2$, $ZnSO_4$, $CuSO_4$ e $LiCl$) sobre a atividade de MADE de *M. fulvus* na degradação de AFB1 em solução tampão fosfato de citrato (pH 6,0) a 35 °C, onde os resultados mostraram que os íons Cu^{2+} , $ZnSO_4$ e Li^+ inibiram a atividade da enzima, enquanto a atividade enzimática aumentou com a adição de íons de Mg^{2+} .

3.3. EFEITO DA MITIGAÇÃO DE AFs POR POD NA COMPOSIÇÃO DO LEITE CRU

As amostras foram avaliadas quanto aos teores de gordura, proteína, lactose e sólidos totais antes e após o tratamento com POD. Os resultados estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 – Composição nutricional do leite cru antes e após mitigação de AFB1 e AFM1 por POD

Análise	LEITE	
	Sem POD (Controle)	Com POD
Gordura (g 100g ⁻¹)(%)	4,21 ^a ±0,06	4,29 ^a ±0,08
Proteína (g 100g ⁻¹)(%)	3,25 ^a ±0,01	3,28 ^a ±0,01
Lactose (g 100g ⁻¹)(%)	3,45 ^a ±0,07	3,64 ^a ±0,01
Sólidos Totais (g 100g ⁻¹)(%)	13,06 ^a ±0,04	10,74 ^b ±0,05
CCS (x1000cél mL ⁻¹)	219,00 ^a ±45,25	32,00 ^b ±5,66

Contagem de células somáticas (CCS); Desvio padrão relativo (DPR%); Letras minúsculas iguais indicam que não há diferença significativa entre as médias pelo teste de Tukey (p <0,05); Leite UAT: 72-75°C/15 a 20 s.

Todos os constituintes analisados não tiveram seus níveis alterados significativamente após aplicação do tratamento de mitigação das AFs por POD. Além disso, a contagem de células somáticas (CCS), sofreu redução média de 219,00 para 32,00 x1000cél mL⁻¹, após o leite ser submetido ao processo de mitigação. Por tanto, os resultados obtidos neste estudo indicam que a aplicação da POD comercial pode ser uma estratégia para mitigar o impacto das AFM1 e AFB1 encontradas no leite cru reduzindo o risco de exposição do consumidor.

A análise por RMN-1H no leite cru sustentam ainda mais o descrito anteriormente. Na Figura 1, estão apresentados os espectros de RMN-1H das amostras de leite cru com e sem aplicação de POD (controle), onde pode se observar que ambos os espectros contêm os mesmos metabólitos e em concentrações semelhantes. Mediante comparação com espectros típicos para leite cru reportados por Yanibada et al. (2018), foi possível identificar alguns aminoácidos, e açúcares (Figura 2 e 3), tais como Valina, 2.3-Hidroxibutirato, Creatina/Fosfocreatina, Dimetil Sulfona, Colina/Fosfocolina, lactose, sendo este último o carboidrato mais abundante. Com isso, pode se afirmar que o tratamento do leite cru mediante o emprego da POD para a mitigação das AFB1 e AFM1 não modifica a natureza dos metabólitos solúveis e a aplicação da enzima no leite não exerce nenhuma das funções hidrolíticas nos compostos majoritários.

Figura 1. Espectro de RMN obtido a partir de amostra de leite cru com (azul) e sem (vermelho) tratamento com POD.

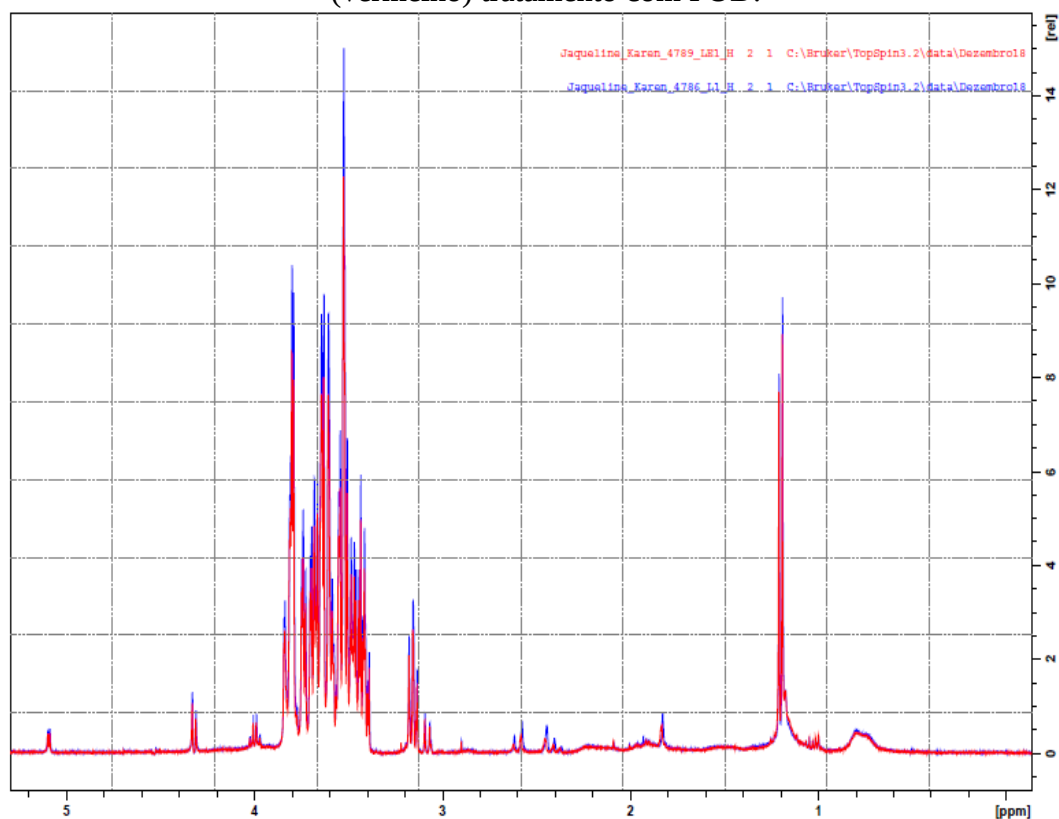


Figura 2. Espectro de RMN obtido a partir de amostra de leite cru tratada com POD.

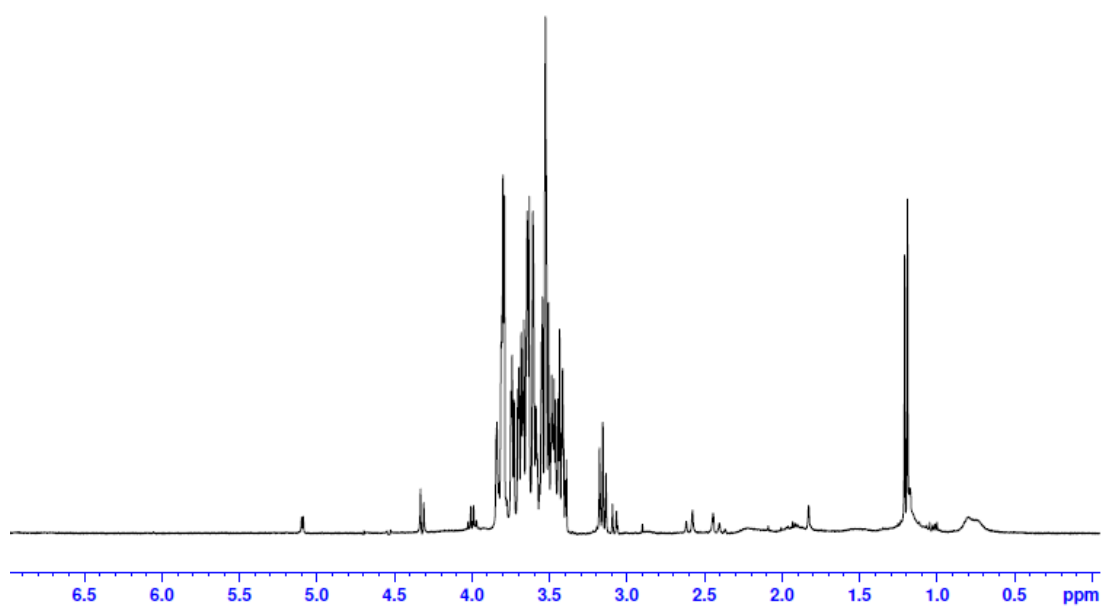
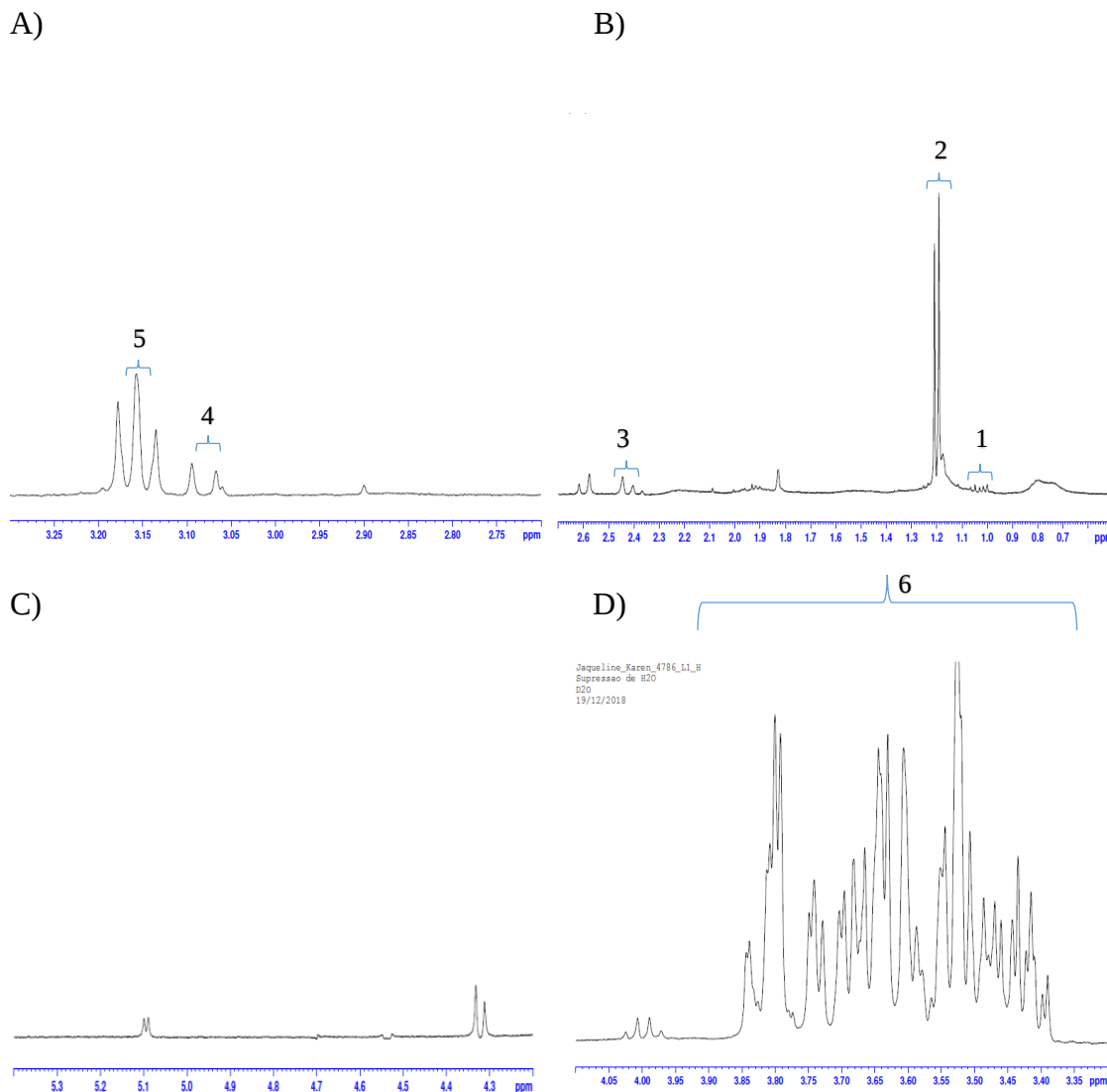


