



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

AÇÃO DE MICRO-ORGANISMOS PROBIÓTICOS NA COMPOSIÇÃO NUTRICIONAL
E NOS NÍVEIS DE MICOTOXINAS EM LEITE
TANIA APARECIDA BECKER-ALGERI

PROF^a DR^a ELIANA BADIALE FURLONG

Orientadora

PROF^a DR^a DEISY ALESSANDRA DRUNKLER

Coorientadora

RIO GRANDE, RS

2016

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

AÇÃO DE MICRO-ORGANISMOS PROBIÓTICOS NA COMPOSIÇÃO NUTRICIONAL
E NOS NÍVEIS DE MICOTOXINAS EM LEITE
TANIA APARECIDA BECKER-ALGERI

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

PROF^a DR^a ELIANA BADIALE FURLONG

Orientadora

PROF^a DR^a DEISY ALESSANDRA DRUNKLER

Coorientadora

RIO GRANDE, RS

2016

Ficha catalográfica

B395a Becker-Algeri, Tania Aparecida.
Ação de micro-organismos probióticos na composição nutricional e nos níveis de micotoxinas em leite / Tania Aparecida Becker-Algeri / 2016.
207 f.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Rio Grande – FURG, Programa de Pós-graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, Rio Grande/RS, 2016.

Orientadora: Dr^a. Eliane Badiale Furlong.

Coorientadora: Dr^a. Deisy Alessandra Drunkler.

1. Micotoxinas 2. Fermentação 3. Leite I. Badiale, Eliane Furlong
II. Drunkler, Deisy Alessandra II. Título.

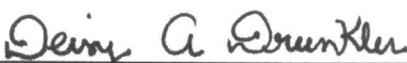
CDU 637.1

APROVAÇÃO

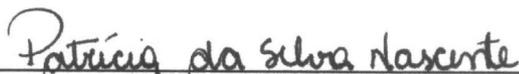
Tese defendida por Tânia Aparecida Becker Algeri e aprovada em 13 de julho de 2016, pela Comissão Examinadora constituída pelos professores:



Profa. Dra. Eliana Badiale Funong – FURG



Profa. Dra. Deisy Drunkler – UTFPR



Profa. Dra. Patrícia da Silva Nascente – UFPEL



Profa. Dra. Susana Juliano Kalil – FURG



Profa. Dra. Marta Marquezan Augusto – FURG



Profa. Dra. Janaina F. de Medeiros Burkert – FURG

Aos meus pais e ao meu marido, com amor dedico.

AGRADECIMENTOS

Ao longo desta caminhada tive a oportunidade de conhecer lugares e pessoas maravilhosas, vivenciar diferentes experiências e além de tudo aprender, muito, com as mais diversas situações. Nada disso seria possível se não tivesse ao meu lado pessoas que me motivaram, me ensinaram e acima de tudo, caminharam comigo e por isso, sou imensamente grata!

Agradeço a Deus e a Nossa Senhora Aparecida por me manterem sempre firme, com fé e saúde, e por proteger as pessoas que amo e que nem sempre puderam estar próximas fisicamente!

Agradeço à minha orientadora, professora Dr^a Eliana, por me acompanhar desde o primeiro dia do mestrado, me orientar e ensinar, por confiar no meu trabalho e acima de tudo, me proporcionar crescimento pessoal e profissional! Obrigada por sua pronta disponibilidade sempre que precisei, solucionando os mais variados problemas, pelo conhecimento compartilhado, por me acolher em sua casa, pelas tantas horas de conversa e conselhos. Com certeza levo um pouco de ti no pouco que sei!

Obrigada à minha coorientadora professora Dr^a Deisy, pelos tantos anos de parceria, orientação e amizade! Por compartilhar o seu conhecimento, promovendo sempre o meu crescimento. Agradeço por sempre ter acreditado no meu trabalho e me motivado em todas as minhas decisões! Seu apoio e ensinamentos foram fundamentais para que concluíssemos mais essa etapa! Muito obrigada!

Agradeço do fundo do coração ao meu marido Thiago, meu amor e grande incentivador! Não há palavras para descrever tudo que você fez por mim nesses 4 anos de doutorado! Obrigada pela sua paciência, persistência e constante motivação! Obrigada pelo seu amor e dedicação pela nossa casa quando estive ausente! Obrigada pela sua espera! Eu te amo, muito, esse título também é seu!

Obrigada à minha família, meus irmãos Walter e Taise, sobrinhos Vinícius, Miguel e o recém chegado Davi, meus cunhados Giselle, Rafael, Samoel e Ellen e aos meus sogros Flávio e Oneida! É tão bom saber que posso contar com vocês! Obrigada em especial aos meus pais, Mario e Cerlei, pessoas simples, mas com uma garra e coração enormes, que sempre nos incentivaram a estudar muito, para que pudéssemos alcançar todos os nossos sonhos! Amo todos vocês!

“Muuuito” obrigada à minha amiga irmã de coração Priscila! Com certeza, um dos presentes que a pós-graduação me deu! Obrigada por tudo que fez por mim amiga! Por me

receber em sua casa em Rio Grande, Pelotas e até em Torino, na Itália!! Por tantas conversas, risadas e até choros que compartilhamos! Obrigada por ser minha confidente, ajudante de laboratório e companheira de viagens e tantas outras aventuras! Que nossa amizade dure para sempre, e que a distância nunca desfaça os laços invisíveis que ela mesma criou!

Obrigada aos meus auxiliares de laboratório, Kennedy, Camila e Maria Clara, a contribuição de vocês foi fundamental para a conclusão deste projeto! Às minhas colegas de pós-graduação Denise, Andressa, Kátia e Juliana, pela ajuda na realização das análises! Obrigada à Laudirene e às professoras Giniani e Patrícia Valderrama, pelo auxílio na coleta das amostras e elaboração das análises! Obrigada à todos os colegas e professores do Programa do Pós Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos da FURG e do Programa de Pós Graduação em Tecnologia de Alimentos da UTFPR! Foram muitas as pessoas que convivi e que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho, cada um a seu modo, mas com certeza, indispensáveis! Muito obrigada!

Agradeço à minha orientadora de doutorado sanduíche professora Dr^a Susana Viegas, pela oportunidade, dedicação e pelo conhecimento aplicado para realização do nosso projeto em Portugal! À professora Dr^a Carlina Ladeira, muito obrigada pela disponibilidade e atenção à mim dedicadas e pelo empenho no desenvolvimento do projeto! À todos que conheci na ESTESL, que me acompanharam na minha estada em Lisboa, obrigada! Agradeço à professora Dr^a Sandra Cabo Verde pela acolhida, disponibilidade e ajuda na elaboração das análises e pelos conhecimentos à mim passados! Aos colegas do C₂TN, Maria Inês, Joana, Helena, Pedro, Paula, Nuno e Rita, muito obrigada pela amizade, cuidado e carinho de vocês e em especial à Andreia Pimenta, por toda sua paciência, disponibilidade e atenção ao me ensinar e desenvolver o projeto!

Aos membros da banca, obrigada pela disponibilidade e contribuições!

Aos meus amigos e familiares que estiveram do meu lado e sempre torceram por mim, muito obrigada!!

'Ao longo da vida todos nós devemos olhar em cinco direções: para frente, para saber para onde vamos; para trás, pra sempre lembrarmos de onde viemos; para baixo, pra nunca pisar em ninguém; para os lados, pra ver quem nos acompanha nos momentos difíceis e para cima, pra saber que sempre há alguém nos olhando e nos cuidando'.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	9
LISTA DE TABELAS	11
APRESENTAÇÃO	13
CAPÍTULO I.....	14
RESUMO	15
ABSTRACT.....	16
1 INTRODUÇÃO	17
2 OBJETIVOS	19
2.1 OBJETIVO GERAL	19
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	19
CAPÍTULO II	20
3 REVISÃO DA LITERATURA	21
3.1 COMPOSIÇÃO NUTRICIONAL DO LEITE	21
3.2 DERIVADOS LÁCTEOS FERMENTADOS	24
3.3 CONTAMINAÇÃO DO LEITE POR AFLATOXINAS: MECANISMOS E RISCOS... ..	26
3.4 BACTÉRIAS ÁCIDO LÁCTICAS: SÍNTESE DE VITAMINAS E INIBIÇÃO DE AFLATOXINAS.....	30
3.5 BIODISPONIBILIDADE DAS AFLATOXINAS	33
CAPÍTULO III.....	36
ARTIGO I - MICOTOXINAS EM LEITE BOVINO E PRODUTOS LÁCTEOS: UMA REVISÃO	37
RESUMO	38
MYCOTOXINS IN BOVINE MILK AND DAIRY PRODUCTS: A REVIEW.....	39
ABSTRACT.....	39
1 INTRODUÇÃO	40
2 CONTAMINAÇÃO DO LEITE POR MICOTOXINAS	41
3 LEGISLAÇÃO.....	41
4 AFLATOXINAS EM LEITE.....	42
4.1 FATORES DE INFLUÊNCIA NA CONTAMINAÇÃO DO LEITE POR AFLATOXINA M ₁	44
4.2 OCORRÊNCIA DE AFLATOXINA M ₁ EM LEITE.....	46
4.3 OCORRÊNCIA DE AFLATOXINA M ₁ EM DERIVADOS LÁCTEOS.....	48

5 FUMONISINA	50
6 ZEARALENONA	52
7 OCRATOXINA.....	53
8 TRICOTECENOS	54
8.1 DEOXINIVALENOL.....	55
8.2 TOXINA T-2	55
9 CONCLUSÕES	56
10 REFERÊNCIAS	56
ARTIGO II - VARIAÇÃO SAZONAL DA QUALIDADE FÍSICO-QUÍMICA, MICROBIOLÓGICA E OCORRÊNCIA DE AFLATOXINAS B ₁ E M ₁ EM LEITE.....	69
RESUMO	70
SEASONAL VARIATION OF QUALITY PHYSICO-CHEMICAL, MICROBIOLOGICAL AND OCCURRENCE AFLATOXINS B ₁ AND M ₁ IN MILK	71
ABSTRACT	71
1 INTRODUÇÃO.....	72
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	74
2.1 AMOSTRAS	74
2.2 REAGENTES.....	74
2.3 ANÁLISE MICROBIOLÓGICA.....	74
2.4 ANÁLISES DA COMPOSIÇÃO CENTESIMAL E DAS PROPRIEDADES FÍSICO- QUÍMICAS	75
2.5 ANÁLISE DE MICOTOXINAS.....	75
2.5.1 Preparo dos Padrões de Aflatoxinas	75
2.5.2 Extração de aflatoxina M ₁ e B ₁	76
2.5.3 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	76
2.6 ANÁLISE DOS RESULTADOS	77
2.6.1 Análise estatística	77
2.6.2 Análise do componente principal	77
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	79
3.2 ANÁLISE DOS COMPONENTES PRINCIPAIS.....	88
4 CONCLUSÃO.....	90
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	91
ARTIGO III - EFEITO DO PROCESSAMENTO TÉRMICO E FERMENTAÇÃO NA COMPOSIÇÃO NUTRICIONAL DE LEITE	95

RESUMO.....	96
EFFECT OF THERMAL PROCESSING AND FERMENTATION IN THE NUTRITIONAL COMPOSITION OF MILK.....	97
ABSTRACT.....	97
1 INTRODUÇÃO.....	98
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	99
2.1 AMOSTRAS.....	99
2.2 DETERMINAÇÃO DE RIBOFLAVINA.....	100
2.2.1 Validação do método de extração e quantificação da vitamina.....	100
2.3 EFEITO DO PROCESSAMENTO TÉRMICO NA COMPOSIÇÃO DO LEITE.....	101
2.4 DETERMINAÇÕES DE pH, ACIDEZ E COMPOSIÇÃO QUÍMICA.....	101
2.5 AÇÃO DE MICRO-ORGANISMOS PROBIÓTICOS NA COMPOSIÇÃO NUTRICIONAL E TEORES DE RIBOFLAVINA.....	101
2.5.1 Bactérias, condições de cultivo e estimativa da concentração microbiana.....	101
2.5.2 Preparo dos fermentados.....	103
2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	103
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	104
3.1 INDICATIVOS DA CONFIABILIDADE DO MÉTODO DE DETERMINAÇÃO DE RIBOFLAVINA.....	104
3.2 EFEITO DO PROCESSAMENTO TÉRMICO NA COMPOSIÇÃO DO LEITE.....	106
3.3 AÇÃO DAS BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS NA COMPOSIÇÃO NUTRICIONAL E TEORES DE RIBOFLAVINA.....	108
4 CONCLUSÃO.....	116
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	116
ARTIGO IV - AÇÃO DE BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS NOS NÍVEIS NUTRICIONAIS, DE AFLATOXINAS B ₁ E M ₁ E SUAS RESPECTIVAS CITOTOXICIDADES EM LEITES FERMENTADOS.....	120
RESUMO.....	121
BACTERIA ACID LACTIC ACTION IN NUTRITION LEVELS, AFLATOXINS B ₁ AND M ₁ AND THEIR RESPECTIVE CYTOTOXICITY IN MILK FERMENTED.....	122
ABSTRACT.....	122
1 INTRODUÇÃO.....	123
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	125
2.1 MATERIAL E REAGENTES.....	125

2.2 BACTÉRIAS, CONDIÇÕES DE CULTIVO E ENUMERAÇÃO	125
2.3 PREPARO DOS FERMENTADOS.....	125
2.4 DETERMINAÇÕES DE pH E ACIDEZ.....	126
2.5 DETERMINAÇÃO DE RIBOFLAVINA.....	126
2.6 DETERMINAÇÃO DE AFLATOXINA M ₁ E B ₁	128
2.6.1 Preparo dos Padrões de Aflatoxinas	128
2.6.2 Extração simultânea das Aflatoxinas M ₁ e B ₁	129
2.6.3 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	130
2.7 DIGESTIBILIDADE <i>IN VITRO</i>	131
2.8 CITOTOXICIDADE	133
2.8.1 Cultura de células	133
2.8.2 Preparo das amostras	134
2.8.3 Citotoxicidade.....	134
2.9 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	135
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	136
3.1 RIBOFLAVINA	136
3.1.1 Ação das BAL nos níveis e na biodisponibilidade de riboflavina.....	136
3.2 AFLATOXINAS	141
3.2.1 Validação de método para determinação das aflatoxinas B ₁ e M ₁	141
3.2.2 Efeito das bactérias ácido lácticas nos níveis de aflatoxinas em leite.....	142
4 CONCLUSÃO.....	150
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	151
CAPÍTULO IV	157
CONCLUSÃO GERAL	158
CAPITULO V	160
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	161
APÊNDICE 1 - EXTRAÇÃO DE AFLATOXINA B ₁ e M ₁ EM LEITE - AOAC.....	189
APÊNDICE 2 – EXTRAÇÃO DA RIBOFLAVINA EM LEITE.....	190
APÊNDICE 3 – EXTRAÇÃO DE AFLATOXINA B ₁ e M ₁ EM LEITE – QuEChERS	191
APÊNDICE 4 – MODELO DE DIGESTÃO <i>IN VITRO</i>	192
APÊNDICE 5 – ENSAIO DE CITOTOXICIDADE – MÉTODO MTT.....	194
ANEXO 1 - ARTIGO PUBLICADO: MYCOTOXINS IN BOVINE MILK AND DAIRY PRODUCTS: A REVIEW.....	197

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO II

REVISÃO DE LITERATURA

Figura 1 - Estruturas da riboflavina, FMN e FAD..... 23

Figura 2 - Biotransformação hepática da aflatoxina B₁ em aflatoxina M₁..... 27

CAPÍTULO III

ARTIGO I - MICOTOXINAS EM LEITE BOVINO E PRODUTOS LÁCTEOS: UMA

REVISÃO

Figura 1 - Biotransformação hepática da aflatoxina B₁ em aflatoxina M₁..... 43

Figura 2 - Fórmula molecular da fumonisina. 51

Figura 3 - Estrutura química da zearalenona e seus metabólitos. 52

ARTIGO II - VARIAÇÃO SAZONAL DA QUALIDADE FÍSICO-QUÍMICA,

MICROBIOLÓGICA E OCORRÊNCIA DE AFLATOXINAS B₁ E M₁ EM LEITE

Figura 1 - Procedimento para a realização da PCA. 79

Figura 2 - Amostras em não conformidade em relação à contagem de mesófilos aeróbios. . 80

Figura 3 - Cromatogramas de eluição das Aflatoxinas M₁ e B₁..... 85

Figura 4 - Gráfico dos *scores*. (A) PC1; (B) PC2; (C) PC3; (D) PC4. 89

Figura 5 - Gráfico dos *loadings*. (A) PC1; (B) PC2; (C) PC3; (D) PC4..... 90

ARTIGO III - EFEITO DO PROCESSAMENTO TÉRMICO E FERMENTAÇÃO NA

COMPOSIÇÃO NUTRICIONAL DO LEITE

Figura 1 - Cromatogramas de confirmação do tempo de retenção da riboflavina..... 104

Figura 2 - Curvas de concentração bacteriana para as quatro BAL..... 108

Figura 3 - Placa de Petri contendo meio de cultivo e colônias típicas de *B. lactis* HN019.. 109

ARTIGO IV - AÇÃO DE BACTÉRIAS ÁCIDO LÁCTICAS NOS NÍVEIS NUTRICIONAIS,

DE AFLATOXINAS B₁ E M₁ E SUAS RESPECTIVAS CITOTOXICIDADES EM LEITES

FERMENTADOS

Figura 1- Esquema das determinações para acompanhamento dos experimentos de fermentação. 128

Figura 2 - Esquema representativo da análise de digestibilidade *in vitro*..... 133

Figura 3 - Cultivo celular de células Caco-2 com >90% confluência. 134

Figura 4 - Esquema de contagem celular em câmara de Neubauer. 134

Figura 5 - Esquema representativo da estimativa da viabilidade celular por meio do ensaio de MTT. 135

Figura 6 - Efeito da fermentação com bactérias ácido lácticas na bioacessibilidade da riboflavina em amostras de leite fortificadas com aflatoxina M₁ e B₁ 138

APÊNDICE 1

Figura 1 – Esquema de extração de AFB₁ e AFM₁ em leite – AOAC..... 189

APÊNDICE 3

Figura 2 – Esquema de extração de AFB₁ e AFM₁ em leite – QhEChERS..... 191

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO III

ARTIGO I - MICOTOXINAS EM LEITE BOVINO E PRODUTOS LÁCTEOS: UMA REVISÃO

Tabela 1 - Legislação internacional para AFM ₁ em leite e derivados lácteos para consumo humano.....	42
Tabela 2 - Ocorrência de contaminação por AFM ₁ em leite bovino.....	47
Tabela 3 - Ocorrência de contaminação por AFM ₁ em derivados lácteos.....	50

ARTIGO II - VARIAÇÃO SAZONAL DA QUALIDADE FÍSICO-QUÍMICA, MICROBIOLÓGICA E OCORRÊNCIA DE AFLATOXINAS B₁ E M₁ EM LEITE

Tabela 1 - Características físico-químicas das amostras de leite conforme legislação vigente.	82
Tabela 2 - Indicativos de confiabilidade do método.	84
Tabela 3 - Níveis de contaminação por micotoxinas em amostras de leite UAT integral, semidesnatado e desnatado, comercializadas no sul do Brasil.	86

ARTIGO III - EFEITO DO PROCESSAMENTO TÉRMICO E FERMENTAÇÃO NA COMPOSIÇÃO NUTRICIONAL DO LEITE

Tabela 1 - Indicativos de eficiência das curvas padrão e de robustez.....	105
Tabela 2 - Recuperação (%R) e CV% do método de extração.	105
Tabela 3 - Composição nutricional do leite antes e após os tratamentos térmicos.....	106
Tabela 4 - Equações potenciais das BAL.....	109
Tabela 5 - Composição nutricional de leite cru refrigerado/pasteurizado.	114
Tabela 6 - Composição nutricional de leite cru refrigerado/UAT.	115

ARTIGO IV - AÇÃO DE BACTÉRIAS ÁCIDO LÁCTICAS NOS NÍVEIS NUTRICIONAIS, DE AFLATOXINAS B₁ E M₁ E SUAS RESPECTIVAS CITOTOXICIDADES EM LEITES FERMENTADOS

Tabela 1 - Constituintes e concentrações dos sucos sintéticos do modelo de digestão <i>in vitro</i>	132
Tabela 2 - Efeito da fermentação com bactérias ácido lácticas nos níveis de riboflavina em amostras de leite fortificadas com Aflatoxina M ₁ e B ₁	136
Tabela 3 - Efeito da fermentação com bactérias ácido lácticas na bioacessibilidade da riboflavina em amostras de leite fortificadas com Aflatoxina M ₁ e B ₁	139

Tabela 4 – Valores de precisão, limite de detecção e limite de quantificação para determinação de AFM ₁ e AFB ₁ em leite, leite fermentado e fluido biológico.....	142
Tabela 5 - Efeito da fermentação com diferentes BAL em leites fortificados com AFB ₁ e AFM ₁	143
Tabela 6 - Bioacessibilidade de AFB ₁ e AFM ₁ em leite fermentado com BAL.	147
Tabela 7 - Viabilidade celular de células expostas às amostras contaminadas.	149
APÊNDICE 4	
Tabela 1 - Constituintes e concentrações dos sucos sintéticos do modelo de digestão <i>in vitro</i>	192

APRESENTAÇÃO

Para o cumprimento dos objetivos desta tese e obtenção do Título de Doutor em Engenharia e Ciência de Alimentos, as atividades experimentais foram realizadas no Laboratório de Micotoxinas e Ciência de Alimentos (LAMCA) da Universidade Federal de Rio Grande – FURG sob orientação da professora Dr^a Eliana Badiale Furlong e no Laboratório de Tecnologia de Alimentos da Universidade Tecnológica Federal do Paraná - UTFPR (Campus Medianeira) sob co-orientação da professora Dr^a Deisy Alessandra Drunkler. Além disso, os experimentos de toxicidade e genotoxicidade dos produtos fermentados elaborados com leite contaminado por aflatoxinas M₁ e B₁ foram realizados na Escola Superior de Tecnologia de Saúde de Lisboa - ESTESL do Instituto Politécnico de Lisboa e no Laboratório de Ensaios Tecnológicos em Áreas Limpas (LETAL) no Campus Tecnológico e Nuclear (CTN) do Instituto Superior Técnico de Lisboa, sob orientação das professoras Dr^a Susana Viegas e Dr^a Sandra Cabo Verde, respectivamente.

O documento que reúne os experimentos e seus resultados foi organizado em capítulos:

I - RESUMO GERAL, ABSTRACT GERAL, INTRODUÇÃO GERAL E OBJETIVOS;

II - REVISÃO DE LITERATURA;

III - DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO;

- Artigo I: MICOTOXINAS EM LEITE BOVINO E PRODUTOS LÁCTEOS: UMA REVISÃO (ANEXO I)
- Artigo II: VARIAÇÃO SAZONAL DA QUALIDADE FÍSICO-QUÍMICA, MICROBIOLÓGICA E OCORRÊNCIA DE AFLATOXINAS B₁ E M₁ EM LEITE
- Artigo III: EFEITO DO PROCESSAMENTO TÉRMICO E FERMENTAÇÃO NA COMPOSIÇÃO NUTRICIONAL DE LEITE
- Artigo IV: AÇÃO DE BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS NOS NÍVEIS NUTRICIONAIS, DE AFLATOXINAS B₁ E M₁ E SUAS RESPECTIVAS CITOTOXICIDADES EM LEITES FERMENTADOS

IV - CONCLUSÃO GERAL;

V - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

CAPÍTULO I

RESUMO

O leite devido à sua composição nutricional, rica em proteínas de alto valor biológico, lipídios, minerais e vitaminas, com destaque para as do complexo B, sendo a principal fonte de riboflavina, ou vitamina B₂, constitui uma das melhores fontes de nutrientes da dieta humana. No entanto, o consumo pode acarretar em problemas de saúde relacionados à ingestão de contaminantes biológicos como as micotoxinas, com destaque para as aflatoxinas, em especial a Aflatoxina M₁ (AFM₁) que é um metabólito tóxico hidroxilado proveniente da metabolização da Aflatoxina B₁ (AFB₁), contaminante de rações e alimentos destinados à alimentação animal, no rumem de animais lactantes. A presença de AFM₁ e AFB₁ é um problema de saúde pública, pois estas micotoxinas são classificadas pela FAO (WHO) como carcinógenos para seres humanos de nível 2B e 1A, respectivamente. Considerando que esses contaminantes são estáveis aos tratamentos térmicos, outros processos de controle da contaminação vêm sendo estudados a fim de garantir a qualidade desses produtos. Processos que podem favorecer a degradação destas micotoxinas são aqueles aonde são empregados micro-organismos que por meio de sua capacidade de ligação e/ou inibição com as aflatoxinas, podem promover a redução dos níveis disponíveis para absorção e distribuição no organismo. O destaque é para as bactérias ácido lácticas (BAL) amplamente utilizadas na indústria de laticínios e que, além de conferir maior palatabilidade e digestibilidade aos produtos lácteos, ainda conferem maior disponibilidade de nutrientes e possível redução de contaminantes. Neste contexto, o trabalho teve como objetivo avaliar a ação de quatro diferentes BAL dos gêneros *Lactobacillus*, *Streptococcus* e *Bifidobacterium* nos níveis nutricionais e sobre as aflatoxinas presentes em leites destinados à fermentação. Iniciou-se pelo levantamento de ocorrência dessas aflatoxinas em 229 amostras de leite Ultra Alta Temperatura (UAT) comercializadas na região sul do Brasil, nos quais foi constatada a ocorrência da AFM₁ e AFB₁ com níveis variando de 0,3 a 4,6 µg.L⁻¹ e 1,4 a 14,1 µg.L⁻¹, respectivamente. Na sequência foi realizado um estudo da ação distinta e combinada dos micro-organismos *L. delbruecki* subsp. *bulgaricus*, *S. salivarius* subsp. *thermophilus* STI 12, *L. acidophilus* La-5 e *B. lactis* HN019, sobre os nutrientes de leites submetidos à diferentes tratamentos térmicos (pasteurização e UAT) e aflatoxinas B₁ e M₁ presentes em leite destinados à fermentação. Foi verificado um aumento significativo nos níveis de riboflavina (23%) após atingir o pH de leite fermentado, com destaque para o *L. acidophilus* que proporcionou aumento nos quatro tipos de leite avaliados. No entanto, esses níveis não aumentaram significativamente quando a amostra destinada a fermentação foi fortificada com a AFM₁ (2 µg.L⁻¹) e AFB₁ (10 µg.L⁻¹), indicando que o micro-organismo destina parte do seu processo metabólico para evitar os efeitos do contaminante. Fato demonstrado pela redução de até 100% dos níveis iniciais da AFB₁ e 88,4% da AFM₁. Ensaio de digestão *in vitro* mostraram a redução da biodisponibilidade das micotoxinas. A fermentação do leite com BAL também reduziu a citotoxicidade das aflatoxinas, demonstrada pelo aumento da viabilidade celular de células epiteliais de adenocarcinoma coloretal (Caco-2) expostas a amostras digeridas após a fermentação láctica.

Palavras chave: Fermentação. Aflatoxinas. Riboflavina.

ABSTRACT

The milk due to its nutritional composition rich in high biological value proteins, lipids, minerals and vitamins, especially the B complex, being the main source of Riboflavin, or Vitamin B2, represents one of the best dietary sources of nutrients for humans. However, consumption may lead to health problems related to the ingestion of biological contaminants such as mycotoxins, particularly aflatoxins, particularly aflatoxin M₁ (AFM₁) which is a toxic metabolite hydroxylated from the metabolization of Aflatoxin B₁ (AFB₁), contamination of feedstuff and food for animal feed in the rumen of lactating animals. The presence of AFM₁ e AFB₁ is a public health problem, because of it, these mycotoxins are classified by FAO (WHO) as carcinogenic to humans as level 2B and 1A, respectively. Considering these contaminants are stable to heat treatments, other contamination processes control have been studied to ensure the quality of these products. Processes that can promote the degradation of these mycotoxins are those where making use of micro-organisms through its binding capacity and / or inhibition with aflatoxins, can promote the reduction of the available levels for absorption and distribution in the body. The highlight is the lactic acid bacteria (LAB) widely used in the dairy industry and that in addition to providing greater palatability and digestibility for dairy products also provide greater nutrient availability and possible reduction of contaminants. In this context, the study aimed to evaluate the effect of four different LAB of *Lactobacillus*, *Streptococcus* and *Bifidobacterium* in nutrient levels and on aflatoxins in milk for fermentation. Began with a survey of occurrence of aflatoxin in 229 milk samples Ultra High Temperature (UHT) commercialized in southern Brazil, where it was found the occurrence of AFM₁ and AFB₁ with levels ranging from 0.3 to 4.62 µg.L⁻¹ and 1.39 to 14.1 µg.L⁻¹, respectively. Following was made a distinct action and combined study of *L. delbruecki* subsp. *bulgaricus*, *S. salivarius* subsp. *thermophilus* STI 12, *L. acidophilus* La-5 e *B. lactis* HN019, on the nutrients of milk submitted to different heat treatments (pasteurization and UHT) and aflatoxin B₁ and M₁ presentes in milk for fermentation. A significant increase was observed in the levels of riboflavin (23%) after reaching the pH of fermented milk, especially the *L. acidophilus* that led to an increase in the four types of evaluated milk. However, these levels did not increase significantly when the sample was destined for fermentation was fortified with AFM₁ (2 µg.L⁻¹) and AFB₁ (10 µg.L⁻¹), indicating that the micro-organism intended part of their metabolic processes to avoid the effects of the contaminant. As demonstrated by the reduction of up to 100% of the initial levels of AFB₁ and 88.4% of AFM₁. *In vitro* digestion assay showed a reduction in the bioavailability of mycotoxins. The milk fermentation with LAB has also reduced the aflatoxin cytotoxicity, demonstrated to increase cell viability of epithelial cells of colorectal adenocarcinoma (Caco-2) exposed the digested samples after lactic fermentation.

Keywords: Fermentation. Aflatoxins. Rioboflavin.

1 INTRODUÇÃO

O leite é uma das principais fontes de nutrientes da dieta humana, tanto como leite de consumo como através de seus derivados (MARCHIORI, 2007). Porém, vários fatores contribuem para que seja um alimento susceptível às mais variadas formas de contaminação, podendo ser de origem microbiológica, física e/ ou química. Trabalhos na literatura brasileira e que englobam a Região Sul têm avaliado se os leites UAT comercializados atendem ao Padrão de Identidade e Qualidade preconizados pela legislação vigente quanto as características microbiológicas e físico-químicas e um percentual expressivo de amostras tem apresentado irregularidades (BERSOT et al., 2010; SARUWTARI et al., 2008). No entanto, poucos são os que avaliam a ocorrência de outros contaminantes, como as micotoxinas (BECKER et al., 2010; SCAGLIONI et al., 2014), que podem ser encontradas no leite.

A contaminação do leite por micotoxinas pode ocorrer devido à ingestão por animais lactantes de ração e/ou forragem contaminada por metabólitos de espécies fúngicas toxigenicas (FINK-GREMMELS, 2008; KAN, 2009). Estudos que correlacionam à ocorrência de micotoxinas em leite e derivados lácteos enfatizam a presença de Aflatoxina M₁ (AFM₁) (CATTANEO et al., 2013; COFFEY; CUMMINS; WARD, 2009; DUARTE et al., 2013; FALLAH et al., 2009; GHANEM; ORFI, 2009; IHA et al., 2013) que é regulamentada pela legislação vigente (BRASIL, 2012). Apesar da maior parte da literatura afirmar que a aflatoxina B₁ (AFB₁) é completamente convertida em M₁, estudos tem demonstrado que isso não é verdadeiro (SCAGLIONI et al., 2014), o que vem a justificar o interesse nela, uma vez que a toxicidade da AFB₁ é maior que a da AFM₁ (HUSSEIN; BRASEL, 2001; ZAIN, 2011).

O desafio com as aflatoxinas é que são estáveis aos tratamentos tecnológicos aos quais a matéria-prima é submetida e permanecem nos leites fluidos e derivados. Em função disso, vários trabalhos tem procurado alcançar redução das micotoxinas em leite por diversos tratamentos. Os métodos físicos de descontaminação de micotoxinas envolvem procedimentos como inativação térmica, luz ultravioleta, radiação ionizante ou extração com solventes, e os métodos químicos utilizam agentes que degradam estruturalmente as micotoxinas, como o uso de cloração (hipoclorito de sódio e cloro gasoso), agentes oxidantes (peróxido de hidrogênio, ozônio e bissulfito de sódio) ou agentes hidrolíticos (ácidos, álcalis e amônia). Entretanto, ambos os procedimentos possuem desvantagens, seja por não removerem eficientemente as toxinas, apresentarem altos custos ou promoverem perdas nutricionais nos produtos (EL-NEZAMI et al., 1998; LINE; BRACKETT, 1995). Os métodos biológicos implicam na ação de micro-organismos, como por exemplo, leveduras, fungos filamentosos, bactérias, algas,

entre outros, sobre as micotoxinas através de mecanismos como competição por nutrientes e espaço, interações e antibiose (FAZELI, 2009).

Os métodos de descontaminação biológicos para micotoxinas estão sendo amplamente estudados e podem ser uma escolha muito promissora, pois apresentam eficiência, especificidade e são ambientalmente corretos (WU et al., 2009). As bactérias ácido-láticas (BAL) constituem um grande grupo de bactérias geneticamente diversas que, além de produzirem ácido láctico, possuem características comuns: são gram-positivas, não-esporogênicas, não se locomovem espontaneamente e são catalase e oxidase negativas. Às BAL se atribui a propriedade de inibir a síntese de aflatoxinas pelas espécies toxigênicas, ou ainda, possuem a habilidade de remover diferentes micotoxinas do meio, quer devido aos produtos da fermentação (ácido láctico, diacetil, acetaldeído, ácido acético, peróxido de hidrogênio ou bacteriocinas) que podem acumular níveis inibitórios em certos alimentos e bebidas (BOVO et al., 2013; ONILUDE et al., 2005), devido a capacidade de se ligarem as micotoxinas, como aflatoxina B1 por mecanismos ainda não completamente elucidados (DALIÉ; DESCHAMPS; RICHARD-FORGET, 2010).

Além de ser uma opção como agente descontaminante, os processos fermentativos aumentam a disponibilidade de nutrientes nas matérias-primas, proporcionam maior digestibilidade e palatabilidade dos produtos derivados (FEDDERN; FURLONG; SOARES, 2007), aliado ao fato de que várias BAL tem sido correlacionadas com propriedades probióticas, por agirem influenciando positivamente o organismo e aumentando o valor nutritivo e terapêutico dos alimentos, através do equilíbrio microbiano intestinal e das funções fisiológicas do trato intestinal humano (GOLDIN, 1998; SHAH, 2001). No entanto, pouco tem sido explorado quanto ao seu papel como agentes de degradação de compostos tóxicos como as micotoxinas.

A presente pesquisa é justificada pela demanda por técnicas de descontaminação avaliadas quanto à biodisponibilidade e toxicidade de compostos após fermentação empregando culturas iniciadoras utilizadas tradicionalmente na indústria alimentícia, assim como as culturas probióticas.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a ação de bactérias ácido-láticas na concentração, biodisponibilidade e citotoxicidade de aflatoxina M₁ e Aflatoxina B₁ em leite fluido e avaliar a ação dessas bactérias e dos diferentes tratamentos térmicos aplicados ao leite nos níveis totais e disponíveis de riboflavina (vitamina B₂).

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar a ocorrência de AFM₁ e AFB₁ em amostras de leite UAT desnatado, semidesnatado e integral produzidas e comercializadas no Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná nas quatro estações do ano.

- Estudar o efeito dos tratamentos térmicos aplicados às amostras de leite cru refrigerado homogeneizado nos níveis de lipídios, proteína bruta, lactose e riboflavina.

- Estudar o efeito das BAL *Lactobacillus delbruecki* subsp. *bulgaricus*, *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* STI 12, *Lactobacillus acidophilus* La-5 e *Bifidobacterium lactis* HN019 nos níveis de AFM₁, AFB₁ e da riboflavina em leite durante a produção de derivados fermentados.

- Determinar a biodisponibilidade da AFM₁, AFB₁ e da riboflavina em amostras de leite submetidas à fermentação com as BAL.

- Avaliar a citotoxicidade do produto lácteo fermentado produzido com leite contaminado com AFM₁ e AFB₁.

CAPÍTULO II

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 COMPOSIÇÃO NUTRICIONAL DO LEITE

Leite, sem outra especificação, constitui o produto oriundo da ordenha completa e ininterrupta, em condições de higiene, de vacas sadias, bem alimentadas e descansadas (BRASIL, 2011). Seu consumo é destinado a diversas faixas etárias e é recomendado somente após processamento industrial. Os leites processados são diferenciados e definidos de acordo com o processo térmico ao qual são submetidos, podendo ser classificados como leite cru refrigerado, leite pasteurizado, leite Ultra Alta Temperatura (UAT) ou *Ultra High Temperature* (UHT, como é mais conhecido) e leite em pó. Quanto ao consumo de leites processados destacam-se o leite pasteurizado e UAT. O leite pasteurizado é definido como o leite submetido à pasteurização a temperaturas de 72 a 75°C durante 15 a 20 s seguido de refrigeração a temperatura inferior a 4°C (BRASIL, 2011). O leite UAT, é definido como o leite homogeneizado que foi submetido, durante 2 a 4 segundos, a uma temperatura de 130°C, mediante um processo térmico de fluxo contínuo, imediatamente resfriado a uma temperatura inferior a 32° C e envasado sob condições assépticas em embalagens estéreis e hermeticamente fechadas (BRASIL, 1997). Quando o leite for destinado a abastecimento público ou produção de derivados lácteos pode ser adotada a pasteurização lenta (*Low Temperature, Long Time* -LTLT), na qual são utilizadas temperaturas em torno de 63°C durante 30 min. O leite é classificado ainda de acordo com seus teores de gordura como integral (mínimo 3,0 g.100 g⁻¹), semidesnatado (0,6 a 2,9 g.100 g⁻¹) e desnatado (máximo 0,5 g.100 g⁻¹) (BRASIL, 2011).

O leite é considerado um alimento completo, composto por uma mistura de nutrientes essenciais para a alimentação, com ampla disponibilidade, como água (87,3%), proteínas de alto valor biológico (3,3 a 3,5%), carboidratos (4,9%), lipídios (3,5 a 3,8%), minerais (0,7%) e vitaminas, que juntos, fornecem elementos importantes à manutenção da saúde (SGARBIERI, 2005).

A maioria das vitaminas são encontradas no leite porém este alimento é boa fonte apenas de vitamina A, riboflavina (B₂) e cianocobalamina (B₁₂), pois os níveis das vitaminas C e D e as demais vitaminas do complexo B não atingem as quantidades necessárias para satisfazer as necessidades dos mamíferos (LOBATO, 2000).