Figura 3. Espectro de RMN obtido a partir de amostra de leite cru tratada com POD. O espectro foi dividido em 4 partes: (A) 1. Valina 2.3-Hidroxibutirato, 3.Creatina/Fosfocreatina; (B) 4. Dimetil Sulfona C) Compostos não identificados 5. Colina/Fosfocolina (D) 6. Lactose



4 CONCLUSÃO

Os resultados encontrados neste estudo demonstram que os íons metálicos testados (com exceção do K^+) assim como o peróxido de hidrogênio na concentração de 0,12%, ajudaram positivamente na ação da POD na mitigação de AFM1 e AFB1 em leite cru, pois a mitigação passou de 13 para 55% e de 53 para 87%, para AFM1 e AFB1, respectivamente. Desta forma, pode se reduzir o risco associado ao consumo destes contaminantes a partir do leite e consequentemente derivados lácteos. Além disso, em relação as propriedades físico-

químicas do leite tratado com POD, essas não foram significativamente ($p < 0,05$) afetadas pelo processo.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CANO-SANCHO, G.; MARIN, S.; RAMOS, A. J.; PERIS-VICENTE, J.; SANCHIS, V. Incidencia de Aflatoxina M1 y Evaluación de la Exposición en Cataluña (España). **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 27, n. 3, p. 130–135, 2010.

CARRARO, A.; DE GIACOMO, A.; GIANNOSI, M. L.; MEDICI, L.; MUSCARELLA, M.; PALAZZO, L.; QUARANTA, V.; SUMMA, V.; TATEO, F. Clay Minerals as Adsorbents of Aflatoxin M1 from Contaminated Milk and Effects on Milk Quality. **Applied Clay Science**, v. 88–89, p. 92–99, 2014.

CASTANHEIRA A.; NEVES K. BR. **Quality**. A importância da temperatura no armazenamento do leite. Disponível em: <https://brqualityconsultoria.com.br/a-importancia-da-temperatura-no-armazenamento-do-leite/>. Acesso em Janeiro 2018.

CORASSIN, C. H.; BOVO, F.; ROSIM, R. E.; OLIVEIRA, C. a. F. Efficiency of *Saccharomyces Cerevisiae* and Lactic Acid Bacteria Strains to Bind Aflatoxin M1 in UHT Skim Milk. **Food Control**, v. 31, n. 1, p. 80–83, 2013.

CREPPY, E. E. Update of Survey, Regulation and Toxic Effects of Mycotoxins in Europe. **Toxicology Letters**, v. 127, n. 1–3, p. 19–28, 2002.

D'SOUZA, D. H.; BRACKETT, R. E. The Role of Trace Metal Ions in Aflatoxin B1 Degradation by *Flavobacterium Aurantiacum*. **Journal of Food Protection**, v. 61, n. 12, p. 1666–1669, 1998.

D'SOUZA, D. H.; BRACKETT, R. E. The Influence of Divalent Cations and Chelators on Aflatoxin B1 Degradation by *Flavobacterium Aurantiacum*. **Journal of Food Protection**, v. 63, n. 1, p. 102–105, 2000.

DAS, C.; MISHRA, H. N. In Vitro Degradation of Aflatoxin by Horse Radish Peroxidase. **Food Chemistry**, v. 68, n. 4, p. 309–313, 2000.

DIAZ, G. J.; SÁNCHEZ, M. P. Determination of Aflatoxin M₁ in Breast Milk as a Biomarker of Maternal and Infant Exposure in Colombia. **Food Additives & Contaminants: Part A**, v. 49, n. May 2015, p. 150511035939005, 2015.

DIENER, U. L.; COLE, R. J.; SANDERS, T. H.; PAYNE, G. A.; LEE, L. S.; KLICH, M. A. Epidemiology of Aflatoxin Formation by *Aspergillus Flavus**. **Annual Review of Phytopathology**, v. 25, n. 1, p. 249–270, 1987.

DUA, A.; AWASTHI, V.; THAKUR, L.; BAHMAN, S.; SINGH, S.; GANGULY, S. Contaminants in Milk and Impact of Heating: An Assessment Study. **Indian Journal of Public Health**, v. 56, n. 1, p. 95, 2012.

EL KHOURY, A.; ATOUI, A.; YAGHI, J. Analysis of Aflatoxin M1 in Milk and Yogurt and AFM1 Reduction by Lactic Acid Bacteria Used in Lebanese Industry. **Food Control**, v. 22, n. 10, p. 1695–1699, 1 Oct. 2011.

FLORES-FLORES, M. E.; LIZARRAGA, E.; LÓPEZ DE CERAIN, A.; GONZÁLEZ-PEÑAS, E. Presence of Mycotoxins in Animal Milk: A Review. **Food Control**, v. 53, p. 163–176, 2015.

GHOLAMI-BORUJENI, F.; MAHVI, A. H.; NASERI, S.; FARAMARZI, M. A.; NABIZADEH, R.; ALIMOHAMMADI, M. Application of Immobilized Horseradish Peroxidase for Removal and Detoxification of Azo Dye from Aqueous Solution. **Research Journal of Chemistry and Environment**, v. 15, n. 2, p. 217–222, 2011.

GIOVATI, L.; MAGLIANI, W.; CIOCIOLA, T.; SANTINOLI, C.; CONTI, S.; POLONELLI, L. AFM1 in Milk: Physical, Biological, and Prophylactic Methods to Mitigate Contamination. **Toxins**, v. 7, n. 10, p. 4330–4349, 2015.

GONÇALVES, K. D. M.; SIBAJA, K. V. M.; FELTRIN, A. C. P.; REMEDI, R. D.; DE OLIVEIRA GARCIA, S.; 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. 260–264, 2018.

GOVARIS, A.; ROUSSI, V.; KOIDIS, P. A.; BOTSOGLOU, N. A. Distribution and Stability of Aflatoxin M1 during Processing, Ripening and Storage of Teleme Cheese. **Food Additives and Contaminants**, v. 18, n. 5, p. 437–443, 2001.

GUAN, S.; JI, C.; ZHOU, T.; LI, J.; MA, Q.; NIU, T. Aflatoxin B1 Degradation by *Stenotrophomonas Maltophilia* and Other Microbes Selected Using Coumarin Medium. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 9, n. 8, p. 1489–1503, 2008.

IKEHATA, K.; BUCHANAN, I. D.; PICKARD, M. A.; SMITH, D. W. Purification, Characterization and Evaluation of Extracellular Peroxidase from Two *Coprinus* Species for Aqueous Phenol Treatment. **Bioresource Technology**, v. 96, n. 16, p. 1758–1770, 1 Nov. 2005.

IARC. (2002). **IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. In Traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene**, v. 82. Lyon: IARC Press.

ISMAIL, A.; AKHTAR, S.; LEVIN, R. E.; ISMAIL, T.; RIAZ, M.; AMIR, M. Aflatoxin M1: Prevalence and Decontamination Strategies in Milk and Milk Products. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 42, n. 3, p. 418–427, 2016.

KOS, J.; LEVIĆ, J.; ĐURAGIĆ, O.; KOKIĆ, B.; MILADINOVIĆ, I. Occurrence and Estimation of Aflatoxin M1 Exposure in Milk in Serbia. **Food Control**, v. 38, p. 41–46, 2014.

KUMAR, R.; SINGH, K. A.; SINGH, V. K.; JAGANNADHAM, M. V. Biochemical Characterization of a Peroxidase Isolated from Caribbean Plant: *Euphorbia Cotinifolia*. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 6, p. 1350–1357, Jun. 2011.

KURADE, M. B.; WAGHMODE, T. R.; GOVINDWAR, S. P. Preferential Biodegradation of Structurally Dissimilar Dyes from a Mixture by *Brevibacillus Laterosporus*. **Journal of Hazardous Materials**, v. 192, n. 3, p. 1746–1755, 15 Sep. 2011.

KURTZMAN, C. P.; HORN, B. W.; HESSELTINE, C. W. *Aspergillus Nomius*, a New Aflatoxin-Producing Species Related to *Aspergillus Flavus* and *Aspergillus Tamaris*. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 53, n. 3, p. 147–158, 1987.

LEE, D.; LEE, K.-G. Analysis of Aflatoxin M1 and M2 in Commercial Dairy Products Using High-Performance Liquid Chromatography with a Fluorescence Detector. **Food Control**, v. 50, p. 467–471, 2015.

LEONTOPOULOS, D.; SIAFAKA, A.; MARKAKI, P. Black Olives as Substrate for *Aspergillus Parasiticus* Growth and Aflatoxin B1 Production. **Food Microbiology**, v. 20, n. 1, p. 119–126, 1 Feb. 2003.

MARIMÓN, K.; GARCIA, S. D. O.; CARLA, A.; FELTRIN, P.; REMEDI, R. D.; BARNES, M.; CERQUEIRA, R.; BADIALE-FURLONG, E.; GARDA-BUFFON, J. Aflatoxin Biotransformation by Commercial Peroxidase and Its Application in Contaminated Food. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 94, n. 4, p. 1187–1194, 2019.

MARIMÓN, K.; GONÇALVES, K.; GARCIA, S.; FELTRIN, A. C.; NOGUEIRA, W.; BADIALE-FURLONG, E.; GARDA-BUFFON, J. Aflatoxin M1 and B1 in Colombian Milk Powder: Occurrence and Estimative Risks Exposure. **Food Additives & Contaminants: Part B**, 2019.

MASOOD, M.; IQBAL, S. Z.; ASI, M. R.; MALIK, N. Natural Occurrence of Aflatoxins in Dry Fruits and Edible Nuts. **Food Control**, v. 55, p. 62–65, 2015.

MEDINA, A.; RODRIGUEZ, A.; MAGAN, N. Effect of Climate Change on *Aspergillus Flavus* and Aflatoxin B1 Production. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, p. 1–7, 2014.

NOUREN, S.; BHATTI, H. N. Mechanistic Study of Degradation of Basic Violet 3 by Citrus Limon Peroxidase and Phytotoxicity Assessment of Its Degradation Products. **Biochemical Engineering Journal**, v. 95, p. 9–19, 15 Mar. 2015.

PRELLE, A.; SPADARO, D.; GARIBALDI, A.; GULLINO, M. L. Co-Occurrence of Aflatoxins and Ochratoxin A in Spices Commercialized in Italy. **Food Control**, v. 39, n. 1, p. 192–197, 2014.

RAKSHA RAO, K.; VIPIN, A. V.; HARIPRASAD, P.; ANU APPAIAH, K. A.; VENKATESWARAN, G. Biological Detoxification of Aflatoxin B1 by *Bacillus Licheniformis* CFR1. **Food Control**, v. 71, p. 234–241, 2017.

SADEGHI, E.; ALMASI, A.; BOHLOLI-OSKOI, S.; MOHAMADI, M.; CONTROL, Q.; PROMOTION, H.; BRANCH, K. The Evaluation of Aflatoxin M1 Level in Collected Raw Milk for Pasteurized Dairy Factories of Kermanshah. **Zahedan Journal of Research in Medical Sciences Journal homepage**, v. 15, n. 3, p. 26–29, 2013.

SANTINI, A.; RAIOLA, A.; FERRANTELLI, V.; GIANROSSO, G.; MACALUSO, A.; BOGNANNO, M.; GALVANO, F.; RITIENI, A. Aflatoxin M1 in Raw, UHT Milk and Dairy Products in Sicily (Italy). **Food additives & contaminants. Part B, Surveillance**, v. 6, n. 3, p. 181–6, 2013.

SMAJLOVIC, A.; MUMINOVIC, M.; MUJEZINOVIC, I.; CUPIC, V. Investigation of Aflatoxin M1 Degradation in Milk. **Veterinarski glasnik**, v. 66, n. 5–6, p. 387–394, 2012.

UNUSAN, N. Occurrence of Aflatoxin M1 in UHT Milk in Turkey. **Food and Chemical Toxicology**, v. 44, p. 1897–1900, 2006.

WANG, Y.; LIU, X.; XIAO, C.; WANG, Z.; WANG, J.; XIAO, H.; CUI, L.; XIANG, Q.; YUE, T. HPLC Determination of Aflatoxin M1 in Liquid Milk and Milk Powder Using Solid Phase Extraction on OASIS HLB. **Food Control**, v. 28, n. 1, p. 131–134, 2012.

WILLIAMS, J. H.; PHILLIPS, T. D.; JOLLY, P. E.; STILES, J. K.; JOLLY, C. M.; AGGARWAL, D. Human Aflatoxin in Developing Countries: A Review of Toxicology, Exposure, Potential Health Consequences, and Interventions. **American Society for Clinical Nutrition**, v. 80, n. June 2015, p. 1106–1122, 2004.

YANIBADA, B.; BOUDRA, H.; DEBRAUWER, L.; MARTIN, C.; MORGAVI, D. P.; CANLET, C. Evaluation of Sample Preparation Methods for NMR-Based Metabolomics of Cow Milk. **Heliyon**, v. 4, n. 10, 2018.

ZHAO, L. H.; GUAN, S.; GAO, X.; MA, Q. G.; LEI, Y. P.; BAI, X. M.; JI, C. Preparation, Purification and Characteristics of an Aflatoxin Degradation Enzyme from *Myxococcus Fulvus* ANSM068. **Journal of Applied Microbiology**, v. 110, n. 1364–5072, p. 147–155, 2010.

CAPÍTULO IV

CONCLUSÃO GERAL

Nos últimos 15 anos, 3517 amostras de leite e 969 de derivados lácteos produzidos e comercializados em países da América Latina e Caribe, mostraram percentual de incidência para AFM1 e faixa de concentração de 66% e 0,001-23,10 $\mu\text{g L}^{-1}$ para o leite e 63% e 0,001-18,12 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para os derivados lácteos, respectivamente.

Das 51 amostras de leite em pó produzidas e comercializadas na Colômbia analisadas, 100% foram positivas para AFM1 (faixa de 0,20-1,19 $\mu\text{g kg}^{-1}$), enquanto AFB1 não foi detectada em nenhuma das amostras. A concentração de AFM1 em 55% das amostras foi superior ao LM para AFM1 no leite permitido pelo Regulamento Colombiano (0,5 $\mu\text{g kg}^{-1}$) e Comissão Europeia (0,05 $\mu\text{g kg}^{-1}$). Porém, nenhuma das amostras excedeu o LM para AFM1 em leite em pó recomendado pelo MERCOSUL (5,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$).

O sistema modelo padronizado para a mitigação de AFs mediante o uso de POD comercial em tampão fosfato (0,1 mol L^{-1}), alcançou mitigação de AFB1 (97%) quando condições que afetam o meio foram otimizadas, tais como: atividade enzimática (0,015 U), pH (7,0-8,0) e temperatura (30-40 °C). Os resultados demonstraram que os processos enzimáticos são uma abordagem viável para a mitigação de AFB1 em soluções aquosas.

A POD comercial demonstrou potencial para mitigação de AFM1 (55%) e AFB1 (87%) em leite cru, sem alterar significativamente ($p < 0,05$) as propriedades físico-químicas (proteínas, carboidratos, lipídeos e sólidos totais) do leite tratado.

CAPÍTULO V

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAR, M.; ANJUM, F. M.; BUTT, M. S.; PASHA, I.; RANDHAWA, M. A.; SAEED, F.; WAQAS, K. Aflatoxins: Biosynthesis, Occurrence, Toxicity, and Remedies. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 53, n. 8, p. 862–874, 2013.
- ADEBO, O. a; NJOBEH, P. B.; GBASHI, S.; NWINYI, O. C.; MAVUMENGWANA, V. Review on Microbial Degradation of Aflatoxins. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 1040–8398, n. November, p. 1549–7852, 2015.
- ALBERTS, J. F.; ENGELBRECHT, Y.; STEYN, P. S.; HOLZAPFEL, W. H.; VAN ZYL, W. H. Biological Degradation of Aflatoxin B1 by *Rhodococcus Erythropolis* Cultures. **International Journal of Food Microbiology**, v. 109, n. 1–2, p. 121–126, 2006.
- ALBERTS, J. F.; GELDERBLOM, W. C. A.; BOTHA, A.; ZYL, W. H. Van. Degradation of Aflatoxin B1 by Fungal Laccase Enzymes. **International Journal of Food Microbiology**, v. 135, p. 47–52, 2009a.
- ALBERTS, J. F.; GELDERBLOM, W. C. a; BOTHA, a.; VAN ZYL, W. H. Degradation of Aflatoxin B1 by Fungal Laccase Enzymes. **International Journal of Food Microbiology**, v. 135, n. 1, p. 47–52, 2009b.
- ALONSO, V. A.; MONGE, M. P.; LARRIESTRA, A.; DALCERO, A. M.; CAVAGLIERI, L. R.; CHIACCHIERA, S. M. Naturally Occurring Aflatoxin M1 in Raw Bulk Milk from Farm Cooling Tanks in Argentina. **Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment**, v. 27, n. 3, p. 373–379, 2010.
- AMANDA, P.; GARZA, Q. **Ocurrencia y estimación de la exposición humana a aflatoxina M1 en muestras de leche procedentes de Monterrey (México)**. 2014. 103 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidad Autonoma de Barcelona, Barcelona, 2014.
- ARAGÓN, S. **Determinación de la presencia de aflatoxina M1 por el método de Elisa en queso seco y oreado que se expende en 5 mercados municipales de la ciudad capital**. 2014. 95 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Engenharia de Alimentos) - Universidad de San Carlos de Guatemala, San Carlos, 2014.
- ARANGUREN, E. M.; ARGÜELLES, M. J. **Detección de Aflatoxina M1 en Quesos Frescos Comercializados en el Municipio de Yopal, Casanare, Mediante la Técnica de Elisa**. 2009. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Microbiologia Industrial) – Universidad Javeriana, Bogotá, 2009.
- ARISTIZÁBAL, J. C.; RESTREPO, M. T.; ESTRADA, A. Evaluación de la composición corporal de adultos sanos por antropometría e impedancia bioeléctrica. **Biomédica**, v. 27, p. 216–24, 2007.
- ASGHAR, M.A.; AHMED, A.; ASGHAR, M.A. Aflatoxin M1 in fresh milk collected from local markets of Karachi, Pakistan. **Food Additives and Contaminantes Part B**, v. 11, n. 3, p. 167–174, 2018.
- 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, p.1856-1858,

2011.

AZARIKIA, M.; MAHDAVI, R.; NIKNIAZ, L. Occurrence and Dietary Factors Associated with the Presence of Aflatoxin B1 and M1 in Breast Milk of Nursing Mothers in Iran. **Food Control**, v. 86, p. 207–213, 2018

BALL, R. W.; COULOMBE, R. A. Comparative Biotransformation of Aflatoxin-B1 in Mammalian Airway Epithelium. **Carcinogenesis**, v. 12, n. 2, p. 305–310, 1991.

ALBERTS, J. F.; GELDERBLOM, W. C. A.; BOTHA, A.; ZYL, W. H. Van. Degradation of Aflatoxin B1 by Fungal Laccase Enzymes. **International Journal of Food Microbiology**, v. 135, p. 47–52, 2009a.

ALBERTS, J. F.; GELDERBLOM, W. C. a; BOTHA, a.; VAN ZYL, W. H. Degradation of Aflatoxin B1 by Fungal Laccase Enzymes. **International Journal of Food Microbiology**, v. 135, n. 1, p. 47–52, 2009b.

ALONSO, V. A.; MONGE, M. P.; LARRIESTRA, A.; DALCERO, A. M.; CAVAGLIERI, L. R.; CHIACCHIERA, S. M. Naturally Occurring Aflatoxin M1 in Raw Bulk Milk from Farm Cooling Tanks in Argentina. **Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment**, v. 27, n. 3, p. 373–379, 2010.