Estudos confirmam que o leite é responsável por cerca de 38% e 46% da riboflavina (vitamina B₂) consumida na dieta de americanos e ingleses, respectivamente (SCOTT et al.,

1984; USDA, 1987). A riboflavina é uma vitamina hidrossolúvel do complexo B (GATTI; GIOIA, 2005), e sua deficiência na dieta humana, caracterizada por glossite, queratose, dermatite e neutropenia, é endêmica em muitas regiões do mundo e em certas populações que apresentam baixas ingestões das suas principais fontes: fígado, leite e derivados, rim, carne, ovos, ostras, germe de trigo, nabos, beterraba e farelo de arroz (ANICETO et al, 2000; FRANCO, 2002; POWERS, 2003).

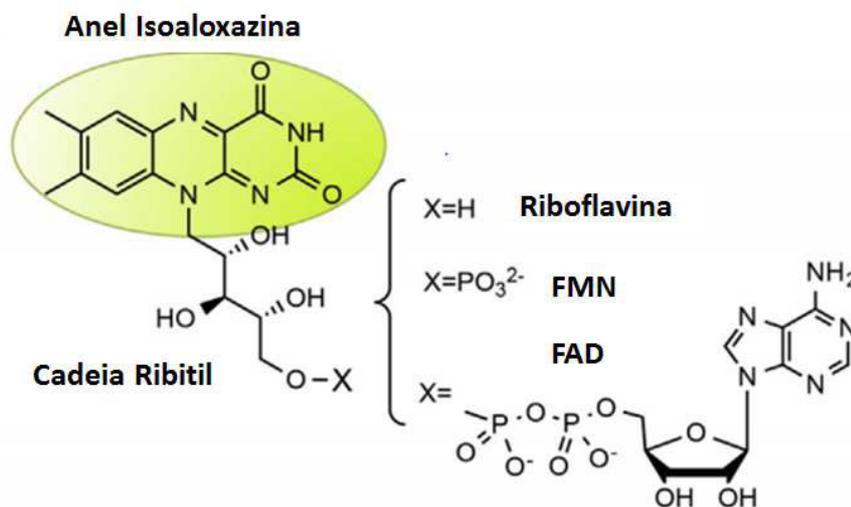
A riboflavina quimicamente é uma 7,8-dimetil-10-ribitol-isoaloxazina, é constituída por um anel isoaloxazina (flavina) substituído na posição N10 por um carboidrato ribitol (Figura 1). É um pó de cor laranja-amarelada, estável ao calor, sensível à luz e fracamente solúvel em água e ácido. Suas formas derivadas flavina adenina dinucleotídeo (FAD) e flavina mononucleotídeo (FMN), são altamente solúveis em água em função de estarem associadas a grupos fosfatos iônicos. O anel isoaloxazina da riboflavina e seus derivados é o responsável pela absorção em UV (BEZTSINNA et al., 2016; POWERS, 2003). A riboflavina proveniente da dieta encontra-se na forma das coenzimas FAD e FMN ligadas a proteínas; no entanto, quando o bolo alimentar chega ao estômago, o meio ácido propicia a liberação das coenzimas. As coenzimas livres serão metabolizadas pelas pirofosfatases e fosfatases, presentes no intestino delgado, levando à liberação da riboflavina (SOUZA et al., 2005).

Os níveis vitamínicos do leite podem ser afetados direta ou indiretamente pelos processamentos térmicos ao qual a matéria prima é submetida, devido principalmente às características termo e fotossensíveis de algumas vitaminas (ABRANCHES et al, 2008; MUÑOZ; ORTIZ; MURCIA, 1994). O enriquecimento do leite com esse nutriente é uma prática comum, que pode ser aplicada tanto para compensar as perdas ocorridas durante o processo de desengorduramento parcial ou simplesmente para aumentar o seu valor nutritivo. Programas de enriquecimento de alimentos e políticas educativas sobre a importância das vitaminas têm sido implementados por alguns governos para que o leite continue sendo uma fonte de vitaminas, independente dos processos aos quais seja submetido (LIMA-PALLONE; CATHARINO; GODOY, 2006; MARTINS; COITINHO; SANTOS, 2007).

Dentre as vitaminas presentes no leite, a vitamina B₂ (riboflavina) é a mais susceptível à luz, temperatura e até mesmo processos fermentativos (ADLER et al., 2013; SAIDI; WARTHESEN, 1993) e mesmo a sua suplementação é dificultada por esses processos. Os processos fermentativos promovem melhorias na qualidade do produto e podem diminuir os riscos de contaminações microbiológicas e por micotoxinas (KABAK; OZBEY, 2012a). A ação da fermentação sobre o conteúdo de vitamina B₂ no leite pode ser afetada pelas diferentes cepas utilizadas e também pelas condições aplicadas, podendo desta forma, ter os

seus níveis diminuídos ou estabilizados (REIF; SHAHANI; CROWE, 1976; SAIDI; WARTHESEN, 1993).

Figura 1 - Estruturas da riboflavina, FMN e FAD.



Fonte: Adaptado de BEZTSINNA et al., (2016).

Os fatores que influenciam na biodisponibilidade das vitaminas incluem: composição da dieta, a qual pode influenciar na velocidade de trânsito intestinal, viscosidade, características emulsificantes e pH; forma da vitamina e interações entre a vitamina e algum componente da dieta alimentar que interferem na absorção intestinal da vitamina (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010).

A biodisponibilidade das formas de ocorrência natural da riboflavina é pouco conhecida, pois a importância nutricional dos derivados de riboflavina na dieta, que tenham potencial de atividade anti-vitáminica, ainda não foi determinada em animais ou humanos. As formas covalentes ligadas de coenzimas FAD mostraram disponibilidade muito baixa quando administradas em ratos, embora essas sejam as formas minoritárias de vitamina. (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010).

A vitamina B₂ também pode ter sua biodisponibilidade afetada em decorrência da qualidade do leite, com relação a contaminantes químicos como micotoxinas, bem como após processos de fermentação, devido aos produtos gerados. É importante salientar que são escassos os estudos que avaliam a taxa de absorção da vitamina B₂ em seres humanos a partir de amostras de leite naturalmente contaminadas por aflatoxinas M₁ e B₁ ou após aplicação de processo fermentativo para redução desses contaminantes.

3.2 DERIVADOS LÁCTEOS FERMENTADOS

Os leites fermentados são considerados um produto com elevado potencial para o desenvolvimento de novos produtos e aplicação de novas tecnologias pela indústria de laticínios, principalmente por proporcionarem melhorias à saúde, devido principalmente a três características: propriedades tecnológicas da matriz láctea, como permitir a viabilidade funcional de ingredientes adicionados ao produto; elevada praticidade dos derivados lácteos e a relação que os consumidores fazem dos produtos lácteos com aspectos relacionados à saúde (COSTA et al., 2013).

A Instrução Normativa 46, legislação de 2007 (BRASIL, 2007), dispõe que Leites Fermentados são os produtos adicionados ou não de outras substâncias alimentícias, obtidas por coagulação e diminuição do pH do leite, ou reconstituído, adicionado ou não de outros produtos lácteos, por fermentação láctica mediante ação de cultivos de micro-organismos específicos, viáveis ativos e abundantes no produto final durante seu prazo de validade. A legislação especifica o iogurte, que é um dos derivados lácteos mais popular, como o produto cuja fermentação se realiza com cultivos protosimbióticos de *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, aos quais podem acompanhar de forma complementar, outras BAL que, por sua atividade, contribuem para a determinação das características do produto final. A contagem mínima de BAL é de 10^7 UFC.g⁻¹ para produtos fermentados e 10^6 UFC.g⁻¹ para produtos fermentados com *Bifidobacterium* com acidez entre 0,6 e 2,0 g de ácido láctico.100g⁻¹ (BRASIL, 2007).

As BAL são um grupo heterogêneo de bactérias gram-positivas, não formadoras de esporos, aerotolerantes, fermentadoras de açúcar, encontradas em vários alimentos, inclusive em leites e derivados e tem o ácido láctico como principal produto da sua fermentação (MOZZI; RAYA; VIGNOLO, 2010; WALSTRA; WOUTERS; GEURTS, 2006). As BAL incluem os seguintes gêneros: *Aerococcus*, *Alloiococcus*, *Carnobacterium*, *Dolosigranulum*, *Enterococcus*, *Globicatella*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Lactosphaera*, *Leuconostoc*, *Mlissococcus*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* e *Weisella* (CROWLEY; MAHONY; VAN-SINDEREN, 2013). Ocorrem naturalmente em diferentes fontes de alimentos e têm sido utilizada na fermentação de alimentos, não conferindo risco à saúde uma vez que possuem certificado GRAS (*Generally Recognized as Safe*). Além disso, possuem atividade antimicrobiana, efeitos benéficos à saúde e são consideradas alternativas a conservadores químicos (DIVYA; VARSHA; NAMPOOTHIRI, 2012; DIVYA et al., 2012).

Algumas BAL que podem ser usadas no preparo de iogurtes e leites fermentados são probióticas, ou seja, micro-organismos viáveis que afetam benéficamente a saúde do hospedeiro por promoverem balanço da microbiota intestinal, sendo *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* as espécies mais utilizadas como probióticos (FAO/WHO, 2002).

Bactérias pertencentes aos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* são mais frequentemente empregadas como suplementos probióticos para alimentos, uma vez que elas têm sido isoladas de todas as porções do trato gastrointestinal do humano saudável (CHARTERIS et al., 1998; SAAD, 2006). O íleo terminal e o cólon parecem ser os locais de preferência para colonização intestinal dos lactobacilos e bifidobactérias (BIELECKA; BIEDRZYCKA; MAJKOWSKA, 2002; CHARTERIS et al., 1998), no entanto, deve ser salientado que o efeito de cada bactéria é específico, não podendo ser extrapolado inclusive para outras cepas de mesma espécie (GUARNER; MALAGELADA, 2003).

Esses gêneros de bactérias produzem compostos orgânicos, decorrentes da atividade fermentativa, como ácido láctico, peróxido de hidrogênio e ácido acético, responsáveis pelo aumento da acidez intestinal, e substâncias denominadas bacteriocinas, proteínas metabolicamente ativas que auxiliam na destruição de micro-organismos indesejáveis inibindo a proliferação bacteriana e o dano ao epitélio intestinal. Os lactobacilos e as bifidobactérias são capazes ainda de promover a lise de proteínas com potencial alergênico no trato gastrointestinal, contribuindo desta forma para a redução de processos alérgicos, minimizando o risco de alergia alimentar (MORAIS; JACOB, 2006).

Os *Lactobacillus* são gram positivos, incapazes de formar esporos, desprovidos de flagelos, possuem forma bacilar ou cocobacilar, e são aerotolerantes ou anaeróbios. O gênero compreende 56 espécies oficialmente reconhecidas e as mais utilizadas para fins probióticos são *L. acidophilus*, *L. rhamnosus* e *L. casei* (GOMES; MALCATA, 1999). As *Bifidobacterium* por sua vez, não são consideradas bactérias ácido lácticas “verdadeiras”, pois produzem tanto ácido acético quanto ácido láctico (heterofermentativas). São bactérias gram-positivas, anaeróbias estritas, não formadoras de esporos, caracterizadas frequentemente por uma bifurcação em forma de Y. (HOLT, 1994). Colonizadoras predominantes do intestino humano e animal, reconhecidas como seguras na sua maioria, o gênero *Bifidobacterium* é composto por 37 espécies diferentes, onde destacam-se: *B. bifidum*, *B. breve*, *B. infantis*, *B. lactis*, *B. animalis*, *B. longum* e *B. thermophilum* (TURRONI; SINDEREN; VENTURA, 2011). As bifidobactérias predominam no intestino grosso, principalmente ao nível de colon proximal, enquanto que os lactobacilos são mais prevalentes na porção dista e no intestino delgado (PERDIGÓN et al., 2003).

Além das vantagens tecnológicas atribuídas à adição de BAL em leite, relacionadas à melhoria nas características sensoriais, reológicas e organolépticas do produto, esses microorganismos ainda podem apresentar propriedades funcionais e de proteção aos alimentos, uma vez que vários estudos relacionam as BAL à síntese de compostos vitamínicos (FABIAN et al., 2008; KEUTH; BISPING, 1993; KNEIFEL et al., 1992) além da degradação de contaminantes químicos como as micotoxinas (EL KHOURY et al., 2011; EL NEZAMI et al. 1998; HASKARB et al. 2001; PELTONEN et al., 2000, 2001; SARIMEHMETOGLU; KÜPLÜLÜ, 2004).

3.3 CONTAMINAÇÃO DO LEITE POR AFLATOXINAS: MECANISMOS E RISCOS

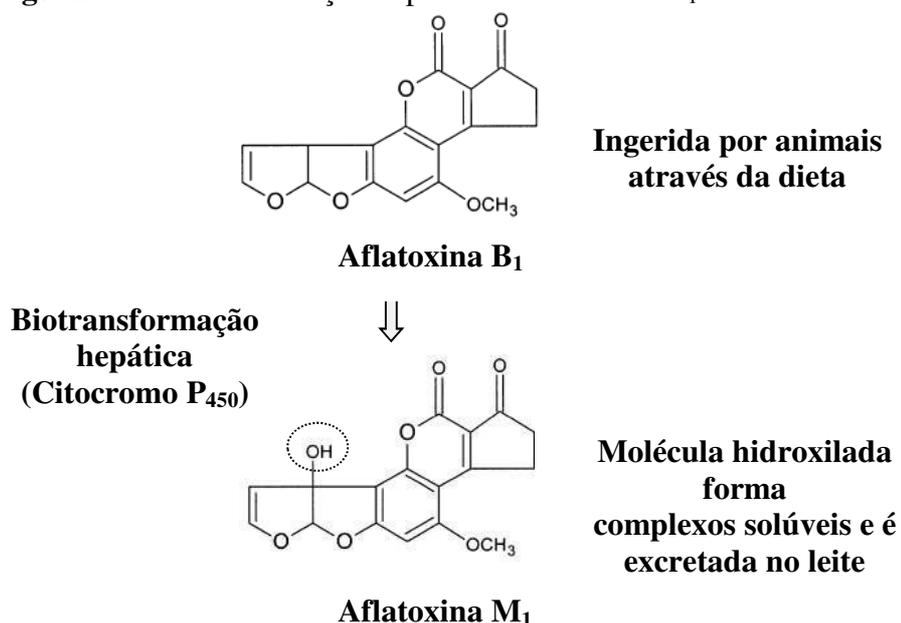
Aflatoxinas constituem um grupo de metabólitos secundários das espécies fúngicas *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus* (PRANDINI et al., 2009). As estruturas químicas policíclicas são do tipo furanocumarinas, que se ingeridas promovem efeitos hepatotóxicos, carcinogênicos e imunossupressores (WILLIAMS et al., 2004). A substituição e organização da estrutura cíclica da furacumarina permite classificar as aflatoxinas em B₁, B₂, G₁, G₂, M₁, M₂ e outras derivadas que possuem propriedades físico-químicas e toxicidade diferenciada (COULOMBE, 1991).

Quando mamíferos em lactação são alimentados com ração contaminada por aflatoxina B₁ (AFB₁), que é metabolizada pelo sistema de enzimas do citocromo P₄₅₀ no fígado em diversos metabólitos (Figura 2) e, por meio da hidroxilação no carbono terciário do sistema de anel difurano cumarina, é convertida para seu principal metabólito a aflatoxina M₁ (AFM₁) (FALLAH et al., 2009). Estes compostos por conterem o grupamento hidroxila são bastante solúveis em água, o que possibilita sua rápida excreção através da urina, bÍlis, fezes ou leite. Aproximadamente 0,3 a 6,2% da AFB₁ presente em alimentos destinados aos animais é transformada em AFM₁ no leite (PEI et al., 2009). Essa taxa de transformação pode variar entre as espécies mamíferas e a AFM₁ pode ser detectada no leite entre 12 e 24 h após a ingestão de AFB₁ (RAHIMI et al., 2010; SADIA et al., 2012).

A contaminação por micotoxinas em leite e derivados passou a ser uma preocupação em meados dos anos 60, quando foram relatados os primeiros casos de ocorrência de AFM₁ em amostras de leite. Neste período, a ingestão de ração contaminada com aflatoxina B₁ era relativamente alta, a produção de leite era baixa e os métodos analíticos pouco eficientes, permitindo determinar concentrações de AFM₁ no leite variando entre 0,2 e 4% em relação aos níveis de AFB₁ ingerida da ração (PETTERSON, 1997; VAN EGMOND, 1989). A partir

de então a incidência deste contaminante em amostras de leite cru e processadas foi relatada em diferentes regiões do mundo (BILANDZIC; VARENINA; SOLOMUN, 2010; FERNANDES et al., 2012; HASSAN; KASSAIFY, 2014; LEE et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2013; PEI, et al., 2009; SCAGLIONI et al., 2014). Ainda estudos que relatam a presença de AFB₁ não metabolizada em amostras de leite (CARVAJAL et al., 2003; SCAGLIONI et al., 2014), aumentando ainda mais os riscos de danos recorrentes da exposição a esta classe de micotoxinas.

Figura 2 - Biotransformação hepática da aflatoxina B₁ em aflatoxina M₁.



Fonte: BECKER-ALGERI et al. (2016)

O limite de AFM₁ em leite adotado pela União Européia é de 0,05 µg.L⁻¹ (CE, 1998). O regulamento técnico do Mercosul estabeleceu níveis de 0,5 ug.L⁻¹ e 5,0 µg.L⁻¹ para leite fluido e leite em pó, respectivamente (MERCOSUL, 1994), sendo estes ainda os limites utilizados pela legislação brasileira (BRASIL, 2012).

O potencial carcinogênico da AFM₁ é significativamente inferior ao da AFB₁, como tal, a AFM₁ e a AFB₁ possuem uma TD₅₀ (teor de micotoxina passível de causar desenvolvimento de tumores malignos em 50% dos indivíduos) de 10,4 e 1,2 µg/kg p.c. (peso corporal)/dia, respectivamente, o que pressupõe que a AFM₁ é cerca de nove vezes menos carcinogênica que a AFB₁. Os fatores que influenciam a toxicidade da AFM₁ em seres humanos são a biodisponibilidade, os efeitos sinérgicos entre classes de contaminantes, os

teores de micotoxinas ingeridos diariamente em função da sua concentração e da quantidade dos alimentos ingeridos, a continuidade ou intermitência da ingestão do alimento contaminado, o peso do indivíduo bem como o estado de saúde e condição fisiológica e a idade do indivíduo. Mesmo a toxicidade da AFM₁ ser menor que do seu precursor, a AFB₁, o risco da presença dela em amostras de leite está diretamente relacionado com a saúde pública, uma vez que as crianças e os jovens são mais sensíveis à toxicidade desses contaminantes devido à maior variabilidade do metabolismo basal e que eventualmente não possuem todos os mecanismos bioquímicos suficientes para a detoxificação, agravado pelo fato de que nesta faixa etária ocorre o maior consumo de leite e derivados (FARIAS et al., 2005).

Quanto ao mecanismo de toxicidade crônica da AFB₁, decorre da ação do sistema enzimático P-450 que forma epóxidos intermediários ativos, que se ligam ao DNA e induzem mutações cancerígenas, embora parte destes epóxidos possa ser executado pela ação da glutathione S-transferase (GST). Existem diferenças significativas na sensibilidade para os efeitos agudos (formação de aduto, danos citotóxicos) e crônicos (carcinogenicidade) da AFB₁ entre espécies (CROY; WOGAN, 1981; DEGEN; NEUMANN, 1981; GORELICK, 1990; HENGSTLER et al., 1999; O'BRIEN et al., 1983; WONG; HSIEH, 1980).

A ligação da AFB₁-epóxido com o DNA modifica a sua estrutura e, conseqüentemente, a sua atividade biológica, originando assim os mecanismos básicos dos efeitos mutagênicos e carcinogênicos da AFB₁. A ocorrência deste tipo de alteração é característica de vários carcinomas no homem, sobretudo o hepático. Os adutos de RNA e de proteínas determinam lesões bioquímicas, as quais devem, provavelmente, estar envolvidas com os mecanismos de toxicidade aguda da AFB₁, dado que conduzem à morte celular pela inativação de macromoléculas essenciais às células. A formação destes adutos inicia-se com a hidrólise da AFB₁-epóxido para produzir 8,9-dihidro-8,9-dihidroxi-B₁ (ou B₁-diol), o qual reage com amino-grupos primários de proteínas, originando bases de *Schiff*. Os principais adutos de proteínas são formados com albumina, durante a sua síntese nos hepatócitos. Além da epoxidação, a biotransformação primária da AFB₁ inclui a hidroxilação, para formar as aflatoxinas M₁, Q₁ e B_{2a}; e o-demetilação, para formar aflatoxina P₁. Todos estes compostos contêm o grupo hidroxila na molécula, o que permite a conjugação com ácido glicurônico ou sulfatos (NEAL et al., 1998).

Na literatura existem poucos estudos que reportam sobre a absorção e metabolismo da AFM₁ no organismo humano, ao contrário ocorre com animais. Em ratos, a AFM₁ é tão tóxica quanto a AFB₁ (PONG; NOGAN, 1971), embora, com base em valores de DL-50, alguns autores tem demonstrado que, em patos com 1 dia de idade a AFM₁ é menos mutagênica

(PURCHASE, 1963). Neal et al. (1998), avaliaram que os microsossomas hepáticos humanos tem capacidade muito limitada para catalisar a epoxidação da AFM₁, e este epóxido também tem menor capacidade que a AFB₁ de se ligar a proteína microsossomal. O potencial tóxico direto da AFM₁ na ausência da ação do citocromo P-450 mediante ativação foi demonstrado, usando uma linha celular de linfoblastóide com ou sem uma expressão estável do P-450. Estudos preliminares demonstraram que a AFB₁ reduzia a estabilidade de células mamárias epiteliais na faixa de concentração entre 4 e 16 µM, sendo o provável mecanismo para esta redução relacionado com a formação de adutos de DNA AFB₁-8,9-exo-epóxido (AFBO), o que provoca danos no DNA. Ela pode também atuar desencadeando aflatoxicoses quando se liga a aminoácidos de proteínas *in vitro* (BEDARD; MASSEY, 2006; CARUSO et al., 2009; HAMID et al., 2013).

Embora as toxicidades da AFB₁ e a da AFM₁ estejam comumente relacionadas com células hepáticas, há evidências de que o risco da exposição também lesiona outros órgãos ou células humanas, como as intestinais. Os dados biológicos dos efeitos tóxicos associados com o trato intestinal são relativamente limitados, especialmente com relação a danos no DNA, no entanto, estudos têm demonstrado que a AFB₁ e M₁ podem diminuir a sobrevivência de células intestinais diferenciadas e indiferenciadas (CALONI et al., 2006; GUERRA et al., 2005). Zhang et al. (2015) avaliaram pela primeira vez o efeito da exposição de diferentes concentrações das aflatoxinas M₁ e B₁ (0,01 a 1 µg.mL⁻¹) à células de adenocarcinoma humano Caco-2 diferenciadas e indiferenciadas. Em tempos de exposição de até 72 horas, foi observada a redução da viabilidade celular dependendo da dose e do tempo de exposição. As células Caco-2 incubadas com AFB₁ foram significativamente inibidas com níveis de exposição mais baixos comparativamente ao da AFM₁. A exposição das células às diferentes concentrações de aflatoxinas também resultou em danos ao DNA, indicados pelas espécies reativas ao oxigênio, demonstrando que estas micotoxinas são citotóxicas e genotóxicas também a células intestinais. Caloni et al. (2006) avaliaram a citotoxicidade da AFM₁ em células Caco-2, através dos ensaios de TPC (*Total Protein Content*) e NRU (*Neutral Red Uptake*), e observaram que nos níveis de contaminação estudados (0,001 a 10,0 µg.Kg⁻¹) a AFM₁ não foi citotóxica após 48 horas de incubação. No entanto, quando avaliados a integridade da membrana celular por meio do ensaio de LDH, foram observados valores significativamente maiores de liberação da enzima, sugerindo que esta micotoxina pode induzir a redução dos enterócitos imaturos, por meio de uma reversível injúria da membrana plasmática.

Uma vez elucidados os mecanismos de toxicidade das aflatoxinas, é de extrema importância a avaliação dos teores encontrados no leite bem como das doses disponíveis para absorção no organismo humano a partir da análise da biodisponibilidade destes compostos, para posterior avaliação dos reais riscos da ingestão do alimento contaminado.

3.4 BACTÉRIAS ÁCIDO LÁCTICAS: SÍNTESE DE VITAMINAS E INIBIÇÃO DE AFLATOXINAS

As BAL constituem um grande grupo de bactérias, que além de produzirem o ácido láctico, possuem características comuns como serem gram-positivas, não-esporogênicas, não se locomoverem espontaneamente, e serem catalase e oxidase negativas. Esses micro-organismos fermentam açúcares e tendem a ser nutricionalmente exigentes, frequentemente requerendo aminoácidos específicos e vitaminas do complexo B como fatores de crescimento (WALSTRA; WOUTERS; GEURTS, 2006). Vários gêneros de BAL, como *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* e *Lactococcus*, são conhecidos por sua capacidade de atuarem como agentes conservadores em produtos alimentícios fermentados, como vegetais, cereais, produtos lácteos e carnes, aonde inibem a deterioração e as bactérias patogênicas, melhorando, portanto a vida de prateleira e as propriedades sensoriais (PELTONEM et al, 2001). As BAL agindo isoladamente ou de forma combinada, podem controlar o desenvolvimento de fungos e melhorar a vida útil de produtos fermentados, e conseqüentemente reduzir os riscos à saúde em decorrência da ingestão de micotoxinas (GOURAMA; BULLERMAN, 1997).

Além de ser uma opção como agente descontaminante, os processos fermentativos aumentam a disponibilidade de nutrientes nas matérias-primas, os níveis elevados de vitaminas do complexo B e de alguns aminoácidos, melhoram a utilização da lactose, além de proporcionarem melhor digestão e palatabilidade das mesmas (FEDDERN; FURLONG; SOARES, 2007; GOMES; MALCATA, 1999; HONG; MARSHALL, 2001). Algumas cepas de BAL são capazes de produzir/liberar e/ou diminuir compostos benéficos específicos em alimentos. Dentre os nutrientes gerados pelas BAL estão as vitaminas (HUGENHOLTZ; SMID, 2002), portanto trata-se de uma alternativa mais natural e economicamente viável de fortificação ao invés de adição de vitaminas sintéticas com a finalidade de produzir alimentos enriquecidos (LEBLANC et al. 2011).

A síntese da riboflavina tem sido descrita tanto em bactérias gram-positivas como em gram-negativas (PERKINS; PERO 2002) e quando ocorre a partir dos precursores de guanosina trifosfato (GTP) e d-ribulose-5-fosfato se dá através de sete passos enzimáticos

(BACHER et al., 2000). O anel de imidazol de GTP é hidroliticamente aberto, dando origem a uma 4,5-diaminopirimidina, que é convertida em 5-amino-6-ribitilamino-2,4 (1H, 3H)-pirimidinodiona por uma sequência de desaminação, redução da cadeia lateral e desfosforilação. A condensação de 5-amino-6-ribitilamina-2,4(1H, 3H) - pirimidinodiona com 3,4-di-hidroxi-2-butanona 4-fosfato obtidos a partir da ribulose 5-fosfato proporciona 6,7-dimetil-8-ribitilumazina. A dismutação dos rendimentos derivados de lumazina riboflavina e 5-amino-6-ribitilamina-2,4 (1H, 3H)-pirimidinodiona, que é reciclado na via biossintética (BACHER et al., 2000).

A síntese e liberação de vitaminas também foram relatadas em produtos lácteos fermentados como requeijão, iogurte, manteiga e outros alimentos à base de cereais fermentados. Além disso, micro-organismos benéficos presentes no trato gastrointestinal, têm sido avaliados como uma fonte de vitaminas hidrossolúveis (CAPOZZI et al., 2011). Dentre as vitaminas produzidas pelas BAL, destaca-se a riboflavina, que é uma vitamina presente em diversas fontes alimentícias, no entanto, não na quantidade suficiente para suprir as necessidades diárias do ser humano (PUTMAN; ALLSHOUSE, 2003).

Várias bactérias foram avaliadas quanto ao poder de produção e liberação da riboflavina, e neste caso a seleção das cepas é importante para obter as concentrações de interesse (LEBLANC et al., 2011). Em leites as culturas iniciadoras de iogurte foram estudadas quanto à produção de vitaminas do complexo B, ficando demonstrada a capacidade dessas BAL para produzir riboflavina. No entanto algumas culturas probióticas de lactobacilos consomem essas vitaminas durante a fermentação, diminuindo sua biodisponibilidade e teores no produto final, reforçando a importância do estudo da adição de diferentes cepas de BAL para aumentar os níveis da vitamina no produto fermentado lácteo (FABIAN et al. 2008; LEBLANC et al., 2011).

Bactérias do gênero *Streptococcus* e *Enterococcus* foram utilizadas na produção de fermentados a partir de derivados de soja e avaliadas quanto à produção de riboflavina ocorrendo aumento significativo da concentração da vitamina nos produtos fermentados (KEUTH; BISPING, 1993). Jayashree, Jayaraman e Kalaichelvan (2010) rastrearam 48 diferentes espécies de bactérias fermentadoras de produtos lácteos, e observaram que em meio quimicamente definido (Chemically Defined Medium - CDM) somente o *Lactobacillus fermentum* MTCC 8711 foi capaz de produzir riboflavina, com produção média de 3 mg.L⁻¹ após 24 horas de incubação. Em recente estudo Silva et al. (2016) isolaram 179 BAL de leite de cabra, e destas, 151 (84%) foram capazes de produzir folato ou riboflavina em concentrações médias de 138 ng.mL⁻¹ e 364 ng.mL⁻¹, respectivamente. Os autores obtiveram a

partir de sequenciamento genético, 19 diferentes perfis genéticos e 7 espécies foram identificadas, com predominância para *S. thermophilus* (7), *Weissella paramesenteroides* (6) e *Lactococcus lactis* (4).

Além da síntese de nutrientes um dos efeitos verificado nas BAL é a proteção contra toxinas contidas nos alimentos, como aminas heterocíclicas aromáticas, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, espécies reativas de oxigênio e micotoxinas. Neste último, pesquisas têm demonstrado que as BAL possuem a propriedade de inibir a síntese de aflatoxinas, ou ainda, possuem a habilidade de remover a micotoxina do meio minimizando a ação delas (FUCHS et al., 2008).

A degradação de aflatoxinas utilizando micro-organismos oferece uma alternativa eficaz para o controle ou eliminação de aflatoxinas em alimentos e rações, mantendo sua qualidade e segurança (ALBERTS et al., 2009), além de poder ser utilizada como composto natural, tornando o produto mais aceitável quando comparado aos expostos à tratamentos químicos (BATA; LASZTITY, 1999). As BAL são um dos micro-organismos mais estudados para degradar as aflatoxinas e os resultados são promissores (BOVO, 2011; KABAK; OZBEY, 2012b). A inibição é, em parte, atribuída aos produtos finais da fermentação, como ácido lático, diacetil, acetaldeído e ácido acético ou por subprodutos secundários da atividade metabólica, tais como peróxido de hidrogênio ou bacteriocinas (ONILUDE et al., 2005). Durante a lise celular, é possível que BAL liberem moléculas que inibem potencialmente o crescimento de fungos e, portanto levam a uma menor acumulação das suas micotoxinas (GOURAMA; BULLERMAN, 1995). Esses metabólitos “anti-micotoxigênicos” podem também ser produzidos durante o crescimento das BAL. Gourama e Bullerman (1997) realizaram um ensaio de diálise e observaram a ocorrência de um metabólito que inibe os níveis de aflatoxina em extratos livres de *Lactobacillus*. Esses resultados também foram observados por Coallier-Ascah e Idziak (1985) que observaram uma significativa redução da síntese de aflatoxina no sobrenadante livre de *Lactobacillus* e sugeriram que essa inibição foi relacionada com um composto estável ao calor de baixo peso molecular.

Estudos *in vitro* mostraram que a ligação entre a AFB₁ e as BAL é um processo rápido (menos de 1 min) e reversível (BUENO et al., 2006) e que depende da cepa e da dose de micotoxina utilizadas (KANKAANPÄÄ et al., 2000). O poder de ligação entre as BAL e a AFM₁ foi avaliado em soluções tampão (EL KHOURY et al., 2011; PIERIDES et al., 2000; SARIMEHMETOGLU; KÜPLÜLÜ, 2004) e em amostras de leite submetidas a fermentação (EL KHOURY et al. 2011; SARIMEHMETOGLU; KÜPLÜLÜ, 2004) ficando demonstrada a

interferência da matriz na ligação das micotoxinas, no entanto, os tipos de interação não foram elucidados.

A maioria dos estudos relacionados à aplicação de BAL na remoção de aflatoxinas são realizados em solução tampão, pois em amostras de leite elas estão associadas à caseína do leite, principalmente em amostras desnatadas, diminuindo a sua biodisponibilidade frente aos processos fermentativos (PIERIDES et al., 2000). Devido a este fato é importante a averiguação de processos que avaliem a biodisponibilidade destes contaminantes após a digestão da amostra, uma vez que, durante este processo, a biodisponibilidade da caseína aumenta, podendo oferecer efeito igual no caso das micotoxinas.

3.5 BIODISPONIBILIDADE DAS AFLATOXINAS

Para demonstrar quaisquer efeitos prejudiciais sobre um tecido ou órgão, a aflatoxina deve ser primeiramente liberada da sua matriz e em seguida, ser absorvida pelo intestino através das células intestinais (VERSANTVOORT et al., 2005).

Estudos em humanos e animais demonstram que a biodisponibilidade oral dos compostos pode variar de acordo com a matriz alimentícia, processamento ou preparo do alimento (WIENK; MARX; BEYENEN, 1999; VAN HET VOF et al., 2000). Assim uma melhor compreensão do efeito da matriz sobre a biodisponibilidade oral de um contaminante permite uma avaliação mais precisa do risco à saúde. A biodisponibilidade oral pode ser vista como o resultado de três processos: liberação do composto a partir da sua matriz em suco digestivo no trato gastrointestinal (bioacessibilidade); transporte através do epitélio intestinal para a veia porta (transporte intestinal); degradação do composto no fígado e intestino (metabolismo). A biodisponibilidade pode ser reduzida durante o transporte do contaminante através do epitélio intestinal ou por degradação do contaminante. Portanto, a determinação da bioacessibilidade de um contaminante a partir da sua matriz pode ser vista como um indicador para a biodisponibilidade oral máxima do contaminante (VERSANTVOORT et al., 2005).

A avaliação quantitativa da biodisponibilidade e bioacessibilidade de compostos a partir de diferentes matrizes é um processo complexo principalmente devido às etapas que compreendem a digestão, por isso, modelos de digestão *in vitro* vêm sendo cada vez mais utilizados para estudar a biodisponibilidade oral humana de compostos contaminantes de leites e outros alimentos (KABAK; OZBEY, 2012b; OOMEN et al. 2003). Os modelos de digestão *in vitro* simulam o processo de digestão a partir da aplicação das condições fisiológicas reais, como por exemplo composição dos fluidos digestivos, pH, temperatura e

tempo de permanência do alimento em cada compartimento. Os fluidos digestivos são preparados artificialmente e a digestão inicia no compartimento da boca (saliva), seguido de estômago (suco gástrico) e intestino delgado (suco duodenal e bile), a fim de avaliar a bioacessibilidade do composto tóxico durante o trânsito da matriz no trato gastrointestinal (VERSANTVOORT et al., 2005).

A bioacessibilidade de micotoxinas a partir de diferentes matrizes alimentícias vem sendo avaliadas a partir de modelos de digestão *in vitro*. Avantaggiato, Havenaar e Visconti (2003, 2004) avaliaram a absorção intestinal de zearalenona (ZEA), deoxinivalenol (DON) e nivalenol (NIV), respectivamente. Kabak e Ozbey (2012a) avaliaram a bioacessibilidade de aflatoxinas em diferentes matrizes alimentícias (amendoins, pistaches, avelãs, figos secos, páprica, trigo e milho) e observaram valores que variaram entre 80 e 98%, e concluíram que, nestes casos, a biodisponibilidade das aflatoxinas não depende diretamente dos níveis de contaminação do alimento e sim do tipo de matriz contaminada. Os mesmos autores, no ano seguinte, realizaram um estudo em amostras de leite, com o intuito de verificar a biodisponibilidade de AFM₁ durante o processo digestivo, e observaram valores de absorção intestinal da micotoxina de 81,7 a 86,2% (KABAK; OZBEY, 2012b).

Além da preocupação quanto aos níveis de absorção intestinal da AFM₁ no organismo humano, a incidência de sua precursora em amostras de leite torna a avaliação da sua biodisponibilidade de suma importância, pois estudos comprovam que a AFB₁ é metabolizada pelo fígado através do sistema enzimático citocromo P₄₅₀ formando o seu metabólito mais carcinogênico, o AFB₁-8,9-epóxido (AFBO), ou, ainda, outras formas menos mutagênicas como AFM₁, Q₁ ou P₁. Existem vários caminhos que a AFBO pode seguir depois de metabolizada, sendo que um deles pode resultar em um câncer, outro em toxicidade, e o outro na sua excreção. A exoforma da AFBO se liga facilmente às macromoléculas celulares, incluindo o material genético, como, por exemplo, as proteínas e DNA, formando adutos. É a formação desses adutos de DNA que leva ao aparecimento de mutações genéticas e câncer, sendo que a sua excreção na urina de pessoas infectadas, não só serve como prova de que os seres humanos têm os caminhos bioquímicos necessários para a carcinogênese, mas também constitui um biomarcador confiável para a exposição a AFB₁ (MURPHY et al, 2006).

Sabendo-se que as aflatoxinas M₁ e B₁ são potencialmente tóxicas para o organismo humano e que, quando contaminantes do leite a bioacessibilidade da AFM₁ é em torno de 85%. Estudos vêm sendo realizados a fim de diminuir a biodisponibilidade desses contaminantes após a ingestão. Dentre os agentes utilizados para este fim, destacam-se as BAL, que tem comprovado poder de ligação tanto com a AFM₁ quanto com a AFB₁, podendo

ser utilizadas como agente para diminuição da bioacessibilidade das aflatoxinas após ingestão do leite contaminado. Kabak e Ozbey (2012b) avaliaram a utilização de BAL de diferentes cepas na diminuição da bioacessibilidade da AFM₁ em amostras de leite contaminadas artificialmente e naturalmente, e observaram reduções de 15,5 a 31,6% nesses teores, sendo as BAL do gênero *Lactobacillus* as que apresentaram melhores resultados. Serrano-Niño et al. (2013) também observaram reduções significativas (entre 20 e 45%) da bioacessibilidade da AFM₁ proveniente de leite fortificado fermentado com BAL, evidenciando desta forma a habilidade dessas bactérias na redução da micotoxina disponível para absorção. Não há relatos de avaliações dos teores de bioacessibilidade e biodisponibilidade da AFB₁ em leite, no entanto, sabendo-se que esta contaminação pode ocorrer, é de suma importância a avaliação também desta micotoxina.