AMANDA, P.; GARZA, Q. **Ocurrencia y estimación de la exposición humana a aflatoxina M1 en muestras de leche procedentes de Monterrey (México)**. 2014. 103 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidad Autonoma de Barcelona, Barcelona, 2014.

ARAGÓN, S. **Determinación de la presencia de aflatoxina M1 por el método de Elisa en queso seco y oreado que se expende en 5 mercados municipales de la ciudad capital**. 2014. 95 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Engenharia de Alimentos) - Universidad de San Carlos de Guatemala, San Carlos, 2014.

ARANGUREN, E. M.; ARGÜELLES, M. J. **Detección de Aflatoxina M1 en Quesos Frescos Comercializados en el Municipio de Yopal, Casanare, Mediante la Técnica de Elisa**. 2009. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Microbiologia Industrial) – Universidad Javeriana, Bogotá, 2009.

ARISTIZÁBAL, J. C.; RESTREPO, M. T.; ESTRADA, A. Evaluación de la composición corporal de adultos sanos por antropometría e impedancia bioeléctrica. **Biomédica**, v. 27, p. 216–24, 2007.

ASGHAR, M.A.; AHMED, A.; ASGHAR, M.A. Aflatoxin M1 in fresh milk collected from local markets of Karachi, Pakistan. **Food Additives and Contaminantes Part B**, v. 11, n. 3, p. 167–174, 2018.

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, p.1856-1858, 2011.

AZARIKIA, M.; MAHDAVI, R.; NIKNIAZ, L. Occurrence and Dietary Factors Associated with the Presence of Aflatoxin B1 and M1 in Breast Milk of Nursing Mothers in Iran. **Food Control**, v. 86, p. 207–213, 2018.

BALL, R. W.; COULOMBE, R. A. Comparative Biotransformation of Aflatoxin-B1 in Mammalian Airway Epithelium. **Carcinogenesis**, v. 12, n. 2, p. 305–310, 1991.

BATTACONE, G.; NUDDA, A.; CANNAS, A.; BORLINO, A. C.; BOMBOI, G.; PULINA, G. Excretion of Aflatoxin M1 in Milk of Dairy Ewes Treated with Different Doses of Aflatoxin B1. **Journal of Dairy Science**, v. 86, n. 8, p. 2667–2675, 1 Aug. 2003.

BECKER-ALGERI, T. A.; CASTAGNARO, D.; BORTOLI, K. De; SOUZA, C. De; DRUNKLER, D. A. Mycotoxins in bovine milk and dairy products : A Review. **Journal of Food Science**, v. 81, n. 3, p. 544–552, 2016.

BELTRÁN, E.; IBÁÑEZ, M.; SANCHO, J. V.; CORTÉS, M. Á.; YUSÀ, V.; HERNÁNDEZ, F. UHPLC–MS/MS Highly sensitive determination of aflatoxins, the aflatoxin metabolite M1 and ochratoxina in baby food and milk. **Food Chemistry**, v. 126, n. 2, p. 737–744, 2011.

BERMUDEZ, R. **Determinación de la presencia de aflatoxina M1 en leche cruda proveniente de explotaciones lecheras asociadas a COOPROLECHE en la región de la costa sur de Guatemala**. 2011.134 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Medicina Veterinaria y Zootecnia) - Universidad de San Carlos de Guatemala, San Carlos, 2011.

BHAT, R.; RAI, R. V.; KARIM, A. A. Mycotoxins in Food and Feed: Present Status and Future Concerns. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 9, n. 1, p. 57–81, 2010.

BHATNAGAR-MATHUR, P.; SUNKARA, S.; BHATNAGAR-PANWAR, M.; WALIYAR, F.; SHARMA, K. K. Biotechnological Advances for Combating Aspergillus Flavus and Aflatoxin Contamination in Crops. **Plant Science**, v. 234, p. 119–132, 2015.

BRAR, M.; ANJUM, F. M.; BUTT, M. S.; PASHA, I.; RANDHAWA, M. A.; SAEED, F.; WAQAS, K. Aflatoxins: Biosynthesis, Occurrence, Toxicity, and Remedies. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 53, n. 8, p. 862–874, 2013.

BRYDEN, W. L. Mycotoxin Contamination of the Feed Supply Chain: Implications for Animal Productivity and Feed Security. **Animal Feed Science and Technology**, v. 173, n. 1–2, p. 134–158, 20 Apr. 2012.

CAI, F.; OUYANG, C.; DUAN, P.; GAO, S.; XU, Y.; CHEN, F. Purification and Characterization of a Novel Thermal Stable Peroxidase from Jatropha Curcas Leaves. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 77, p. 59–66, 2012.

CALDAS, S.S.; BOLZAN, C.M.; CERQUEIRA, M.B.; TOMASINI, D.; FURLONG, E.B.; FAGUNDES, C.; PRIMEL, E.G. Evaluation of a Modified QuEChERS Extraction of Multiple Classes of Pesticides from a Rice Paddy Soil by LC-APCI-MS/MS. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n.22, p. 11918–11926, 2011.

CANO-SANCHO, G.; MARIN, S.; RAMOS, A. J.; PERIS-VICENTE, J.; SANCHIS, V. Incidencia de Aflatoxina M1 y Evaluación de La Exposición En Cataluña (España). **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 27, n. 3, p. 130–135, 2010.

CAPDEVILLE, M.; BUDZINSKI, H. Trace-level analysis of organic contaminants in drinking waters and groundwaters. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 30, n. 4, p. 586-606, 2011.

CAPRIOTTI, A.L.; CARUSO, G.; CAVALIERE, C.; FOGLIA, P.; SAMPERI, R.; LAGANÀ, A. Multiclass Mycotoxin Analysis in Food, Environmental and Biological Matrices with Chromatography/mass Spectrometry. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 31, n. 4, p. 466–503, Jul. 2012.

CARRARO, A.; DE GIACOMO, A.; GIANNOSSI, M. L.; MEDICI, L.; MUSCARELLA, M.; PALAZZO, L.; QUARANTA, V.; SUMMA, V.; TATEO, F. Clay Minerals as Adsorbents of Aflatoxin M1 from Contaminated Milk and Effects on Milk Quality. **Applied Clay Science**, v. 88–89, p. 92–99, 2014.

CASTANHEIRA A.; NEVES K. BR. **Quality**. A importância da temperatura no armazenamento do leite. Disponível em: <https://brqualityconsultoria.com.br/a-importancia-da-temperatura-no-armazenamento-do-leite/>. Acesso em Janeiro 2018.

CHAVARRÍA, G.; GRANADOS-CHINCHILLA, F.; ALFARO-CASCANTE, M.; MOLIN, A. Detection of aflatoxin M1 in milk, cheese and sour cream samples from Costa Rica using enzyme-assisted extraction and HPLC. **Food Additives and Contaminates Part B**, v. 8, n. 2, p. 128–135, 2015. 586-606, 2015.

CIAT – MADR. Logros y retos de la agricultura colombiana frente al cambio climático. 20115. Disponível em: <https://www.minagricultura.gov.co/noticias/Paginas/Foro-cambio-clim%C3%A1tico.aspx>. Acesso em Março 2018.

CLAEYS, W. L.; CARDOEN, S.; DAUBE, G.; DE BLOCK, J.; DEWETTINCK, K.; DIERICK, K.; DE ZUTTER, L.; HUYGHEBAERT, A.; IMBERECHTS, H.; THIANGE, P.; VANDENPLAS, Y.; HERMAN, L. Raw or Heated Cow Milk Consumption: Review of Risks and Benefits. **Food Control**, v. 31, n. 1, p. 251–262, 2013.

Codex Alimentarius Commissions. (2001). Comments submitted on the draft maximum level for aflatoxin M1 in milk. Hauge, The Netherlands: Codex Committee on Food Additives and Contaminants, 33rd sessions.

COFFEY, R.; CUMMINS, E.; WARD, S. Exposure assessment of mycotoxins in dairy milk. **Food Control**, v. 20, p. 239-249, 2009.

COLE, R. J.; KIRKSEY, J. W.; BLANKENSHIP, B. R. Conversion of Aflatoxin B1 to Isomeric Hydroxy Compounds by *Rhizopus* Spp. **J. Agric. Food Chem.**, v. 20, n. 6, p. 1100–1102, 1972.

COMBITA, A. del pilar; MILDENBERG, S. **Detección de aflatoxina M1 en leches frescas comercializadas en la zona del valle del cauca (Colombia) mediante la técnica de Elisa**. 2009. 78 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Medicina Veterinária) - Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, 2009.

CORASSIN, C. H.; BOVO, F.; ROSIM, R. E.; OLIVEIRA, C. a. F. Efficiency of *Saccharomyces Cerevisiae* and Lactic Acid Bacteria Strains to Bind Aflatoxin M1 in UHT Skim Milk. **Food Control**, v. 31, n. 1, p. 80–83, 2013.

COULOMBE, R.A. Biological Action of Mycotoxins. **Journal of dairy science**, v. 76, n. 3, p. 880–91, 1993.

CREPPY, E. E. Update of Survey, Regulation and Toxic Effects of Mycotoxins in Europe. **Toxicology Letters**, v. 127, n. 1–3, p. 19–28, 2002.

D'SOUZA, D. H.; BRACKETT, R. E. The Influence of Divalent Cations and Chelators on Aflatoxin B1 Degradation by *Flavobacterium Aurantiacum*. **Journal of Food Protection**, v. 63, n. 1, p. 102–105, 2000.

DAS, C.; MISHRA, H. N. In Vitro Degradation of Aflatoxin B1 in Groundnut (*Arachis Hypogaea*) Meal by Horse Radish Peroxidase. **LebensmWiss Technol**, v. 33, n. 4, p. 308–312, 2000a.

DAS, C.; MISHRA, H. N. In Vitro Degradation of Aflatoxin by Horse Radish Peroxidase. **Food Chemistry**, v. 68, n. 4, p. 309–313, 2000b.

DIAZ, G. J.; ESPITIA, E. Occurrence of aflatoxin M1 in retail milk samples from Bogotá, Colombia. **Food Additives and Contaminants**, v. 23, n. 8, p. 811–815, 2006.

DIAZ, G. J.; SÁNCHEZ, M. P. Determination of Aflatoxin M₁ in breast milk as a biomarker of maternal and infant exposure in Colombia. **Food Additives & Contaminants: Part A**, v. 49, p.37–41, 2015.

DIAZ, G. J.; SÁNCHEZ, M. P. Determination of Aflatoxin M₁ in Breast Milk as a Biomarker of Maternal and Infant Exposure in Colombia. **Food Additives & Contaminants: Part A**, v. 49, n. May 2015, p. 150511035939005, 2015.

DIENER, U. L.; COLE, R. J.; SANDERS, T. H.; PAYNE, G. A.; LEE, L. S.; KLICH, M. A. Epidemiology of Aflatoxin Formation by *Aspergillus Flavus**. **Annual Review of Phytopathology**, v. 25, n. 1, p. 249–270, 1987.

DILKIN, P.; MALLMANN, C. A.; SANTURIO, J. M.; HICKMANN, J. L. Classificação Macroscópica, Identificação ea Microbiota Fúngica e Produção de Aflatoxinas em Híbridos de Milho. **Ciência Rural**, v. 30, n. 1, p. 137–141, 2000.

DOYLE, M. P.; MARTH, E. H. Aflatoxin Is Degraded at Different Temperatures and pH Values by Mycelia of *Aspergillus Parasiticus*. **European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 6, n. 1, p. 95–100, 1978c.

DOYLE, M. P.; MARTH, E. H. Aflatoxin Is Degraded by Fragmented and Intact Mycelia of *Aspergillus Parasiticus* Grown 5 to 18 Days with and without Agitation. **Journal of Food Protection**, v. 41, n. 7, p. 549–555, 1978b.

DOYLE, M. P.; MARTH, E. H. Aflatoxin Is Degraded by Heated and Unheated Mycelia, Filtrates of Homogenized Mycelia and Filtrates of Broth Cultures of *Aspergillus Parasiticus*. **Mycopathologia**, v. 64, n. 1, p. 59–62, 1978d.

DOYLE, M. P.; MARTH, E. H. Degradation of Aflatoxin by Lactoperoxidase. **Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung**, v. 166, n. 5, p. 271–273, 1978a.

DOYLE, M. P.; MARTH, E. H. Peroxidase Activity in Mycelia of *Aspergillus Parasiticus*.

European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology, v. 7, p. 211–217, 1979.

DUA, A.; AWASTHI, V.; THAKUR, L.; BAHMAN, S.; SINGH, S.; GANGULY, S. Contaminants in Milk and Impact of Heating: An Assessment Study. **Indian Journal of Public Health**, v. 56, n. 1, p. 95, 2012.

ECONOMOU, A.; BOTITSI, H.; ANTONIOU, S.; TSIPI, D. Determination of multi-class pesticides in wines by solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, n. 31, p. 5856-5867, 2009.

EL KHOURY, A.; ATOUI, A.; YAGHI, J. Analysis of Aflatoxin M1 in Milk and Yogurt and AFM1 Reduction by Lactic Acid Bacteria Used in Lebanese Industry. **Food Control**, v. 22, n. 10, p. 1695–1699, 1 Oct. 2011.

ELZUPIR, A.O; ELHUSSEIN, A.M. Determination of aflatoxin M1 in dairy cattle milk in Khartoum State, Sudan. **Food Control**, v. 21, p. 945–946, 2010.

ESQUIVEL, A.; LLANOS-HERRERA, L.; AGUDELO, D.; PRAGER, S.D.; FERNANDES, K.; ROJAS, A.; VALENCIA, J.J.; RAMIREZ-VILLEGAS J. 2018. Predictability of seasonal precipitation across major crop growing areas in Colombia. *Clim Serv.* Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2405880718300177#bb0035>. Acesso em Abril 2018.

European Commission. 2006a. Commission regulation 2006/1881/EC of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. *Off. J. Eur. Union.* 2006, L364, 25.

European Commission. 2006b. Commission regulation 401/2006/EC of 23 February 2006 Laying Down the Methods of Sampling and Analysis for the Official Control of the Levels of Mycotoxins in Foodstuffs. *Off. J. Eur. Union.* 2006, L70,12.

FALETTTO, M.B.; KOSER, P.L.; BATTULA, N; TOWNSEND, G.K., MACCUBBIN, A.E., GELBION, H.V. Cytochrome P3-450 cDNA encodes aflatoxin B1 hydroxylase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 263, p. 12187-12189, 1988.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Gateway to dairy production and products. **Dairy production and products: Products.** Disponível em: <http://www.fao.org/dairy-production-products/products/en/>. Acesso em Abril 2018.

FEDEGAN. **Consumo | Fedegan.** Disponível em: <http://www.fedegan.org.co/estadisticas/consumo-0>. Acesso em Novembro 2017a.

FEDEGAN. **Producción | Fedegan.** Disponível em: <http://www.fedegan.org.co/estadisticas/produccion-0>. Acesso em Novembro 2018b.

FELTRIN, A. C. P.; GARCIA, S. D. O.; CALDAS, S. S.; PRIMEL, E. G.; BADIALE-FURLONG, E.; GARDA-BUFFON, J. Characterization and Application of the Enzyme Peroxidase to the Degradation of the Mycotoxin DON. **Journal of Environmental Science and Health, Part B**, v. 1234, n. September, p. 1–7, 2017.

FETAIH, H. A.; DESSOUKI, A. A.; HASSANIN, A. A. I.; TAHAN, A. S. Toxopathological and Cytogenetic Effects of Aflatoxin B1 (AFB1) on Pregnant Rats. **Pathology Research and Practice**, v. 210, n. 12, p. 1079–1089, 2014.

FINK-GREMMELS, J. Mycotoxins in Cattle Feeds and Carry-over to Dairy Milk. **Food Additives and Contaminants**, v. 25, n. 2, p. 172–180, 2008a.

FINK-GREMMELS, J. The Role of Mycotoxins in the Health and Performance of Dairy Cows. **The Veterinary Journal**, v. 176, n. 1, p. 84–92, 2008b.

FLORES-FLORES, M. E.; LIZARRAGA, E.; LÓPEZ DE CERAIN, A.; GONZÁLEZ-PEÑAS, E. Presence of Mycotoxins in Animal Milk: A Review. **Food Control**, v. 53, p. 163–176, 2015.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. Gateway to dairy production and products: Dairy animals. Disponível em: <<http://www.fao.org/dairy-production-products/production/dairy-animals/en/>>. Acesso em Março 2018.

FRAGOSO, E.; DAVID, T.; ROMERO, S.; OSPINO, H. Determination of aflatoxin M1 in raw milk by HPLC marker as evidence of cattle- food storage conditions from the herd suppliers of a dairy company in the city of Valledupar. Disponível em: <https://pdfs.semanticscholar.org/ce69/a8b36bc9a2e9868c152a2f9d011f43a097af.pdf>. Acesso em Novembro 2017.

FRISVAD, J.C., 1995. Mycotoxins and mycotoxigenic fungi in storage. In: Jayas, D.S., White, N.D.G., Muir, W.E. (Eds.), *Stored-Grain Ecosystems*. Marcel Dekker, Inc, New York, pp. 251–288.

GARCÍA LONDOÑO, V. A.; BOASSO, A. C.; Z. DE PAULA, M. C.; GARCIA, L. P.; SCUSSEL, V. M.; RESNIK, S.; PACÍN, A. Aflatoxin M1 survey on randomly collected milk powder commercialized in Argentina and Brazil. **Food Control**, v. 34, n. 2, p. 752–755, 2013.

GARCÍA LONDOÑO, V. A.; BOASSO, A. C.; Z. DE PAULA, M. C.; GARCIA, L. P.;

GARCIA, S. O.; FELTRIN, A. C. P.; GARDA-BUFFON, J.; GARCIA, S. O.; FELTRIN, A. C. P.; GARDA-BUFFON, J. Zearalenone Reduction by Commercial Peroxidase Enzyme and Peroxidases from Soybean Bran and Rice Bran. v. 35, n. 9, p. 1819–1831, 2018.

GHANEM, I.; ORFI, M. Aflatoxin M1 in raw, pasteurized and powdered milk available in the Syrian market. **Food Control**, v. 20, n. 6, p. 603–605, 2009.

GHOLAMI-BORUJENI, F.; MAHVI, A. H.; NASERI, S.; FARAMARZI, M. A.; NABIZADEH, R.; ALIMOHAMMADI, M. Application of Immobilized Horseradish Peroxidase for Removal and Detoxification of Azo Dye from Aqueous Solution. **Research Journal of Chemistry and Environment**, v. 15, n. 2, p. 217–222, 2011.

GIOVATI, L.; MAGLIANI, W.; CIOCIOLA, T.; SANTINOLI, C.; CONTI, S.; POLONELLI, L. AFM1 in Milk: Physical, Biological, and Prophylactic Methods to Mitigate Contamination. **Toxins**, v. 7, n. 10, p. 4330–4349, 2015.

GONÇALVES, K. D. M.; MARIMON, K. V. M.; FELTRIN, A. C. P.; REMEDI, R. D.; DE OLIVEIRA GARCIA, S.; 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. 260–264, 2018.

- GONÇALVES, L.; DALLA ROSA, A.; GONZALES, S.; FELTES, M. M.; BADIALE-FURLONG, E.; DORS, G. C. Incidence of Aflatoxin M1 in Fresh Milk from Small Farms. **Food Science and Technology**, v. 37, n. spe, p. 11–15, 2017.
- GONZÁLEZ, E.; FELICIO, M. .; ROSSI, M, H.; NOGUEITA, J. H. .; MANGINELLI, S. Ocorrência de Aflatoxina M1 em Leite Comercializado em Alguns Municípios do Estado de São Paulo. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 72, n. 4, p. 435–438, 2005.
- GOURAMA, H. Inhibition of Growth and Mycotoxin Production of *Penicillium* By *Lactobacillus* Species. **Food Science & Technology-Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie**, v. 30, n. 3, p. 279–283, 1997.
- GOVARIS, A.; ROUSSI, V.; KOIDIS, P. A.; BOTSOGLOU, N. A. Distribution and Stability of Aflatoxin M1 during Processing, Ripening and Storage of Teleme Cheese. **Food Additives and Contaminants**, v. 18, n. 5, p. 437–443, 2001.
- GRENIER, B.; BRACARENSE, A. P. F. L.; SCHWARTZ, H. E.; TRUMEL, C.; COSSALTER, A. M.; SCHATZMAYR, G.; KOLF-CLAUW, M.; MOLL, W. D.; OSWALD, I. P. The Low Intestinal and Hepatic Toxicity of Hydrolyzed Fumonisin B1 Correlates with Its Inability to Alter the Metabolism of Sphingolipids. **Biochemical Pharmacology**, v. 83, n. 10, p. 1465–1473, 2012.
- GUAN, S.; JI, C.; ZHOU, T.; LI, J.; MA, Q.; NIU, T. Aflatoxin B 1 Degradation by *Stenotrophomonas maltophilia* and Other Microbes Selected Using Coumarin Medium. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 9, n. 8, p. 1489–1503, 2008.
- HAMID, A. Bin; SMITH, J. E. Degradation of Aflatoxin by *Aspergillus Flavus*. **Journal of General Microbiology**, v. 4, n. 133, p. 2023–2029, 1987.
- HASSAN, Z.U.; THANI, R.A.; ATIA, F.A.; MEER, S.A.; MIGHELI, Q.; JAOUA, S. Co-occurrence of mycotoxins in commercial formula milk and cerealbased baby food on the Qatar market, **Food Additives and Contaminants Part B**. 11(3):191-197, 2018.
- HERNÁNDEZ, J.; ABADÍA, B.; MORENO, J. Determinación de Aflatoxina M1 En Leche Proveniente Del Caribe Colombiano, Empleando Cromatografía Líquida de Ultra Resolución. **Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias**, v. 22, n. 3, p. 430–437, 2009.
- HERZALLAH, S.M. Determination of aflatoxins in eggs, milk, meat and meat products using HPLC fluorescent and UV detectors. **Food Chemistry**, v. 114, p. 1141–1146, 2009.
- HOYOS OSSA, D. E.; HINCAPIÉ, D. A.; PEÑUELA, G. A. Determination of Aflatoxin M1 in Ice Cream Samples Using Immunoaffinity Columns and Ultra-High Performance Liquid Chromatography Coupled to Tandem Mass Spectrometry. **Food Control**, v. 56, p. 34–40, 2015.
- HUSSEIN, H.S; BRASEL, J.M. Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. **Toxicology**, v, 167, p, 101–134, 2001.
- HUYNH, V. L.; GERDES, R. G.; LLOYD, A. B. Synthesis and Degradation of Aflatoxins by *Aspergillus Parasiticus*. II. Comparative Toxicity and Mutagenicity of Aflatoxin B1 and Its Autolytic Breakdown Products. **Australian Journal of Biological Sciences**, v. 37, n. 3, p. 123–129, 1984.