CAPÍTULO III

**ARTIGO I - MICOTOXINAS EM LEITE BOVINO E PRODUTOS LÁCTEOS: UMA
REVISÃO**

RESUMO

Esse artigo apresenta uma revisão de literatura sobre a ocorrência de diversas micotoxinas em leite bovino e derivados lácteos, uma vez que é o principal tipo de leite produzido e comercializado no mundo. As micotoxinas são produzidas por diferentes gêneros de fungos filamentosos e apresentam sérios riscos à saúde como carcinogenicidade e mutagenicidade. Sobre condições favoráveis, os fungos toxigênicos produzem metabólitos secundários (micotoxinas) que contaminam alimentos de vacas lactantes. Durante o metabolismo, essas micotoxinas sofrem biotransformação e são secretadas no leite. Dados mostram que há uma tendência sazonal nos níveis de micotoxinas em leite, sendo estes maiores nos meses frios, provavelmente devido ao armazenamento prolongado necessário para alimentação do gado, proporcionando condições favoráveis para o crescimento de fungos. Boas práticas de agricultura e estocagem são de fundamental importância no controle de espécies toxigênicas e micotoxinas. Apesar de as aflatoxinas (especialmente a AFM₁) serem as micotoxinas com maior incidência em leite e produtos lácteos, essa revisão mostra que outras micotoxinas, como a fumonisina, ocratoxina A, tricotecenos, zearalenona, toxina T-2 e deoxinivalenol, também podem estar presentes nesse alimento. Considerando que o leite é largamente consumido e uma importante fonte de nutrientes, especialmente para crianças, um estudo completo da ocorrência de micotoxinas bem como medidas para minimizar a contaminação do leite são essenciais.

Palavras chave: leite de vaca; ocorrência; toxicidade.

MYCOTOXINS IN BOVINE MILK AND DAIRY PRODUCTS: A REVIEW

ABSTRACT

This paper presents a literature review of the occurrence of several mycotoxins in bovine milk and dairy products, because it is the main type of milk produced and marketed worldwide. Mycotoxins are produced by different genera of filamentous fungi and present serious health hazards such as carcinogenicity and mutagenicity. Under favorable growth conditions, toxigenic fungi produce mycotoxins which contaminate the lactating cow's feedstuff. During metabolism, these mycotoxins under go biotransformation and are secreted in milk. Data show that there is a seasonal trend in the levels of mycotoxins in milk, with these being higher in the cold months probably due to the prolonged storage required for the cattle feeds providing favorable conditions for fungal growth. Good agricultural and storage practices are therefore of fundamental importance in the control of toxigenic species and mycotoxins. Although aflatoxins (especially aflatoxin M₁) are the mycotoxins of greater incidence in milk and dairy products, this review shows that other mycotoxins, such as fumonisin, ochratoxin A, trichothecenes, zearalenone, T-2 toxin, and deoxynivalenol, can also be found in these products. Given that milk is widely consumed and is a source of nutrients, especially in childhood, a thorough investigation of the occurrence of mycotoxins as well the adoption of measures to minimize their contamination of milk is essential.

Keywords: cow's milk, occurrence, toxicity

1 INTRODUÇÃO

As micotoxinas são um grupo de compostos altamente tóxicos produzidos por fungos ou leveduras, que se desenvolvem em lugares que apresentam baixa disponibilidade de água e os quais são inadequados para o crescimento de bactérias (JOUANI, 2001). As formas de preparo e armazenamento de alimentos destinados à alimentação animal, como ração e silagem, podem proporcionar a contaminação por micotoxinas (BRYDEN, 2009, 2012). Quando os animais ingerem alimentos contaminados, as micotoxinas são metabolizadas, biotransformadas e transferidas para os produtos, tal como o leite ou a carne, tornando-se conseqüentemente um risco para a saúde humana (BRUERTON, 2001).

A preocupação com contaminação por micotoxinas em leite e derivados iniciou em meados dos anos 60, quando foram relatados os primeiros casos de contaminação por aflatoxina M₁ (AFM₁), que é o produto secretado no leite oriundo da metabolização da aflatoxina B₁ (AFB₁) no rumem do animal. Durante o ano de 1960, a ingestão de ração contaminada com aflatoxina B₁ era relativamente alta, a produção de leite era baixa e os métodos analíticos pouco desenvolvidos. Estudos têm indicado que valores entre 0,3 e 6,2% da AFB₁ presente na alimentação animal, é metabolizada, biotransformada e secretada no leite na forma de AFM₁, no entanto os níveis de biotransformação variam entre animais ou outros fatores, incluindo fatores nutricionais e fisiológicos, como a dieta, quantidades ingeridas, saúde do animal, capacidade de biotransformação do fígado e produção do animal leiteiro (CREEPY, 2002; DUARTE et al., 2013; UNUSAN 2006; IQBAL; ASI; JINAP, 2013).

Outras micotoxinas, como a ocratoxina (OTA) (BOUDRA et al., 2007; BREITHOLTZ-EMANUELSSON et al., 1993; PATTONO et al., 2013), zearalenona (ZEA) (COFFEY; CUMMINS; WARD, 2009; HUANG et al., 2014; YIANNIKOURIS; JOUANY, 2002), fumonisinas (GAZZOTTI et al., 2009), toxina T-2 e deoxinivalenol (DON) (SORENSEN; ELBAEK, 2005; SWANSON; CORLEY, 1989), podem ser identificadas em amostras de leite e produtos lácteos, apesar de não ser tão estudadas quanto a AFM₁ e a quantidade dessas micotoxinas e seus metabólitos conjugados em leite ser baixa, a falta de estudos é preocupante, uma vez que o leite é uma importante fonte de alimentação, principalmente para crianças.

O leite de vaca é o principal tipo de leite utilizado para consumo humano, corresponde a 83% da produção mundial de leite, seguido por leite de búfala com 13%, leite de cabra com 2% e leite de ovelha com 1%; leite de camelo representa 0,3%. O restante é produzido por outras espécies lactantes, como equinos e iaques (FAO, 2015).

Desta forma, além da micotoxina mais comumente encontrada, a AFB₁, há uma vasta gama de contaminantes de leite e produtos lácteos, portanto, este estudo visa avaliar a contaminação e a incidência de várias micotoxinas no leite e produtos lácteos da espécie bovina destinados ao consumo humano.

2 CONTAMINAÇÃO DO LEITE POR MICOTOXINAS

A qualidade do leite em relação aos contaminantes tóxicos está diretamente relacionada com os tipos e qualidade da alimentação animal seguido do metabolismo das micotoxinas e sua subsequente excreção no leite (JOBIM; GONÇALVES; SANTOS, 2001). O nível de excreção de micotoxinas no leite é geralmente baixa e é afetada pelo peso molecular e lipofilicidade de cada micotoxina. A taxa de transporte também é influenciada pelo gradiente de pH entre o plasma do sangue e o leite, que muda de acordo com a saúde da vaca ou doença que afeta o animal (KALAC, 2011; YIANNIKOURIS; JOUANY, 2002). A absorção das micotoxinas pela glândula mamária pode ocorrer por filtração intercelular, difusão passiva através da membrana celular ou transporte ativo (JOUANY, 2001; YIANNIKOURIS; JOUANY, 2002).

Quando a alimentação do animal é suplementada com silagem, as principais micotoxinas contaminantes são a DON e a ZEA. Os teores de contaminação podem ser reduzidos pela microflora do rúmen, em animais saudáveis, diminuindo desta forma o risco de contaminação do leite (KALAC, 2011). O fluido ruminal, contendo microbiota protozoária, bactérias ruminais, etc., é considerado o primeiro sistema de defesa contra algumas micotoxinas como a ZEA, OTA, toxina T-2 e diacetoxiscirpenol (DAS), mas é ineficaz para a AFB₁, fumonisina e patulina (KIESSLING et al., 1984; OBREMSKI et al., 2009; PRANDINI, et al., 2009). No entanto, a barreira do rúmen pode ser alterada por algumas doenças, alterações na dieta e alta contaminação por micotoxinas na alimentação animal. Um exemplo disso é os diferentes alimentos destinados a vacas leiteiras com alto potencial genético para produção de leite podem induzir a diminuição do pH do rúmen que, por sua vez, também pode influenciar a taxa de degradação de OTA (PATTONO et al., 2011).

3 LEGISLAÇÃO

Muitos países possuem regulamento para controlar os níveis de AFB₁ em rações e propõem níveis máximos permissíveis de AFLAM₁ em leite e derivados para reduzir os riscos (RASTOGI et al, 2004), como descrito na Tabela 1.

Tabela 1 - Legislação internacional para AFM₁ em leite e derivados lácteos para consumo humano

País	Leite cru (µg/kg)	Derivados de leite (µg/kg)
União Europeia	0,05	0,05
Alemanha	0,05	
Bélgica	0,05	
Itália		0,01 (alimentos para crianças)
Suécia		0,05 (alimentos de leite líquidos)
Uruguai	0,5	0,5
Barbados	0,05	
Chipre	0,5	0,5
Mauritius	10	10
Áustria	0,05; 0,01(leite pasteurizado infantil)	0,02 (manteiga); 0,25 (queijo); 0,40 (leite em pó)
França	0,05; 0,03 (para crianças <3anos)	0,05; 0,03 (para crianças <3anos) (leite em pó)
Suíça	0,05	0,025 (soro de leite e produtos); 0,25 (queijo); 0,02 (manteiga); 0,10 (leite em pó)
Bulgária	0,50	0,1 (leite em pó); 0 (leite em pó para dietas e alimentos infantís); 0,02 (alimentos infantís)
Romênia	0	
República Tcheca	0,50	5; 0,1 (alimentos infantís)
EUA		0,50
Brasil	*	0,50 (leite fluido); 5,0 (leite em pó); **2,5g/kg (queijo)
Argentina	0,05	0,50; 0,05 (leite em pó)
Honduras	0,05	0,25 (queijo); 0,02 (alimentos infantís)
Nigéria	1	
Egito	0	0
Turquia	0,05	0,25 (queijo)
MERCOSUL	0,5	5,0 (leite em pó)

Fonte: Adaptado de KANIOU-GRIGORIADOU, et al. (2005).

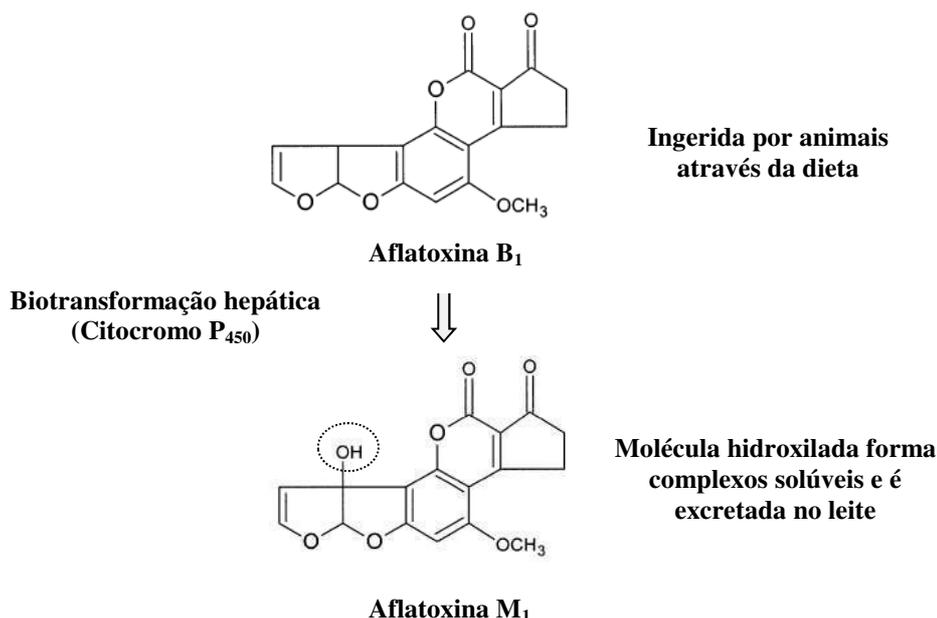
*Não há legislação para leite cru no Brasil; ** Limite estabelecido por BRASIL, 2011

4 AFLATOXINAS EM LEITE

Aflatoxinas são estruturas policíclicas pertencentes à classe de compostos denominados furanocumarinas, que constituem um grupo de metabólitos fúngicos hepatotóxicos, carcinogênicos e imunossupressores (WILLIAMS et al., 2004) principalmente produzidos por *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus* (PRANDINI et al., 2009). Quando mamíferos em lactação tais como vacas, ovelhas e cabras são alimentadas com ração

contaminada por AFB₁, essa micotoxina ingerida é metabolizada pelo sistema de enzima citocromo P₄₅₀ no fígado em diversos metabólitos (Figura 1). Por meio da hidroxilação no carbono terciário do sistema de anel difurano cumarina, é convertida para seu principal metabólito AFM₁ (FALETTO et al., 1988). Devido ao grupamento hidroxila, estes compostos são bastante solúveis em água, o que possibilita sua rápida excreção através da urina, bÍlis, fezes ou leite (VAN EGMOND, 1983).

Figura 1 - Biotransformação hepática da aflatoxina B₁ em aflatoxina M₁.



A AFM₁ é termicamente resistente e não é completamente inativada pela pasteurização, esterilização ou outros processos de tratamento do leite (ASSEM; MOHAMAD; OULA, 2011). Assim, uma vez que o leite é um dos primeiros e principais nutrientes do consumo humano, principalmente de crianças, o controle da incidência de AFM₁ nesses alimentos é extrema importância.

Embora a AFM₁ seja a aflatoxina de maior ocorrência em leite (COFFEY; CUMMINS; WARD, 2009) o conceito de que a AFB₁ é totalmente convertida em AFM₁ é contestado por alguns estudos. Carvajal et al. (2003) detectaram AFB₁ (0 a 0,4 µg L⁻¹) em amostras de leite tratadas termicamente e Scaglioni et al. (2014) detectaram em leite pasteurizado e UHT, com níveis médios de contaminação de 1,476 e 0,690 µg L⁻¹, respectivamente. Uma vez que a AFB₁ é mais tóxica que a AFM₁ (ZAIN 2011), a presença da AFB₁ em leite também deve ser avaliada. A aflatoxina M₂ (AFM₂), outro metabólito da AFB₁, também tem sido investigada em leite, embora um estudo prévio não tenha detectado

(GARRIDO et al., 2003), Sartori et al. (2015) detectaram, respectivamente, em 17 (24%) das amostras de leite em pó ($>0,08 \mu\text{g Kg}^{-1}$) e em 3 (18%) das amostras de leite UHT ($>0,009 \mu\text{g Kg}^{-1}$) comercializados no Brasil., Lee e Lee (2015) também detectaram AFM₂ em amostras de leite UHT e pasteurizado.

4.1 FATORES DE INFLUÊNCIA NA CONTAMINAÇÃO DO LEITE POR AFLATOXINA M₁

A contaminação do leite e de produtos lácteos por AFM₁ exibe variações de acordo com a região geográfica, país, estação, condições ambientais, nível de desenvolvimento do país, diversidade de sistemas agrícolas, baixa disponibilidade de forragem verde, consumo excessivo de alimentos concentrados, entre outros (BILANDZIC; VARENINA; SOLOMUN, 2010; DASHTI et al., 2009; GHAZANI 2009; HESHMATI; MILANI 2010; RAHIMI et al., 2010; PEI et al., 2009; TAJKARIMI et al., 2008; XIONG et al., 2013). Tem sido demonstrado que o leite produzido durante estações quentes é menos contaminado por AFM₁ do que o leite produzido em estações frias (GHIASIAN et al., 2007; PENG; CHEN, 2009). Segundo Dashti et al. (2009) a maior incidência de contaminação nos meses frios pode ser explicada pelo armazenamento prolongado requerido para a alimentação dos bovinos, o que poderia fornecer condições favoráveis para o desenvolvimento fúngico. Além disso, fatores ambientais, como temperatura e umidade relativa, produtos agrícolas utilizados nos alimentos/rações e efeitos sazonais dos países de origem das rações podem afetar os níveis de contaminação da alimentação animal por AFB₁ (DASHTI et al. 2009).

Xiong et al. (2013) também avaliaram a contaminação de leite cru em diferentes estações e observaram que a ocorrência de AFM₁ no leite foi significativamente maior durante o inverno ($0,123 \mu\text{g L}^{-1}$; $p < 0,05$) quando comparada as outras estações, não houve diferença significativa (primavera $0,0291 \mu\text{g L}^{-1}$, verão $0,0319 \mu\text{g L}^{-1}$ e outono $0,0316 \mu\text{g L}^{-1}$) ($p > 0,05$). Na Croácia, Bilandzic, Varenina e Solomun, (2010) verificaram a distribuição da concentração de AFM₁ em leite em diferentes estações e observaram que essas concentrações foram estatisticamente maiores entre os meses de Janeiro a Abril ($0,036$ a $0,059 \mu\text{g L}^{-1}$), que correspondem às estações de inverno e primavera, do que entre os meses de junho e setembro ($0,012$ a $0,015 \mu\text{g L}^{-1}$), correspondentes ao verão e outono. Segundo os autores alimentos frescos disponíveis, tais como pastagem, grama, ervas daninhas e alimentos crus estão disponíveis durante a primavera e no verão. No entanto, nos meses frios, preparados secos ou concentrados são utilizados com maior frequência. Além disso, nas estações frias os animais

são frequentemente alimentados com feno seco, que em condições inadequadas de armazenamento pode levar ao aparecimento de fungos aflatoxigênicos e, conseqüentemente, de aflatoxinas (HESHMATI; MILANI, 2010; KAMKAR, 2005; TAJKARIMI et al., 2008).

Através do monitoramento dos níveis de AFM₁ no leite, Veldman (1992) demonstraram que a taxa de conversão da AFB₁ pode ser de até 6,2%, com médias de 1,8%. Uma vez que os processamentos de produção não afetam a concentração de AFM₁, devido a sua estabilidade térmica, é sugerido que as maneiras mais eficazes de controle de AFM₁ no leite sejam através da redução da contaminação de AFB₁ nas matérias-primas e que os alimentos fornecidos ao gado sejam por meio de Boas Práticas Agrícolas e de armazenamento (BILANDZIC; VARENINA; SOLOMUN, 2010; DIAZ; ESPITIA, 2006; ELZUPIR; ELHUSSEIN, 2010; NURYONO et al., 2009; PRANDINI et al., 2009; RAHIMI et al., 2010).

Han et al. (2013) observaram que embora todas as amostras de alimentos destinados ao gado leiteiro analisadas estivessem com níveis de AFB₁ abaixo do máximo estabelecido pela Comissão Européia (CE) (5 µg kg⁻¹), o conteúdo de AFM₁ em três das 200 amostras de leite estavam acima do máximo estabelecido pela CE (0,05 µg L⁻¹). Battacone et al. (2009) também relataram que não há garantia de que a concentração de AFM₁ no leite será sempre inferior do limite legal da CE quando os níveis de AFB₁ nos alimentos destinados aos animais estiverem dentro dos limites.

Em estudo conduzido em Portugal, os níveis mais altos de AFM₁ foram detectados nas amostras de leite produzidas nas ilhas Açorianas do que nas amostras continentais (DUARTE et al., 2013). Segundo os autores, esse fato sugere a existência de fatores locais relacionados ao tempo e condições de armazenamento de alimentos que merecem maior atenção e análise de influência. Nos Açores, é necessária a suplementação com forragens conservadas, principalmente silagem de milho e capim, dadas as necessidades energéticas de um rebanho de alto rendimento e da escassez de pastagem sazonal durante o verão em áreas mais baixas e de inverno nas partes mais altas (REGO, 2010). Considera-se que sistemas de produção de leite à base de pasto bovino apresentam baixo risco de incidência de aflatoxinas (FINK-GREMMELS, 2008a; MOTAWEE; BAUER; MCMAHON, 2009) e acredita-se que esse risco é maior em leite oriundo de gado alimentado com alimentação à base de concentrados (DUARTE et al., 2013).

Ainda, alguns estudos enfatizam que o *carry over* da AFB₁ é maior em leite bovino (0,03%) do que de em leite de ovelha e cabra, provavelmente devido à extensa variabilidade na expressão e atividade catalítica das famílias de enzimas hepáticas (por exemplo, citocromo P₄₅₀ e transferase-glutationa) envolvidas na biotransformação e detoxificação da AFB₁

presente nessas espécies (BATTACONE et al., 2003; DIAZ et al., 2004; HASSAIN; KASSAIFY 2014).

4.2 OCORRÊNCIA DE AFLATOXINA M₁ EM LEITE

A ocorrência de AFM₁ já foi relatada em diversas localidades globais (Tabela 2.) com muitos dos estudos elevando a preocupação quanto aos níveis de contaminação por AFM₁ por estarem acima dos limites máximos estabelecidos pela legislação da União Européia (UE) (0,05 µg L⁻¹) (CE, 2001). No entanto, os níveis de AFM₁ estão geralmente abaixo do limite máximo (0,5 µg L⁻¹ para leite fluido) estabelecido por autoridades nacionais, incluindo o *Institute of Standards and Industrial Research of Iran* (ISIRI, 2002) (Irã), o *Turkish Food Codex* (TFC) (Turquia), a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (BRASIL, 2011) e o *Food and Drug Administration* (FDA) (Estados Unidos).

Dados coletados a partir de estudos realizados nos últimos anos evidenciam que a incidência da AFM₁ em amostras de leite e derivados lácteos é relativamente menor em países da Europa (Portugal, Turquia, Itália e Croácia), independente do tipo de amostra. Em contrapartida, em estudos realizados em países asiáticos como China, Tailândia e Taiwan foram frequentemente observados a ocorrência de micotoxinas em até 100% das amostras. No Brasil, devido à sua grande extensão, diferenças no clima e na produção de leite e derivados lácteos, os resultados geralmente variam quanto a porcentagem de ocorrência da micotoxina (30,7 a 100%) e quanto aos níveis de contaminação encontrados (0,0018 a 4,1 µg L⁻¹).

Em um estudo realizado por Fallah (2010) com amostras coletadas no Irã, quando considerado os limites estabelecidos pelo FDA e pelo ISIRI para AFM₁ em leite (0,05 µg L⁻¹), apenas 1,7% das amostras de leite pasteurizado e 2,7% das amostras de leite ultra alta temperatura (UAT) apresentaram níveis superiores ao estipulado. Entretanto, de acordo com os limites estabelecidos pela CE (0,05 µg L⁻¹), 27% e 17% das amostras de leite pasteurizado e UAT, respectivamente, estiveram acima do limite aceitável. Na Síria, 80% e 60% das amostras de leite pasteurizado analisados excederam os limites estabelecidos pela CE e FDA, respectivamente (GHANEM; ORFI, 2009). Em estudo realizado na Turquia, 47% e 3,2% das amostras de leite UAT apresentaram níveis superiores aos limites permitidos pela CE e FDA, respectivamente (UNUSAN, 2006) e 31% das amostras de leite UAT apresentaram níveis acima da regulamentação da CE (TEKINSEN; EKEN, 2008). Ainda, 64% (CELIK; SARIMEHMETOGLU; KUPLULU, 2005) e 47% das amostras de leite UAT (UNUSAN, 2006) excederam 0,05 µg L⁻¹. No Irã, em 78% (OVEISI et al., 2007), 80% (KAMKAR et al.,

2008) e 18% (ALBORZI et al., 2006) das amostras de leite detectaram-se concentrações superiores a $0,05 \mu\text{g L}^{-1}$ e Gholampour, Khoushnevis e Hashemi, (2008) examinaram 111 pacotes de leite pasteurizado e UAT produzidas durante o inverno e observaram que 100% das amostras estavam contaminadas com níveis acima do limite estipulado pela CE. No Sudão, 83,3% das amostras de leite cru apresentaram níveis bastante superiores ao máximo permitido pelo FDA ($0,5 \mu\text{g L}^{-1}$), enquanto que 100% amostras excederam o limite máximo estabelecido pela CE (ELZUPIR; ELHUSSEIN, 2010).

Tabela 2 - Ocorrência de contaminação por AFM₁ em leite bovino

País	Amostra	Frequência (%)	Mín-Máx ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Referência	
Sérvia	Leite pasteurizado	(35/36) 97,2	0,06 - 1,2	KOS et al. (2014)	
	Leite UAT	(69/70) 98,5	0,02 - 0,41		
	Leite orgânico	(6/6) 100	0,01 - 0,08		
	Leite cru	(40/40) 100	0,08 - 1,2	TOMASEVIC et al. (2015)	
	Leite cru	(382/678) 73,6	0,282-0,358		
	Leite tratado termicamente	(143/438) 32,6	0,09 - 0,145		
Líbano	Leite cru	(28/38) 73,6	0,0026 - 0,126	ASSEM; MOHAMAD; OULA (2011)	
	Leite pasteurizado	(17/25) 68,0	0,0033 - 0,084		
	Leite em pó	(5/14) 35,7	0,0092 - 0,016		
Espanha	Leite UAT	(68/72) 94,4	0,002 - 0,014	CANO-SANCHO et al. (2010)	
Brasil	Leite pasteurizado	(26/30) 87	0,009 - 0,437	IHA et al. (2013)	
	Leite UAT	(13/17) 76	0,008 - 0,215		
	Leite c/ aditivos	(13/17) 76	0,009 - 0,061		
	Leite em pó	(12/12) 100	0,020 - 0,760		
	Fórmula infantil	(0/7) 0	-		
		Leite fluido	(26/65) 40	0,009 - 0,069	JAGER et al. (2013)
		Leite em pó	(2/4) 50	0,500 - 0,810	
		Leite UAT	(23/75) 30,7	1,0 - 4,1	OLIVEIRA et al. (2013)
	Leite UAT	(133/152) 87,5	0,002 - 0,08	SILVA et al. (2015)	
Coréia do Sul	Leite cru	(48/100) 48	0,002 - 0,08	LEE et al. (2009)	
	Leite UAT e pasteurizado	(11/40) 27,5	0,007 - 0,07	DUARTE et al. (2013)	
Portugal					
Itália	Fórmula infantil	(2/185) 1,1	0,012 - 0,015	MEUCCI et al. (2010)	
Tailândia	Leite cru	(240/240) 100	0,05 - 0,101	RUANGWISES; RUANGWISES (2010)	
Turquia	Leite fluido	(43/50) 86	0,001 - 0,03	ERTAS et al. (2011)	
	Leite UAT	(75/129) 58,1	0 - 0,544	UNUSAN (2006)	
	Leite UAT	(67/100) 67	0,01 - 0,63	TEKINSEN; EKEN (2008)	

Tabela 2 - Ocorrência de contaminação por AFM₁ em leite bovino “cont.”

País	Amostra	Frequência (%)	Mín-Máx ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Referência
Marrocos	Leite pasteurizado	(54/61) 88,8	0,001 – 0,117	ZINEDINE et al. (2007)
Índia	Fórmula infantil	(17/18) 94	0,143 – 0,77	RASTOGI et al. (2004)
Taiwan	Leite pasteurizado	(44/48) 90,9	0,002 – 0,083	LIN et al. (2004)
Irã	Leite cru	(85/111) 76,6	0,015 – 0,28	KAMKAR (2006)
	Leite pasteurizado	(83/116) 71,5	0,006 – 0,528	FALLAH et al. (2010)
	Leite UAT	(68/109) 62,3	0,006 – 0,516	
	Leite UAT	(84/153) 54,9	0,006 – 0,16	ZHENG et al. (2013)
	Leite pasteurizado	(25/26) 96,2	0,023 – 0,154	
Sudão	Leite cru	(42/44) 95,5	0,22 – 6,9	ELZUPIR; ELHUSSEIN (2010)
Paquistão	Leite cru	(76/107) 71	0,004 – 0,845	IQBAL; ASI (2013)
Croácia	Leite cru	(723543) 2	0,006 – 0,027	BILANDZIC; VARENINA; SOLOMUN (2010)

No Brasil, Pereira et al. (2005) detectaram a AFM₁ em 38% das amostras de leite pasteurizado com nível médio de $0,059 \mu\text{g L}^{-1}$, mas as concentrações obtidas encontraram-se dentro do limite máximo estabelecido pela regulamentação brasileira ($0,5 \mu\text{g L}^{-1}$). Já os resultados recentes obtidos por Oliveira et al. (2013) são bastante preocupantes visto que 31% das amostras de leite UAT apresentaram níveis bastante altos de AFM₁, variando de 1,0 a $4,1 \mu\text{g L}^{-1}$, os quais equivalem ao dobro ou mais do limite máximo tolerável pela regulamentação brasileira. Outros estudos realizados no Brasil, detectaram a presença de AFM₁ em 95% ($0,01$ a $0,2 \mu\text{g L}^{-1}$) (SHUNDO et al., 2009), 40% ($0,009$ a $0,069 \mu\text{g L}^{-1}$) (JAGER et al., 2013), 53% (nível médio de $0,074 \mu\text{g L}^{-1}$) (PEREIRA et al., 2005), e 24% (nível médio $0,68 \mu\text{g L}^{-1}$) (SASSAHARA; PONTES NETTO; YANAKA, 2005) em amostras de leite coletadas em São Paulo (SP), Pirassununga (SP), Lavras (MG) e no norte do Paraná, respectivamente.

4.3 OCORRÊNCIA DE AFLATOXINA M₁ EM DERIVADOS LÁCTEOS

Variações nas concentrações de AFM₁ em queijos e outros derivados lácteos em diferentes estudos (Tabela 3.) podem ser explicadas por diferentes níveis de contaminação do leite, práticas de fabricação do queijo, tipo de queijo, condições de maturação do queijo e os métodos analíticos empregados (FALLAH et al., 2011; SARIMEHMETOGLU; KUPLULU; CELIK, 2004). Considerando a afinidade preferencial da AFM₁ pela fração de caseína, uma alta concentração da toxina pode ocorrer no coágulo durante a fabricação de queijo (SENGUN; YAMAN; GONUL, 2008), resultando em concentrações de AFM₁ de cerca de 3 vezes mais elevadas em muitos queijos moles e cerca de 5 vezes mais elevadas em queijos

duros do que no leite a partir do qual o queijo é feito (ARDIC et al., 2009). A ocorrência de AFM₁ em amostras de derivados lácteos como queijos, iogurtes, e manteigas é considerada alta em várias regiões do mundo. Como mostra a Tabela 3 exceto para amostras da Grécia, outros estudos mostram uma frequência de ocorrência de micotoxinas de até 100%, com contaminações alcançando 7,0 µg L⁻¹ (amostra de manteiga da Turquia).

Tavakoli et al. (2012) observaram variação sazonal na contaminação, sendo que as amostras coletadas no inverno foram significativamente ($p < 0,03$) maiores do que as amostras colhidas durante o verão.

Iha et al. (2013) avaliaram a estabilidade de AFM₁ em derivados lácteos e observaram que, em 28 dias, houve um decréscimo na concentração de 3,2% para o queijo tipo Minas Frescal, os autores atribuíram esse decréscimo a possíveis variações analíticas. Os resultados foram similares aos encontrados por Oruc et al. (2006), em que a estabilidade da AFM₁ foi visível em dois tipos de queijo (queijo Kashar por um período de 60 dias e queijo branco por 90 dias) durante os períodos de armazenamento e de maturação.

Govaris et al. (2002) ao estudarem a estabilidade de AFM₁ em iogurte artificialmente contaminado, durante 4 semanas de armazenamento a 4°C, em dois valores de pH (4,0 e 4,6), observaram decréscimo de 6% no iogurte, conflitando com os resultados obtidos por Iha et al. (2013). Os resultados mostraram que em pH 4,6, os níveis de AFM₁ não alteraram significativamente ($p > 0,01$); entretanto, iogurtes com pH 4,0 apresentaram um decréscimo significativo ($p < 0,01$) após a terceira e quarta semana de armazenamento nos dois níveis de concentração (0,05 e 0,1 µg/L⁻¹) provavelmente associado ao baixo pH. Govaris et al. (2002) relataram que durante a fermentação do iogurte, os níveis de AFM₁ diminuíram significativamente dos valores iniciais presente no leite e atribuíram isso à diferentes fatores como baixo pH, formação de ácidos orgânicos e pela presença de *Lactobacillus* sp.

Estudos têm demonstrado que bactérias ácido-láticas possuem a propriedade de inibir a biossíntese de aflatoxinas, e podem ainda remover diferentes micotoxinas do meio, devido aos produtos da fermentação (ácido lático, diacetil, acetaldeído, ácido acético, peróxido de hidrogênio, bacteriocinas ou hidrogênio) atingindo níveis inibitórios em certos alimentos e bebidas (BOVO et al., 2013; ONILUDE et al., 2005), ou devido a capacidade de se ligarem as micotoxinas (DALIÉ; DESCHAMPS; RICHARD-FORGET, 2010). *Saccharomyces cerevisiae*, levedura amplamente utilizada na fermentação de alimentos, tem sido estudada como potencial agente de descontaminação de micotoxinas em alimentos (SHETTY; JESPERSEN, 2006).

Tabela 3 - Ocorrência de contaminação por AFM₁ em derivados lácteos

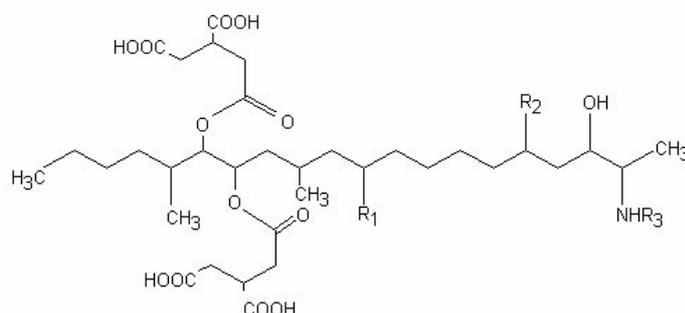
País	Amostra	Frequência (%)	Mín-Máx ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Referência
Kuwait	Queijo branco	(32/40) 80	0,024 – 0,452	DASHTI et al. (2009)
Turquia	Queijo	(68/72) 94,4	0,012 – 0,378	ERTAS et al. (2011)
	Iogurte	(28/50) 56	0,0025 – 0,078	
	Sobremesa láctea	(26/50) 52	0,0015 – 0,08	
	Manteiga	(92/92) 100	0,01 – 7,0	TEKINSEN; UÇAR (2008)
	Cream cheese	(99/100) 99	0 – 4,1	
	Iogurte	(70/80) 87,5	0,01 – 0,475	ATASEVER; ATASEVER; OZTURAN (2011)
Irã	Queijo branco	(93/116) 80,1	0,052 -0,745	FALLAH et al. (2009)
	Cream cheese	(68/94) 72,3	0,058 – 0,785	
	Lighvan cheese	(49/75) 65,3	0,03 – 0,313	FALLAH et al. (2011)
	Queijo	(47/88) 53,4	0,082 – 1,254	RAHIMI, E.; KARIM, G.; SHAKERIAN (2009)
	Queijo branco	(30/50) 60	0,041 – 0,374	TAVAKOLI et al. (2012)
	Feta cheese	(66/80) 82,5	0,15 – 2,41	KAMKAR (2006)
Líbia	Queijo	(15/20) 75	0,11 – 0,520	ELGERBI et al. (2004)
Brasil	Queijo	(3/10) 30	0,091 – 0,3	JAGER et al. (2013)
	Iogurte	-	-	
Grécia	Feta cheese	(0/54) 0	-	KANIOU-GRIGORIADOU et al. (2005)
Paquistão	Queijo branco	(93/119) 78	0,004 – 0,595	IQBAL; ASI (2013)
	Creme de queijo	(89/150) 59	0,004 – 0,456	
	Manteiga	(33/74) 45	0,004 – 0,413	
	Iogurte	(59/96) 61	0,004 – 0,616	
Sérvia	Produtos de leite	(122/322) 37,8	0,268 – 0,952	TOMASEVIC et al. (2015)

5 FUMONISINA

As fumonisinas foram descobertas em 1988 por meio de seu isolamento em culturas de *F. Verticillioides* (GELDERBLOM et al., 1988), sendo produzidas, também, por *F. proliferatum* e outras espécies de *Fusarium* (GLENN, 2007) como *F. fujikuroi* (PROCTOR et al., 2004), *F. globosum* (MARASAS et al., 2004), *F. napiforme* (NELSON et al., 1992), *F. nygamai* (LESLIE et al., 2005) e *F. oxysporum* (PROCTOR et al., 2004). Problemas de saúde animal e humana relacionados a essas micotoxinas são quase exclusivamente associados com o consumo de milho contaminado ou seus derivados (ABBAS, et al. 2006; BOLGER et al., 2001; WANG, et al, 1999). Dezoito diferentes tipos de fumonisinas já foram isolados e identificados diferindo quanto aos grupos hidroxil (Figura 2).

A forma molecular predominante e mais tóxica produzida pelo *Fusarium moniliforme* é a fumonisina B₁ (FB₁) (SEO; LEE, 1999) que, juntamente com a fumonisina B₂ (FB₂) são responsáveis por cerca de 70% de toda a fumonisina encontrada na natureza e alimentos (NIDERKON et al., 2009, SEO et al., 2001). A FB₁ é classificada pela Agencia Internacional de Pesquisa sobre Câncer (IARC) no grupo 2B como um possível carcinogênico para humanos.

Figura 2 - Fórmula molecular da fumonisina.



Fumonisin	R1	R2	R3
B1	OH	OH	H
B2	H	OH	H
B3	OH	H	H
B4	H	H	H
A1	OH	OH	CH ₃ CO
A2	H	OH	CH ₃ CO

Fonte: DIAZ; BOERMANS (1994).

Ruminantes parecem ser tolerantes a FB₁, devido a micotoxina ser pouco metabolizada pelo fígado e pela microflora do rúmem (CALONI et al., 2000; SPOTTI; POMPA; CALONI, 2001). Entretanto, a transferência desses contaminantes para o leite já foi confirmada por alguns estudos (HAMMER; BLÜTHGEN; WALTE, 1996; MARAGOS; RICHARD, 1994; SPOTTI et al., 2001), enquanto outros não encontraram nenhuma contaminação do leite por FB₁ (RICHARD et al., 1996; SCOTT et al., 1994). Valores de 0,05% de secreção de FB₁ no leite foram reportados, resultante da administração de 3 mg da toxina por kg de alimento para os animais (HAMMER; BLÜTHGEN; WALTE, 1996).

A incidência de fumonisin em amostras de leite não tem sido extensivamente estudada. Deve-se notar, no entanto, que em todos os casos os limites de quantificação dos métodos utilizados foram considerados altos (entre 1,0 e 50 µg.Kg⁻¹). Gazzotti et al. (2009) desenvolveram um método para determinar e quantificar FB₁ em amostras de leite por meio

de cromatografia líquida acoplada de massas; das 10 amostras analisadas, 8 apresentaram contaminação acima do limite de quantificação ($0,26 \mu\text{g} \cdot \text{Kg}^{-1}$).