IALIMENTOS. Colombia, cuarto país con mayor consumo de leche - IAlimentos, 2018. Disponível em: <https://revistaialimentos.com/ediciones/ed-61-oportunidades-sector-lacteo/colombia-cuarto-pais-con-mayor-consumo-de-leche>. Acesso em Janeiro 2018.

IARC. (2002). **IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. In Traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene**, v. 82. Lyon: IARC Press.

IBGE. **Indicadores IBGE**. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE, p. 14–49, 2018. Disponível em: ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Pecuaria/Fasciculo_IHA, M. H.; BARBOSA, C. B.; OKADA, I. A.; TRUCKSESS, M. W. Aflatoxin M1 in Milk and Distribution and Stability of Aflatoxin M1 during Production and Storage of Yoghurt and Cheese. **Food Control**, v. 29, n. 1, p. 1–6, 2013.

IHA, M. H.; BARBOSA, C. B.; OKADA, I. A.; TRUCKSESS, M. W. Aflatoxin M1 in Milk and Distribution and Stability of Aflatoxin M1 during Production and Storage of Yoghurt and Cheese. **Food Control**, v. 29, n. 1, p. 1–6, 2013.

IIZUMI, T.; LUO, J.; CHALLINOR, A.; SAKURAI, G.; YOKOZAWA, M.; SAKUMA, H.; BROWN, M.; YAMAGATA, T. Impacts of El Niño Southern oscillation on the global yields of major crops. **Nat Commun** 5, v. 3712, p. 1-7, 2014.

IKEHATA, K.; BUCHANAN, I. D.; PICKARD, M. A.; SMITH, D. W. Purification, Characterization and Evaluation of Extracellular Peroxidase from Two Coprinus Species for Aqueous Phenol Treatment. **Bioresource Technology**, v. 96, n. 16, p. 1758–1770, 1 Nov. 2005.

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.

IQBAL, S. Z.; JINAP, S.; PIROUZ, A. A.; FAIZAL, A. R. A. Aflatoxin M1 in Milk and Dairy Products, Occurrence and Recent Challenges: A Review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 46, p. 110–119, 2015.

ISMAIL, A.; AKHTAR, S.; LEVIN, R. E.; ISMAIL, T.; RIAZ, M.; AMIR, M. Aflatoxin M1: Prevalence and Decontamination Strategies in Milk and Milk Products. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 42, n. 3, p. 418–427, 2016.

JECFA. **Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives**. Disponível em: <http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v47je02.htm>. Acesso em: 16 apr. 2018.

KAN, C. A. Transfer of Toxic Substances from Feed to Food. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 38, n. SUPPL. 1, p. 423–431, 2009.

KOS, J.; LEVIĆ, J.; ĐURAGIĆ, O.; KOKIĆ, B.; MILADINOVIĆ, I. Occurrence and Estimation of Aflatoxin M1 Exposure in Milk in Serbia. **Food Control**, v. 38, p. 41–46, 2014.

KUMAR, R.; SINGH, K. A.; SINGH, V. K.; JAGANNADHAM, M. V. Biochemical Characterization of a Peroxidase Isolated from Caribbean Plant: Euphorbia Cotinifolia. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 6, p. 1350–1357, Jun. 2011.

KURADE, M. B.; WAGHMODE, T. R.; GOVINDWAR, S. P. Preferential Biodegradation of Structurally Dissimilar Dyes from a Mixture by *Brevibacillus Laterosporus*. **Journal of Hazardous Materials**, v. 192, n. 3, p. 1746–1755, 15 Sep. 2011.

KURTZMAN, C. P.; HORN, B. W.; HESSELTINE, C. W. *Aspergillus Nomius*, a New Aflatoxin-Producing Species Related to *Aspergillus Flavus* and *Aspergillus Tamaris*. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 53, n. 3, p. 147–158, 1987.

KUSUMANINGTYAS, E.; WIDIASTUTI, R.; MARYAM, R. Reduction of Aflatoxin B1 in Chicken Feed by Using *Saccharomyces Cerevisiae*, *Rhizopus Oligosporus* and Their Combination. **Mycopathologia**, v. 162, n. 4, p. 307–311, 2006.

LANDEROS, P.; NOA, M.; LÓPEZ, Y.; GONZÁLEZ, D. G.; NOA, E.; REAL, M.; JUÁREZ, C.; MEDINA, M. S. Niveles de Aflatoxina M1 En Leche Cruda y Pasteurizada Comercializada en ea Zona Metropolitana de Guadalajara, México Aflatoxin M1 Levels in Raw and Pasteurized Milk Produced in Guadalajara, Mexico. **Rev. Salud Anim**, v. 34, n. 1, p. 40–45, 2012.

LAPALIKAR, G. V.; TAYLOR, M. C.; WARDEN, A. C.; SCOTT, C.; RUSSELL, R. J.; OAKESHOTT, J. G. F 420H 2-Dependent Degradation of Aflatoxin and Other Furanocoumarins Is Widespread throughout the Actinomycetales. **PLoS ONE**, v. 7, n. 2, 2012.

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.

LEE, D.; LEE, K.-G. Analysis of Aflatoxin M1 and M2 in Commercial Dairy Products Using High-Performance Liquid Chromatography with a Fluorescence Detector. **Food Control**, v. 50, p. 467–471, 2015.

LEONTOPOULOS, D.; SIAFAKA, A.; MARKAKI, P. Black Olives as Substrate for *Aspergillus Parasiticus* Growth and Aflatoxin B1 Production. **Food Microbiology**, v. 20, n. 1, p. 119–126, 1 Feb. 2003.

LÓPEZ, C. E.; RAMOS, L. .; RAMADÁN, S. S.; BULACIO, L. C. Presence of Aflatoxin M1 in Milk for Human Consumption in Argentina. **Food Control**, v. 14, p. 31–34, 2003.

MARIMÓN, K.; GARCIA, S. D. O.; CARLA, A.; FELTRIN, P.; REMEDI, R. D.; BARNES, M.; CERQUEIRA, R.; BADIALE-FURLONG, E.; GARDA-BUFFON, J. Aflatoxin Biotransformation by Commercial Peroxidase and Its Application in Contaminated Food. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 94, n. 4, p. 1187–1194, 2019.

MARIMÓN, K.; GONÇALVES, K.; GARCIA, S.; FELTRIN, A. C.; NOGUEIRA, W.; BADIALE-FURLONG, E.; GARDA-BUFFON, J. Aflatoxin M1 and B1 in Colombian Milk Powder: Occurrence and Estimative Risks Exposure. **Food Additives & Contaminants: Part B**, 2019.

MARTÍNEZ, M.M.; VARGAS del RÍO, L.M.; GÓMEZ, V.M. Aflatoxinas: incidencia, impactos en la salud, control y prevención. **Biosalud**, v. 12 n. 2, p. 89-109, 2013.

MASOERO, F.; GALLO, A.; MOSCHINI, M.; PIVA, G.; DIAZ, D. Carryover of Aflatoxin from Feed to Milk in Dairy Cows with Low or High Somatic Cell Counts. **Animal**, v. 9, n. 1, p. 1344–1350, 2007.

MASOOD, M.; IQBAL, S. Z.; ASI, M. R.; MALIK, N. Natural Occurrence of Aflatoxins in Dry Fruits and Edible Nuts. **Food Control**, v. 55, p. 62–65, 2015.

MATUSZEWSKI, B.; CONSTANZER, M.; CHAVEZ-ENG, C. Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC–MS/MS. **Analytical Chemistry**, v. 75, n. 13, p. 3019–3030, 2003.

MEDINA, A.; RODRIGUEZ, A.; MAGAN, N. Effect of Climate Change on *Aspergillus Flavus* and Aflatoxin B1 Production. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, p. 1–7, 2014.

MERCOSUR. MERCOSUL\GMC\RES Nº 56/94. Disponível em: <<https://sogi8.sogi.com.br/Arquivo/Modulo113.MRID109/Registro28781/mercosul-gmc-res-nº56-94.pdf>>. Acesso em Abril. 2018.

MICHLIG, N.; SIGNORINI, M.; GAGGIOTTI, M.; CHIERICATTI, C.; BASÍLICO, J. C.; REPETTI, M. R.; BELDOMENICO, H. R. Risk Factors Associated with the Presence of Aflatoxin M1 in Raw Bulk Milk from Argentina. **Food Control**, v. 64, p. 151–156, 2016.

MINSALUD. RESOLUCIÓN NÚMERO 4506 DE 2013. Disponível em: <<https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/DE/DIJ/resolucion-4506-de-2013.pdf>>. Acesso em Abril 2018.

MOHAMMED, S.; MUNISSI, J.J.; NYANDORO, S.S. Aflatoxin M1 in raw milk and aflatoxin B1 in feed from household cows in Singida, Tanzania. **Food Additives and Contaminants Part B**, v. 9, n. 2, p. 85–90, 2016.

MOTOMURA, M.; TOYOMASU, T.; MIZUNO, K.; SHINOZAWA, T. Purification and Characterization of an Aflatoxin Degradation Enzyme from *Pleurotus Ostreatus*. **Microbiological research**, v. 158, n. 3, p. 237–242, 2003.