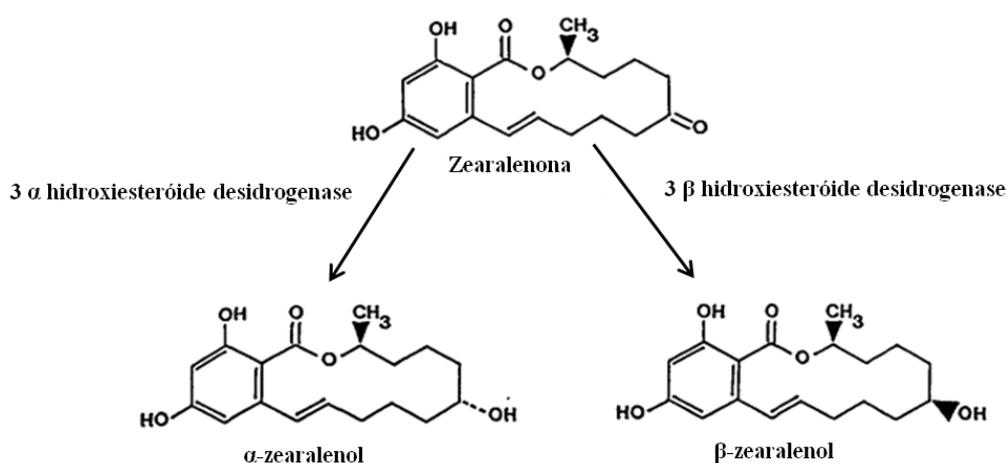
Uma vez que a FB_1 e FB_2 quando presentes em amostras de leite são estáveis à tratamentos térmicos como a pasteurização ($62^\circ\text{C}/30\text{min}$) e armazenamento a 4°C durante 11 dias (MARAGOS; RICHARD, 1994), a incidência desse contaminante é uma questão importante para a saúde humana. Portanto, o estabelecimento de metodologias para detecção e quantificação e posterior regulamentação dos níveis mínimos permitidos são de suma importância.

6 ZEARALENONA

A zearalenona (ZEA) é uma micotoxina lactona e pode ser produzida por várias espécies de *Fusarium*; *Fusarium graminearum* e *Fusarium culmorum* são os principais produtores (ZINEDINE et al., 2007). A redução da ZEA aos seus metabólitos (Figura 3) ocorre primeiramente no fígado, porém também pode ser convertida por protozoários do rúmen (MALEKINEJAD; MAAS-BAKKER; FINK-GREMMELS, 2006).

Diferente das aflatoxinas, ZEA não é considerada carcinogênica. No entanto, essa micotoxina possui efeitos estrogênicos, sendo que a atividade estrogênica de α -ZEA é de 3 a 4 vezes superior a do composto original ZEA (MINERVINI et al., 2005).

Figura 3 - Estrutura química da zearalenona e seus metabólitos.



Fonte: POMPA et al. (1986)

Embora a ZEA não seja uma das micotoxinas de maior ocorrência no leite e em seus derivados, alguns estudos relataram contaminação. Em estudo realizado na Itália, Meucci et al. (2011) detectaram ZEA em 9% (máximo de $0,76 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$), α -ZEA em 26% (máximo $12,91$

$\mu\text{g.L}^{-1}$) e β -ZEA em 28% (máximo de $73,24 \mu\text{g.L}^{-1}$) nas amostras de fórmula infantil à base de leite estudadas, e os autores obtiveram limites de detecção (LD) de 0,02, 0,02 e $0,2 \mu\text{g.L}^{-1}$ para ZEA, α -ZEA e β -ZEA, respectivamente. Além disso, houve variações significativas de níveis de metabólitos de ZEA nas marcas de fórmulas infantis avaliadas. Segundo os autores, isto poderia ser atribuído a diferentes práticas de fabricação e, provavelmente, à variação na qualidade da matéria-prima utilizada pelo fabricante da fórmula infantil. Na Argentina, Signorini et al. (2012), estimaram que a concentração de ZEA foi de $0,125 \mu\text{g.L}^{-1}$ no leite cru. Na China, HUANG et al. (2014) observaram a ocorrência de ZEA em amostras de leite cru, leite pasteurizado e leite em pó, e apesar de o LD ser aproximadamente dez vezes menor que o obtido por Meucci et al. (2010), as porcentagens de amostras contaminadas foram similares, de 23,3%, 16,7% e 25%, respectivamente.

7 OCRATOXINA

Ocratoxina A (OTA) é uma micotoxina sintetizada por uma variedade de diferentes espécies de fungos, a maior parte delas a partir dos gêneros *Aspergillus* (*A. ochraceus*, *A. melleus*, *A. sulphureus*, *Aspergillus section Nigri*, *A. carbonarius*, *A. awamori*) e *Penicillium* (*P. verrucosum*, *P. crysogenum* and *P. nordicum*) (BAYMAN; BAKER 2006; MAGAN, 2006; RODRÍGUEZ, 2011; ZHENG et al., 2005). Esta toxina tem mostrado ser nefrotóxica, hepatotóxica, teratotóxica e neurotóxica. A Agência Internacional de Pesquisas do Câncer classificou a OTA no grupo 2B (possível agente carcinogênico) (*International Agency for Research On Cancer – IARC*, 1993).

Segundo Nogueira e Oliveira (2006), a principal via de contaminação da OTA é o trato digestório, sendo a micotoxina absorvida lentamente. Na maioria das espécies, ocorre primeiramente uma rápida absorção no estômago, devido a suas características ácidas, seguindo-se uma absorção lenta, a nível intestinal. De acordo com Völkel et al. (2011), somente uma pequena porcentagem de OTA é que permanece livre na corrente sanguínea. No entanto, devido a OTA ser degradada pela microbiota do rúmen de bovinos, tem sido sugerido que a taxa de excreção no leite é mínima (FINK-GREMMELS, 2008b).

Em um estudo de detecção e quantificação de OTA em leites na Itália, Pattono et al. (2011) analisaram 63 amostras de leite provenientes de fazendas orgânicas e 20 amostras de leite não orgânico comercialmente disponíveis. O limite de quantificação (LQ) do método foi de $0,05 \mu\text{g L}^{-1}$ e os resultados mostraram que apenas 3 amostras orgânicas estavam contaminadas com OTA em quantidades compreendidas entre 0,07 e $0,11 \mu\text{g L}^{-1}$. Nenhuma

das amostras não orgânicas foi positiva para OTA. Em uma pesquisa na França, Boudra et al (2007) avaliaram 132 amostras de leite bovino de fazendas do noroeste do país com o intuito de determinar a presença de AFM₁ e OTA. Apenas 3 amostras foram detectadas com presença de OTA acima do LQ do método (0,05 µg L⁻¹). Em um estudo de micotoxinas em alimentação animal, Galtier (1991) calculou que para uma vaca alimentada com uma dose oral de 1 g dia⁻¹ resultaria em 100 µg kg⁻¹ de OTA no leite, correspondendo a uma taxa de transferência de 0,01%. Outro estudo realizado em Torino, Itália, analisou os níveis de OTA em queijos coloniais feitos com leite cru. De 32 amostras de queijo avaliadas, 6 apresentaram resultado positivo para presença de OTA com valores entre 18,4 e 146,0 µg kg⁻¹ na parte interior, e entre 1,0 a 262,2 µg kg⁻¹ na casca do queijo. A presença de micotoxinas sobre as superfícies do queijo pode ser explicada devido às condições ambientais das adegas (por exemplo, temperatura e atividade de água) durante a maturação do queijo que podem ser favoráveis para a atividade metabólica de algumas cepas produtoras de micotoxinas (PATTONO et al., 2013).

8 TRICOTECENOS

Os tricotecenos são produzidos por vários gêneros de fungos, incluindo *Fusarium*, *Stachybotrys*, *Myrothecium*, *Trichothecium*, *Trichoderma*, *Cephalosporium*, *Cylindrocarpon*, *Verticimonosporium*, and *Phomopsis* (SCOTT, 1989). São micotoxinas que podem estar presentes na maioria dos cereais durante a colheita e armazenamento. O ácido fusárico, que está muitas vezes presente em cereais, aumenta a toxicidade dos tricotecenos através de um mecanismo sinérgico (YIANNIKOURIS; JOUANY, 2002). Apesar do grande número destes compostos na natureza, somente pequena quantidade têm sido detectados a partir de contaminação natural em alimentos, tais como DON, nivalenol, toxina T-2, HT-2 e toxina diacetoxiscirpenol (GARDA; MACEDO; BADIALE-FURLONG, 2004; KOTAL et al., 1999; RADOVÁ; HOLADOVÁ; HAJSLOVÁ, 1998). Em geral, o leite não é considerado uma importante fonte de toxinas da classe dos tricotecenos, no entanto, os altos níveis de contaminação de rações e silagem por essas micotoxinas, aliados a um desequilíbrio fisiológico do animal, podem resultar em níveis significativos no leite. Estudos recentes revelaram que animais que ingeriram rações contaminadas por tricotecenos do tipo A e B (DON e toxina T-2) apresentaram biotransformação das micotoxinas e excreção em fluidos como leite, tornando-se assim, um risco para a saúde humana (DANICKE; BREZINA, 2013).

8.1 DEOXINIVALENOL

DON, também conhecida como vomitoxina, é produzida principalmente por *Fusarium graminearum* e, em algumas regiões, por *Fusarium culmorum* (RICHARD, 2000). O principal produto do metabolismo desta micotoxina no organismo de animais é o di-epoxi-DON, um metabólito menos tóxico e que pode ser eliminado tanto em secreções como urina e fezes, como no leite (MAUL et al., 2012; SHEPHARD et al., 2013). Em um estudo, Seeling et al. (2006a) estudaram o “*carry-over*” (razão entre a concentração de DON ou seus metabólitos em alimentos e a concentração de DON na dieta do animal) e encontraram valores entre 0.0001 e 0.0002 para DON, e 0.0004 e 0.0024 para di-epoxi-DON, concluindo que, em vacas saudáveis, a micotoxina é detectada no sangue e no leite, principalmente como di-epoxi-DON.

Os estudos de metabolização e excreção de deoxinivalenol (DON) em amostras de leite são realizados desde 1980 (CHARMLEY et al., 1993; CÔTÉ et al., 1986). Hoje em dia, outros metabólitos oriundos da contaminação de rações por DON vêm sendo estudados em leite (DANICKE; BREZINA, 2013; SEELING et al. 2006b), porém, existem poucos relatos de estudos de ocorrência natural destes compostos tóxicos em amostras de leite para consumo humano (SIGNORINI et al., 2012).

Mesmo sabendo-se que a quantidade de DON e seus derivados conjugados no leite é muito pequena, alguns autores avaliaram a incidência dessas micotoxinas nesses alimentos. Deste modo, Rubert, Soler e Mañes (2012) elaboraram e validaram uma metodologia capaz de extrair, quantificar e identificar simultaneamente 21 diferentes micotoxinas em alimentos destinados à crianças, incluindo leite fluido. Dentre as micotoxinas estudadas, os autores avaliaram a incidência natural de DON, 3-acetildeoxinivalenol e 15-acetildeoxinivalenol em três grupos de alimentos para bebês, porém, nenhuma das amostras de leite estavam naturalmente contaminadas por DON e nem por seus metabólitos.

A alta incidência de DON em cereais destinados à alimentação animal (SOLEIMANY et al., 2012) reforça ainda mais a necessidade de estudos que avaliem a incidência desta micotoxina e seus produtos de degradação em amostras de leite destinadas ao consumo humano. Além disso, leis para regulamentar esses contaminantes neste tipo de alimento deve ser implantado.

8.2 TOXINA T-2

A Toxina T-2 é uma micotoxina produzida principalmente por fungos do gênero *Fusarium sporotrichioides* (CAST, 2003) e pertence ao grupo dos tricotecenos não macrocíclicos.

A contaminação do leite por T-2 através da alimentação animal com ração contaminada já foi comprovada por diversos pesquisadores (ROBISON et al., 1979; YOSHIZAWA et al., 1981). Esses estudos puderam também prever o destino metabólico desta micotoxina no organismo do animal, bem como os possíveis compostos formados durante a digestão do alimento (YOSHIZAWA et al., 1981). No entanto, não existem relatos na literatura que descrevem a ocorrência natural desta micotoxina, bem como de seus metabólitos, em amostras de leite destinadas ao consumo humano.

9 CONCLUSÕES

Dada à extensa ocorrência de diferentes tipos de micotoxinas não somente em leite mas em outros derivados lácteos, bem como a preocupação com sua toxicidade a humanos e animais e o fato de que o leite é uma das principais fonte de nutrientes para crianças, é essencial adotar medidas para minimizar a contaminação dos alimentos por essas micotoxinas. Assim, um cuidado especial deve ser tomado com a alimentação de vacas em lactação e aumentar a consciência do uso de Boas Práticas Agrícolas e de Estocagem.

10 REFERÊNCIAS

- ABBAS, H. K.; CARTWRIGHT, R. D.; XIE, W.; SHIER, W.T. Aflatoxin and fumonisin contamination of corn (maize, *Zea mays*) hybrids in Arkansas. **Crop Protection**, [S. I.], v. 25, n. 1, p. 1-9, 2006.
- ALBORZI, S.; POURABBAS, B.; RASHIDI, M.; ASTANEH, B. Aflatoxin M₁ contamination in pasteurized milk in Shiraz (south of Iran). **Food Control**, [S. I.], v. 17, n. 7, p. 582-584, 2006.
- ARDIC, M.; KARAKAYA, Y.; ATASEVER, M.; ADIGUZEL, G. Aflatoxin M₁ levels of Turkish white brined cheese. **Food Control**, [S. I.], v. 20, n.3, p. 196-199, 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**, [S. I.], v. 22, n. 12, p. 1856-1858, 2011.

ATASEVER, M. A.; ATASEVER, M.; OZTURAN, K. Aflatoxin M₁ levels in retail yoghurt and ayran in Erzurum in Turkey. **Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences**, [S. I.], v. 35, n. 1, p. 59-62, 2011.

BATTACONE, G.; NUDDA, A.; CANNAS, A.; CAPPIO BORLINO, A.; BOMBOI, G.; PULINA, G. Excretion of Aflatoxin M₁ in Milk of Dairy Ewes Treated with Different Doses of Aflatoxin B₁. **Journal of Dairy Science**, [S. I.], v. 86, n. 8, p. 2667–75, 2003..

BATTACONE, G.; NUDDA, A.; PALOMBA, A.; MAZZETTE, A.; PULINA, G. The transfer of aflatoxin M₁ in milk of ewes fed diet naturally contaminated by aflatoxins and effect of inclusion of dried yeast culture in the diet. **Journal of Dairy Science**, [S. I.], v. 92, n. 10, p. 4997–5004, 2009.

BAYMAN, P.; BAKER, J. L. Ochratoxins: a global perspective. **Mycopathologia**, [S. I.], v. 162, n. 3, p. 215–23, 2006.

BILANDZIC, N.; VARENINA, I.; SOLOMUN, B. Aflatoxin M₁ in raw milk in Croatia. **Food Control**, [S. I.], v. 21, n. 9, p. 1279–1281, 2010.

BOLGER M.; COKER R.D.; DINOVI M.; GAYLOR, D., GELDERBLOM, W.C.A., OLSEN, M., PASTER, N., RILEY, R.T., SHEPHARD, G., SPEIJERS, G.J.A., 2001. Fumonisin. Safety Evaluation of Certain Mycotoxins in Foods. **FAO Food and Nutrition Paper 74**. World Health Organization, Geneva, pp. 103–279.

BOUDRA, H.; BARNOUIN, J.; DRAGACCI, S.; MORGAVI, D.P. Aflatoxin M₁ and Ochratoxin A in Raw Bulk Milk from French Dairy Herds. **Journal of Dairy Science**, [S. I.], v. 90, n. 7, p. 3197-3201, 2007.

BOVO, F.; CORASSIN, C. H.; ROSIM, R. E.; OLIVEIRA, C. A. F. Efficiency of Lactic Acid Bacteria Strains for Decontamination of Aflatoxin M₁ in Phosphate Buffer Saline Solution and in Skimmed Milk. **Food and Bioprocess Technology**, [S. I.], v. 6, n. 8, p. 2230-2234, 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC N. 7, de 18 de fevereiro de 2011. Aprova o Regulamento Técnico sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos (p. 66). Brasília, DF: **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**. N. 46, Seção 1.

BREITHOLTZ-EMANUELSSON, A.; OLSEN, M.; OSKARSSON, A.; PALMINGER, I.; HULT, K. Ochratoxin A in cow's milk and in human milk with corresponding human blood samples. **Journal of AOAC International**, [S. I.], v.76, n. 4, p. 842, 1993.

BRUERTON, K. 2001. Finding practical solutions to mycotoxins in commercial production: a nutritionist's perspective. In: Alltech's 17th Annual Symposium, 2001. **Proceedings...** 2001. p. 161-168.

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, 2012.

BRYDEN, W.L. **Mycotoxins and mycotoxicoses: significance, occurrence and mitigation in the food chain.** In: Ballantyne, B., Marrs, T., Syversen, T. (Eds.), *General and Applied Toxicology.*, third ed. John Wiley & Sons Ltd, Chichester, UK, pp. 3529–3553, 2009.

CALONI F.; SPOTTI M.; AUERBACH H.; OP DEN CAMP H., FINK-GREMMELS J.; POMPA G. *In vitro* metabolism of fumonisin B₁ by ruminal microflora. **Veterinary Research Communications**, [S. I.], v. 24, n. 6, p. 379–387, 2000.

CANO SANCHO, G.; MARIN, S.; RAMOS, A. J.; PERIS-VICENT, J.; SANCHIS, V. Occurrence of aflatoxin M₁ and exposure assessment in Catalonia (Spain). **Revista Iberoamericana de Micología**, [S. I.], v. 27, n. 3, p. 130-135, 2010.

CARVAJAL, M.; ROJO, F.; MÉNDEZ, I.; BOLAÑOS, A. Aflatoxin B₁ and its interconverting metabolite aflatoxicol in milk: the situation in Mexico. **Food Additives and Contaminants**, [S. I.], v. 20, n. 11, p. 1077-86, 2003.

CAST, 2003. **Mycotoxins: Risks in Plant, Animal and Human Systems.** Report No. 139. Council for Agricultural Science and Technology, Ames, IA, USA.

CELIK, T. H.; SARIMEHMETOGLU, B.; KUPLULU, O. Aflatoxin M₁ contamination in pasteurised milk. **Veterinarski arhiv**, [S. I.], v. 75, n. 1, p. 57–65, 2005.

CHARMLEY, E.; TRENHOLM, H. L.; THOMPSON, B. K.; VUDATHALA, D.; NICHOLSON, J.W.G.; PRELUSKY, D. B.; CHARMLEY, L.L. Influence of level of Deoxynivalenol in the diet of dairy cows on feed intake, milk production, and its composition. **Journal of Dairy Science**, [S. I.], v. 76, n. 11, p. 3580-3587, 1993.

COFFEY, R.; CUMMINS, E.; WARD, S. Exposure assessment of mycotoxins in dairy milk. **Food Control**, [S. I.], v. 20, n. 3, p. 239 - 249, 2009.

CÔTÉ, L. M.; DAHLEM, A. M.; YOSHIZAWA, T.; SWANSON, S. P.; BUCK, W. B. Excretion of deoxynivalenol and its metabolites in milk, urine, and feces of lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, [S. I.], v. 69, n. 9, p. 2416– 2423, 1986.

CREEPY, E. E. Update of survey, regulation, and toxic effects of mycotoxins in Europe. **Toxicology Letter**, [S. I.], v. 127, n. 1 – 3, p. 19–28, 2002.

DALIÉ, D. K. D., DESCHAMPS, A. M., RICHARD-FORGET, F. Lactic acid bacteria – Potential for control of mould growth and mycotoxins: A review. **Food Control**, [S. I.], v. 21, n. 4, p. 370-380, 2010.

DANICKE, S.; BREZINA, U. Kinetics and metabolism of the Fusarium toxin deoxynivalenol in farm animals: Consequences for diagnosis of exposure and aintoxication and carry over. **Food and Chemical Toxicology**, [S. I.], v. 60, p. 58 - 75, 2013.

DASHTI, B.; AL-HAMLI, S.; ALOMIRAH, H.; AL-ZENKI, S.; ABBAS, A. B.; SAWAYA, W. Levels of aflatoxin M₁ in milk, cheese consumed in Kuwait and occurrence of total aflatoxin in local and imported animal feed. **Food Control**, [S. I.], v. 20, n. 7, p. 686-690, 2009.

DIAZ, D. E.; HAGLER JR, W. M.; BLACKWELDER, J. T.; EVE, J. A.; HOPKINS, B. A.; ANDERSON, K. L.; JONES, F. T.; WHITLOW, L. W. Aflatoxin binders II: reduction of

aflatoxin M₁ in milk by sequestering agents of cows consuming aflatoxin in feed.

Mycopathologia, [S. I.], v. 157, n. 2, p. 233–41, 2004.

DIAZ, G. J.; BOERMANS, H. J. Fumonisin toxicoses em domestic animals: a review.

Veterinary and human toxicology, [S. I.], v. 36, n. 6, p. 548–55, 1994.

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

DUARTE, S. C.; ALMEIDA, A. M.; TEIXEIRA, A. S.; PEREIRA, A. L.; FALCÃO, A. C.; PENA, A.; LINO, C. M. Aflatoxin M₁ in marketed milk in Portugal: Assessment of human and animal Exposure. **Food Control**, [S. I.], v. 30, n. 2, p. 411-417, 2013.

EC - EUROPEAN COMMISSION. 2001. **Regulation (EC) No. 466/2001 of 8 March 2001**, setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. O J L77:1–13.

ELGERBI, A. M.; AIDOO, K. E.; CANDLISH, A. A. G.; TESTER, R. F. Occurrence of aflatoxin M₁ in randomly selected North African milk and cheese samples. **Food Additives and Contaminants**, [S. I.], v. 21, n. 6, p. 592-597, 2004.

ELZUPIR, A. O.; ELHUSSEIN, A. M. Determination of aflatoxin M₁ in dairy cattle milk in Khartoum State, Sudan. **Food Control**, [S. I.], v. 21, n. 6, p. 945-946, 2010.

ERTAS, N.; GONULALAN, Z.; YILDIRIM, Y.; KARADAL, F. A survey of concentration of aflatoxin M₁ in dairy products marketed in Turkey. **Food Control**, [S. I.], v. 22, n. 12, p. 1956-1959, 2011.

FALETTO, M. B.; KOSER, P. L.; BATTULA, N.; TOWNSEND, G. K.; MACCUBBIN, A. E.; GELBION, H. V. Cytochrome P3-450 cDNA encodes aflatoxin B₁ hydroxylase. **The Journal of Biological Chemistry**, [S. I.], v. 263, n. 25, p. 12187–9, 1988.

FALLAH, A. A.; JAFARI, T.; FALLAH, A.; RAHNAMA, M. Determination of aflatoxin M₁ levels in Iranian white and cream cheese. **Food and Chemical Toxicology**, [S. I.], v. 47, n. 8, p.1872-1875, 2009.

FALLAH, A. A.; RAHNAMA, M.; JAFARI, T.; SAEI-DEHKORDI, S. S. Seasonal variation of aflatoxin M₁ contamination in industrial and traditional Iranian dairy products. **Food Control**, [S. I.], v. 22, n. 10, p. 1653-1656, 2011.

FALLAH, A. Assessment of aflatoxin M₁ contamination in pasteurized and UHT milk marketed in central part of Iran Aziz. **Food and Chemical Toxicology**, [S. I.], v. 48, n. 3, p. 988-991, 2010.

FAO. **Dairy Animals**. Disponível em: <http://www.fao.org/agriculture/dairy-gateway/milkproduction/dairy-animals/en/#.VS6myfB5JOY>. Acesso em abril 2015.

FINK-GREMMELS, J. Mycotoxins in cattle feeds and carry-over to dairy milk: a review. **Food Additives and Contaminants**, [S. I.], 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.

GALTIER, P. Biological fate of mycotoxins in animals. **Revue de médecine vétérinaire**, [S. I.], v. 146, p. 549-554, 1991.

GARDA, J.; MACEDO, R. M.; BADIALE-FURLONG, E. Determinação de Tricotecenos em Cerveja e Avaliação de Incidência no Produto Comercializado no Rio Grande Do Sul, **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 24, n. 4, p. 657-663, 2004.

GARRIDO, N. S.; IHA, M. H.; SANTOS ORTOLANI, M. R.; DUARTE FÁVARO, R. M. Occurrence of aflatoxins M₁ and M₂ in milk commercialized in Ribeirão Preto-SP, Brazil. **Food Additives and Contaminants**, [S. I.], v. 20, n. 1, p. 70-3, 2003.

GAZZOTTI, T.; LUGOBONI, B.; ZIRONI, E.; BARBAROSSA, A.; SERRAINO, A.; PAGLIUCA, G. Determination of fumonisin B₁ in bovine milk by LC-MS/MS. **Food Control**, [S. I.], v. 20, n. 12, p. 1171-1174, 2009.

GELDERBLOM W. C.; GALENDO D.; ABEL S.; SWANEVELDER S.; MARASAS W. F.; WILD C. P. Cancer initiation by fumonisin B₁ in rat liverrole of cell proliferation. **Cancer Letter**, [S. I.], v. 169, n. 2, p.127-137, 1988.

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

GHAZANI, M. H. M. Aflatoxin M₁ contamination in pasteurized milk in Tabriz (northwest of Iran. **Food and Chemical Toxicology**, [S. I.], v. 47, n. 7, p. 1624-1625, 2009.

GHIASIAN, S. A.; MAGHSOOD, A. H.; NEYESTANI, T. R.; MIRHENDI, S. H. Occurrence of aflatoxin M₁ in raw milk during the summer and winter seasons in Hamadan, Iran. **Journal of Food Safety**, [S. I.], v. 27, n. 2, p. 188-198, 2007.

GHOLAMPOUR A. I.; KHOUSHNEVIS, S. H.; HASHEMI, S. J. Aflatoxin M₁ level in pasteurized and sterilized milk of Babol city. **Tehran University Medical Journal**, [S. I.], v. 65, n. 13, p. 20-24, 2008.

GLENN A. E. MycotoxigenicFusariumspecies in animal feed. In: Morgavi, D.P., Riley, R.T. (Eds.),Fusarium and their Toxins: Mycology, occurrence, toxicity, control and economic impact. **Animal Feed Science and Technology**, 2007.

GOVARIS, A.; ROUSSI, V.; KOIDIS, P. A.; BOTSOGLOU, N. A. Distribution and stability of aflatoxin M₁ during production and storage of yoghurt. **Food Additives and Contaminants**, [S. I.], v. 19, n. 11, p. 1043-1050, 2002.

HAMMER, P.; BLÜTHGEN, A.; WALTE, H. G. Carry over of fumonisin B₁ into the milk of lactating cows. **Milchwissenschaft**, [S. I.], v. 51, n. 12, p. 691–695, 1996.

HAN, R. W.; ZHENG, N.; WANG, J. Q.; ZHEN, Y. P.; XU, X. M.; LI, S. L. Survey of aflatoxin in dairy cow feed and raw milk in China. **Food Control**, [S. I.], v. 34, n. 1, p. 35-39, 2013.

HASSAIN, H. F.; KASSAIFY, Z. The risks associated with aflatoxins M₁ occurrence in Lebanese dairy products. **Food Control**, [S. I.], v. 37, p. 68–72, 2014.

HESHMATI, A.; MILANI, J. M. Contamination of UHT milk by aflatoxin M₁ in Iran. **Food Control**, [S. I.], v. 21, n. 1, p. 19-22, 2010.

HUANG, L.C.; ZHENG, N.; ZHENG, B.Q.; WEN, F.; CHENG, J.B.; HAN, R.W.; XU, X.M.; LI, S.L.; WANG, J.Q. Simultaneous determination of aflatoxin M₁, ochratoxin A, zearalenone and α -zearalenol in milk by UHPLC–MS/MS. **Food Chemistry**, [S. I.], v. 146, p. 242-249, 2014.

IARC - International Agency For Research On C. 1993. **Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans**, 56. Some naturally occurring substances: Food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins.

IHA, M.L.; 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**, [S. I.], v. 29, n. 1, p. 1-6, 2013.

IQBAL, S. Z.; ASI, M. R.; JINAP, S. Variation of aflatoxin M₁ contamination in milk and milk products collected during winter and summer seasons. **Food Control**, [S. I.], v. 34, n. 2, p. 714-718, 2013.

ISIRI Institute. 2002. Institute of Standard and Industrial Research of Iran. Maximum tolerated limits of mycotoxins in foods and feeds. **National Standard 5925**.

JAGER, A. V.; TEDESCO, M. P.; SOUTO, P. C. M. C.; OLIVEIRA, C. A. F. Assessment of aflatoxin intake in São Paulo, Brazil. **Food Control**, [S. I.], v. 33, n. 1, p. 87-92, 2013.

JOBIM, C. C.; GONÇALVES, G. D.; SANTOS, G. T. Qualidade sanitária de grãos e de forragens conservadas “*versus*” desempenho animal e qualidade de seus produtos. P.242-261. **Simpósio Sobre Produção e Utilização de Forragens Conservadas (2001 – Maringá)** Anais do Simpósio Sobre Produção e Utilização de Forragens Conservadas / Maringá : UEM/CCA/DZO, 2001. 319P.

JOUANY, J. P. **The impact of mycotoxins on performance and health of dairy cattle**. In: Alltech’s 17th Annual Symposium, 2001. Proceedings..., p. 191-222, 2001.

KALAC, P. The effects of silage feeding on some sensory and health attributes of cow’s milk: A review. **Food Chemistry**, [S. I.], v. 125, n. 2, p. 307-317, 2011.

KAMKAR, A. A study on the occurrence of aflatoxin M₁ in raw milk produced in Sarab city of Iran. **Food Control**, [S. I.], v. 16, n. 7, p. 593-599, 2005.

KAMKAR, A. A study on the occurrence of aflatoxin M₁ in Iranian Feta cheese. **Food Control**, [S. I.], v. 17, n. 10, p. 768-775, 2006.

KAMKAR, A.; KARIM, G.; ALIABADI, F. S.; KHAKSAR, R. Fate of aflatoxin M₁ in Iranian white cheese processing. **Food and Chemical Toxicology**, [S. I.], v. 46, n. 6, p. 2236-2238, 2008.

KANIOU-GRIGORIADOU, I.; ELEFThERiADOu, A.; MOURATIDOU, T.; KATIKOU, P. Determination of aflatoxin M₁ in ewe’s milk samples and the produced curd and Feta cheese. **Food Control**, [S. I.], v. 16, n. 3, p. 257 - 261, 2005.

KIESSLING, K.H.; PETTERSSON, H.; SHOLM, K.; OLSEN. Metabolism of aflatoxin, ochartoxin, zeralenone, and three trichothecenes by intact rumen fluid, rumen protozoa, and rumen bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, [S. I.], v. 47, n. 5, p. 1070-1073, 1984.

KOS, J.; LEVI, J.; ĐURAGI, O.; KOKI, B.; MILADINOVI, I. Occurrence and estimation of aflatoxin M₁ exposure in milk in Serbia. **Food Control**, [S. I.], v. 38, p. 41–6, 2014..

KOTAL, F.; HOLADOVÁ, K.; HAJLOVÁ, J.; POUSTKA, J.; RADOVÁ, Z. Determination of trichothecenes in cereal. **Journal of Chromatography**, [S. I.], v. 830, p. 2110-225, 1999.

LEE, D.; LEE, K. G. Analysis of aflatoxin M₁ and M₂ in commercial dairy products using highperformance liquid chromatography with a fluorescence detector. **Food Control**, [S. I.], v. 50, p. 467–471, 2015.

LEE, J. E.; KWAK, B. M.; AHN, J. H.; JEON, T. H. Occurrence of aflatoxin M₁ in raw milk in South Korea using an immunoaffinity column and liquid chromatography. **Food Control**, [S. I.], v. 20, n. 2, p. 136-138, 2009.

LESLIE, J. F.; ZELLER, K. A.; LAMPRECHT, S. C.; RHEEDER, J. P.; MARASAS, W. F. O. Toxicity, pathogenicity, and genetic differentiation of 5 species of *Fusarium* from sorghum and millet. **Phytopathology**, [S. I.], v. 95, n. 3, p. 275–283, 2005.

LIN, L. C.; LIU, F. M.; FU, Y. M.; SHIH, D. Y. Survey of Aflatoxin M₁ Contamination of Dairy Products in Taiwan. **Journal of Food and Drug Analysis**, [S. I.], v. 12, n. 2, p. 154-160, 2004.

MAGAN, N. Mycotoxin contamination of food in Europe: Early detection and prevention strategies. **Mycopathologia**, [S. I.], v. 262, n. 3, p. 245–253, 2006.

MALEKINEJAD, H.; MAAS-BAKKER, R.; FINK-GREMMELS, J. Species differences in the hepatic biotransformation of zearalenone. **The Veterinary Journal**, [S. I.], v. 172, n. 1, p. 96–102, 2006.

MARAGOS, C. H.; RICHARD, J. L. Quantitation and stability of fumonisin B₁ and B₂ in milk. **Journal of AOAC International**, [S. I.], v. 77, n. 5, p. 1162–1167, 1994..

MARASAS, W. F. O.; RILEY, R. T.; HENDRICKS, K. A.; STEVENS, V. L.; SADLER, T. W.; GELINEAU-VAN WAES, J.; MISSMER, S. A.; CABRERA, J.; TORRES, O.; GELDERBLUM, W. C. A.; ALLEGOOD, J.; MARTINEZ, C.; MADDOX, J.; MILLER, J. D.; STARR, L.; SULLARDS, M. C.; ROMAN, A.; VOSS, K. A.; WANG, E.; MERRILL, A. H. Fumonisin disrupt sphingolipid metabolism, folate transport, and neural tube development in embryo culture and in vivo: a potential risk factor for human neural tube defects among populations consuming fumonisin contaminated maize. **Journal of Nutrition**, [S. I.], v. 134, n. 4, p. 711–716, 2004.

MAUL, R.; WARTH, B.; KANT, J.S.; SCHEBB, N.H.; KRŠKA, R.; KOCH, M.; SULYOK, M. Investigation of the hepatic glucuronidation pattern of the fusarium mycotoxin deoxynivalenol in various species. **Chemical Research in Toxicology**, [S. I.], v. 25, n. 12, p. 2715–2717, 2012.

MEUCCI, V.; RAZZUOLI, E.; SOLDANI, G.; MASSART, F. Mycotoxin detection in infant formula milks in Italy. **Food Additives and Contaminants**, [S. I.], v. 27, n. 1, p. 64-71, 2010.

MEUCCI, V.; SOLDANI, G.; RAZZUOLI, E.; SAGGESE, G.; MASSAR, M. Mycoestrogen Pollution of Italian Infant Food. **Journal of Pediatrics**, [S. I.], v. 159, n. 2, p. 278-83, 2011.

MINERVINI, F.; FORNELLI, F.; LUCIVERO, G.; ROMANO, C.; VISCONTI, A. T-2 toxin immunotoxicity on human B and T lymphoid cell lines. **Toxicology**, [S. I.], v. 210, n. 1, p. 1-91, 2005.

MOTAWEE, M. M.; BAUER, J.; MCMAHON, D. J. Survey of aflatoxin M₁ in cow, goat, buffalo and camel milks in Ismailia-Egypt. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, [S. I.], v. 83, n. 5, p. 766-769, 2009.

NELSON, P. E. Taxonomy and biology of *Fusarium moniliforme*. **Mycopathologia**, [S. I.], v. 117, n. 1 - 2, p. 29-36, 1992.

NIDERKON, V.; MORGAVI, D. P.; ABOAB, B.; LEMAIRE, M.; BOUDRA, H. Cell wall component and mycotoxin moieties involved in the binding of fumonisin B₁ and B₂ by lactic acid bacteria. **Journal of Applied Microbiology**, v. 106, n. 3, p. 977-985, 2009.

NOGUEIRA, S.; OLIVEIRA, E. M. B. P. P. Prevalência de Ocratoxina A em alimentos e consequentes problemas de segurança alimentar. **Alimentação Humana**, Portugal, v. 12, n. 2, p. 69-75, 2006.

NURYONO, N.; AGUS, A.; WEDHASTRI, S.; MARYUDANI, Y. B.; SIGIT SETYABUDI, F. M. C.; BOHM, J.; RAZZAZI-FAZELI, E. A limited survey of aflatoxin M₁ in milk from Indonesia by ELISA. **Food Control**, [S. I.], v. 20, n. 8, p. 721-724, 2009.

OBREMSKI, K.; ZIELONKA, L.; GAJECKA, M.; EWA JAKIMIUK, E.; GAJECKI, M. Mycotoxins - dairy cattle breeding problem. A case report. **Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy**, [S. I.], v. 53, n. 2, p. 221-224, 2009.

OLIVEIRA, C. P.; SOARES, N. F. F.; OLIVEIRA, T. V.; JÚNIOR, J. C. B.; SILVA, W. A. Aflatoxin M₁ occurrence in ultra high temperature (UHT) treated fluid milk from Minas Gerais/Brazil. **Food Control**, [S. I.], v. 30, n. 1, p. 90-92, 2013.

ONILUDE, A. A.; FAGADE, O. E.; BELLO, M. M.; FADAHUNSI, I. F. Inhibition of aflatoxin-producing aspergilli by lactic acid bacteria isolates from indigenously fermented cereal gruels. **African Journal of Biotechnology**, [S. I.], v. 4, n. 12, p. 1404 - 1408, 2005.

ORUC, H. H.; CIBIK, R.; YILMAZ, E.; KALKANLI, O. Distribution and stability of aflatoxin M₁ during processing and ripening of traditional white pickled cheese. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 23, n. 2, p. 190-195, 2006.

OVEISI, M-R.; JANNAT, B.; SADEGHI, N.; HAJIMAHMOODI, M.; NIKZAD, A. Presence of aflatoxin M₁ in milk and infant milk products in Tehran, Iran. **Food Control**, [S. I.], v. 18, n. 10, p. 1216-1218, 2007.

PATTONO, D.; GALLO, P. F.; CIVERA, T. Detection and quantification of Ochratoxin A in milk produced in organic farms. **Food Chemistry**, [S. I.], v. 127, n. 1, p. 374-377, 2011.

- PATTONO, D.; GROSSO, A.; STOCCO, P.P.; PAZZI, M.; ZEPPA, G. Survey of the presence of patulin and ochratoxin A in traditional semi-hard cheeses. **Food Control**, [S. I.], v. 33, n. 1, p. 54-57, 2013.
- PEI, S. C.; ZHANG, Y. Y.; EREMIN, S. A.; LEE, W. J. Detection of aflatoxin M₁ in milk products from China by ELISA using monoclonal antibodies. **Food Control**, [S. I.], v. 20, n. 12, p. 1080-1085, 2009.
- PENG, K. Y.; CHEN, C. Y. Prevalence of Aflatoxin M₁ in Milk and Its Potential Liver Cancer Risk in Taiwan. **Journal of Food Protection**, [S. I.], v. 72, n. 5, p. 1025-1029, 2009.
- PEREIRA, M. M. G.; CARVALHO, E.P.; PRADO, G.; ROSA, C.A.R.; VELOSO, T.; SOUZA, L.A.F.; 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**, Lavras, v. 29, n. 1, p.106-112, 2005.
- POMPA, G.; MONTESISSA, C.; DILAURO, F. M.; FADINI, L. The metabolism of zearalenone in subcellular fractions from rabbit and hen hepatocytes and its estrogenic activity in rabbits. **Toxicology**, v. 42, n. 1, p. 69-75, 1986.
- 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**, [S. I.], v. 47, n. 5, p. 984–991, 2009.
- PROCTOR, R. H.; PLATTNER, R. D.; BROWN, D. W.; SEO, J. A.; LEE, Y. W. Discontinuous distribution of fumonisin biosynthetic genes in the *Gibberella fujikuroi* species complex. **Mycological Research**, [S. I.], v. 108, n. 7, p. 815–822, 2004.
- RADOVÁ, Z.; HOLADOVÁ, K.; HAJŠLOVÁ, J. Comparison of two clean-up principles for determination of trichothecenes in grain extract. **Journal of Chromatography A**, [S. I.], v. 829, n. 1 – 2, p. 259-267, 1998.
- RAHIMI, E.; BONYADIAN, M.; RAFEI, M.; KAZEMEINI, H. R. Occurrence of aflatoxin M₁ in raw milk of five dairy species in Ahvaz, Iran. **Food and Chemical Toxicology**, [S. I.], v. 48, n. 1, p. 129-131, 2010.
- RAHIMI, E.; KARIM, G.; SHAKERIAN A. Occurrence of aflatoxin M₁ in traditional cheese consumed in Esfahan, Iran. **World Mycotoxin Journal**, [S. I.], v. 2, n. 1, p. 91-94, 2009.
- RASTOGI, S.; DWIVEDI, P. D.; KHANNA, S. K.; DAS, M. Detection of Aflatoxin M₁ contamination in milk and infant milk products from Indian markets by Elisa. **Food Control**, [S. I.], v. 15, n. 4, p. 287-290, 2004.
- REGO, O. A. Influência da dieta sobre o perfil dos ácidos gordos da gordura do leite de vaca. **Vida Rural**, Portugal, p. 30-40, 2010.
- RICHARD, J. L.; MEERDINK, G.; MARAGOS, C. M.; TUMBLESÓN, M.; BORDSON, G.; RICE, L. G.; ROSS, P. F. Absence of detectable fumonisins in the milk of cows fed *Fusarium proliferatum* (Matsushima) Nirenberg culture material. **Mycopathologia**, [S. I.], v. 133, n. 2, p. 123–126, 1996.

RICHARD, J.L., 2000. **Mycotoxins: an overview**. In: Richard, J.L. (Ed.), Romer Labs' Guide to Mycotoxins, v. 1, p. 1–48.

ROBISON, T. S.; MIROCHA, C. J.; KURTZ, H. J.; BEHRENS, J. C.; CHI, M. S.; WEAVER, G. A.; NYSTROM, S. D. Transmission of T-2 toxin into bovine and porcine milk. **Journal of Dairy Science**, [S. I.], v. 62, n. 4, p. 637, 1979.

RODRÍGUEZ, A.; RODRÍGUEZ, M.; ISABEL LUQUE, M.; JUSTESEN, A. F.; CÓRDOBA, J. J. Quantification of ochratoxin A-producing molds in food products by SYBR Green and TaqMan real-time PCR methods. **International journal of food microbiology**, v. 149, n. 3, p. 226–235, 2011.

RUANGWISES, N.; RUANGWISES, S. Aflatoxin M₁ Contamination in Raw Milk within the Central Region of Thailand. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, [S. I.], v. 85, n. 2, p. 195-198, 2010.

RUBERT, J.; SOLER, C.; MAÑES, J. Application of an HPLC-MS/MS method for mycotoxin analysis in commercial baby foods. **Food Chemistry**, [S. I.], v. 133, n. 1, p. 176-183, 2012.

SARIMEHMETOGLU, B.; KUPLULU, O.; CELIK, T. H. Detection of aflatoxin M₁ in cheese samples by ELISA. **Food Control**, [S. I.], v. 15, n. 1, p. 45-49, 2004.

SARTORI, A. V.; MATOS, J. S.; MORAES, M. H. P.; N´OBREGA, 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 tandemMass spectrometry. **Food Analytical Methods**, [S. I.], v. 8, n. 9, p. 2321–30, 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**, [S. I.], 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**, [S. I.], v. 829, p. 68–74, 2014.

SCOTT, P. M. **The natural occurrence of trichothecenes**. In: Beasley, V. R., editor. Trichothecene mycotoxicosis: pathophysiologic effects, vol. I. Boca Raton, FL: CRC Press, 1989, Inc. p. 1-26.

SCOTT, P. M.; DELGADO, T.; PRELUSKY, D. B.; TRENHOLM, H. L.; MILLER, J. D. Determination of fumonisins in milk. **Journal of Environmental Science and Health**, [S. I.], v. 29, n. 5, p. 989 – 998, 1994.

SEELING, K.; BOGUHN, J.; STROBEL, E.; DANICKE, S.; VALENTA, H.; UEBERSCHAR, K. H.; RODEHUTSCORD, M. On the effects of Fusarium toxin contaminated wheat and wheat chaff on nutrient utilisation and turnover of deoxynivalenol and zearalenone in vitro (Rusitec). **Toxicology in Vitro**, [S. I.], v. 20, n. 5, p. 703-711, 2006b.

SEELING, K.; DANICKE, S.; VALENTA, H.; VAN EGMOND, H. P.; SCHOTHORST, R. C.; JEKEL, A. A.; LEBZIEN, P.; SCHOLLENBERGER, M.; RAZZAZI-FAZELI, E.; FLACHOWSKY, G.. Effects of Fusarium toxin-contaminated wheat and feed intake level on

the biotransformation and carry-over of deoxynivalenol in dairy cows. **Food Additives and Contaminants**, v. 23, n. 10, p. 1008–1020, 2006a.

SENGUN, I. Y.; YAMAN, D. B.; GONUL, S. A. Mycotoxins and mould contamination in cheese: a review. **World Mycotoxin Journal**, [S. I.], v. 1, n. 3, p. 291–298, 2008.

SEO, J. A.; PROCTOR, R. H.; PLATTNER, M. R. Characterization of 4 clustered and co regulated genes associated with fumonisin biosynthesis in *Fusarium verticillioides*. **Fungal Genetics and Biology**, [S. I.], v. 34, n. 3, p. 155–165, 2001.

SEO, J. A.; LEE, Y. W. Natural occurrence of the C series of fumonisin in mouldy corn. **Applied and Environmental Microbiology**, [S. I.], v. 65, n. 3, p. 1331–1334, 1999.

SHEPHARD, G. S.; BURGER, H. M.; GAMBACORTA, L.; GONG, Y. Y.; KRŠKA, R.; RHEEDER, J. P.; SOLFRIZZO, M.; SREY, C.; SULYOK, M.; VISCONTI, A.; WARTH, B.; WESTHUIZEN, L. V. D. Multiple mycotoxin exposure determined by urinary biomarkers in rural subsistence farmers in the former Transkei, South Africa. **Food and Chemical Toxicology**, [S. I.], v. 62, p. 217–25, 2013.

SHETTY, P. H.; JESPERSEN, L. *Saccharomyces cerevisiae* and lactic acid bacteria as potential mycotoxin decontaminating agents. **Trends in Food Science & Technology**, [S. I.], v. 17, n. 2, p. 48–55, 2006.

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**, [S. I.], v. 20, n. 7, p. 655–657, 2009.

SIGNORINI, M. L.; GAGGIOTTI, M.; MOLINERI, A.; CHIERICATTI, C. A.; ZAPATA DE BASÍLICO, M. L.; BASÍLICO, J. C.; PISANI, M. Exposure assessment of mycotoxins in cow's milk in Argentina. **Food and Chemical Toxicology**, [S. I.], v. 50, n. 2, p. 250–257, 2012.

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

SOLEIMANY, F.; JINAP, S.; FARIDAH, A.; KHATIB, A. A UPLC-MS/MS for simultaneous determination of aflatoxins, ochratoxin A, zeralenone, DON, fumonisins, T-2 toxin and HT-2 toxin in cereals. **Food Control**, [S. I.], v. 25, n. 2, p. 647–653, 2012.

SORENSEN, L. K.; ELBAEK, T. H. Determination of mycotoxins in bovine milk by liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, [S. I.], v. 820, n. 2, p. 183–196, 2005.

SPOTTI, M.; CALONI, F.; FRACCHIOLLA, L.; POMPA, G.; VIGO, D.; MAFFEO, G. Fumonisin B₁ carry-over into milk in the isolated perfused bovine udder. **Veterinary and Human Toxicology**, [S. I.], v. 43, n. 2, p. 109–111, 2001.

SPOTTI, M.; POMPA, G.; CALONI, F. Fumonisin B₁ metabolism by bovine liver microsomes. **Veterinary Research Communications**, [S. I.], v. 25, n. 6, p. 511–516, 2001.

- SWANSON, S.P., CORLEY, R.A. **The distribution, metabolism, and excretion of trichothecene mycotoxins.** In: Beasley, V.R. (Ed.), *Trichothecene Mycotoxicosis Pathophysiologic Effects*, vol. I. CRC Press, Boca Raton, 1989, p. 37–61.
- TAJKARIMI, M.; ALIABADI-SH, F.; NEJAD, A. S.; POURSOULTANI, H.; MOTALLEBI, A. A.; MAHDAVI, H. Aflatoxin M₁ contamination in winter and summer milk in 14 states in Iran. **Food Control**, [S. I.], v. 19, n. 11, p. 1033-1036, 2008.
- TAVAKOLI, H. R.; RIAZIPOUR, M.; KAMKAR, A.; SHALDEHI, H. R.; NEJAD A. H. M. Occurrence of aflatoxin M₁ in white cheese samples from Tehran, Iran. **Food Control**, [S. I.], v. 23, n. 1, p. 293-295, 2012.
- TEKINSEN, K. K.; UÇAR, G. Aflatoxin M₁ levels in butter and cream cheese consumed in Turkey. **Food Control**, [S. I.], v. 19, n. 1, p. 27-30, 2008.
- TEKINSEN, K.; EKEN, H. S. Aflatoxin M₁ levels in UHT milk and kashar cheese consumed in Turkey. **Food and Chemical Toxicology**, [S. I.], v. 46, n. 10, p. 3287-3289, 2008.
- TOMASEVIC, I.; PETROVIC, J.; JOVETIC, M.; RAICEVIC, S.; MILOJEVIC, M.; MIOCINOVIC, J. Two year survey on the occurrence and seasonal variation of aflatoxin M₁ in milk and milk products in Serbia. **Food Control**, [S. I.], v. 56, p. 64–70, 2015.
- UNUSAN, N. Occurrence of aflatoxin M₁ in UHT milk in Turkey. **Food and Chemical Toxicology**, [S. I.], v. 44, n. 11, p. 1897-1900, 2006.
- US FDA. Sec. 527.400 whole milk, low fat milk, skim milk-aflatoxin M₁ (CPG 7106.210). Washington, DC: **FDA compliance policy guides**. 1996, p 219.
- VAN EGMOND, H.P. *Mycotoxins in Dairy Products*. **Elsevier Applied Science**, London, 1989.
- VELDMAN, A. Effect of sorbentia on carry-over of aflatoxin from cow feed to milk. **Milchwissenschaft**, [S. I.], v. 47, p. 777–780, 1992.
- VÖLKEL, I.; SCHRÖER-MERKER, E.; CZERNY, C-L. The carry-over of mycotoxins in products of animal origin with special regard to its implications for the European food safety legislation. **Food Nutrition Science**, [S. I.], v. 2, n. 8, p. 852–867, 2011.
- WANG E.; RILEY R.T.; MEREDITH F.I.; MERRILL A.H. JR. Fumonisin B₁ consumption by rats causes reversible, dose-dependent increases in urinary sphinganine and sphingosine. **Journal of Nutrition**, [S. I.], v. 129, n. 1, p. 214 – 220, 1999.
- WILLIAMS, J. H.; PHILLIPS, T. D.; JOLLY, P. E.; STILES, J. K.; AGGARWAL, D. Human aflatoxicosis in developing countries: a review of toxicology, exposure, potential health consequences, and interventions. **American Journal of Clinical Nutrition**, [S. I.], v. 80, n. 5, p. 1106-1122, 2004.
- XIONG, J. L.; WANG, Y. M.; MAC, M. R.; LIU, J. X. Seasonal variation of aflatoxin M₁ in raw milk from the Yangtze River Delta region of China. **Food Control**, [S. I.], v. 34, n. 2, p. 703-706, 2013.

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

YOSHIZAWA, T.; MIROCHA, C. J.; BEHRENS, J. C.; SWANSON, S. P. Metabolic fate of T-2 toxin in a lactating cow. **Food and Cosmetics Toxicology**, [S. I.], v. 19, p 31-39, 1981.

ZAIN, M. E. Impact of mycotoxins on humans and animals. **Journal of Saudi Chemical Society**, [S. I.], v.15, n. 2, p. 129-144, 2011.

ZHENG, N.; SUN, P.; WANG, J. Q.; ZHEN, Y. P.; HAN, R. W.; XU, X. M. Occurrence of aflatoxin M₁ in UHT milk and pasteurized milk in China market. **Food Control**, [S. I.], v. 29, n. 1, p. 198-201, 2013.

ZHENG, Z.; HANNEKEN, J.; HOUCHINS, D.; KING, R.S.; LEE, P.; RICHARD, J. L. Validation of an ELISA test kit for the detection of ochratoxin A in several food commodities by comparison with HPLC. **Mycopathologia**, [S. I.], v. 159, n. 2, p. 265–72, 2005.

ZINEDINE, A.; SORIANO, J. M.; MOLTÓ, J. C.; MAÑES, J. Review on the toxicity, occurrence, metabolism, detoxification, regulations and intake of zearalenone: An oestrogenic mycotoxin. **Food and Chemical Toxicology**, v. 45, n. 1, p.1-18, 2007.

**ARTIGO II - VARIAÇÃO SAZONAL DA QUALIDADE FÍSICO-QUÍMICA,
MICROBIOLÓGICA E OCORRÊNCIA DE AFLATOXINAS B₁ E M₁ EM LEITE**

RESUMO

A qualidade do leite é definida por parâmetros de composição química, características físico-químicas e de higiene e está diretamente relacionada com a alimentação, manejo, genética e raça do animal. Além disso, fatores como o período de produção e tipo de alimentação destinada aos animais lactantes podem alterar a composição nutricional, microbiológica e ocorrência de micotoxinas no leite devido à suplementação com rações em períodos com escassez de pastagem. Neste contexto, este estudo avaliou a qualidade físico-química e microbiológica bem como a incidência de AFM₁ e AFB₁ em 229 amostras de leite Ultra Alta Temperatura integral, semidesnatado e desnatado, nos estados que integram a região sul do Brasil (Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná). Após incubação a 37°C durante 7 dias, uma amostra apresentou precipitação da proteína, impossibilitando a realização das demais análises. Das demais, quanto aos padrões microbiológicos, 19,7% apresentaram-se em desacordo com a legislação (10^2 UFC.mL⁻¹) e quanto aos padrões físico-químicos os valores de extrato seco desengordurado e acidez foram os que apresentaram maior número de irregularidades. A Aflatoxina M₁ foi detectada em 30 (13,2%) das 228 amostras em concentração acima do valor de limite de quantificação do método (0,3 µg.L⁻¹). Em 3,1% das amostras foi detectada a Aflatoxina B₁ (7 amostras). As amostras produzidas durante o período da primavera foram as que apresentaram maior frequência de não conformidades microbiológicas, extrato seco desengordurado, acidez e contaminação por micotoxinas (Aflatoxina M₁ e B₁) Os resultados foram confirmados por meio da análise do componente principal (PCA).

Palavras chave: Inocuidade. Composição. Micotoxinas.

**SEASONAL VARIATION OF QUALITY PHYSICO-CHEMICAL,
MICROBIOLOGICAL AND OCCURRENCE AFLATOXINS B₁ AND M₁ IN MILK**

ABSTRACT

The milk's quality is defined by parameters of chemical composition, physical-chemical and hygiene characteristics and is directly related to the feeding, management, genetic and breed of the animal. Moreover, factors such as the production period and type of feed intended for lactating animals can alter the milk's nutritional composition, microbial composition and mycotoxins occurrence, because of the supplemental feed during periods of shortage pasture. In this context, this study evaluated the physical-chemical and microbiological quality and the incidence of AFM₁ and AFB₁ in 229 samples of whole Ultra High Temperature milk, semi-skimmed and skimmed milk, the states that make up the southern region of Brazil (Rio Grande do Sul, Santa Catarina and Paraná). After incubation at 37 ° C for 7 days, one sample showed precipitation of the protein, preventing the implementation of other analyzes. Regarding the microbiological standards, 19.7% were in disagreement with the legislation (10^2 UFC.mL⁻¹) and as physico-chemical standards, the nonfat dried extract and acidity values showed the highest number of irregularities. Aflatoxin M₁ was detected in 30 (13.2%) of 229 samples, in concentrations above the limit of quantification of the method value (0,3 µg.L⁻¹). In 3.1% (7 samples) was detected Aflatoxin B₁. Samples produced during the spring showed the highest frequency of non-compliance as the microbiological testing, nonfat dry extract, acidity and contamination by mycotoxins (Aflatoxin M₁ and B₁). These results were confirmed by Principal Component Analysis (PCA).

Keywords: Innocuousness. Composition. Mycotoxins.

1 INTRODUÇÃO

Pela vida útil, facilidade de uso e assepsia das embalagens o leite processado no sistema Ultra Alta Temperatura (UAT) tem ganhado a preferência dos consumidores das diferentes faixas etárias. Dentre os fatores que favorecem o uso deste tipo de produto, a Associação Brasileira de Leite Longa Vida (ABLV) destaca o aumento da população no país e a substituição do leite pasteurizado e em pó de consumo direto pelo UAT. Além disso, o declínio do consumo de leite não industrializado favorece o consumo de outros produtos, dentre eles o Longa Vida, que, mesmo em um ano turbulento com relação aos custos, estima-se um crescimento de 1,5% na produção atingindo 6,7 bilhões de litros de leite produzidos em 2015 (FILHO, 2015). As propriedades sensoriais deste tipo de produto também são atrativas, o que em caso de contaminação com micotoxinas o torna um veículo de risco para a saúde da população.

O leite UAT ou, como é mais conhecido, UHT (*Ultra High Temperature*) é definido pela legislação brasileira como o leite homogeneizado que foi submetido, durante dois a quatro segundos, a uma temperatura entre 130 e 150°C, mediante um processo térmico de fluxo contínuo, imediatamente resfriado a uma temperatura inferior a 32°C e envasado sob condições assépticas em embalagens estéreis e hermeticamente fechadas (BRASIL, 1997). Este processo é conhecido também como "esterilização comercial", pois não destrói totalmente a carga microbiana inicial da matéria prima e sim nove ciclos logaritmos, e aqueles que sobrevivem ao processo não causam danos ao leite durante sua estocagem, sendo necessário somente manter o leite sobre refrigeração após a embalagem ser aberta (FERREIRA, 2007; PRATA, 2001).

As características físico químicas podem indicar a qualidade do leite, entretanto, o RTIQ (Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade) do leite UAT, preconiza como seus parâmetros físico químicos mínimos de qualidade apenas o teor de gordura, acidez, estabilidade ao etanol/alizarol e ESD (Extrato Seco Desengordurado) (BRASIL, 1997). Parâmetros como pH, acidez relativa e crioscopia devem ser avaliados a partir do RTIQ do leite cru refrigerado (BRASIL, 2011a). Quanto aos padrões microbiológicos, o leite UAT não deve ter micro-organismos capazes de proliferar em condições normais de armazenamento e distribuição, sendo que, após incubação na embalagem fechada a 35-37°C, durante 7 dias, não deve sofrer modificações que alteram a embalagem, ser estável ao etanol 68% (v/v), acidez menor que 0,2 g de ácido láctico.100 mL⁻¹ e número de contagem de aeróbios mesófilos igual ou menor que 1 x 10² UFC.mL⁻¹ (BRASIL, 1997).

A qualidade do leite está diretamente relacionada às suas características físico-químicas e microbiológicas, porém contaminantes de origem química, como as micotoxinas, em especial as aflatoxinas vem sendo monitoradas, principalmente pelo fato de serem estáveis aos tratamentos térmicos aos quais o leite é submetido (SCAGLIONI et al., 2014).

A contaminação do leite por aflatoxina M_1 (AFM_1) pode ocorrer devido à ingestão de ração e/ou forragem contaminada por metabólitos de espécies toxigênicas de *Aspergillus* produtoras de aflatoxinas do grupo B e G. A AFM_1 é o produto hidroxilado da biotransformação da aflatoxina B_1 ($AFLAB_1$) no organismo animal, sendo assim excretado em fluidos como leite e urina (FINK-GREMMELS, 2008; GIOLO et al., 2012; KAN, 2009).

Os níveis de conversão da $AFLAB_1$ em M_1 ainda não foram totalmente elucidados, em princípio toda a micotoxina é convertida em seu metabólito hidroxilado e posteriormente excretada. No entanto, estudos recentes demonstraram que, dependendo da contaminação inicial da ração animal o processo digestivo não evita a presença de AFB_1 nos fluidos corporais (CARVAJAL et al., 2003; SCAGLIONI et al., 2014). Assim o consumo de silagem contaminada por AFB_1 e posteriormente em leite foi reportado, tornando recomendável avaliação dela nos produtos lácteos visto que é mais tóxica que a AFM_1 e comprovadamente a mais carcinogênica entre as do grupo AFLA (HERZALLAH et al., 2009; HUSSEIN; BRASEL, 2001; ZAIN, 2011).

A composição química e microbiológica de leite é de extrema importância e pode ser alterada por diversos fatores como a sazonalidade, fase de lactação, alimentação, saúde do animal, intervalo de ordenha, fatores genéticos e outras variações diárias (HECK et al., 2009). Os efeitos na concentração de alguns constituintes e propriedade físico-químicas do leite já foram reportados por diversos autores que estudaram sua variação no decorrer do ano em diferentes regiões (CHEN; LEWIS; GRANDISON, 2014). Estas alterações no ano estão diretamente relacionadas com a temperatura e o tipo de alimentação dos animais, uma vez que, no inverno são empregados alimentos mais secos (rações e forragens) enquanto que no verão e em períodos mais quentes o animal se alimenta preferencialmente em pastagens (FOX; MCSWEENEY, 2003 apud CHEN; LEWIS; GRANDISON, 2014).

Considerando a direta ligação entre a sazonalidade e regionalidade nas características químicas, físicas e microbiológicas do leite, o objetivo do trabalho foi avaliar a qualidade microbiológica e físico-química, bem como a ocorrência das aflatoxinas B_1 e M_1 em amostras de leite UAT desnatado, semi desnatado e integral, produzidas e comercializadas nas principais mesorregiões produtoras de leite dos estados de Rio Grande do Sul, Santa Catarina

e Paraná nas quatro diferentes estações do ano. Os dados levantados podem também ser utilizados como subsídios para a tomada de medidas preventivas ou recomendações de uso.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 AMOSTRAS

Foram coletadas 229 amostras de leite UHT desnatado (74), semidesnatado (61) e integral (94), nas regiões noroeste do Rio Grande do Sul, Oeste de Santa Catarina e Oeste do Paraná, no período de agosto de 2012 a agosto de 2014. Foram coletados 2 litros de mesmo lote de cada marca disponível no comércio dessas regiões e transportadas à temperatura ambiente até o local das determinações.

2.2 REAGENTES

O meio de cultura PCA (*Plate Count Agar*) utilizado nas análises microbiológicas foi adquirido da *Merck*®. Os padrões das micotoxinas AFM₁ e AFB₁ foram adquiridos da *Sigma Chemical Company*®. Todos os solventes utilizados para a cromatografia líquida possuíam pureza analítica grau HPLC e a água utilizada foi ultrapurificada em sistema purificador de água por osmose reversa (Osmose 10 LX, Gehaka, 2010) acoplado a sistema ultrapurificador de água (*Master System P&D TOC, MS 2000, Gehaka*). Os demais reagentes utilizados nas análises microbiológicas, físico químicas e de micotoxinas foram de grau analítico.

2.3 ANÁLISE MICROBIOLÓGICA

As amostras foram previamente incubadas em estufa a temperatura de 35-37°C durante 7 dias, seguido de avaliação quanto a ocorrência de alterações das características do produto, como coagulação devido alterações no pH e estufamento das embalagens devido a formação de gás. Posteriormente, foi realizada enumeração total de bactérias aeróbias mesófilas (UFC.mL⁻¹) utilizando-se ágar padrão para contagem (PCA – Alemanha) segundo método descrito na Instrução Normativa N° 62, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2003).

2.4 ANÁLISES DA COMPOSIÇÃO CENTESIMAL E DAS PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS

Foram avaliados o teor de gordura (%) e extrato seco desengordurado (ESD), utilizando analisador ultrassônico de leite (Lactoscan®, Milkotronic, Bulgária). A determinação da acidez e o teste de estabilidade ao etanol 68% (EA), bem como testes qualitativos para verificar possíveis adulterações e/ou alterações do leite (amido, cloretos, peróxido de hidrogênio, formol, pus e sangue) seguiu o disposto na Instrução Normativa N° 68, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. (BRASIL, 2006).

2.5 ANÁLISE DE MICOTOXINAS

2.5.1 Preparo dos Padrões de Aflatoxinas

Os padrões das aflatoxinas foram preparados conforme proposto pela Portaria n. 49 (BRASIL, 1999) e o Manual de Garantia Analítica (BRASIL, 2011b). O preparo partiu da diluição de 5 µg do padrão da AFM₁ em 5 mL de benzeno:acetonitrila (98:2), divididos em frascos âmbar previamente higienizados (1 µg.mL⁻¹) e evaporados sob corrente de N₂ (solução estoque). Posteriormente, 1 µg seco de AFM₁ foi diluído em 2 mL de fase móvel para obtenção da solução de trabalho (0,5 µg.mL⁻¹). Foram diluídos 5 mg do padrão de AFB₁ em 100 mL de benzeno:acetonitrila (98:2), divididos em frascos âmbar (50 µg.mL⁻¹) e evaporados sob corrente de N₂ (solução estoque). A solução de trabalho adotada continha 0,5 µg.mL⁻¹. Para as corridas cromatográficas foram preparadas soluções padrão contendo 5 µg.L⁻¹ (5 ng.mL⁻¹) de cada aflatoxina, a partir das respectivas soluções de trabalho.

Foram construídas duas curvas de calibração: (a) padrões diluídos em fase móvel e (b) concentrações conhecidas dos analitos na matriz (leite). Em (a), a linearidade foi determinada por meio da construção de curvas de calibração na faixa de 0,3 a 20 µg L⁻¹ para a AFM₁ e 1,0 a 20 µg L⁻¹ para AFB₁. Foram utilizados seis níveis para a construção de cada curva de calibração com as seguintes concentrações: 0,3; 1,0; 5,0; 7,0; 14,0 e 20,0 µg L⁻¹ para AFM₁ e 1,0; 3,0; 7,0; 9,0; 14,0 e 20,0 µg L⁻¹ para AFB₁, a partir da solução padrão das aflatoxinas. Para a construção da curva de calibração na matriz (b) foram também utilizados seis níveis com as seguintes concentrações para AFM₁: 0,3; 2,0; 5,0; 10,0; 20,0 e 40,0 µg L⁻¹ e para AFB₁: 0,5; 2,0; 5,0; 10,0; 20,0 e 40,0 µg L⁻¹. O primeiro nível foi alterado para as diferentes aflatoxinas conforme os limites de quantificação previamente estabelecidos para cada uma.

2.5.2 Extração de aflatoxina M₁ e B₁

As etapas de extração e purificação foram realizadas conforme método n° 49.3.07 descrito na AOAC (2000) (APÊNDICE 1), sendo que os volumes de amostras e solventes foram reduzidos em três vezes, a fim de minimizar a geração de resíduos. A extração foi realizada utilizando metanol e celite, seguida de partição com solução de cloreto de sódio a 4% e hexano. A extração das aflatoxinas e remoção da água residual dos extratos foram realizadas utilizando, respectivamente, clorofórmio e sulfato de sódio anidro. O extrato foi evaporado sob corrente de nitrogênio (Evaporador Tecnal, TE – 019, Brasil) e armazenado sob temperatura de congelamento (-20°C) até o momento da quantificação.

2.5.3 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Para a determinação e quantificação das aflatoxinas foi utilizado cromatógrafo a líquido de ultra alta eficiência acoplado de detector de fluorescência (UHPLC-FLD) (*Dionex Corporation, UltiMate 3000, Sunnyvale, Estados Unidos*) e processamento no *software Chromeleon 7.2*. Para a separação simultânea das micotoxinas AFM₁ e AFB₁ foi utilizada fase móvel composta por acetonitrila:metanol:água acidificada (1% ácido acético), na proporção de 35:15:55 (v:v:v), sob eluição isocrática. A corrida cromatográfica foi realizada em coluna de fase reversa C18 *Acclaim PA2, 5 µm Analítica (4,6 x 250 mm)*, com vazão de fase móvel de 1 mL.min⁻¹ e temperatura da coluna de 35°C, 360 e 450nm foram os comprimentos de onda de excitação e emissão, respectivamente, e o volume de injeção da amostra de 20 µL. O tempo da corrida cromatográfica foi de 10 min.

Os tempos de retenção da AFM₁ e AFB₁ foram de 4,6 min e 7,3 min, respectivamente. Os compostos foram identificados baseados no tempo de retenção do soluto com relação ao padrão e para confirmação foi realizada co-cromatografia adicionando soluções padrão que promoviam o aumento de sinal do composto ao seu dobro. A quantificação foi realizada por normalização externa com base nas curvas de calibração, aonde o sinal foi a área do pico cromatográfico.

A linearidade do método e do instrumento, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ) e % de recuperação do método foram avaliados (BRASIL, 2003; ISO, 1997; THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2002).

2.6 ANÁLISE DOS RESULTADOS

2.6.1 Análise estatística

A análise estatística dos resultados obtidos foi realizada utilizando o *software Statistica v. 7.0*. Foram avaliadas as médias dos experimentos realizados em triplicata e a significância de suas diferenças, empregando o teste de Tukey ao nível de confiança de 95%.

2.6.2 Análise do componente principal

Em pesquisas relacionadas à análise de alimentos é comum expressar os resultados de análises químicas no formato de tabelas. Entretanto, na maioria das vezes é bastante complexo avaliar os resultados obtidos conjuntamente. Assim, objetivando verificar possíveis semelhanças ou diferenças entre os resultados obtidos foi realizada uma Análise de Componentes Principais (PCA – do inglês, *Principal Component Analysis*) (WOLD, 1987), empregando o *software Matlab R2007b* através das ferramentas do PLS-Toolbox 5.2, na avaliação dos resultados de gordura (G), extrato seco desengordurado (ESD), acidez titulável (AT), Estabilidade ao álcool (EA), aflatoxina B₁ (AB₁) e aflatoxina M₁ (AM₁) em amostras de leite integral, semi-desnatado e desnatado provenientes dos estados do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul nas estações do inverno, verão, outono e primavera.

Primeiramente os resultados foram organizados no formato de uma matriz 228x6 (228 amostras x 6 variáveis – G, ESD, AT, EA, AB₁, AM₁). O Quadro 1 apresenta a codificação utilizada para as amostras na organização da matriz. A matriz de resultados foi auto escalada, um pré-processamento que visa retirar a influência das grandezas bem como de suas unidades (OTTO, 1999).

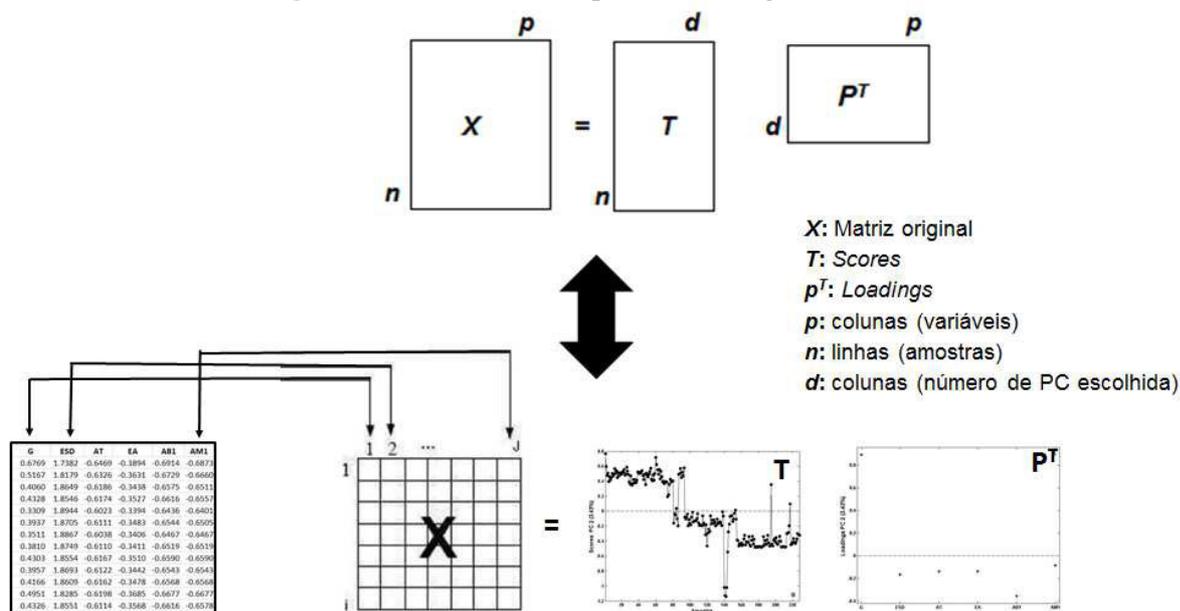
A Figura 1 ilustra o procedimento para realização da PCA. Primeiramente, os resultados são organizados no formato de uma matriz **X**. Para tanto, cada linha da matriz **X** contém o resultado das análises realizadas para cada uma das amostras enquanto cada coluna da matriz **X** apresenta as informações das diferentes variáveis estudadas, nesse caso, gordura, extrato seco desengordurado, acidez titulável, estabilidade ao álcool, aflatoxina B₁ e aflatoxina M₁.

Quadro 1 - Codificação das amostras na organização da matriz.

Tipo de leite	Estação do ano	Estado	Código das amostras
Leite integral	Inverno	PR	1 a 11
		RS	12 a 19
		SC	20 a 28
	Outono	PR	29 a 38
		RS	39 a 45
		SC	46 a 59
	Primavera	PR	60 a 67
		RS	68 a 73
		SC	74 a 80
	Verão	PR	81 a 86
		RS	87 a 88
		SC	89 a 93
Leite semi-desnatado	Inverno	PR	94 a 102
		RS	103 a 109
		SC	110 a 116
	Outono	PR	117 a 123
		RS	124 a 129
		SC	130 a 134
	Primavera	PR	135 a 139
		SC	140 a 145
	Verão	PR	146 a 148
		RS	149
		SC	150 a 154
	Leite desnatado	Inverno	PR
RS			164 a 168
SC			169 a 175
Outono		PR	176 a 185
		RS	186 a 192
		SC	193 a 200
Primavera		PR	201 a 206
		RS	207 a 212
		SC	213 a 216
Verão		PR	217 a 221
		RS	222 a 223
		SC	224 a 228

O princípio da PCA consiste em decompor a matriz \mathbf{X} em um produto de duas outras matrizes, uma matriz denominada de *scores* (\mathbf{T}) e outra chamada de *loadings* (\mathbf{P}^T) e isso acontece quando novos eixos, denominados componentes principais (PCs), são calculados. A matriz de *scores* carrega informações acerca das amostras, ou seja, das linhas da matriz \mathbf{X} , enquanto que os *loadings* fornecem informações sobre as variáveis, ou colunas de \mathbf{X} . Os resultados da decomposição da matriz \mathbf{X} em *scores* e *loadings* podem ser interpretados graficamente (VALDERRAMA et al, 2016; WOLD, 1987).

Figura 1 - Procedimento para a realização da PCA.



3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

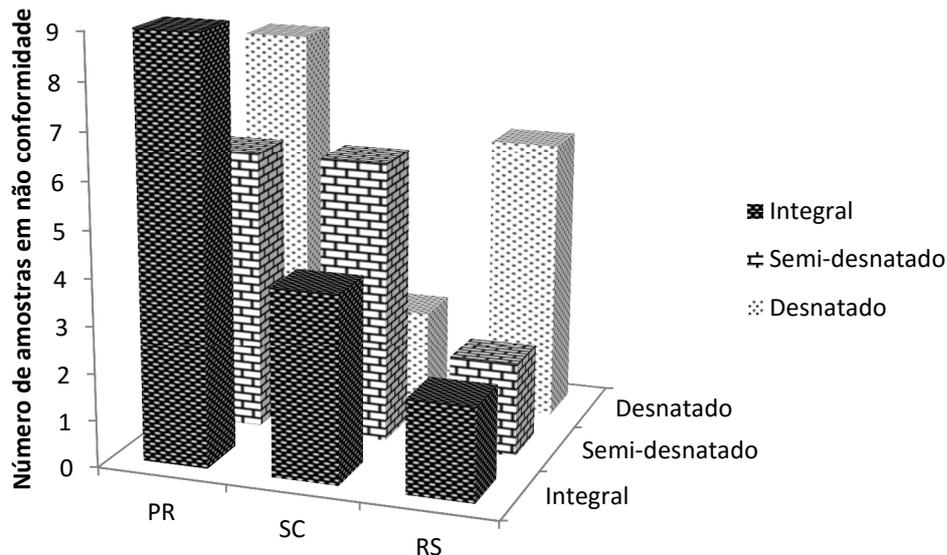
Após incubação a 35-37°C por sete dias, uma amostra de leite integral (Primavera/SC) apresentou estufamento e coagulação do leite, impossibilitando a sequente realização das análises microbiológicas e físico-químicas.

Assim, das 228 amostras analisadas, 45 (19,7%) apresentaram contagem de mesófilos aeróbios acima do padrão estabelecido pela legislação brasileira e comunidade europeia (contagem máxima de 10^2 UFC.mL⁻¹) (BRASIL, 1997; Conselho da Comunidade Europeia-CCE, 1992). As amostras de leite que apresentaram maior número de não conformidade foram as do tipo UAT desnatado (21,6% das amostras de leite UAT desnatados analisadas) (Figura 2). As amostras produzidas durante a primavera foram as que apresentaram o maior número de incidência de contaminação microbiológica, seguidos de outono e verão, com 39,6, 23 e 14,7% das amostras referentes à cada estação com contagem acima de 10^2 UFC.mL⁻¹, respectivamente.

A presença de micro-organismos mesófilos aeróbios em amostras produzidas na região sul do Brasil vem sendo mencionada por diversos autores. Pereira et al., (2013) analisaram 60 amostras de leite UHT integral e desnatado de 11 diferentes marcas produzidos nos estados do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul, e encontrou 23 (38,3%) amostras com contagens acima de 100 UFC.mL⁻¹, sendo 4 (66,6%) das 6 marcas provenientes do Paraná, 5 (83,3%) das 6 produzidas no Rio Grande do Sul e 2 (66,6%) das 3 marcas de Santa Catarina. Bersot et

al., (2010) analisaram 150 amostras de leite UHT integral comercializadas no Paraná, em que 24% apresentaram contagem acima do padrão estabelecido pela RTIQ para leite UHT (10^2 UFC.mL⁻¹).

Figura 2 – Amostras em não conformidade em relação à contagem de mesófilos aeróbios.