NAKAZATO, M.; MOROZUMI, S.; SAITO, K.; FUJINUMA, K.; NISHIMA, T.; KASAI, N. Interconversion of Aflatoxin B1 and Aflatoxicol by Several Fungi. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, n. 5, p. 1465–1470, 1990.

NORA, N. (FURG). **Redução dos níveis de Ocratoxina A por ação enzimática.pdf**. 2015. 165 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciencia de Alimentos). Escola de Química e Alimentos. Universidade Federal de Rio Grande. Rio Grande, 2015.

NOUREN, S.; BHATTI, H. N. Mechanistic Study of Degradation of Basic Violet 3 by Citrus Limon Peroxidase and Phytotoxicity Assessment of Its Degradation Products. **Biochemical Engineering Journal**, v. 95, p. 9–19, 15 Mar. 2015.

OBREMSKI, K.; ZIELONKA, L.; GAJECKA, M.; JAKIMIUK, E.; GAJECKI, M. Mycotoxins - dairy cattle breeding problem. A case report. **Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy**, v. 53, p. 221–224, 2009.

OLIVEIRA, C. P. De; SOARES, N. D. F. F.; OLIVEIRA, T. V. De; BAFFA JÚNIOR, J. C.; SILVA, W. A. Da. Aflatoxin M1 Occurrence in Ultra High Temperature (UHT) Treated Fluid Milk from Minas Gerais/Brazil. **Food Control**, v. 30, n. 1, p. 90–92, 2013.

OPLATOWSKA-STACHOWIAK, M.; SAJIC, N.; XU, Y.; HAUGHEY, S. A.; MOONEY, M. H.; GONG, Y. Y.; VERHEIJEN, R.; ELLIOTT, C. T. Fast and Sensitive Aflatoxin B1 and Total Aflatoxins ELISAs for Analysis of Peanuts, Maize and Feed Ingredients. **Food Control**, v. 63, p. 239–245, 1 May 2016.

ORGANIZACIÓN DE LAS NACIONES UNIDAS PARA LA ALIMENTACIÓN Y LA AGRICULTURA & FEDERACIÓN PANAMERICANA DE LECHERIA. Informe producido en el ámbito del Observatorio de la cadena láctea de América Latina y el Caribe. Disponível em: <http://www.fao.org/fileadmin/templates/est/COMM_MARKETS_MONITORING/Dairy/Documents/Paper_Lechería_AmLatina_2011.pdf>. Acesso em Abril 2018.

ORTIZ MARTINEZ, R.; VALDIVIA FLORES, A. G.; DE LUNA LOPEZ, M.; QUEZADA TRISTAN, T.; MIRANDA CASTAÑEDA, C. A.; RANGEL MUÑOZ, E. J.; CRUZ VAZQUEZ, C. Occurrence of Aflatoxins in Milk since Dairy Farms until Consumers: An Exploratory Study. **Toxicology Letters**, v. 258, p. S87–S88, 16 Sep. 2016.

ORTIZ-MARTINEZ, R.; DE LUNA-LOPEZ, M. C.; VALDIVIA-FLORES, A.; QUEZADA-TRISTAN, T. Assessment of Aflatoxin M1 Levels in White Cheese. **Toxicology Letters**, v. 229, p. S224, 10 Sep. 2014.

ORTIZ-MARTINEZ, R.; VALDIVIA-FLORES, A.; QUEZADA-TRISTAN, T.; LUNA-LÓPEZ, M. C. Contamination of White Cheese with Aflatoxin M1. **Toxicology Letters**, v. 221, p. S63, 28 Aug. 2013.

PEREIRA, M.G.; CARVALHO, E. P; PRADO, G.; ROSA, A.R.; VELOSO, T.; SOUZA, L; RIBEIRO, J. M. Aflatoxinas em alimentos destinados a bovinos e em amostras de leite da região de Lavras, Minas Gerais - Brasil. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 29, p. 106–112, 2005.

PEREIRA, P. C. Milk Nutritional Composition and Its Role in Human Health. **Nutrition**, v. 30, n. 6, p. 619–627, 2014.

PEREIRA, V. L.; FERNANDES, J. .; CUNHA, S. . Micotoxinas Em Portugal : Ocorrência E Toxicidade. **Acta Farmacologica Portuguesa**, v. II, n. 1, 2000.

PÉREZ, J.; GUTIÉRREZ, R.; VEGA, S.; DÍAZ, G.; URBÁN, G.; CORONADO, M.; ESCOBAR, A. Ocurrência De Aflatoxina M1 En Leches Cruda, Ultrapasteurizada Y Orgánica Producidas Y Comercializadas En El Altiplano Mexicano. **Revista Salud Animal**, v. 30, n. 2, p. 103–109, 2008.

PICCIANO, M. F. Nutrient composition of human milk. **Pediatric Clinics of North America**, v. 48, n. 1, p. 53–67, 2001.

PICININ, L. C. A.; CERQUEIRA, M. M. O. P.; VARGAS, E. A.; LANA, Â. M. Q.; TOALDO, I. M.; BORDIGNON-LUIZ, M. T. Influence of Climate Conditions on Aflatoxin M1 Contamination in Raw Milk from Minas Gerais State, Brazil. **Food Control**, v. 31, n. 2, p. 419–424, 2013.

PRADO, G.; OLIVEIRA, M. S. De; LIMA, A. S.; PAULA, A.; MOREIRA, A. Occurrence of

Aflatoxin M1 in Parmesan Cheese Consumed in Minas Gerais, Brazil. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 32, n. 6, p. 1906–1911, 2008.

PRANDINI, A.; TANSINI, G.; SIGOLO, S.; FILIPPI, L.; LAPORTA, M.; PIVA, G. On the occurrence of Aflatoxin M1 in milk and dairy products. **Food and Chemical Toxicology**, v. 47, n. 5, p. 984–991, 2009.

PRELLE, A.; SPADARO, D.; GARIBALDI, A.; GULLINO, M. L. Co-Occurrence of Aflatoxins and Ochratoxin A in Spices Commercialized in Italy. **Food Control**, v. 39, n. 1, p. 192–197, 2014.

RAKSHA RAO, K.; VIPIN, A. V.; HARIPRASAD, P.; ANU APPAIAH, K. A.; VENKATESWARAN, G. Biological Detoxification of Aflatoxin B1 by *Bacillus Licheniformis* CFR1. **Food Control**, v. 71, p. 234–241, 2017.

RAMÍREZ-VÉLEZ, R.; CORREA-BAUTISTA, J. E.; MOTA, J.; GARCIA-HERMOSO, A. Comparison of different maximal oxygen uptake equations to discriminate the cardiometabolic risk in children and adolescents. **Journal of Pediatrics**, p. 1–7, 2018.

REYES VELÁZQUEZ, W.; MARTÍNEZ, S. P.; ISAÍAS ESPINOSA, V. H.; NATHAL VERA, M. A.; DE LUCAS PALACIOS, E.; ROJO, F. Aflatoxinas totales en raciones de bovinos y AFM1 en leche cruda obtenida en establos del estado de Jalisco, México. **Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias**, v. 47 n. 2, p. 223–230, 2009.

SADEGHI, E.; ALMASI, A.; BOHLOLI-OSKOI, S.; MOHAMADI, M.; CONTROL, Q.; PROMOTION, H.; BRANCH, K. The Evaluation of Aflatoxin M 1 Level in Collected Raw Milk for Pasteurized Dairy Factories of Kermanshah. **Zahedan Journal of Research in Medical Sciences Journal homepage**, v. 15, n. 3, p. 26–29, 2013.

SAHIN, H.Z.; CELIK, M.; KOTAY, S.; KABAK, B. Aflatoxins in dairy cow feed, raw milk and milk products from Turkey. **Food Additives and Contaminants Part B**, v. 9, n. 2, p. 152–158, 2016.

SANTE/EU. Analytical Quality Control and Method Validation Procedures for Pesticide Residues Analysis in Food and Feed. **SANTE/11945/2015**, n. Leg Depos. 11945:1–42., 2015.

SANTINI, A.; RAIOLA, A.; FERRANTELLI, V.; GIANGROSSO, G.; MACALUSO, A.; BOGNANNO, M.; GALVANO, F.; RITIENI, A. Aflatoxin M1 in Raw, UHT Milk and Dairy Products in Sicily (Italy). **Food additives & contaminants. Part B, Surveillance**, v. 6, n. 3, p. 181–6, 2013.

SANTOS, A. L.; BANDO, E.; MACHINSKI JUNIOR, M. Ocorrência de aflatoxina M1 em leite bovino comercializado no estado do Paraná, Brasil. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 35, n. 1, p. 371, 2014.

SARIMEHMETOGLU, B.; KUPLULU, O.; CELIK, H. . Detection of Aflatoxin M 1 in Cheese Samples by ELISA. **Food Control**, v. 15, p. 45–49, 2004.

SARTORI, A. V.; SWENSSON DE MATTOS, 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-High-Performance Liquid

Chromatography Tandem Mass Spectrometry. **Food Analytical Methods**, v. 8, n. 9, p. 2321–2330, 2015.

SASSAHARA, M.; PONTES NETTO, D.; YANAKA, E.K. Aflatoxin occurrence in foodstuff supplied to dairy cattle and aflatoxin M1 in raw milk in the North of Parana state. **Food and Chemical Toxicology**, v. 43, n. 6, p. 981–984, 2005.

SCAGLIONI, P. T.; BECKER-ALGERI, T.; DRUNKLER, D.; BADIALE-FURLONG, E. Aflatoxin B1 and M1 in Milk. **Analytica Chimica Acta**, v. 829, p. 68–74, 2014.

SHANTHA, T. Fungal Degradation of Aflatoxin B1. **Natural Toxins**, v. 7, n. January 1999, p. 175–178, 1999.

SHUNDO, L.; ALMEIDA, A. P. de; ALABURDA, J.; LAMARDO, L. C. A.; NAVAS, S. A.; RUVIERI, V.; SABINO, M. Ocorrência de Aflatoxina M1 em Amostras de Leite Bovino Consumido em Diferentes Regiões do Brasil. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, n. July 2017, p. 1–8, 2016.

SHUNDO, L.; ALMEIDA, A. P.; ALABURDA, J.; LAMARDO, C.A., NAVAS, S. A.; RUVIERI, V.; SABINO, M. Ocorrência de aflatoxina M1 em amostras de leite bovino consumido em diferentes regiões do Brasil. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, p. 1–8, 2017.

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, n. 7, p. 655–657, 2009.

SIGMA CHEMICAL COMPANY. **Commercial Peroxidase Enzyme Specifications (Peroxidase from horseradish)**. Disponível em: <<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/substance/peroxidasefromhorseradish12345900399011?lang=pt®ion=BR>>. Acesso abril 2018.