Legislação: 10^2 UFC.mL⁻¹ (BRASIL, 1997; CCE, 1992)

Em pesquisa realizada em amostras de leite UHT produzidas e comercializadas em países do Mercosul, Luiz et al., (2010) avaliaram microbiologicamente amostras adquiridas nas cidades de Foz do Iguaçu (Brasil), Ciudad del Leste (Paraguai) e Puerto Iguazú (Argentina) e detectaram nas marcas de leite analisadas do Brasil três lotes (37,5%) em desacordo com os critérios microbiológicos e tolerância do leite UAT. Tendo em vista que houve amostras com teores de micro-organismos acima do estipulado pela legislação vigente, cabe ressaltar que o processamento térmico aplicado ao leite UAT pode ser capaz de reduzir, mas não de eliminar a carga microbiana encontrada no leite *in natura*. Desta forma, a qualidade dos produtos processados é determinada pela qualidade da matéria-prima, eficácia do tratamento térmico e/ou integridade das embalagens utilizadas no armazenamento deste tipo de leite (FERREIRA, 2007; PRATA, 2001).

Os resultados, apresentados como médias das determinações físico químicas legisladas pelo Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade (RTIQ) (BRASIL, 1997) para leites UHT integral, desnatado e semidesnatado estão na Tabela 1.

As amostras coletadas no Rio Grande do Sul foram as que apresentaram menor número de irregularidades, sendo que, somente para os dados de ESD, as amostras produzidas no período da primavera apresentaram valores médios de 7,9 %, abaixo do valor permitido e dos valores obtidos nas demais estações do ano.

As amostras provenientes do estado de Santa Catarina, foram as que apresentaram no quesito acidez o maior número de médias abaixo do legislado, amostras estas referentes aos três tipos de leite e produzidas principalmente nos períodos de Verão e Primavera, com exceção para o leite integral que apresentou resultados médios de 0,13 g ácido láctico.100mL⁻¹ em amostras de leite produzidas no verão e outono. Essas amostras também apresentaram valores médios abaixo do estipulado pela legislação para ESD, com média para todas as coletas de leite integral de 8,1 % (m/m). As amostras de leite semidesnatado e desnatado produzidas na primavera também apresentaram valores de ESD abaixo do permitido.

As amostras oriundas do Paraná, todas de leite integral, apresentaram valores de ESD abaixo do estipulado pela legislação, com média total de 8,1 %, sendo o legislado 8,2 %, além disso, as amostras de leite integral, semidesnatado e desnatado produzidas no verão apresentaram média de acidez de 0,13 g ácido láctico.mL⁻¹, estando também abaixo do permitido.

Os valores de ESD abaixo do valor estipulado pela legislação podem estar relacionados à possível injeção de água durante o processamento térmico por injeção de vapor, que pode acontecer durante o processamento do leite UAT, diluindo seus componentes (MARTINS et al., 2008). O leite UAT processado com matéria prima de qualidade deficiente, que contenha enzimas termorresistentes, pode ter sua composição físico química ainda mais alterada durante a estocagem do leite devido a presença de enzimas proteolíticas e lipolíticas termorresistentes. (COSTA; MOURA; OLIVEIRA, 2009).

Tabela 1 - Características físico-químicas das amostras de leite conforme legislação vigente.

Estado	Estação do ano	Características Físico Químicas											
		Leite Integral				Leite Semidesnatado				Leite Desnatado			
		Acidez x (±dp)	Gordura x (±dp)	ESD x (±dp)	EE	Acidez x (±dp)	Gordura x (±dp)	ESD x (±dp)	EE	Acidez x (±dp)	Gordura x (±dp)	ESD x (±dp)	EE
RS	Primavera	0,17 (±0,01) ^{ab*}	3,03 (±0,04) ^b	7,94 (±0,15) ^b	E	***	**	**	**	0,17 (±0,01) ^{ab}	0 ^b	7,33 (±0,11) ^b	E
	Verão	0,15 (±0,01) ^{ab}	3,57 (±0,08) ^a	8,28 (±0,13) ^a	E	0,17 ^a	1,68 ^{a*****}	9,21 ^a	E	0,17 (±0,001) ^{ab}	0,17 (±0,05) ^{ab}	8,90 (±0,06) ^a	E
	Outono	0,17 (±0,008) ^{ab}	3,61 (±0,09) ^a	8,25 (±0,13) ^a	E	0,18 (±0,03) ^a	1,31 (±0,16) ^a	8,63 (±0,07) ^b	E	0,17 (0,01) ^a	0,28 (±0,20) ^a	8,81 (±0,08) ^a	E
	Inverno	0,15 (±0,01) ^b	3,59 (±0,16) ^a	8,23 (±0,08) ^a	E	0,15 (±0,02) ^a	1,45 (±0,22) ^a	8,69 (±0,22) ^b	E	0,15 (±0,01) ^b	0,25 (±0,19) ^{ab}	8,94 (±0,07) ^a	E
Média		0,16 ^{A**}	3,45 ^A	8,16 ^A		0,16 ^A	1,41 ^A	8,70 ^A		0,16 ^A	0,18 ^A	8,41 ^A	
SC	Primavera	0,19 (±0,17) ^a	3,06 (±0,11) ^c	8,01 (0,07) ^b	E	0,13 (±0,009) ^b	0,67 (±0,16) ^b	7,66 (±0,14) ^c	E	0,13 (±0,003) ^{ab}	0 (±0) ^a	7,5 (±0,05) ^c	E
	Verão	0,13 (±0,002) ^a	3,51 (±0,17) ^{ab}	7,96 (±0,07) ^b	E	0,13 (±0,01) ^b	1,48 (±0,24) ^a	8,34 (±0,07) ^b	E	0,12 (±0,007) ^b	0,52 (±0,2) ^a	9,24 (±0,37) ^a	E
	Outono	0,13 (±0,004) ^a	3,39 (±0,20) ^a	8,13 (±0,09) ^a	E	0,14 (±0,004) ^{ab}	1,19 (±0,1,3) ^a	8,58 (±0,1) ^a	E	0,14 (±0,01) ^{ab}	0,48 (±0,9) ^a	8,67 (±0,24) ^b	E
	Inverno	0,15 (±0,01) ^a	3,66 (±0,14) ^b	8,23 (±0,09) ^a	E	0,15 (±0,01) ^a	1,21 (±0,19) ^a	8,50 (±0,14) ^a	E	0,15 (±0,007) ^a	0,28 (±0,2) ^a	8,8 (±0,7) ^b	E
Média		0,15 ^A	3,41 ^A	8,08 ^A		0,14 ^B	1,12 ^A	8,26 ^A		0,14 ^B	0,36 ^A	8,63 ^A	
PR	Primavera	0,14 (±0,009) ^a	3,8 (±0,29) ^a	8,13 (±0,13) ^a	E	0,14 (±0,007) ^{ab}	1,37 (±0,25) ^a	8,5 (±0,1) ^a	E	0,14 (±0,006) ^a	0,30 (±0,19)	8,8 (±0,14) ^{ab}	E
	Verão	0,13 (±0,004) ^a	3,46 (±0,18) ^{ab}	8,05 (±0,11) ^a	E	0,13 (±0,002) ^b	1,4 (±0,23) ^a	8,54 (±0,19) ^a	E	0,13 (±0,002) ^b	0,56 (±0,84)	8,6 (±0,28) ^a	E
	Outono	0,14 (±0,007) ^a	3,14 (0,13) ^b	8,17 (±0,08) ^a	E	0,15 (±0,01) ^a	0,67 (±0,35) ^b	7,6 (±0,25) ^b	E	0,14 (±0,007) ^a	0,0 (±0)	7,58 (±0,11) ^c	E
	Inverno	0,14 (±0,006) ^a	3,54 (±0,37) ^a	8,16 (±0,1) ^a	E	0,14 (±0,008) ^{ab}	1,36 (±0,2) ^a	8,6 (±0,09) ^a	E	0,15 (±0,009) ^a	0,17 (±0,15)	8,84 (±0,11) ^b	E
Média		0,14 ^A	3,47 ^A	8,14 ^A		0,14 ^B	1,65 ^A	8,28 ^A		0,14 ^B	0,20 ^A	8,37 ^A	
Legislação		0,14-0,18	≥3,0	≥8,2	E	0,14-0,18	0,6 a 2,9	≥8,3	E	0,14-0,18	≤0,5	≥8,4	E

Acidez (g ácido láctico.100mL⁻¹); Gordura (%);ESD: Extrato Seco Desengordurado (m/m); EE - Estabilidade ao Etanol 68% (v/v); RS: Rio Grande do Sul; SC: Santa Catarina; PR: Paraná; *Para um mesmo parâmetro médias com letras minúsculas iguais indicam que não há diferença significativa entre as médias pelo teste de Tukey ($\alpha<0,05$); **Para um mesmo parâmetro médias com letras maiúsculas iguais indicam que não há diferença significativa entre as médias pelo teste de Tukey ($\alpha<0,05$)***não foi possível realizar coleta referente às amostras de leite semidesnatado/Primavera/RS; ****não foi possível calcular o desvio padrão, pois foi coletada somente uma amostra. Valores em negrito correspondem a resultados em desacordo com a legislação vigente. Legislação: (Brasil, 1997).

Quando comparados os três estados, somente os resultados de acidez relativas às amostras de leite semidesnatado e desnatado coletadas no Rio Grande do Sul, foram significativamente maiores que os demais estados ($p < 0,05$), com valores médios de 0,16 g ácido láctico.100mL⁻¹ e 0,14 g ácido láctico.100mL⁻¹ para SC e PR, para os dois tipos de leite.

Os valores médios dos conteúdos de gordura para todas as amostras de todos os estados estavam dentro do estipulado pela legislação para cada tipo de leite; porém, quando analisadas individualmente, 10 amostras de leite desnatado (13,5%) estavam acima do limite permitido (0,5%), destas uma coletada no Paraná e produzida durante o verão apresentou teor de gordura significativamente maior e consideravelmente elevado (2%). Das amostras de leite integral e semidesnatado, 11,8 e 11,5% apresentavam teores de gordura abaixo do legislado, respectivamente. Uma amostra de leite integral (Primavera/SC) apresentou acidez de 0,62 g ácido láctico.100mL⁻¹, impossibilitando as determinações físico-químicas devido a precipitação das proteínas.

Tamanini et al., (2011) analisaram 33 amostras de leite integral e desnatado produzidas nos estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná. Dos leites desnatados dois (12,5%) das 16 amostras apresentaram resultado fora do padrão, enquanto dos leites integrais quatro (23,5%) das 17 amostras apresentaram porcentagens de gordura inferiores ao estabelecido, sendo que a média obtida foi de 0,3% para os leites desnatados e 3,2% para as amostras de leite integral. Quanto a acidez, os autores observaram que 11 (33,3%) amostras apresentaram resultados superiores ao valor máximo e nenhuma apresentou resultado abaixo de 0,14 g. ac. láctico/ 100mL⁻¹. Martins et al. (2008) avaliaram o efeito do processamento térmico UAT sob os parâmetros físico-químicos de 30 amostras de leite integral e verificaram que os teores de acidez e matéria gorda não se apresentaram fora dos limites estipulados pela legislação, indicando que o processo térmico não determinou esse tipo de não conformidade.

Todas as amostras apresentaram estabilidade ao etanol 68%, bem como resultados negativos para os testes qualitativos de amido, cloretos, peróxido de hidrogênio, formol, pus e sangue, indicando ausência de adulterações e/ou alterações do leite.

A fim de avaliar os teores de AFM₁ e AFB₁ nas amostras de leite UAT analisadas, foi realizada a validação do método para extração, separação, identificação e quantificação das duas aflatoxinas simultaneamente, com base no procedimento proposto pela AOAC (2000) com algumas adaptações. O intervalo de concentração para as curvas de trabalho da AFM₁ e AFB₁ foi de 0,3 a 20 µg.L⁻¹ e 0,5 - 20 µg.L⁻¹, respectivamente. Os coeficientes de determinação foram maiores que 0,99 para ambas as curvas mostrando a linearidade do intervalo de concentração e o sinal analítico determinado. Para a construção das curvas de

calibração de trabalho e do solvente foram utilizados seis níveis de concentração das micotoxinas. As diretrizes da ANVISA (BRASIL, 2003) e a *International Conference on Harmonisation (ICH)* (1995) especificam um mínimo de cinco níveis de concentração para a construção da curva. Os resultados são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 - Indicativos de confiabilidade do método.

Figuras analíticas	AFB₁	AFM₁
Curva nos solventes	$y = 233,4210 x + 45,4133$	$y = 486,2601 x - 108,8897$
Linearidade ($\mu\text{g L}^{-1}$)	1,0 – 20	0,3 – 20
Coefficiente de determinação (R^2)	0,9977	0,9972
LD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	0,30	0,10
LQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	1,00	0,30
Curva de trabalho	$y = 365,3151 x -$	$y = 488,2898 x -$
	143,0639	688,6451
Linearidade ($\mu\text{g L}^{-1}$)	0,5 – 40	0,3 – 40
Coefficiente de determinação (R^2)	0,9961	0,9930
LD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	0,15	0,09
LQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	0,50	0,33

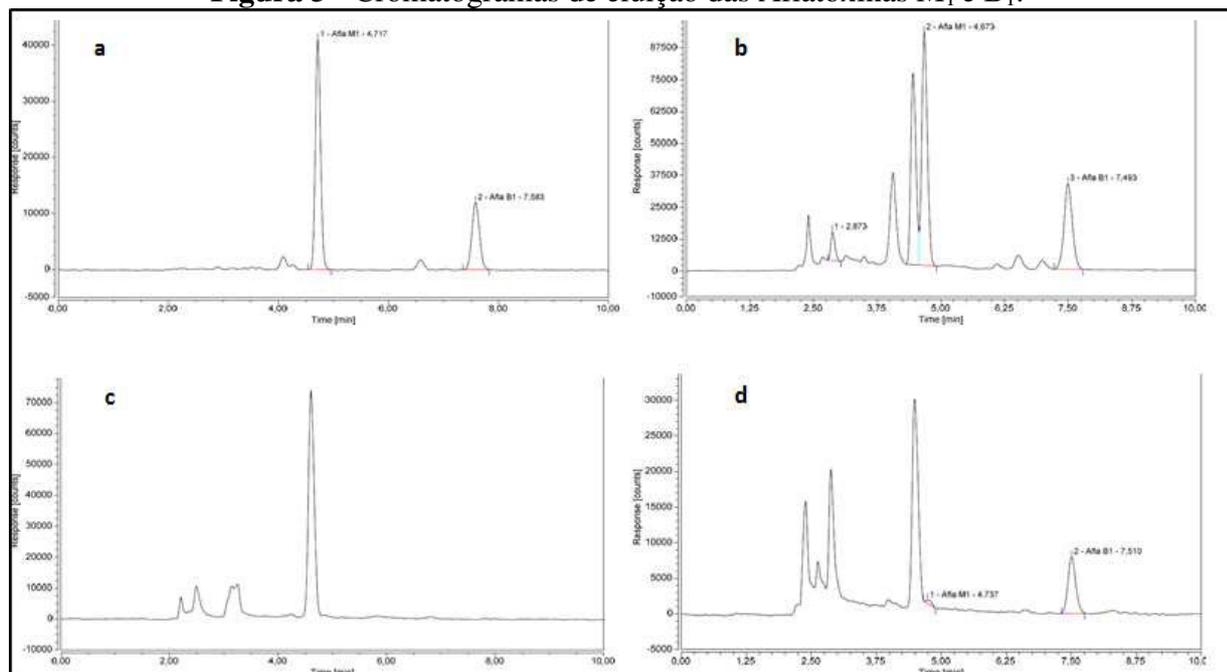
Nas concentrações de 0,09 e 0,15 $\mu\text{g L}^{-1}$ para AFM₁ e AFB₁, respectivamente, a relação sinal-ruído foi igual a 3:1, representando a menor concentração em que estes compostos podem ser detectados (LD), quando analisados pelo método desenvolvido. Os valores de LQ da curva de trabalho (LQ do método) foram determinados nas concentrações de 0,5 $\mu\text{g L}^{-1}$ para AFB₁ e 0,33 $\mu\text{g L}^{-1}$ para AFM₁, apresentando relação sinal-ruído igual a 10:1 (RIBANI et al., 2004; THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2002). Sendo o valor de LQ da AFM₁ inferior ao limite máximo estabelecido em leite (0,5 $\mu\text{g L}^{-1}$), portanto satisfatório para a pesquisa da micotoxina nessa matriz.

Os percentuais de recuperação (%R) variaram de 70,2 a 85,7% para a AFM₁ e 109 a 150% para AFB₁, com coeficientes de variação de 23 e 26%, respectivamente. Na determinação de micotoxinas consideram-se como aceitáveis valores de recuperação no intervalo de 70 a 120% e coeficiente de variação inferior a 30% (HORWITZ; ALBERT; NESHEIM, 1993; HORWIT; KAMPS; BOYER, 1980). A AFB₁ apresentou altos teores de %R. Casos semelhantes foram observados em outros estudos encontrados na literatura. Silva (2013) obteve valores de 98 a 152% dessa mesma micotoxina em produtos cárneos. Kawashima e Valente Soares (2006) observaram percentual de recuperação de AFB₁ variou

de 93 a 133% em produtos à base de milho. De acordo com Ribani et al., (2004) a limitação dos ensaios de recuperação decorre do fato que a substância adicionada não está, necessariamente na mesma forma que a nativa na amostra. Isso poderia implicar, por exemplo, na presença de substâncias adicionais que promove melhor detecção, ocasionando avaliações excessivamente otimistas de recuperação. Portanto, é necessária a correção dos valores determinados considerando os efeitos observados da superestimação dos resultados.

A ocorrência das micotoxinas AFM₁ e AFB₁ em amostras de leite UHT comercializadas no Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do sul, nos períodos de agosto de 2012 a agosto de 2014 estão apresentadas na Tabela 3. A Figura 3 apresenta cromatogramas referentes aos padrões das aflatoxinas estudadas (a), uma representação da operação de confirmação com co-cromatografia (b), uma amostra isenta de contaminação (c) e uma amostra naturalmente contaminada por ambas as micotoxinas (d).

Figura 3 - Cromatogramas de eluição das Aflatoxinas M₁ e B₁.



a: Cromatograma de padrão mix de AFM₁ e AFB₁ (20 µg.L⁻¹); *b*: cocromatografia AFM₁ e AFB₁ (50 µg.L⁻¹); *c*: amostra isenta de contaminação; *d*: amostra naturalmente contaminada por AFM₁ (0,42 µg.L⁻¹) e AFB₁ (14,11 µg.L⁻¹).

Tabela 3 - Níveis de contaminação por micotoxinas em amostras de leite UAT integral, semidesnatado e desnatado, comercializadas no sul do Brasil.

Tipo de leite	Aflatoxina M ₁											
	Paraná				Santa Catarina				Rio Grande do Sul			
	<i>n</i>	Contaminação (µg.L ⁻¹)	<i>n</i> >LQ	<i>n</i> >legislação	<i>n</i>	Contaminação (µg.L ⁻¹)	<i>n</i> >LQ	<i>n</i> >legislação	<i>n</i>	Contaminação (µg.L ⁻¹)	<i>n</i> >LD	<i>n</i> >legislação
Integral	35	0,53 – 4,62	5	5	35	0,34 – 0,93	11	9	23	-	0	0
Semidesnatado	24	0,30 – 0,48	2	0	23	0,33 – 0,51	8	1	14	-	0	0
Desnatado	30	0,32 – 0,54	2	1	24	0,34 – 0,42	2	0	20	-	0	0
Total	89	0,30 – 4,62	9	6	82	0,33 – 0,93	21	10	57	-	0	0

Tipo de leite	Aflatoxina B ₁											
	Paraná				Santa Catarina				Rio Grande do Sul			
	<i>n</i>	Contaminação (µg.L ⁻¹)	<i>n</i> >LQ	<i>n</i> positivas*	<i>n</i>	Contaminação (µg.L ⁻¹)	<i>n</i> >LD	<i>n</i> positivas	<i>N</i>	Contaminação (µg.L ⁻¹)	<i>n</i> >LD	<i>n</i> positivas
Integral	35	-	0	0	35	1,39 – 1,62	2	2	23	-	0	0
Semidesnatado	24	-	0	0	23	1,69 – 14,11	5	5	14	-	0	0
Desnatado	30	-	0	0	24	-	0	0	20	-	0	0
Total	89	-	0	0	82	1,39 – 14,11	7	7	57	-	0	0

*não existe legislação vigente para o nível de AFB₁ em amostras de leite UHT. *n*: número de amostras analisadas; LQ (AFM₁): 0,3 µg.L⁻¹; LQ (AFB₁): 0,5µg.L⁻¹.

A AFM₁ foi detectada em 113 (49,6%) das 228 amostras analisadas, porém somente 30 (13,2%) em concentração acima do valor de LQ do método (0,3 µg.L⁻¹). Em 3,1% das amostras foi detectada a micotoxina AFB₁ (7 amostras). A ocorrência de amostras contaminadas tanto por AFM₁ quanto por AFB₁ foi maior em amostras provenientes do estado de Santa Catarina. O leite integral de todos os estados, foi o que apresentou o maior incidência de contaminação pela AFM₁ (16 amostras), com níveis variando de 0,34 a 4,62 µg.L⁻¹, estando 14 amostras com níveis acima do estipulado pela legislação brasileira (0,5 µg.L⁻¹) e todas acima do legislado pela EC (0,05 µg.L⁻¹) (*European Commission - EC*, 2006). Esta maior contaminação no leite integral com aflatoxinas mostra que o processo de separação da gordura é uma forma de diminuir o risco para o leite de consumo, mas fica o desafio para os produtos elaborados com a fração lipídica ou sem previa separação.

A contaminação natural por AFB₁ foi verificada em 5 amostras de leite semidesnatado e 2 amostras de leite integral, todas oriundas do estado de Santa Catarina. A ocorrência de AFM₁ em amostras de leite vem sendo relatada também em outros países. Tomasevic et al., (2015) analisaram 328 amostras de leite UAT produzidos na Sérvia nos anos de 2013 e 2014, encontrando resultados acima do estipulado pela legislação em 22% das amostras analisadas. Na Croácia, Bilandzic et al. (2015) analisaram 3198 amostras de leite cru coletadas entre outubro de 2013 e setembro de 2014, e destas somente 71 amostras apresentaram contaminação superior ao estipulado pela EC (EC, 2006).

No Brasil, Oliveira et al. (2013) analisaram 75 amostras de leite UAT produzidas nos períodos de julho a novembro de 2009, e observaram que 30,7% das amostras apresentaram valores acima da legislação brasileira e europeia com níveis de contaminação entre 1,0 e 4,1 µg.L⁻¹. Esses resultados evidenciam a importância da revisão nos níveis permitidos pela legislação, uma vez que, em países legislados pela Comissão Europeia os dados de ocorrência são relativamente menores que no Brasil, aonde o limite legislado é dez vezes maior (0,5 e 0,05 µg.L⁻¹, para Brasil e Europa, respectivamente).

A incidência de AFB₁ neste estudo chama atenção, uma vez que os níveis encontrados são maiores que o limite legislado no Brasil para seu composto hidroxilado (AFM₁) que é de 0,5 µg.L⁻¹. Poucos estudos relacionam a ocorrência desta micotoxinas em amostras de leite UAT de origem animal. Scaglioni et al., (2014) analisaram 15 amostras de leite UAT e 12 de leite pasteurizado e encontraram contaminação por AFB₁ em 2 e 5 amostras, respectivamente, com valores médios de 0,69 µg.L⁻¹ para leite UAT e 1,48 µg.L⁻¹ para leite pasteurizado. Herzallah et al., (2009) analisaram 30 amostras de leite pasteurizados de vaca, ovelha e de cabra, e relataram 5 amostras contaminadas por AFB₁, com teores que variaram de 0,16 a

5,23 $\mu\text{g.Kg}^{-1}$. Fica evidente a tomada de cuidado no manejo da ração administrada aos animais.

Os períodos do ano com a incidência das maiores concentrações de contaminação por AFM₁ foram o inverno e a primavera, com médias de contaminação de 0,58 e 0,87 $\mu\text{g.L}^{-1}$, respectivamente. Os resultados obtidos para as determinações microbiológicas, durante a primavera foram consistentes com a maior contaminação por AFB₁.

Altas concentrações de Aflatoxina M₁ durante o inverno foram relatadas também por Golge (2014) que analisou 176 amostras de leite cru oriundas de fazendas da Turquia, e observou que, das 53 amostras contaminadas, as maiores concentrações provinham de amostras coletadas entre setembro e novembro (outono) e na temporada de inverno (dezembro e fevereiro), em que observou também a maior concentração natural pela micotoxina (1,1 $\mu\text{g.Kg}^{-1}$).

No Paraná, Silva et al. (2015), analisaram 152 amostras de leite UAT, destas 133 (87,5%) foram positivas, com uma média de contaminação por AFM₁ de 19,6 ng.L^{-1} , porém neste caso nenhuma amostra excedeu o limite estipulado pela legislação brasileira. Os maiores níveis de contaminação foram observados em amostras coletadas no inverno e no outono.

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

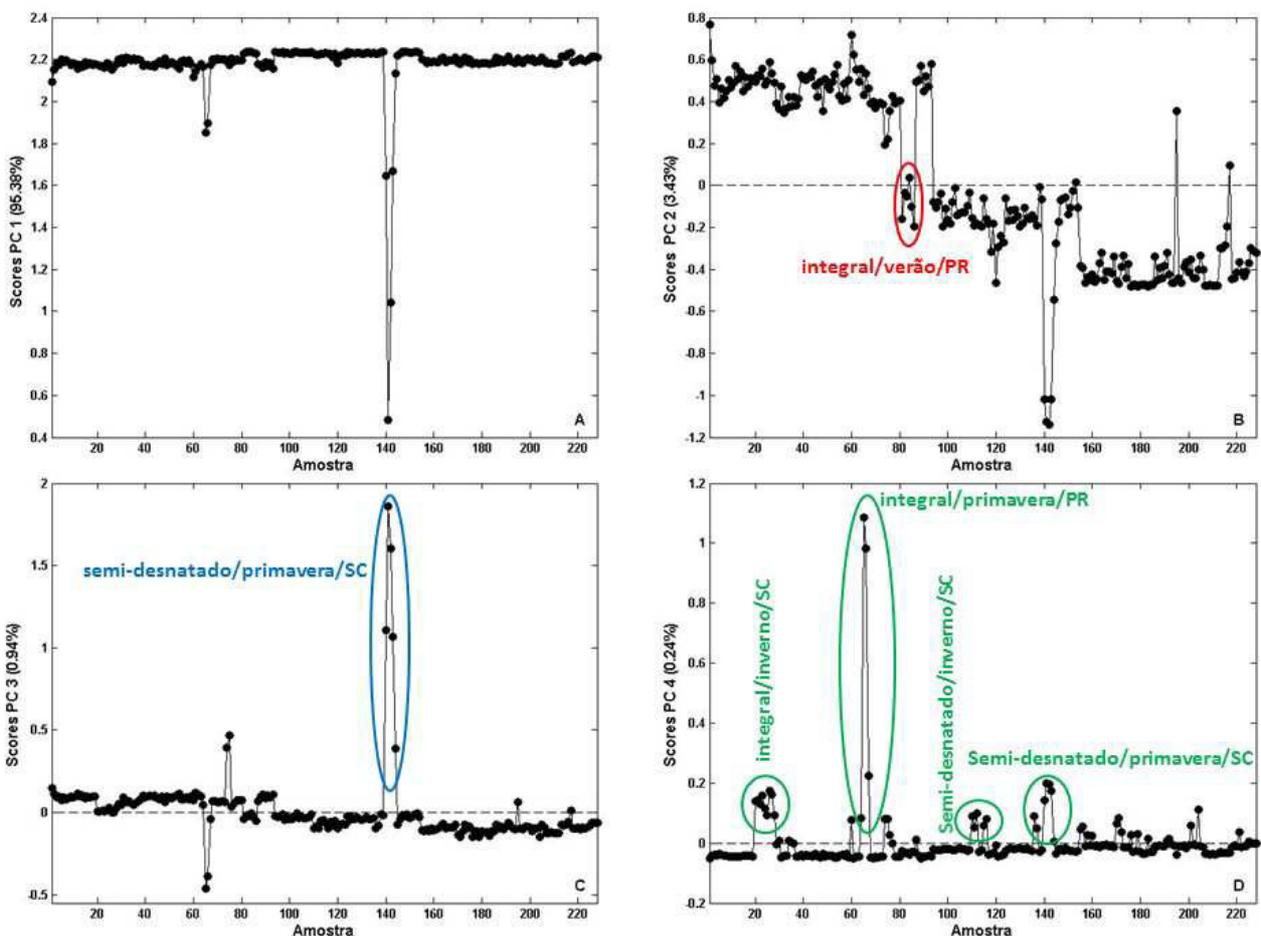
3.2 ANÁLISE DOS COMPONENTES PRINCIPAIS

A análise de componentes principais, realizada na matriz auto escalada, mostrou que duas PCs são suficientes para explicar mais de 98% da variância dos resultados. Entretanto, as PCs 3 e 4 evidenciam diferenças pronunciadas em alguns tipos de leite em determinadas estações do ano. O gráfico dos *scores*, apresentado na Figura 4, mostra que na PC1, responsável pela explicação da maior percentagem de variância dos dados, todas as amostras avaliadas são semelhantes, pois todas se encontram na parte positiva de PC1.

Analisando a PC2 verifica-se que, com exceção das amostras de leite integral da estação verão do estado do PR, ocorre uma distinção entre as amostras de leite integral na parte positiva de PC2 em relação às demais amostras na parte negativa dessa PC.

A PC3 na parte positiva destaca um padrão de comportamento diferente para as amostras de leite semidesnatado na primavera do estado de SC. A PC4, também na parte positiva, revela um padrão de semelhança entre as amostras de leite integral e semi-desnatado nas estações de inverno e primavera dos estados de SC e PR.

Figura 4 - Gráfico dos *scores*. (A) PC1; (B) PC2; (C) PC3; (D) PC4.

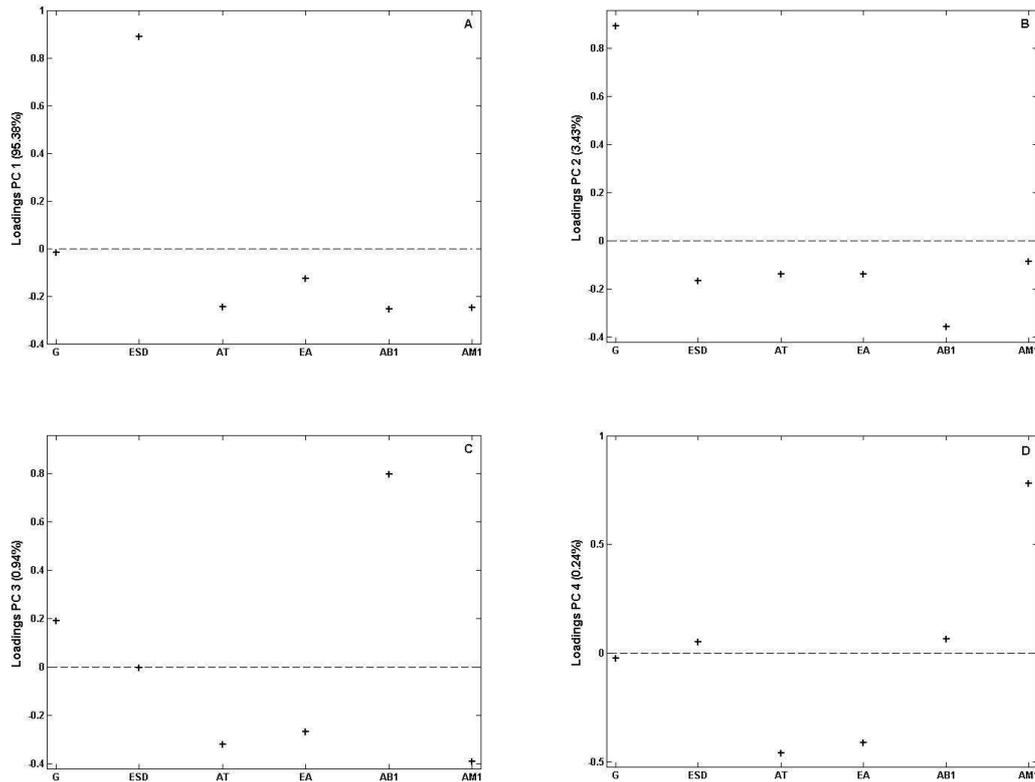


Através do gráfico dos *loadings*, apresentado na Figura 5, pode-se encontrar quais as variáveis estudadas que são responsáveis pela similaridade e diferenças entre as amostras, observada no gráfico dos *scores*.

Na parte positiva da PC1, os *loadings* mostram que todas as amostras são semelhantes em função da variável extrato seco desengordurado (ESD). Na PC2 verifica-se que os leites do tipo integral, com exceção das amostras de leite integral da estação inverno do estado do PR, apresentam semelhança em função do teor de gordura (G).

As amostras de leite semi-desnatado na primavera do estado de SC são agrupadas na PC3 em função da aflatoxina B₁ (AFB₁). O padrão de semelhança observado no gráfico dos scores para as amostras de leite integral e semi-desnatado nas estações de inverno e primavera dos estados de SC e PR ocorrem devido a aflatoxina M₁ (AFM₁).

Figura 5 - Gráfico dos *loadings*. (A) PC1; (B) PC2; (C) PC3; (D) PC4.



G = gordura; ESD = extrato seco desengordurado; AT = acidez titulável; EA = estabilidade ao álcool; AB1 = aflatoxina B₁; AM1 = aflatoxina M₁.

4 CONCLUSÃO

A avaliação microbiológica mostrou 19,7% das amostras em desacordo com a legislação local e internacional, com contagem de mesófilos aeróbios acima de 10^2 UFC.mL⁻¹. A maior frequência deste defeito ocorreu nas amostras de leite desnatado coletadas na primavera. As amostras de leite integral e desnatado do Rio Grande do Sul e Santa Catarina, produzidas durante a primavera apresentaram valores de ESD abaixo da legislação. Nos demais estados os níveis de ESD em leite integral estavam abaixo do estipulado pela legislação na maioria das amostras. Os teores médios de gordura de todas as amostras estavam dentro do estipulado pela legislação. Todas as amostras estavam estáveis ao álcool 68%. A

AFM₁ foi detectada em 113 das 228 amostras e em 7 amostras foi detectado a AFB₁. A maior incidência das micotoxinas foi relatada em leite integral, coletadas no estado de SC, na primavera cujos níveis de contaminação por AFM₁ e AFB₁ foram também os maiores, seguida do inverno. O PCA confirmou que o observado no gráfico dos *scores* ocorre devido às variáveis extrato seco desengordurado na PC1, gordura na PC2, aflatoxina B₁ na PC3 e aflatoxina M₁ na PC4. Portanto, apesar das PCs 3 e 4 explicarem muito pouco da variância dos dados analisados, estas PCs são de extrema importância na distinção das amostras com aflatoxinas.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AOAC. **Association of Official Analytical Chemists**. Official Methods of analysis international, 17 th, CD-ROM, Willian Horwitz, 2000.

BERSOT, L. S.; GALVÃO, J. A.; RAYMUNDO, N. K. L.; BARCELLOS, V. C.; PINTO, J. P. A. N.; MAZIERO, M. T. Avaliação microbiológica e físico-química de leites UHT produzidos no Estado do Paraná – Brasil. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 31, n. 3, p. 645-652, 2010.

BILANDZIC, N.; VARENINA, I.; KOLANOVIC, B. S.; BOZIC, D.; DOKIC, M.; SEDAK, M.; TANKOVIC, S.; POTOENJAK, D.; CVETNIC, Z. Monitoring of aflatoxin M₁ in raw milk during four seasons in Croatia. **Food Control**, [S. I.], v. 54, p. 331-337, 2015.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº62, de 29 de dezembro de 2011a. Regulamento técnico de identidade e qualidade de leite cru refrigerado. Gabinete do Ministro. Anexo II, Item IV.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Secretaria de Defesa Agropecuária (SDA). Manual de garantia da qualidade analítica. Resíduos e Contaminantes em Alimentos. Brasília, 2011b, 277 p.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Instrução Normativa nº 68, de 12 de dezembro de 2006. Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais Físico-Químicos, para Controle de Leite e Produtos Lácteos. **Diário Oficial da União**, Brasília, 14 de dezembro de 2006.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa N° 62, de 26 de agosto de 2003. Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água. **Diário Oficial da União**, 18/09/2003, Seção 01, Página 14, Anexo I.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução (ANVISA). Resolução n. 899, de 29 de maio de 2003. Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos. **Diário Oficial da União**, Brasília, 02 de junho de 2003.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Portaria n. 49, de 3 de setembro de 1999. Preparo de soluções padrões de aflatoxinas, ocratoxina A, zearalenona, tricotecenos e fumonisina B₁. **Diário Oficial da União**, de 15 de setembro de 1999.

BRASIL. Portaria n.370, de 04 de setembro de 1997. In: Regulamento Técnico para fixação de Identidade e Qualidade de leite UHT. **Diário Oficial da República**, República Federativa do Brasil, Brasília, n.172, 08 set.1997.

CARVAJAL, M.; ROJO, F.; MÉNDEZ, I.; BOLAÑOS, A. Aflatoxin B₁ and its interconverting metabolite aflatoxicol in milk: the situation in Mexico. **Food Additives and Contaminants**, [S. I.], v. 20, n.11, p. 1077-1086, 2003.

CHEN, B.; LEWIS, M. J.; GRANDISON, A. S. Effect of seasonal variation on the composition and properties of raw milk destined for processing in the UK. *Food Chemistry*, [S. I.], v. 158, p. 216-223, 2014.

Conselho Da Comunidade Europeia (CCE). Sanitary Regulations and Standards SanPiN 2.3.4.551-96. Food and Processing Industry Enterprises (Technological Processes. Raw Materials). Production Of Milk And Milk products. Disponível em: <http://ec.europa.eu/food/safety/international_affairs/eu_russia/sps_requirements/docs/cu_sps_req_sanpin_2-3-4-559-96_en.pdf>. Acesso em: 01 de junho, 2015.

COSTA, A. M. C. ; MOURA, C. J. ; OLIVEIRA, M. B. . Avaliação da Qualidade Físico-Química no Leite UHT (UAT) Produzido no Estado de Goiás. In: VI CONPEEX - Congresso de Pesquisa Ensino E Extensão - VI Seminário de Pós-graduação Mestrado, 2009, Goiânia. VI, p. 566-568, 2009.

EUROPEAN COMMISSION. Commission Regulation 401/2006 of 23 February 2006 laying down the methods of sampling and analysis for the official control of the levels of mycotoxins in foodstuffs. **Official Journal of the European Union**, [S. I.], v. 70, n. 12, 34, 2006.

FERREIRA, M. A. Controle de qualidade físico químico em leite fluido. Brasília: SBRT/CDT/UnB, 2007. 18 p. (Dossiê técnico).

FILHO, A. O. **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, EMBRAPA**. Produção de leite longa vida subirá 1,5% em 2015. Disponível em <http://www.canalrural.com.br/noticias/leite/producao-leite-longa-vida-subira-2015-59200>, Acesso em março de 2015.

FINK-GREMMELS, J. Mycotoxins in cattle feeds and carry-over to dairy milk: a review. **Food Additives & Contaminants**, [S. I.], v. 25, n. 2, p. 172- 80, 2008.

FOX, P. F.; MCSWEENEY, P. L. H. (2003). *Advanced dairy chemistry*, vol. 1, proteins (3rd ed.,). London: Kluwer Academic/Plenum Publishers. In: Chen, B.; Lewis, M. J.; Grandison, A. S. Effect of seasonal variation on the composition and properties of raw milk destined for processing in the UK. *Food Chemistry*, v. 158, p. 216-223, 2014.

GIOLO, M. P., OLIVEIRA, C. M., BERTOLINI, D. A., LONARDONI, M. V. C., GOUVEIA, M. S., PONTES-NETTO, D.; NIXDORF, S. L.; MACHINSKI JUNIOR, M.. Aflatoxin M₁ in the urine of non-carriers and chronic carriers of hepatitis B virus in Maringa,

Brazil. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, São Paulo, v. 48, n. 3 p. 447-452, 2012.

GOLGE, O. A survey on the occurrence of aflatoxin M₁ in raw milk produced in Adana province of Turkey. **Food Control**, [S. I.], v. 45, p. 150-155, 2014.

HECK, J. M. L.; VAN VALENBERG, H. J. F.; DIJKSTRA, J.; VAN HOOIJDONK, A. C. M. Seasonal variation in the Dutch bovine raw milk composition. **Journal of Dairy Science**, [S. I.], v. 92, n. 10, p. 4745–4755, 2009.

HERZALLAH, S. M. Determination of aflatoxins in eggs, milk, meat and meat products using HPLC fluorescent and UV detectors. **Food Chemistry**, [S. I.], v. 114, n. 3, p. 1141-1146, 2009.

HORWITZ, W.; ALBERT, R.; NESHEIM, S. Reliability of mycotoxin assays--an update. **The Journal of AOAC International**, [S. I.], v. 76, n. 3, p. 461-491, 1993.

HORWITZ, W.; KAMPS, L. R.; BOYER, K. W. Quality assurance in the analysis of foods and trace constituents. **The Journal of AOAC International**, [S. I.], v. 63, n. 6, p. 1344-1354, 1980.

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

ICH – **International Conference on Harmonisation**. Validation of Analytical Procedures: Methodology, Q2B (CPMP/ICH/281/95), 1995.

ISO Standard 11843: Capability of Detection-1, ISO, Geneva, 1997

KAN, C. A. Transfer of toxic substances from feed to food. **Revista Brasileira de Zootecnia**, São Paulo, v. 38, n. spe, p. 423-431, 2009.

KAWASHIMA, M. L.; VALENTE SOARES, L. M. Incidência de fumonisina B₁, aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂, ocratoxina e zearalaenona em produtos de milho. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n. 3, p. 516-521, 2006.

LUIZ, D. J.; SIMÕES, D. J.; TAMOSTU, S. R.; CASALE, A. A. L.; WALTER DE, S. E. H. Avaliação físico-química e microbiológica do leite UHT comercializado em três países do Mercosul (Brasil, Argentina e Paraguai). **Archivos Latinoamericanos de Nutricion**, [S. I.], v. 60, n. 3, p.261-269, 2010.

MARTINS, A. M. C. V.; ROSSI JR, O. D.; SALOTTI, B. M.; BURGER, K. P.; CORTEZ, A. L. L.; CARDOZO, M. V. Efeito do processamento UAT (Ultra Alta Temperatura) sobre as características físico-químicas do leite. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.28, n. 2; p. 295-298, 2008.

OLIVEIRA, C. P.; SOARES, N. F. F.; OLIVEIRA, T. V.; BAFFA JR, J. C.; SILVA, W. A. Aflatoxin M₁ occurrence in ultra high temperature (UHT) treated fluid milk from Minas Gerais/Brazil. **Food Control**, [S. I.], v. 30, n. 1, p. 90-92, 2013.

OTTO, M. **Chemometrics**. Weinheim: New York, [s. n], 1999, p.121-122.

- PEREIRA, J. R.; TAMANINI, R.; RIOS, E. A.; OLIVEIRA, V. H. S.; YAMAMURA, A. A. M.; BELOTI, V. Microbiota Mesófila Aeróbia Contaminante do Leite UHT. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 68, n. 394, p. 25-31, 2013.
- PRATA, L. F. Fundamentos de Ciência do Leite. Jaboticabal: FUNEP/UNESP, 2001. 287 p.
- RIBANI, M.; BOTTOLI, C.B.G.; COLLINS, C.H.; JARDIN, I.C.S.F.; MELO, L.F.C. Validação de Métodos Cromatográficos e Eletroforéticos. *Química Nova*, São Paulo, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.
- SCAGLIONI, P. T.; BECKER-ALGERI, T.; DRUNKLER, D.; BADIALE-FURLONG, E. Aflatoxin B₁ and M₁ in milk. **Analytica Chimica Acta**, [S. I.], v. 829, p. 68-74, 2014.
- SILVA, D. R. T. **Avaliação da Qualidade de Presuntos de Suíno, Ovino e Caprino Relativamente à Contaminação por Micotoxinas**. 2013. Dissertação (Mestrado em Qualidade e Segurança Alimentar). Escola Superior Agrária de Bragança, Bragança.
- SILVA, V. S.; JANEIRO, V.; BANDO, E.; MACHINSKY Jr, M. Occurrence and estimative of aflatoxin M₁ intake in UHT cow milk in Paraná State, Brazil. **Food Control**, [S. I.], v. 53, p. 222-225, 2015.
- TAMANINI, R.; BELOTI, V.; RIBEIRO JR, J. C.; SILVA, L. C. C.; YAMADA, A. K.; SILVA, F. A. Contribuição ao Estudo da Qualidade Microbiológica e Físico-Química Do Leite UHT. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 66, n. 382, p. 27-33, 2011.
- THOMPSON, M.; ELLISON, S. L. R.; WOOD, R. Harmonized Guidelines For Single Laboratory Validation of Methods of Analysis (IUPAC Technical Report). **IUPAC, Pure and Applied Chemistry**, [S. I.], v. 74, n. 5, p. 835-855, 2002.
- TOMASEVIC, I.; PETROVIC, J., JOVETIC, M.; RAICEVIC, S.; MILOJEVIC, M.; MIOCINOVIC, J. Two year survey on the occurrence and seasonal variation of aflatoxin M₁ in milk and milk products in Serbia. **Food Control**, [S. I.], v. 56, p. 64 - 70, 2015.
- UNUSAN, N. Occurrence of aflatoxin M₁ in UHT milk in Turkey. **Food and Chemical Toxicology**, [S. I.], v. 44, n. 11, p. 1897-1900, 2006.
- VALDERRAMA, L.; PAIVA, V.B.; MARÇO, P.H.; VALDERRAMA, P. Proposta experimental didática para o ensino de análise de componentes principais. **Química Nova**, São Paulo, v. 39, n. 2, p. 245-249, 2016
- WOLD, S. Principal Component Analysis: Tutorial. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, [S. I.], v. 2, p. 37-52, 1987.
- ZAIN, M. E. Impact of mycotoxins on humans and animals. **Journal of Saudi Chemical Society**, [S. I.], v.15, n. 2, p. 129-144, 2011.

**ARTIGO III - EFEITO DO PROCESSAMENTO TÉRMICO E FERMENTAÇÃO NA
COMPOSIÇÃO NUTRICIONAL DE LEITE**

RESUMO

O trabalho objetivou avaliar a ação dos tratamentos térmicos de pasteurização rápida (*High Temperature, Short Time* - HTST) e ultra alta pasteurização (Ultra Alta Temperatura - UAT), nos níveis de riboflavina e dos principais componentes do leite bem como a estabilidade destes compostos em amostras de leite submetidas à diferentes ensaios de fermentação. As amostras foram coletadas em unidades processadoras de leite, antes e após o processamento térmico, resultando em quatro diferentes amostras: leite cru homogeneizado (antes da pasteurização), leite homogeneizado pasteurizado por meio de pasteurização rápida - HTST (após pasteurização), leite cru homogeneizado (antes do processamento UAT) e leite Ultra Alta Temperatura - UAT (após processamento UAT). Para avaliar o efeito do tratamento térmico foram quantificados os teores de lipídios (F) (%), proteína bruta (P) (%), lactose (L) (%) e riboflavina ($\text{mg}\cdot 100\text{mL}^{-1}$) nas amostras antes e após os distintos tratamentos e após submeter cada amostra à fermentação com bactérias ácido lácticas (BAL) dos gêneros *Lactobacillus*, *Streptococcus* e *Bifidobacterium* utilizadas separadas e combinadas (8 ensaios). A extração, identificação e quantificação da Riboflavina em leite e produtos fermentados foi validada, com percentuais de recuperação (%R) variando de 92,8% a 105,2%. Os tratamentos térmicos causaram mudanças significativas nos teores de proteína bruta, lactose e riboflavina, sendo a pasteurização e o processamento UAT responsáveis pela redução de 34% dos níveis de riboflavina e proteína, respectivamente. Os produtos fermentados, apresentaram um aumento da concentração de riboflavina em todas as amostras submetidas à fermentação com a BAL *L. acidophilus*, indicando a eficácia desta bactéria na produção da vitamina em leite.

Palavras chave: Bactérias ácido lácticas. Tratamento térmico. Riboflavina. Composição físico química.

EFFECT OF THERMAL PROCESSING AND FERMENTATION IN THE NUTRITIONAL COMPOSITION OF MILK

ABSTRACT

The study evaluated the action of heat treatment of rapid pasteurization (High Temperature, Short Time - HTST), and ultra high pasteurization (Ultra High Temperature - UHT), in Riboflavin level and the main milk's components, as well the stability these compounds in milk samples submitted to different fermentation essay. Samples were collected in milk processing units, before and after thermal processing, resulting in four different samples: homogenized raw milk (before to pasteurisation), homogenized milk pasteurized by flash pasteurization - HTST (after pasteurisation), homogenized raw milk (before UHT processing) and Ultra High Temperature Milk (after UHT processing). To evaluate the effect of the heat treatment, were quantified lipid content (F) (%), gross protein (P) (%), lactose (L) (%) and Riboflavin (mg.100 mL⁻¹) in the samples before and after the different treatments and after fementation this samples with lact acid bacteria (LAB) of genera *Lactobacillus*, *Streptococcus* and *Bifdobacterium*, used separate and combined (8 essay). Riboflavin extracion, identification and quantification in milk and fermented products was validated with Recovery percentage (R%), ranging from 92,8 to 105,2%. The thermal treatment caused significant changes in crude protein, lactose and riboflavin, being pasteurization and UHT processing responsible for 34% reduction of Riboflavin and protein levels, respectively. Fermented products, had increased in Riboflavin concentration in all samples submitted to fermentation with LAB *L. acidophilus*, indicating the effectiveness of this bacterium for the production of vitamin milk.

Keywords: Lactic Acid Bacteria. Thermal treatment. Riboflavin. Physical-Chemical composition.

1 INTRODUÇÃO

O leite é um fluido biológico complexo, composto, principalmente, por carboidratos, lipídeos, proteínas e micronutrientes como as vitaminas, com destaque para as do complexo B, em especial a vitamina B₂ ou riboflavina, que está presente em concentrações de aproximadamente 1 mg.L⁻¹ (FOOD..., 1998). A fim de torná-lo seguro para o consumo e aumentar a vida útil, o leite é tratado termicamente. A pasteurização é o tratamento térmico mais empregado e utiliza temperaturas entre 72° - 75 °C durante 15 – 20 s, permitindo desta forma o armazenamento sob refrigeração, durante aproximadamente 5 dias. Outro tratamento térmico industrial é o processo Ultra Alta Temperatura - UAT (do inglês, *Ultra High Temperature* - UHT) que utiliza temperaturas entre 130° - 150° C durante 2 a 4 s, e que combina o processo com o envase em embalagens assépticas com proteção da luz, que torna o produto estável à temperatura ambiente durante quatro meses (BRASIL, 2011; BRASIL, 1997; WADA; LONNERDAL, 2014).

A composição química e nutricional do leite pode ser afetada pelos tratamentos térmicos oferecidos ao consumo e ao processamento de derivados lácteos. Uma alternativa para diminuição desses danos nutricionais é a elaboração de leites fermentados com bactérias ácido lácticas (BAL), que representam um grupo heterogêneo de micro-organismos que conferem propriedades tecnológicas importantes. Algumas BALs são consideradas probióticas, pois, quando ingeridas regularmente e em quantidades adequadas conferem benefícios a saúde do consumidor (FAO/WHO, 2001).

As bactérias ácido lácticas quando utilizadas como culturas probióticas são responsáveis pela produção, liberação e aumento de alguns macronutrientes, micronutrientes (como as vitaminas) e outros compostos dependentes da composição inicial do substrato (HUGENHOLTZ; SMID, 2002). Dentre os principais produtos da fermentação por BAL, está a riboflavina, (7,8-dimetil-10-ribitil-isoaloxazina), que é uma vitamina hidrossolúvel pertencente ao complexo vitamínico B₂. Sua liberação no organismo humano ocorre em meio ácido, quando o bolo alimentar chega ao estômago liberando as coenzimas FAD (flavina adenina dinucleotídeo) e FMN (flavina mononucleotídeos) ligadas a proteínas (MACHADO, 2003; SOUZA et al., 2005). Está presente em diversos alimentos, dentre eles, leite e as vísceras, como fígado e rins, sendo que mais de um quarto das recomendações de ingestão de vitamina B₂ é proveniente do leite e dos seus derivados (POWERS, 2003).

A vitamina B₂, de acordo com a *Food and Nutrition Board* dos EUA, tem uma ingestão diária recomendada de 1,3 mg de riboflavina (FOOD..., 1996). A deficiência de

riboflavina na dieta humana é caracterizada por glossite, queratose, dermatite e neutropenia. É endêmica em muitas regiões do mundo e em certas populações que apresentam baixas ingestões das suas principais fontes: fígado, leite e derivados, rim, carne, ovos, ostras, germe de trigo, nabos, beterraba e farelo de arroz (FANICETO et al., 2000; FRANCO, 2002; POWERS, 2003).

Uma porção considerável da riboflavina existente no leite está na forma de coenzima, ligada covalentemente à proteína e estudos sugerem que a fermentação do leite de vaca com bactérias iniciadoras como as do gênero *Lactobacillus* proporcionam um aumento do teor desta vitamina no leite, além de que a riboflavina sintetizada por culturas iniciadoras pode também aumentar a sua biodisponibilidade (SINGH; DEODHAR, 1994). Em contrapartida, Deeth e Tamine (1994) evidenciaram a redução desta vitamina quando o leite foi submetido à fermentação por bactérias ácido láticas, enquanto que, em outros casos esse componente não foi alterado durante a produção de iogurte e bebida láctea fermentada (SAIDI, 1993).

Tendo em vista esses aspectos e a escassez de estudos com relação à estabilidade nutricional e de vitaminas em amostras de leite submetidas ao beneficiamento e à fermentação para produção de iogurte e outros derivados lácteos, o objetivo deste trabalho foi determinar a estabilidade da riboflavina e dos principais componentes do leite ao processamento industrial, bem como a estabilidade destes compostos em amostras de leite submetidas a diferentes ensaios de fermentação.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 AMOSTRAS

As amostras de leite foram coletadas em dois laticínios localizados na região oeste do estado do Paraná. A fim de se avaliar o efeito das etapas de beneficiamento aplicadas na indústria, as coletas foram realizadas antes e após as operações de homogeneização e tratamento térmico, resultando em quatro amostras distintas: leite cru homogeneizado integral (antes da pasteurização), leite homogeneizado integral pasteurizado por meio de pasteurização rápida - HTST (após pasteurização), leite cru homogeneizado integral (antes do processamento UAT) e leite Ultra Alta Temperatura – UAT integral (após processamento UAT). As amostras foram coletadas, identificadas e resfriadas a temperatura de $3^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ até o momento das determinações.

2.2 DETERMINAÇÃO DE RIBOFLAVINA

2.2.1 Validação do método de extração e quantificação da vitamina

O padrão de riboflavina utilizado na construção da curva de calibração foi adquirido da *Sigma Chemical Company*®, (USA, 2013) e preparado a partir de diluição prévia em ácido acético 0,02M (sob proteção de luz) a fim de obter uma solução de trabalho com concentração teórica de $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (ABRANCHES et al., 2008). A partir desta solução, foram preparadas as demais soluções intermediárias para a construção da curva de calibração, constituídas com as seguintes concentrações: 1×10^{-4} , 1×10^{-3} , 1×10^{-2} , 5×10^{-2} , 1×10^{-1} e $2 \times 10^{-1} \mu\text{g.mL}^{-1}$. Todas as soluções foram armazenadas em frasco âmbar sob proteção da luz. O tempo de retenção (tr) da riboflavina foi comprovado a partir da injeção do padrão em concentrações crescentes, e a partir desses dados, foi construída a curva de calibração da vitamina. Os dados obtidos variando as concentrações do padrão foram ajustados em modelo de regressão linear para ser empregado na quantificação da vitamina em amostras de leite.

Após obtenção da curva de calibração, uma amostra de leite UAT desnatado foi submetida à extração da vitamina. Para a extração da riboflavina da amostra de leite UAT desnatado, foi utilizado o método proposto por Bianchini e Penteado (2000) com modificações (APÊNDICE 2), o qual consiste na extração ácida da vitamina (TCA 16%) por meio de agitação em banho ultrasônico (1 h) seguido de filtração e neutralização (pH 6,5 a 7,0) com NaOH 10% e nova purificação em unidades filtrantes de $0,45 \mu\text{m}$ de porosidade. Todas as etapas foram realizadas em ambiente escuro, protegido da luz e em vidrarias âmbar, devido à foto sensibilidade do composto. Os extratos foram armazenados em frascos âmbar até quantificação em sistema cromatográfico.

As condições cromatográficas utilizadas para identificação, separação e quantificação da riboflavina foram: cromatógrafo a líquido de ultra alta eficiência, *Thermo Fisher Scientific*®, munido de bomba quaternária de alta pressão, injetor automático termostaticado; detector de fluorescência; *software* “Chromleon^(c)” Dionex Versão 7.1.2.1478; coluna C18 Acclaim 120, $5 \mu\text{m}$ Analítica (150 x 4,6 mm); fase móvel composta de metanol e água ultrapura (40:60); fluxo 1 mL.min^{-1} . Os cromatogramas foram obtidos em comprimento de onda de excitação 456 e de emissão 525 nm. A identificação da riboflavina foi realizada por comparação do tempo de retenção do padrão e amostras analisadas sob as mesmas condições. Foram injetados $20 \mu\text{L}$ de cada amostra, sendo o tempo de corrida de aproximadamente 10 minutos.

Uma curva de matriz foi obtida a partir da extração e quantificação da riboflavina presente em uma amostra de leite UAT desnatado. O extrato foi quantificado e apresentou teor de $533 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e a partir deste foram obtidos os pontos referentes à curva de efeito de matriz (1×10^{-4} , 1×10^{-3} , 1×10^{-2} , 5×10^{-2} , 1×10^{-1} e $2 \times 10^{-1} \mu\text{g.mL}^{-1}$), para garantir a seletividade e linearidade do método. O efeito de matriz (seletividade) foi estimado a partir do cálculo de fator de matriz das curvas do padrão e da matriz, usando a relação entre os coeficientes angular de ambas. Foram avaliados ainda os valores de recuperação do método (%R) (BRASIL, 2003).

2.3 EFEITO DO PROCESSAMENTO TÉRMICO NA COMPOSIÇÃO DO LEITE

O estudo da estabilidade térmica dos componentes do leite foi realizado a partir da estimativa dos teores de lipídios (F) (%), proteína bruta (P) (%), lactose (L) (%) e riboflavina (mg.100mL^{-1}) nas amostras de leite cru antes do processamento e após pasteurização rápida - HTST (72 a 75°C/ 15 a 20 segundos/ Resfriamento a 4°C) e processamento UAT (130 a 150°C/ 2 a 4 segundos/ Resfriamento a 32°C).

2.4 DETERMINAÇÕES DE pH, ACIDEZ E COMPOSIÇÃO QUÍMICA

A determinação da acidez e do pH seguiu o proposto pela Instrução Normativa N°68 (BRASIL, 2006). Para determinação da composição centesimal e das propriedades físico-químicas foram avaliados o teor de lipídios (F) (%), proteína bruta (P) (%), lactose (L) (%), extrato seco desengordurado (ESD) (%) e densidade a 15°C (D), utilizando analisador ultrassônico de leite (Lactoscan®, Milktronic, Bulgária).

2.5 AÇÃO DE MICRO-ORGANISMOS PROBIÓTICOS NA COMPOSIÇÃO NUTRICIONAL E TEORES DE RIBOFLAVINA

2.5.1 Bactérias, condições de cultivo e estimativa da concentração microbiana

As bactérias ácido-láticas (BAL) foram originadas de cepas previamente certificadas de *S. salivarius* subsp. *thermophilillus* STI 12 (Christian Hansen®), *L. acidophilus* La-5 (Christian Hansen®) e *B. lactis* HN019 (Danisco®) foram recebidas na forma liofilizada e 0,5 g de cada cultura foi reativada em 50 mL de Caldo Man-Rogosa-Sharpe (MRS) com

0,05% de L-cisteína (com exceção do *S. thermophilus* que não requer uso de agente redutor de oxigênio) e incubadas a 37°C durante 48 horas.

A cepa bacteriana de *L. delbruecki* subsp. *bulgaricus* (CCT 1375-NCDO 1489) foi recebida na forma liofilizada, sendo reativada em caldo MRS (37°C/ 24 h) e conservada sob temperatura de congelamento de -20°C em tubos de 2 mL, onde eram adicionados 800 µL de cultura bacteriana crescida em caldo MRS e 200 µL de glicerol estéril (agente crioprotetor) (BOVO , 2011). Para a reativação das cepas, estas foram descongeladas rapidamente e repicadas em caldo MRS e incubadas a temperatura de 37°C por 48 horas em estufa incubadora B. O. D. (Nova Ética, 403-3D, Brasil) . As culturas foram repicadas em caldo MRS repetidas vezes até que as mesmas alcançassem uma concentração elevada de células.

Para o cálculo da estimativa da concentração bacteriana, cada cepa foi submetida distintamente à inoculação em caldo MRS seguido de plaqueamento em profundidade realizado em triplicata, inoculando-se 1 mL de cada diluição, em placas de Petri estéreis, adicionando-se em seguida meio de cultura ágar MRS para as bactérias anaeróbicas (*L. acidophilus* La-5, *B. lactis* HN019 e *L. delbruecki* subsp. *Bulgaricus*) e ágar M17 para o *S. thermophilus*, seguido de incubação. Para garantir as condições anaeróbicas, as placas foram acondicionadas invertidas em uma câmara de anaerobiose contendo um gerador de anaerobiose (Anaerobac®) e, então, incubadas a temperatura de 37°C±1°C por 48 horas em estufa incubadora B. O. D. (Nova Ética, 403-3D, Brasil). Foram selecionadas para contagem as placas com 25 a 250 colônias, sendo o cálculo do resultado feito de acordo com o número de colônias confirmadas e a diluição inoculada. Os resultados foram expressos em unidades formadoras de colônias (UFC) por mL de meio (UFC.mL⁻¹). Este procedimento foi realizado a cada duas horas, até completar 15 horas de incubação da bactéria reativada. Concomitante ao plaqueamento foi realizada a estimativa da concentração bacteriana nos caldos, através da técnica de Turbidimetria, por meio de medida da densidade óptica (DO) em espectrofotômetro (PerkinElmer, Lambda XLS, Reino Unido) a 600 nm a cada duas horas. A estimativa da concentração das cepas bacterianas foi realizada por meio da criação de uma curva de concentração correlacionando a medida de absorvância com o logaritmo da concentração bacteriana obtida através da contagem das colônias por plaqueamento em profundidade (BOVO et al., 2013). A partir desses dados, foram geradas equações para calcular a concentração bacteriana no meio e o volume de caldo de cultura necessário para obter 1 x 10⁸ UFC. O ajuste das equações aos dados foi avaliado a partir da análise dos coeficientes de determinação (r²).

2.5.2 Preparo dos fermentados

Após a incubação de cada cepa bacteriana em caldo MRS a 37°C por 24 horas foi realizada leitura em espectrofotômetro (PerkinElmer, Lambda XLS, Reino Unido) para determinação da concentração de células bacterianas no meio através da curva de calibração construída previamente. O fermentado foi preparado a partir da inoculação das bactérias nos leites com concentração previamente estimada de 10^8 UFC.mL⁻¹ seguido de incubação a temperatura de 42°C±1°C em estufa incubadora B.O.D. (Nova Ética, 403-3D, Brasil). Os diferentes fermentados produzidos estão apresentados no Quadro 01.

Quadro 01 - Delineamento do estudo da estabilidade de vitamina em amostras de leite fermentadas com bactérias ácido lácticas

Ensaio	Micro-organismo
Controle	-
1	<i>L. delbruecki</i> subs. <i>Bulgaricus</i>
2	<i>L. acidophilus</i>
3	<i>B.. lactis</i> HN019
4	<i>S. salivarius</i> ssp. <i>Thermophilus</i>
5	<i>L. delbruecki</i> subs. <i>bulgaricus</i> + <i>S. salivarius</i> ssp. <i>Thermophilus</i>
6	<i>L. delbruecki</i> subs. <i>bulgaricus</i> + <i>S. salivarius</i> ssp. <i>thermophilus</i> + <i>L. acidophilus</i>
7	<i>L. delbruecki</i> subs. <i>bulgaricus</i> + <i>S. salivarius</i> ssp. <i>thermophilus</i> + <i>B.. lactis</i> HN019
8	<i>L. delbruecki</i> subs. <i>bulgaricus</i> + <i>S. salivarius</i> ssp. <i>thermophilus</i> + <i>L. acidophilus</i> + <i>B.. lactis</i> HN019

Foram coletadas 50 mL de amostra no tempo zero (0 hora de incubação) e a cada 4 horas para realização das determinações de pH, acidez, composição centesimal e riboflavina. Uma amostra de cada tipo de leite, sem as bactérias ácido lácticas, denominada “Controle” também foi incubada. As coletas foram realizadas até o fermentado atingir pH entre 4,4 e 4,9 (pH referente à produção de iogurte e/ou leites fermentados).

2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

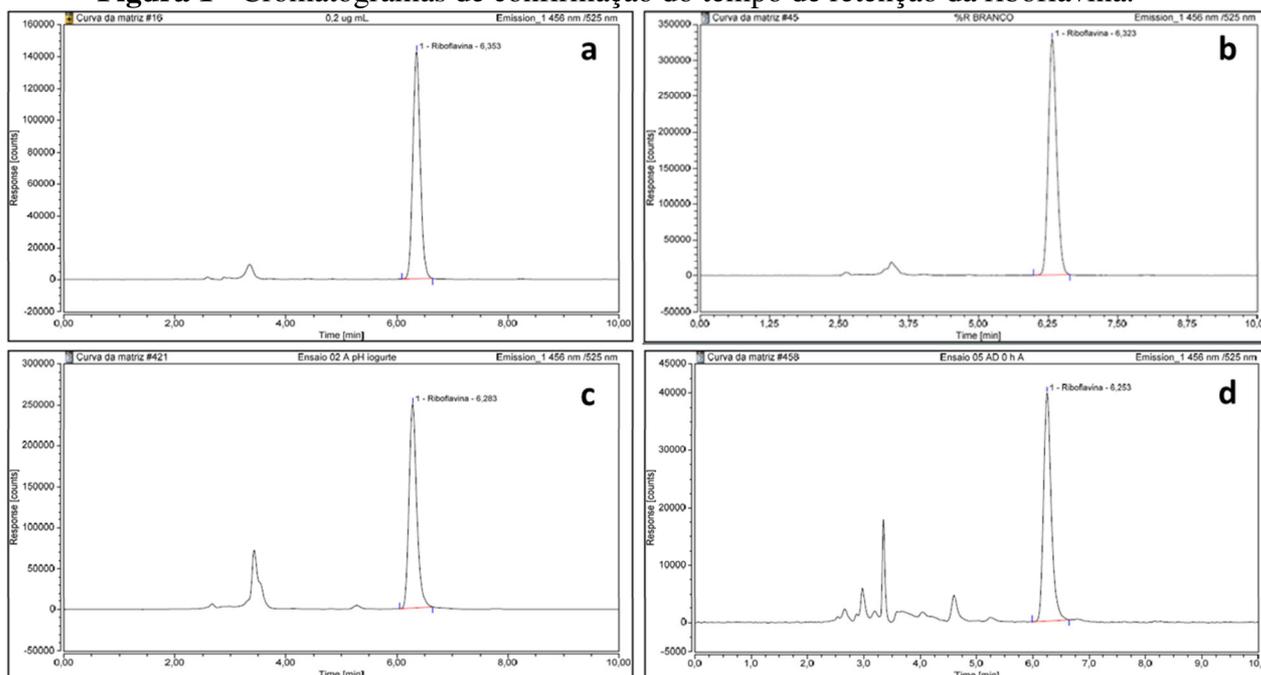
A análise estatística dos resultados foi realizada utilizando o *software Statistica* v. 7.0. Foram avaliadas as médias dos experimentos realizados em triplicata, e a significância de suas diferenças, empregando o teste de Tukey ao nível de confiança de 95%.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 INDICATIVOS DA CONFIABILIDADE DO MÉTODO DE DETERMINAÇÃO DE RIBOFLAVINA

O tempo de retenção (t_r) da riboflavina foi comprovado a partir da injeção do padrão em concentrações crescentes obtendo-se desta forma o t_r de 6,35 min. O tempo de retenção da vitamina nas amostras de leite, leite fermentado e digerido também foram em torno de 6,3 min. (Figura 1). A partir da determinação do t_r foi construída a curva de calibração da riboflavina. O coeficiente de correlação (r) foi maior que 0,99, estando de acordo com orientações da ANVISA e do INMETRO, que recomendam, respectivamente, $r \geq 0,99$ e $r \geq 0,90$ (BRASIL, 2003; INMETRO, 2003).

Figura 1 - Cromatogramas de confirmação do tempo de retenção da riboflavina.



a: Cromatograma do padrão de riboflavina ($0,2 \mu\text{g.mL}^{-1}$); b: cromatograma de uma amostra de leite ($0,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$); c: cromatograma de uma amostra de leite fermentada ($0,4 \mu\text{g.mL}^{-1}$); cromatograma de uma amostra digerida ($0,06 \mu\text{g.mL}^{-1}$).

O método de extração e quantificação foi validado por meio da construção da curva de calibração da matriz com seis níveis de concentração de riboflavina, com coeficiente de determinação (r^2) igual a 0,99999 (Tabela 1). Os percentuais de recuperação (%R) variaram

de 92,8% a 105,2% (Tabela 2). Os dados de regressão linear gerados a partir da construção da curva padrão e curva de efeito da matriz estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 - Indicativos de eficiência das curvas padrão e de robustez

Indicativos	Curva padrão	Curva da matriz
Concentrações ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	0,0001 -0,2	0,0001 - 0,2
Coef. de determinação (r^2)	0,99865	0,99999
Equação	$y = 108,5496x - 215,6050$	$y = 110,1212x - 8,4934$

A seletividade foi confirmada a partir da relação entre os coeficientes angulares das duas curvas, que foi igual a 0,98, indicando valor próximo a 1,0, que de acordo com a literatura é um indicativo de ausência de interferentes que possam causar efeito no instrumento (KRUIVE; LEITO; HERODES, 2009).

Tabela 2 - Recuperação (%R) e CV% do método de extração.

Fortificação ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)*	% Recuperação (% R)	Média \pm CV (%)
0,05	92,8	
0,05	105,6	101,5 \pm 5,71
0,05	106,1	
0,1	100,9	
0,1	102,3	101,7 \pm 0,57
0,1	102,0	
0,2	96,5	
0,2	105,2	98,0 \pm 4,91
0,2	92,3	

*Teor natural de riboflavina na amostra utilizada para fortificação: $2,675 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

Estudos recentes avaliaram a concentração de vitaminas em amostras de leite e derivados a partir da técnica de cromatografia líquida. Abranches et al. (2003) avaliaram o teor de riboflavina em leite desnatado, iogurte e queijo tipo *petit suisse*, e obtiveram tr de 3,59, 3,50 e 3,53 min, respectivamente. Woollard e Indyk (2002) estudaram um método rápido para separação e determinação de tiamina, riboflavina, piridoxina e niacinamida em fórmulas infantis a partir da cromatografia líquida e obtiveram um limite de detecção de $0,004 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para a riboflavina com tr de 2,2 min e regressão linear $y=334,030x -0,370$.

3.2 EFEITO DO PROCESSAMENTO TÉRMICO NA COMPOSIÇÃO DO LEITE

As amostras foram avaliadas quanto aos teores de lipídeos, proteína, lactose e riboflavina antes e após os tratamentos térmicos realizados nas indústrias de laticínios. Os resultados estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 - Composição nutricional do leite antes e após os tratamentos térmicos.

Tratamento térmico	Pasteurização		UAT	
	72-75°C/ 15 a 20 segundos		130-150°C/ 2 a 4 segundos	
	Antes	Após	Antes	Após
Lipídeos (%)	3,83 ^a ± 0,04	3,47 ^b ± 0,06	3,33 ^a ± 0,06	3,31 ^a ± 0,004
Proteína bruta (%)	4,55 ^a ± 0,01	3,94 ^b ± 0,007	4,30 ^a ± 0,03	2,82 ^b ± 0,01
Lactose (%)	4,56 ^a ± 0,01	4,03 ^b ± 0,008	4,40 ^a ± 0,02	4,22 ^b ± 0,01
Riboflavina (mg.100mL ⁻¹)	0,11 ^a ± 0,008	0,07 ^b ± 0,004	0,14 ^a ± 0,001	0,12 ^b ± 0,002

Para um mesmo parâmetro médias com letras minúsculas iguais indicam que não há diferença significativa entre as médias de cada tratamento térmico para cada análise (linha), pelo teste de Tukey ($\alpha < 0,05$);

Com exceção dos percentuais de lipídeos nas amostras UAT, que não sofreram alteração significativa após aplicação do tratamento térmico, todos os demais constituintes analisados tiveram seus níveis reduzidos significativamente após o beneficiamento. Os percentuais de proteína sofreram uma redução média de 34 e 13,4%, quando o leite foi submetido ao processo UAT e pasteurização, respectivamente. Em contrapartida, as maiores reduções de lactose e riboflavina, foram observadas nas amostras pasteurizadas, em que os níveis de lactose reduziram de 4,56 para 4,03 e a riboflavina sofreu um decréscimo de 0,037 mg.100mL⁻¹. Essas perdas também foram observadas nas amostras de leite UAT, no entanto, em níveis menores (4,3 % e 0,014 mg.100mL⁻¹, respectivamente).

Os níveis de proteína sofreram redução significativa em ambos os tratamentos térmicos avaliados, principalmente quando aplicado o processo UAT, que ocasionou redução de aproximadamente 1,5% da proteína bruta inicial. O tratamento térmico do leite origina a desnaturação das proteínas e o efeito varia de acordo com a severidade do aquecimento desde

a desnaturação parcial durante a pasteurização até a total na esterilização convencional. As imunoglobulinas são as proteínas mais instáveis, seguido da α -lactoalbumina, β -lactoglobulina e albumina sérica. A pasteurização realizada em condições ótimas não ocasiona uma desnaturação significativa das proteínas já o processamento UHT Direto pode desnaturar até 60% das proteínas do lactosoro e conseqüentemente causar o aroma de cozido relacionado aos leites UAT (VARNAM; SUTHERLAND, 1995; VEISEYRE, 1988).

Os teores de lipídeos foram pouco afetados pelos tratamentos térmicos moderados aplicados ao leite, uma vez que, são necessárias temperaturas muito superiores a 100°C ou ainda exposição do leite durante várias horas a 70-80°C para detectar uma degradação dos triglicérides que se traduzem pela formação de γ -lactonas, a partir da hidrólise dos hidroxiácidos graxos. Nestes casos pode ocorrer a formação de metil cetonas a partir de ácidos β -cetônicos provenientes da hidrólise dos glicérides, que irão afetar diretamente o sabor do leite (VEISSEYRE, 1988).

As alterações nas características sensoriais do leite também podem estar associadas aos efeitos do uso de temperaturas elevadas sobre os teores de lactose do produto, isso por que, quando os cristais de lactose são aquecidos a temperaturas mais elevadas, pode ocorrer a Reação de Maillard, que é resultante da reação entre o grupo aldeído da lactose e o grupo amino das proteínas e a polimerização das moléculas de lactose, conferindo ao produto uma cor mais escura. Outro aspecto negativo quanto à degradação da lactose quando utilizadas altas temperaturas é a decomposição do composto por oxidação em ácidos orgânicos que acarreta em um aumento de acidez após a esterilização do leite (AMIOT; ALMUDI, 1991).

O tratamento térmico e a homogeneização não afetam diretamente os teores de riboflavina do leite, no entanto podem alterar a fotossensibilidade da vitamina, por meio de mudanças na dispersão e/ou absorção da luz, que podem alterar também algumas propriedades físico químicas. Essas alterações ocorrem principalmente devido a desnaturação de proteínas do soro do leite e possível associação com as micelas de caseína, escurecimento não enzimático e agregação de caseína micelar (SAIDI, 1996). Haddad e Loewenstein (1981) submeteram amostras de leite fluido à quatro diferentes tipos de tratamento térmico, sendo dois de pasteurização rápida (72°C/16s; 80°C/16s) e dois processos UAT (110°C/3 a 5 s; 140°C/3 a 5 s) e observaram que quando aplicados os processos de pasteurização havia uma leve perda de riboflavina (0,001 mg.L⁻¹) enquanto que o processamento pelo processo UAT (140°C por 3 a 5 segundos) proporcionou uma diminuição de 2,7% nos teores de vitamina, sendo estes valores considerados não significativos quando comparados ao teor inicial da vitamina no leite fluido (1,332 mg.L⁻¹). As maiores perdas de riboflavina observadas em

nosso trabalho foram no leite submetido ao processo HTST, que pode ser justificada pelo envase do leite tratado termicamente em embalagens que não oferecem proteção da luz, enquanto que nas amostras de leite UAT o envase é realizado em embalagens assépticas cartonadas as quais impossibilitam o contato do produto com a claridade.

3.3 AÇÃO DAS BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS NA COMPOSIÇÃO NUTRICIONAL E TEORES DE RIBOFLAVINA

As curvas de concentração bacteriana, apresentadas na Figura 2, foram obtidas pela correlação entre as medidas de absorvância e do plaqueamento em profundidade de cada bactéria. Na Figura 03 está uma placa de Petri contendo colônias típicas de BAL, mais precisamente *B. lactis* HN019 resultantes do plaqueamento em profundidade realizado para determinar a concentração bacteriana no caldo MRS cultivado por 24 horas a 37°C.

A partir dos dados obtidos, foram geradas as equações potenciais, que foram utilizadas no cálculo da concentração bacteriana no meio, e em seguida, para o cálculo do volume de meio com o cultivo de bactérias utilizado para alcançar a concentração de $1,0 \times 10^8$ UFC.mL⁻¹ de leite. As equações adequaram-se perfeitamente aos dados, uma vez que o valor do coeficiente de determinação (r^2) de cada uma das equações variou entre 0,97 e 0,99 (Tabela 4 e Figura 2).