SILVA, M. V.; JANEIRO, V.; BANDO, E.; MACHINSKI Jr, M. Occurrence and estimative of aflatoxin M1 intake in UHT cow milk in Paraná State, Brazil. **Food Control**, v. 53, p. 222–225, 2015.

SILVA, M. V.; JANEIRO, V.; BANDO, E.; MACHINSKI JR, M. Occurrence and Estimative of Aflatoxin M1 Intake in UHT Cow Milk in Paraná State, Brazil. **Food Control**, v. 53, p. 222–225, 2015.

ŠKRBIĆ, B.; ŽIVANČEV, J.; ANTIĆ, I.; GODULA, M. Levels of Aflatoxin M1 in different types of milk collected in Serbia: Assessment of Human and Animal Exposure. **Food Control**, v. 40, n. 1, p. 113–119, 2014.

SMAJLOVIC, A.; MUMINOVIC, M.; MUJEZINOVIC, I.; CUPIC, V. Investigation of Aflatoxin M1 Degradation in Milk. **Veterinarski glasnik**, v. 66, n. 5–6, p. 387–394, 2012.

STOLOFF, L.; VAN EGMOND, H. P.; PARK, D. L. Rationales for the establishment of limits and regulations for mycotoxins. **Food Additives and Contaminants**, v. 8, n. 2, p. 213–221, 1991.

TAYLOR, M. C.; JACKSON, C. J.; TATTERSALL, D. B.; FRENCH, N.; PEAT, T. S.; NEWMAN, J.; BRIGGS, L. J.; LAPALIKAR, G. V.; CAMPBELL, P. M.; SCOTT, C.; RUSSELL, R. J.; OAKESHOTT, J. G. Identification and Characterization of Two Families of F420H2-Dependent Reductases from Mycobacteria That Catalyse Aflatoxin Degradation. **Molecular Microbiology**, v. 78, n. 3, p. 561–575, 2010.

TENIOLA, O. D.; ADDO, P. A.; BROST, I. M.; FÄRBER, P.; JANY, K. D.; ALBERTS, J. F.; VAN ZYL, W. H.; STEYN, P. S.; HOLZAPFEL, W. H. Degradation of Aflatoxin B1 by Cell-Free Extracts of *Rhodococcus Erythropolis* and *Mycobacterium Fluoranthenorans* Sp. Nov. DSM44556T. **International Journal of Food Microbiology**, v. 105, n. 2, p. 111–117, 2005.

U.S. DEPARTMENT OF AGRICULTURE. ¿Cómo evolucionó la producción de leche en el mundo en los últimos años? Disponível em: <http://www.campogalego.com/es/leche/como-evoluciono-la-produccion-de-leche-en-el-mundo-en-los-ultimos-anos/>. Acesso em Fevereiro 2018.

UNUSAN, N. Occurrence of Aflatoxin M1 in UHT Milk in Turkey. **Food and Chemical Toxicology**, v. 44, p. 1897–1900, 2006.

URBÁN, G.; PÉREZ, J.; MARTÍNEZ, F.; SALAS, J.; DÍAZ, G.; RAMÍREZ, M.L.; ESCOBAR, A. Niveles De Aflatoxina M1 En Quesos Frescos Producidos En Diferentes Zonas De México. **Revista Salud Animal**, v. 31, n. 2, p. 115–121, 2009.

VAN EGMOND, H.P. Mycotoxins in Dairy Products. **Food Chemistry**, v. 11, p. 289–307, 1993.

VÁSQUEZ, P. **Evaluación de aflatoxinas en suplementos para vacas lecheras en la sabana de Bogotá, y su relación con aflatoxina M1 en leche**. 2006. 90 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Zootecnia) – Universidad de la Salle. Bogotá.

VEGA, S.; RUIZ, J.L.; YAMAZAKI, A.; RIVERA, J.G., ESCOBAR, A. Evaluación de aflatoxina M1 en leche orgánica producida en Tecpatán, Chiapas, México, **Revista de Salud Animal**, v. 35 n. 1, p. 33–37.

VELA, E. **Determinación de la presencia de aflatoxina M1 en leche cruda de vaca distribuida en un centro de acopio ubicado en la región de la costa sur de Guatemala**. 2015. 123 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Medicina Veterinaria y Zootecnia) - Universidad de San Carlos de Guatemala, San Carlos, 2015.

VERRAES, C.; VLAEMYNCK, G.; VAN WEYENBERG, S.; DE ZUTTER, L.; DAUBE, G.; SINDIC, M.; UYTENDAELE, M.; HERMAN, L. A Review of the Microbiological Hazards of Dairy Products Made from Raw Milk. **International Dairy Journal**, v. 50, p. 32–44, 2015.

VETAL, M. D.; RATHOD, V. K. Three Phase Partitioning a Novel Technique for Purification of Peroxidase from Orange Peels (*Citrus Sinenses*). **Food and Bioproducts Processing**, p. 3–8, 2014.

- VIRDIS, S.; CORGIOLU, G.; SCARANO, C.; PILO, A. L.; DE SANTIS, E. P. L. Occurrence of Aflatoxin M1 in Tank Bulk Goat Milk and Ripened Goat Cheese. **Food Control**, v. 19, n. 1, p. 44–49, 1 Jan. 2008.
- WALPOLE, S. C.; PRIETO-MERINO, D.; PHIL, E.; CLELAND, J.; STEVENS, G.; ROBERTS, I. The Weight of Nations: An Estimation of Adult Human Biomass. **BMC Public Health**, v. 12, n. 1, p. 0–5, 2012.
- WANG, J.; OGATA, M.; HIRAI, H.; KAWAGISHI, H. Detoxification of Aflatoxin B1 by Manganese Peroxidase from the White-Rot Fungus *Phanerochaete Sordida* YK-624. **FEMS Microbiology Letters**, v. 314, n. 2, p. 164–169, 2011.
- WANG, Y.; LIU, X.; XIAO, C.; WANG, Z.; WANG, J.; XIAO, H.; CUI, L.; XIANG, Q.; YUE, T. HPLC Determination of Aflatoxin M1 in Liquid Milk and Milk Powder Using Solid Phase Extraction on OASIS HLB. **Food Control**, v. 28, n. 1, p. 131–134, 2012.
- WHO, World Health Organization. (2009). Principles and Methods for the Risk Assessment of Chemicals in Food, Geneva: World Health Organization.
- WHO, World Health Organization. (2015). Food Safety. Fact Sheet N° 399. World Health Organization, Geneva. World Health Organization.
- WICKLOW, D.T., 1995. The mycology of stored grain: an ecological perspective. In: Jayas, D.S., White, N.D.G., Muir, W.E. (Eds.), *Stored-Grain Ecosystems*. Marcel Dekker, Inc, New York, pp. 197–249
- WILLIAMS, J. H.; PHILLIPS, T. D.; JOLLY, P. E.; STILES, J. K.; JOLLY, C. M.; AGGARWAL, D. Human Aflatoxin in Developing Countries: A Review of Toxicology, Exposure, Potential Health Consequences, and Interventions. **American Society for Clinical Nutrition**, v. 80, n. June 2015, p. 1106–1122, 2004.
- World Health Organization; International Agency for Research on Cancer. 2002 Aflatoxins. In *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*; IARC Press: Lyon, France; Volume 82, p. 171–300.
- WU, Y. Z.; LU, F. P.; JIAN, H. L.; TAN, C. P.; YAO, D. S.; XIE, C. F.; LIU, D. L. The Furofuran-Ring Selectivity, Hydrogen Peroxide-Production and Low Km Value Are the Three Elements for Highly Effective Detoxification of Aflatoxin Oxidase. **Food and Chemical Toxicology**, v. 76, p. 125–131, 2015.
- YANIBADA, B.; BOUDRA, H.; DEBRAUWER, L.; MARTIN, C.; MORGAVI, D. P.; CANLET, C. Evaluation of Sample Preparation Methods for NMR-Based Metabolomics of Cow Milk. **Heliyon**, v. 4, n. 10, 2018.
- YAO, D.; LIANG, R.; LIU, D.; GU, L.; MA, L.; CHEN, W. Screening of the Fungus Whose Multienzyme System Has Catalytic Detoxification Activity towards Aflatoxin B1 (Part I). **ANNALS NEW YORK ACADEMY OF SCIENCES**, v. 864, n. 1, p. 579–585, 1998.
- YEHA, R. S. Aflatoxin Detoxification by Manganese Peroxidase Purified from *Pleurotus Ostreatus*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 45, n. 1, p. 127–133, 2014.

YIANNIKOURIS, A.; JOUANY, J. P. Mycotoxins in feeds and their fate in animals: a review. **Animal Research**, v. 51, p. 81-99, 2002.

ZAIN, M. E. Impact of Mycotoxins on Humans and Animals. **Journal of Saudi Chemical Society**, v. 15, n. 2, p. 129-144, 2011.

ZAMBRANO, J.; MARTINEZ, N. **Evaluación de la reducción de aflatoxina M1 con dos tratamientos térmicos respecto a leche cruda en hatos de la sabana de Bogotá**. 2009. 62 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Zootecnia) - Universidad de la Salle, Bogotá, 2009.

ZEINVAND-LORESTANI, H.; SABZEVARI, O.; SETAYESH, N.; AMINI, M.; NILI-AHMADABADI, A.; FARAMARZI, M. A. Comparative Study of in Vitro Prooxidative Properties and Genotoxicity Induced by Aflatoxin B1 and Its Laccase-Mediated Detoxification Products. **Chemosphere**, v. 135, p. 1-6, 2015.

ZENGİN, B.; UCKAYA, F.; DURMUS, Z. International Journal of Biological Macromolecules Chitosan and Carboxymethyl Cellulose Based Magnetic Nanocomposites for Application of Peroxidase Purification. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 96, p. 149-160, 2017.

ZHANG, W.; XUE, B.; LI, M.; MU, Y.; CHEN, Z.; LI, J.; SHAN, A. Screening a Strain of *Aspergillus Niger* and Optimization of Fermentation Conditions for Degradation of Aflatoxin B1. **Toxins**, v. 6, p. 3157-3172, 2014.

ZHAO, L. H.; GUAN, S.; GAO, X.; MA, Q. G.; LEI, Y. P.; BAI, X. M.; JI, C. Preparation, Purification and Characteristics of an Aflatoxin Degradation Enzyme from *Myxococcus Fulvus* ANSM068. **Journal of Applied Microbiology**, v. 110, n. 1364-5072, p. 147-155, 2010.

ZINEDINE, A.; GONZÁLEZ-OSNAYA, L.; SORIANO, J. M.; MOLTÓ, J. C.; IDRISSE, L.; MAÑES, J. Presence of Aflatoxin M1 in pasteurized milk from Morocco. **International Journal of Food Microbiology**, v. 114, n. 1, p. 25-29, 2007.