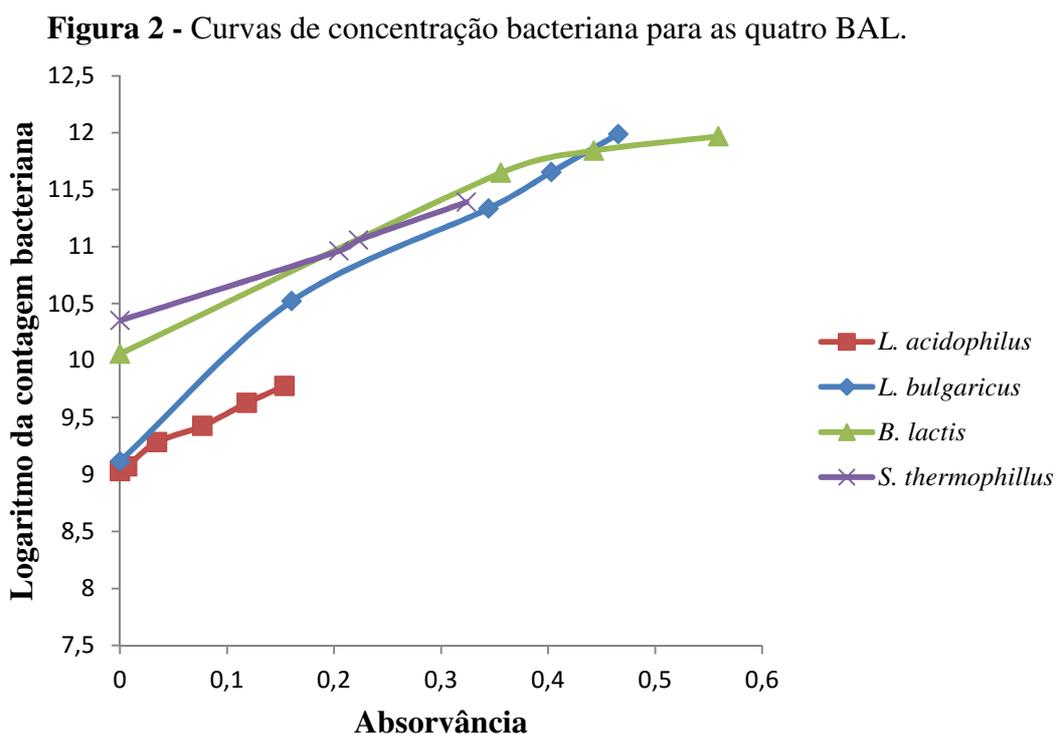
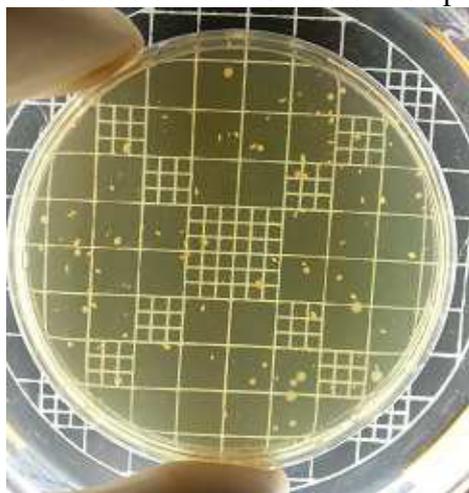


Figura 3 - Placa de Petri contendo meio de cultivo e colônias típicas de *B. lactis* HN019**Tabela 4** - Equações potenciais das BAL.

Bactéria	Equação	Coefficiente de determinação (r^2)
<i>L. acidophilus</i>	$y = 11,055x^{0,0983}$	0,9938
<i>L. bulgaricus</i>	$y = 12,871x^{0,1354}$	0,9939
<i>B. lactis</i>	$y = 12,529x^{0,1304}$	0,994
<i>S. thermophilus</i>	$y = 12,026x^{0,0949}$	0,9774

Após inoculação e incubação dos leites, foram realizadas coletas nos tempos 0 h, 4 h e ao atingir pH de fermentação de produtos lácteos (entre 4,4 e 4,9) para determinar o efeito das BAL sobre a composição nutricional e de riboflavina nos diferentes tempos de fermentação.

A composição química das amostras, comparadas às médias em relação ao tempo de fermentação de cada tipo de leite e inóculo está apresentada nas Tabelas 5 e 6. A legislação vigente determina que os leites fermentados integrais contenham de 3,0 a 5,9 g de matéria gorda por 100 g do produto e no mínimo 2,9% de proteínas lácteas (BRASIL, 2007). É possível observar que, quando utilizado leite cru para a fermentação os níveis de lipídios não atingiram o proposto pela legislação nos ensaios 2, 3, 6 e 8, indicando que o processo térmico pode auxiliar na disponibilidade desse composto no produto fermentado. Para garantir a composição e as características sensoriais, os leites destinados à produção de iogurte podem ser padronizados quanto aos teores de sólidos e gordura. Para isto são acrescentados açúcar (10% a 12%) e leite em pó desnatado (2% a 4%) para dar sabor e aumentar o teor de extrato seco total (KARDEL; ANTUNES apud LERAYER; SALVA, 1997; OLIVEIRA apud LERAYER; SALVA, 1997).

Na etapa de pré-tratamento também é realizado o tratamento térmico, para inativar os micro-organismos patogênicos e outros que possam competir com as culturas do iogurte, bem como promover a desnaturação das proteínas do soro, reduzindo a contração do coágulo da caseína do iogurte. Neste caso, o tratamento térmico também diminui a susceptibilidade a sinérese dos géis lácteos, favorece o início da cultura láctica, devido à redução do conteúdo de oxigênio no leite e influi no aumento da viscosidade do iogurte e na obtenção de uma boa textura (VARNAM; SUTHERLAND, 1994). Quando utilizada a esterilização (110°C por 30 min ou 130°C por 40 s) no pré tratamento do leite destinado à produção de leites fermentados, pode ocorrer a incorporação de proteínas do soro resultando no aumento na viscosidade e firmeza (TAMIME; ROBISONS apud TAMINE; ROBISONS, 2007, 2007; WALSTRA, WOUTERS; GEURTS, 2006). Este aumento dos teores de proteína total pode ser observado nos produtos fermentados elaborados com leite UAT e pasteurizado, quando comparados aos níveis no leite cru utilizado na produção. Os maiores teores de proteínas no produto fermentado foram observados nas amostras preparadas a partir de leite pasteurizado, em que esses níveis variaram de 4,1 a 4,9%, sendo o maior teor observado na amostra produzida com as quatro BAL de forma conjunta.

Os tratamentos térmicos aplicados à matéria prima destinada à produção de leites fermentados afetam as enzimas, naturais ou provenientes de micro-organismos, presentes no leite cru influenciando a composição química dos produtos fermentados. Enzimas naturais do leite como as lipases podem causar alterações no sabor e na estabilidade das proteínas em alimentos lácteos. As enzimas oxidorreduzidas também podem ter efeitos sobre a estabilidade do sabor, particularmente sobre a fração lipídica, devido a sua influência sobre o estado oxidativo (DAMODARAN, PARKIN E FENNEMA, 2010). É necessário considerar ainda as enzimas produzidas por micro-organismos presentes no leite cru, como por exemplo os psicotróficos, provenientes da refrigeração do leite, e que produzem enzimas lipolíticas e proteolíticas. As proteases produzidas por *Pseudomonas* degradam a caseína, atuando primeiramente na K-caseína com consequente desestabilização da micela. Esta enzima é produzida em temperaturas entre 5 e 20°C e é mais ativa entre 37 e 45°C enquanto as lipases são bastante ativas em temperaturas de refrigeração (ESALQ, 2016).

Neste estudo, não houve o pré-tratamento térmico nas amostras de leite cru destinadas a produção de fermentado lácteo a partir de diferentes BAL, resultando nas características distintas dos leites tratados e não tratados termicamente, principalmente com relação à textura e precipitação do coágulo. Estes podem ter influenciado nos demais parâmetros, aumentando a variabilidade dos resultados de determinação Lactoscam®, principalmente quanto aos

valores de lactose no produto fermentado, que tiveram seus valores aumentados após a fermentação, considerando desta forma, que o equipamento pode ter quantificado outros carboidratos presente na amostra além da lactose, visto que estes índices podem aumentar após fermentação do leite com BAL (CUNHA et al., 2008)

Quando avaliados os diferentes inóculos de BAL utilizados nas fermentações, para o leite pasteurizado os ensaios que, após atingir o tempo final (T_f - tempo final da fermentação - pH entre 4,4 e 4,9), proporcionaram os maiores aumentos nos níveis de proteínas e lactose foram o ensaio 4 (*S. thermophilus*) para ambos os compostos, e os ensaios 08 (todas as BAL) e 1 (*L. delbrueckii*), respectivamente, com aumento de em torno 0,5% nos teores. Nos ensaios realizados em leite cru refrigerado e leite UAT, esse comportamento foi observado, respectivamente nas fermentações correspondentes aos ensaios 07, com aumento de aproximadamente 0,55% nos teores de proteína e lactose, e às amostras inoculadas com *L. acidophilus*, com aumentos de 0,55% da proteína e 0,8% da lactose inicial da amostra (0h). Os fermentados lácteos produzidos a partir do leite cru refrigerado coletado antes da pasteurização não apresentaram aumento nos teores de proteínas e lactose após atingir o pH correspondente ao final da fermentação (4,4 a 4,9).

O uso de diferentes tipos de culturas bacterianas, composição inicial do leite e o processamento, afetam nas propriedades físico químicas de leites fermentados (AFONSO et al., 2003; AICHINGER et al., 2003; LIN et al., 2006). Cunha et al. (2008) avaliaram a composição físico química de amostras submetidas à fermentação com cultura láctica termofílica contendo *S. thermophilus*, *L. acidophilus* (LA-5) e *Bifidobacterium* e relataram a ocorrência de redução nos percentuais de proteínas (3,1 para 2,8%), estabilidade nos lipídios (3,0%) e um aumento significativo de carboidratos totais (4,9 para 13,0%). Esses dados são concistentes com os valores obtidos no nosso estudo, quando utilizadas as três BAL citadas pelo autor juntamente com o *L. delbrueckii* subs. *bulgaricus* em amostras de leite UAT.

A utilização de matéria prima tratada termicamente proporcionou melhores resultados quanto aos compostos químicos produzidos pelas BAL durante a fermentação do leite, com destaque para o uso conjunto das bactérias e o uso isolado das BAL *S. thermophilus* e *L. acidophilus*, que proporcionaram aumento dos teores de proteína bruta e lactose nas nos fermentados lácteos produzidos a partir de amostras tratadas termicamente (leite pasteurizado e UAT).

Quando analisadas as amostras de leite UAT, o maior teor inicial de riboflavina foi observado na amostra controle, que apresentou teor médio de 0,178 mg.100mL⁻¹. Neste caso,

todos os produtos fermentados tiveram valores significativamente menores que o controle (T_f da amostra sem inóculo). No entanto, ao analisar o tempo 0h de cada inóculo e seus respectivos produtos fermentados (T_f) é possível observar que, nos ensaios 02 (*L. acidophilus*) 04 (*S. thermophilus*) e 06 (*L. delbruecki* + *S. thermophilus* + *B. lactis*) houve um aumento considerável nos teores da riboflavina do produto final, evidenciando a habilidade do *L. acidophilus* e do uso combinado das BAL na produção de vitamina no meio. Quando os fermentados foram produzidos com leite cru antes do processamento UAT, os teores de riboflavina nas amostras inoculadas e fermentadas foram significativamente maiores nos ensaios 01 (*L. delbruecki*), 02 (*L. acidophilus*), 04 (*S. thermophilus*) e 07 (*L. delbruecki* + *S. thermophilus* + *B. lactis*), com destaque para o leite fermentado produzido com *L. acidophilus* que teve um aumento de aproximadamente $0,050 \text{ mg} \cdot 100\text{mL}^{-1}$ da riboflavina no T_f , quando comparada ao tempo 0h.

A utilização de mais de uma BAL em conjunto proporcionou aumento na concentração da vitamina partindo de leite cru antes da pasteurização (ensaio 06 e 08) e de leite UAT (ensaios 05, 06 e 08). A produção de riboflavina por BAL vem sendo estudada como forma de enriquecer o valor nutricional de alimentos de consumo humano. Ibrahim et al. (2014) avaliaram a produção de riboflavina por bactérias ácido lácticas do gênero *Streptococcus* e *Lactobacillus*, isoladas de amostras de leite fermentado, leite cru e queijo e observaram que as bactérias *L. lactis* e *S. thermophilus* produziram uma maior quantidade de riboflavina, quando comparadas com as demais bactérias, com teor máximo de $13,6 \text{ ug} \cdot \text{mL}^{-1}$ e $10,39 \text{ ug} \cdot \text{mL}^{-1}$, em 48 horas, respectivamente. Neste estudo os valores máximos de aumento da vitamina obtidos a partir das fermentações foram de $0,061 \text{ mg} \cdot 100\text{mL}^{-1}$ produzidas pelo *L. acidophilus* e $0,056 \text{ mg} \cdot 100\text{mL}^{-1}$ produzidas em fermentado obtido da combinação das bactérias *L. delbruecki* subs. *Bulgaricus*, *S. salivarius* ssp. *thermophilus* *B.lactis* e *L. acidophilus*.

Tabela 7 - Médias das concentrações de riboflavina (mg.100mL⁻¹) nos produtos submetidos a fermentação

Teores de riboflavina (mg.100mL ⁻¹)									
<i>Leite cru refrigerado (antes da pasteurização)</i>									
Tempo	C	01	02	03	04	05	06	07	08
incubação									
0h	0,108	0,126	0,127	0,122	0,129	0,123	0,137	0,117	0,095
4 horas	0,101	0,109	0,092	0,134	0,110	0,098	0,072	0,083	0,099
T _f	0,101 ^{d*}	0,144 ^{abc}	0,144 ^{abc}	0,097 ^d	0,126 ^{bcd}	0,095 ^d	0,168 ^a	0,109 ^{cd}	0,151 ^{ab}
Δrib.	-0,007	0,018	0,017	-0,025	-0,003	-0,028	0,031	-0,008	0,056
Teores de riboflavina (mg.100mL ⁻¹)									
<i>Leite pasteurizado</i>									
Tempo	C	01	02	03	04	05	06	07	08
incubação									
0h	0,071	0,094	0,048	0,08	0,07	0,067	0,074	0,077	0,113
4 horas	0,053	0,092	0,047	0,053	0,076	0,043	0,061	0,051	0,062
T _f	0,055 ^{cd}	0,084 ^{ab}	0,109 ^a	0,072 ^{bc}	0,047 ^d	0,041 ^d	0,043 ^d	0,05 ^{cd}	0,054 ^{cd}
Δrib.	-0,016	-0,010	0,061	-0,008	-0,023	-0,026	-0,031	-0,027	-0,059
Teores de riboflavina (mg.100mL ⁻¹)									
<i>Leite cru refrigerado (antes do processo UAT)</i>									
Tempo	C	01	02	03	04	05	06	07	08
incubação									
0h	0,139	0,14	0,102	0,123	0,151	0,143	0,149	0,152	0,132
4 horas	0,107	0,154	0,112	0,125	0,158	0,158	0,130	0,113	0,130
T _f	0,133 ^c	0,151 ^b	0,150 ^{ab}	0,133 ^c	0,154 ^{ab}	0,133 ^c	0,138 ^{abc}	0,151 ^b	0,130 ^c
Δrib.	-0,006	0,011	0,048	0,010	0,003	-0,010	-0,0,11	-0,001	-0,002
Teores de riboflavina (mg.100mL ⁻¹)									
<i>Leite UAT</i>									
Tempo	C	01	02	03	04	05	06	07	08
incubação									
0h	0,125	0,130	0,113	0,134	0,125	0,139	0,128	0,142	0,131
4 horas	0,144	0,151	0,129	0,136	0,133	0,182	0,152	0,138	0,111
T _f	0,178 ^a	0,123 ^{cd}	0,145 ^{bc}	0,135 ^{bc}	0,142 ^{bc}	0,141 ^{bc}	0,152 ^c	0,112 ^d	0,132 ^{bc}
Δrib.	0,053	-0,007	0,032	0,001	0,017	0,002	0,024	-0,030	0,001

T_f: Tempo final da fermentação (pH entre 4,4 e 4,9); Δrib.: diferença entre o teor de riboflavina final (T_f) e inicial (0h) para cada amostra (mg.100 mL⁻¹); Controle: amostra de leite sem adição de BAL; Ensaios 01 a 08: Fermentados produzidos com as diferentes BAL isoladas e combinadas (Quadro 01). *Para um mesmo parâmetro médias com letras minúsculas iguais indicam que não há diferença significativa entre as médias dos controles (C) e dos ensaios para cada tipo de leite (linhas) pelo teste de Tukey ($\alpha < 0,05$);

Tabela 5 - Composição nutricional de leite cru refrigerado/pasteurizado.

<i>Leite Cru refrigerado (antes da pasteurização)</i>																					
Tempo		0 h							4 horas							T _f					
Análise	pH	A	F	D	ESD	P	L	pH	A	F	D	ESD	P	L	pH	A	F	D	ESD	P	L
Controle	6,79	0,14	3,63	1,0297	9,04	4,4	4,57	5,96	0,27	3,72	1,0306	9,36	4,62	4,73	4,89	0,37	2,19	1,0232	7,05	3,48	3,56
01	6,81	0,20	3,89	1,0303	9,20	4,54	4,56	5,87	0,27	3,58	1,0303	9,21	4,55	4,66	4,73	0,48	2,85	1,0253	7,68	3,79	3,88
02	6,76	0,14	3,65	1,0303	9,22	4,55	4,66	5,75	0,29	4,03	1,0315	9,57	4,73	4,84	4,8	0,46	2,24	1,0240	7,31	3,61	3,70
03	6,8	0,13	3,91	1,0302	9,17	4,53	4,64	5,92	0,25	3,75	1,0307	9,34	4,61	4,72	4,53	0,55	3,36	1,0304	9,24	4,56	4,67
04	6,82	0,13	3,44	1,0294	8,94	4,41	4,52	5,89	0,25	3,85	1,0308	9,37	4,63	4,74	4,61	0,42	1,98	1,0232	7,05	3,48	3,56
05	6,8	0,14	4,06	1,0297	9,03	4,46	4,57	5,88	0,29	3,87	1,0309	9,38	4,63	4,74	4,65	0,46	1,86	1,0229	6,95	3,43	3,51
06	6,77	0,14	3,89	1,0303	9,21	4,55	4,66	5,76	0,31	3,60	1,0305	9,26	4,58	4,68	4,82	0,61	3,32	1,0296	8,98	4,44	4,54
07	6,81	0,13	3,80	1,0300	9,11	4,5	4,61	6,07	0,22	3,92	1,0309	9,38	4,63	4,74	4,61	0,40	2,38	1,0240	7,31	3,61	3,7
08	6,76	0,13	4,16	1,0306	9,29	4,59	4,7	5,77	0,31	3,64	1,0308	9,36	4,62	4,73	4,91	0,48	3,15	1,0290	8,22	4,36	4,46
<i>Leite pasteurizado</i>																					
Tempo		0 h							4 horas							T _f					
Análise	pH	A	F	D	ESD	P	L	pH	A	F	D	ESD	P	L	pH	A	F	D	ESD	P	L
Controle	6,82	0,15	3,27	1,0262	7,97	3,93	4,03	6,77	0,11	3,26	1,0267	8,11	4,01	4,10	4,9	0,59	3,42	1,0295	8,97	4,43	4,54
01	6,74	0,15	3,60	1,0293	8,9	4,4	4,5	6,69	0,13	3,53	1,0289	8,77	4,33	4,44	4,7	0,82	3,66	1,0312	9,52	4,7	4,81
02	6,76	0,15	3,55	1,0289	8,77	4,33	4,43	6,46	0,19	3,6	1,0295	8,95	4,42	4,53	4,75	0,72	3,30	1,0309	9,39	4,64	4,75
03	6,82	0,13	3,26	1,0262	7,94	3,92	4,01	6,72	0,15	3,25	1,0262	7,95	3,93	4,02	4,89	0,65	3,29	1,0283	8,6	4,25	4,35
04	6,8	0,15	3,3	1,0264	8,0	3,95	4,05	6,54	0,15	3,3	1,0266	8,09	3,99	4,09	4,81	0,65	3,74	1,0302	9,18	4,53	4,64
05	6,79	0,13	3,28	1,0263	7,99	3,95	4,04	6,48	0,17	3,28	1,0267	8,12	4,01	4,10	4,88	0,57	3,31	1,0287	8,7	4,30	4,4
06	6,77	0,17	3,32	1,0265	8,06	3,98	4,07	6,16	0,24	3,33	1,0272	8,25	4,08	4,17	4,86	0,61	3,40	1,0288	8,75	4,32	4,42
07	6,8	0,17	3,25	1,0259	7,87	3,89	3,98	6,47	0,17	3,23	1,0260	7,9	3,9	4,0	4,9	0,72	3,10	1,0274	8,33	4,11	4,21
08	6,75	0,18	3,6	1,0295	8,95	4,42	4,53	6,13	0,28	3,59	1,0300	9,11	4,5	4,6	4,63	0,67	3,87	1,0327	9,92	4,9	4,64

T_f: Tempo final da fermentação (pH entre 4,4 e 4,9); A: Acidez (g ácido láctico.100mL⁻¹); F: Lipídios (%); D: Densidade a 15°C; ESD: Extrato Seco Desengordurado; P: Proteína; Controle: amostra de leite sem adição de BAL; Ensaios 01-08: Fermentados produzidos com as diferentes BAL isoladas e combinadas (Quadro 01).

Tabela 6 - Composição nutricional de leite cru refrigerado/UAT.

<i>Leite cru refrigerado (antes do processo UHT)</i>																					
Tempo		0h							4 horas							T _f					
Análise	pH	A	F	D	ESD	P	L	pH	A	F	D	ESD	P	L	pH	A	F	D	ESD	P	L
Controle	6,71	0,13	3,49	1,0292	8,85	4,37	4,48	6,32	0,26	3,22	1,0287	8,73	4,31	4,41	5,05	0,54	3,18	1,0303	9,20	4,54	4,65
01	6,73	0,13	3,06	1,0281	8,54	4,22	4,32	6,43	0,22	3,03	1,0283	8,60	4,25	4,35	4,72	0,59	3,16	1,0308	9,34	4,61	4,72
02	6,71	0,15	3,12	1,0282	8,55	4,22	4,33	6,16	0,24	3,26	1,0288	8,75	4,32	4,42	4,69	0,53	2,94	1,0323	9,81	4,84	4,96
03	6,76	0,17	3,32	1,0287	8,71	4,30	4,41	6,34	0,20	3,11	1,0284	8,62	4,26	4,36	4,79	0,49	2,96	1,0314	9,55	4,71	4,83
04	6,74	0,15	3,19	1,0283	8,6	4,25	4,35	6,12	0,26	3,07	1,0284	8,61	4,25	4,36	4,78	0,63	3,06	1,0306	9,3	4,59	4,7
05	6,74	0,13	3,06	1,0282	8,55	4,22	4,32	5,7	0,37	3,11	1,0291	8,84	4,37	4,47	4,68	0,67	3,31	1,0310	9,41	4,65	4,76
06	6,7	0,15	3,10	1,0282	8,56	4,23	4,33	6,04	0,28	3,04	1,0281	8,53	4,21	4,31	4,41	0,67	2,15	1,0254	7,71	3,81	3,90
07	6,75	0,13	3,13	1,0282	8,55	4,22	4,32	6,16	0,26	3,23	1,0287	8,71	4,30	4,41	4,51	0,57	3,10	1,0317	9,63	4,75	4,87
08	6,73	0,15	3,31	1,0285	8,65	4,27	4,37	6,11	0,26	3,23	1,0287	8,71	4,30	4,41	4,48	0,49	3,10	1,0307	9,31	4,60	4,71
<i>Leite UHT integral</i>																					
Tempo		0h							4 horas							T _f					
Análise	pH	A	F	D	ESD	P	L	pH	A	F	D	ESD	P	L	pH	A	F	D	ESD	P	L
Controle	6,9	0,16	3,32	1,0278	7,80	2,85	4,27	6,79	0,18	3,23	1,0280	7,84	2,86	4,29	4,45	0,75	3,54	1,0312	8,74	3,19	4,79
01	6,88	0,17	3,27	1,0274	7,69	2,81	4,21	6,75	0,18	3,27	1,0276	7,75	2,83	4,24	4,76	0,67	3,46	1,0305	8,57	3,12	4,67
02	6,86	0,15	3,28	1,0272	7,65	2,79	4,19	6,45	0,18	3,28	1,0278	7,79	2,84	4,26	4,69	0,55	2,49	1,0336	9,12	3,34	5,0
03	6,88	0,17	3,30	1,0273	7,67	2,8	4,20	6,75	0,22	3,29	1,0274	7,69	2,81	4,21	4,47	0,71	3,56	1,0306	8,57	3,13	4,69
04	6,86	0,13	3,28	1,0270	7,61	2,78	4,17	6,41	0,22	3,30	1,0273	7,68	2,8	4,20	4,87	0,54	3,51	1,0303	8,48	3,09	4,64
05	6,88	0,15	3,31	1,0272	7,65	2,79	4,19	6,52	0,20	3,26	1,0270	7,59	2,77	4,15	4,63	0,66	3,15	1,0317	8,77	3,2	4,8
06	6,86	0,17	3,3	1,0272	7,66	2,8	4,19	6	0,30	3,3	1,0278	7,79	2,85	4,26	4,68	0,64	3,19	1,0312	8,67	3,17	4,75
07	6,87	0,15	3,32	1,0272	7,67	2,8	4,2	6,48	0,20	3,28	1,0270	7,59	2,77	4,16	4,6	0,67	3,62	1,0307	8,61	3,14	4,71
08	6,85	0,15	3,3	1,0271	7,62	2,78	4,17	6,03	0,30	3,32	1,0275	7,8	2,85	4,27	4,71	0,68	3,39	1,0313	8,71	3,18	4,77

T_f: Tempo final da fermentação (pH entre 4,4 e 4,9); A: Acidez (g ácido láctico.100mL⁻¹); F: Lipídios (%); D: Densidade a 15°C; ESD: Extrato Seco Desengordurado; P: Proteína; Controle: amostra de leite sem adição de BAL; Ensaios 01-08: Fermentados produzidos com as diferentes BAL isoladas e combinadas (Quadro 01).

4 CONCLUSÃO

Os tratamentos térmicos HTST e UAT diminuíram significativamente os teores de proteína, lactose e riboflavina nas amostras de leite e promoveram aumento significativo nos teores de riboflavina nas amostras fermentadas após o processo UAT. A fermentação utilizando as bactérias isoladas promoveu aumento nos teores de riboflavina, diminuição do pH e aumento da acidez. A composição nutricional dos fermentados produzidos pela bactéria *L. acidophilus* foi a que apresentou aumento de todos os nutrientes em especial da riboflavina no leite fermentado.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRANCHES, M. V.; DELLA LUCIA, C. M. ROCHA, F. I. G.; MORAES, V. B.; GONÇALVES, E. F.; NEVES, E. G. F.; SANT'ANA, H. M. P. Conteúdo de riboflavina em leite e produtos lácteos e comparação com o valor anunciado no rótulo. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v.19, n.3, p.307-314, 2008.
- AFONSO, I. M.; HES, L.; MAIA, J. M.; MELO, L. F. Heat transfer and rheology of stirred yoghurt during cooling in plate heat exchangers. **Journal of Food Engineering**, [S. I.], v. 57, n. 2, p. 179-187, 2003.
- AICHINGER, P. A.; MICHEL, M.; SERVAIS, C.; DILLMANN, M. L.; ROUVET, M.; D'AMICO, N.; ZINK, R.; KLOSTERMEYER, H.; HORNE, D. S. Fermentation of a skim milk concentrate with *Streptococcus thermophilus* and chymosin: structure, viscoelasticity and syneresis of gels. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, Amsterdam, v. 31, n. 1, p. 243-255, 2003.
- AMIOT, J. ALMUDI, R. O. Ciencia y Tecnologia de la Leche. [S. I.], Acribia, 1991. 547 p.
- BIANCHINI, R.; PENTEADO, M.D.V.C. Teores de tiamina, riboflavina e piridoxina em leites bovinos comercializados na cidade de São Paulo. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 20, n. 3, p. 291-298, 2000.
- BOVO, F. **Avaliação da eficiência de bactérias ácido-láticas para descontaminação de aflatoxina M₁**. 2011. 69 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos). Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos. Universidade de São Paulo. Pirassununga.
- BOVO, F.; CORASSIN, C. H.; ROSIM, R. E.; OLIVEIRA, C. A. F. Efficiency of Lactic Acid Bacteria Strains for Decontamination of Aflatoxin M₁ in Phosphate Buffer Saline Solution and in Skimmed Milk. **Food and Bioprocess Technology**, [S. I.], v. 6, n. 8, p. 2230-2234, 2013.
- BRASIL. Portaria n.370, de 04 de setembro de 1997. In: Regulamento Técnico para fixação de Identidade e Qualidade de leite UHT. **Diário Oficial da República**, República Federativa do Brasil, Brasília, n.172, 08 set.1997.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução (ANVISA). Resolução n. 899, de 29 de maio de 2003. Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos. **Diário Oficial da União**, Brasília, 02 de junho de 2003.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Instrução Normativa nº 68, de 12 de dezembro de 2006. Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais Físico-Químicos, para Controle de Leite e Produtos Lácteos. **Diário Oficial da União**, Brasília, 14 de dezembro de 2006.

BRASIL. Instrução Normativa Nº 46, de 23 de outubro de 2007. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento Gabinete do Ministro. **Diário Oficial da União** de 24/10/2007 (nº 205, Seção 1, pág. 4). Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leites Fermentados. Item 2.

BRASIL. Instrução Normativa nº62, de 29 de dezembro de 2011. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Gabinete do Ministro. Anexo I - Regulamento técnico de produção, identidade e qualidade de leite tipo A.

CUNHA, T. M.; CASTRO, F. P.; BARRETO, P. L. M.; BENEDET, H. D.; PRUDÊNCIO, E. S. Avaliação físico-química, microbiológica e reológica de bebida láctea e leite fermentado adicionados de probióticos. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 29, n. 1, p. 103-116, 2008.

DAMADORAN, S.; PARKIN, D. L.; FENNEMA, O. R. **Química de Alimentos de Fennema**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

DEETH, H. C.; TAMIME, A. Y.. Yogurt: Nutritive and therapeutic aspects. **Journal of Food Protection**, [S. I.], v. 44, n. 1, p. 78-86, 1981.

ESALQ. **Microbiologia do leite**. Disponível em: <http://www.esalq.usp.br/departamentos/lan/pdf/TecnologiaLeite.pdf>. Acesso em janeiro 2016.

FANICETO, C. CANAES, L. S.; FATIBELLO-FILHO, O.; CAVALHEIRO, C. C. S. Determinação espectrofotométrica de vitamina B2 (riboflavina) em formulações farmacêuticas empregando sistema de análises por injeção em fluxo. **Química Nova**, São Paulo, v. 23, n. 5, p. 637-640, 2000.

FAO/WHO. Report of a Joint FAO/WHO expert consultation on evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria, 2001. Disponível em: <http://www.fao.org/food/food-safety-quality/a-z-index/probiotics/en/>. Acesso em janeiro 2016.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Food labelling: Health claims and food label statements; folate and neural tube defects. **Federal Register**, v. 61, n. 192, p. 8752–8807, 1996.

FOOD AND NUTRITION BOARD. Institute of Medicine of the National Academies. **Dietary Reference Intakes for Dietary reference intakes for thiamin, riboflavin, niacin, vitamin B6, folate vitamin B12, pantothenic acid, biotin and choline**. Washington (DC): National Academies Press (US); 1998.

FRANCO, G. Tabela de composição química dos alimentos. 9.ed. São Paulo: Atheneu, 2002. 307p.

HADDAD, G. S.; LOEWENSTEIn, M. Effect of Several Heat Treatments and Frozen Sotorage on Thiamine, Riboflavin, and Ascorbic Acid Content of Milk. **Journal of Dairy Science**, [S. I.], v. 66, n. 8, p. 1601 - 1606, 1981.

HUGENHOLTZ, J.; SMID, E.J. Nutraceutical production with food-grade microorganisms. **Current Opinion in Biotechnology**, [S. I.], v.13, n. 5, p. 497–507, 2002.

IBRAHIM, G. A.; KAWTHER, E.S.; HODA, W.E.S.; SHARAF, O.M. Isolation, Identification and Selection of Lactic Acid Bacterial Cultures for Production of Riboflavin and Folate. **Middle East Journal of Applied Sciences**, [S. I.], v. 4, n. 4, p. 924-930, 2014.

INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. **Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos**. Doq-cg-cre- 008, 2003.

KARDEL, G.; ANTUNES, L. A. F. Culturas lácticas e probióticas empregadas na fabricação de leites fermentados:leites fermentados. In: LERAYER, A. L. S.; SALVA, T. J. G. Leites fermentados e bebidas lácteas: tecnologia e mercado. Campinas: ITAL, 1997. Cap. 2, p. 26-33.

KRUBE, A.; LEITO, I.; HERODES, K. Combating matrix effects in LC/ESI/MS: The extrapolative dilution approach. **Analytica Chimica Acta**, [S. I.], v. 651, n. 1, p. 75–80, 2009.

LIN, W. H.; HWANG, C. F.; CHEN, L. W.; TSEN, H. Y. Viable counts, characteristic evaluation for commercial lactic acid bacteria products. **Food Microbiology**, London, v. 23, n. 1, p. 74-81, 2006.

MACHADO, F.M.S. **Estratégias de concorrência da indústria alimentícia e seus desdobramentos na dimensão nutricional**. 2003. 200 f. Tese (Doutorado em Nutrição Humana Aplicada – PRONUT) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Economia, Administração e Contabilidade, Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, 2003.

OLIVEIRA, A. F. A. **Qualidade e organização na produção de leites fermentados**. In: LERAYER, A. L. S.; SALVA, T. J. G. Leites fermentados e bebidas lácteas: tecnologia e mercado. Campinas: ITAL, 1997. Cap. 16, p. 1-14.

POWERS, H.J. Riboflavin (vitamin B2) and health. **The American Journal of Clinical Nutrition**, [S. I.], v. 77, n. 6, p. 1352–1360, 2003.

SAIDI, B. Effect of Heat and Homogenization on Riboflavin Photolysis in Milk. **International Dairy Journal**, [S. I.], v.5, n. 7, p. 635-645, 1996.

SAIDI, B.; WARTHESEN, J. J. Effect of Milk Fermentation on Riboflavin Content and Stability. **International Dairy Journal**, [S. I.], v. 3, n. 8, p. 675-684, 1993.

SINGH, R.; DEODHAR, A. D. Relative Bioavailability of Riboflavin in Cows' Milk and Fermented Milk using Rat Bioassay. **International Dairy Journal**, [S. I.], v. 4, n. 1, p. 59-71, 1994.

SOUZA, A. C. S.; FERREIRA, C. V.; JUCÁ, M. B.; AOYAMA, H.; CAVAGIS, A. D. M.; PEPPELENBOSCH, M. P. Riboflavina: uma vitamina multifuncional. **Química Nova**, São Paulo, v. 28, n. 5, p. 887-891, 2005.

TAMIME, A.Y.; ROBISONS, R.K. Chapter 1 Historical background. In Tamime and Robinson's Yogurt: Science and Technology, 3rd ed.; Woodhead Publishing LTD: Cambridge, UK, 2007; p. 1–10.

VARNAM, A.H.; SUTHERLAND, J.P. Leche y productos lácteos: tecnología, química y microbiología. Zaragoza: Acribia, 1994. p. 63-72.

VEISSEYRE, R. **Lactología técnica: composición, recogida, tratamiento y transformación de la leche**. 2o ed. Zaragoza: Acribia, 1988. 629p.

WADA, Y. LONNERDAL, B. Effects of Different Industrial Heating Processes of Milk on Site-Specific Protein Modifications and Their Relationship to in Vitro and in Vivo Digestibility. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [S. I.], v. 62, n. 18, p. 4175-4185, 2014.

WALSTRA, P.; WOUTERS, J.T.M.; GEURTS, T.J. **Chapter 7 Heat treatment**. In Dairy Science and Technology; Taylor & Francis Group, LLC: Boca Raton, FL, USA, 2006; pp. 225–272.

WOOLLARD, D. C.; INKYK, H. E. Rapid determination of thiamine, riboflavin, pyridoxine, and niacinamide in infant formulas by liquid chromatography. **Journal of AOAC International**, [S. I.], v. 85, n. 4, p. 945 - 951, 2002.

**ARTIGO IV - AÇÃO DE BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS NOS NÍVEIS
NUTRICIONAIS, DE AFLATOXINAS B₁ E M₁ E SUAS RESPECTIVAS
CITOTOXICIDADES EM LEITES FERMENTADOS**

RESUMO

O leite está sujeito a diversos tipos de contaminação como as micotoxinas, principalmente as Aflatoxinas. Em vista disso métodos de inibição e/ou descontaminação das aflatoxinas são estudados, destacando-se a fermentação com bactérias ácido lácticas (BAL), que conferem melhorias no valor nutricional, biodisponibilidade de nutrientes e nas características sensoriais dos produtos. Neste trabalho o objetivo foi avaliar a capacidade de quatro diferentes BAL, na produção e biodisponibilidade de riboflavina em leites contaminados artificialmente por AFM₁ e B₁ submetidos à fermentação, bem como avaliar a redução dessas micotoxinas, sua biodisponibilidade e citotoxicidade após digestibilidade em um modelo de digestão *in vitro*. As quatro BAL dos gêneros *Lactobacillus*, *Streptococcus* e *Bifidobacterium* foram inoculadas nas amostras fortificadas com AFM₁ (2 µg.L⁻¹) e AFB₁ (10 µg.L⁻¹) de forma isolada e combinada, totalizando 8 diferentes ensaios. A contaminação das amostras de leite pasteurizado homogeneizado integral pelas aflatoxinas interferiu na produção de riboflavina das BAL, não permitindo aumento significativo da vitamina quando comparada ao controle (amostra não fermentada e sem as aflatoxinas). Em contrapartida a fermentação do leite por BAL proporcionou aumento de até 65% da vitamina disponível para absorção. A fermentação das amostras de leite com as diferentes BAL proporcionou redução nos níveis das aflatoxinas dos leites fortificados, com destaque para os níveis de AFB₁ (9 a 100% de redução), sendo o *Lactobacillus acidophilus* a BAL mais eficaz. Os ensaios que utilizavam *L. delbruecki* subs. *bulgaricus* + *S. salivarius* ssp. *thermophilus* e *L. delbruecki* subs. *bulgaricus* + *S. salivarius* ssp. *thermophilus* + *L. acidophilus* foram os que apresentaram redução nos dois tipos de leite fortificados. As bactérias ácido lácticas também proporcionaram redução na bioacessibilidade das aflatoxinas e na citotoxicidade dos fermentados digeridos expostos à células epiteliais de adenocarcinoma coloretal humano Caco-2.

Palavras chave: Fermentação. Vitamina. Micotoxinas. Bioacessibilidade.

BACTERIA ACID LACTIC ACTION IN NUTRITION LEVELS, AFLATOXINS B₁ AND M₁ AND THEIR RESPECTIVE CYTOTOXICITY IN MILK FERMENTED

ABSTRACT

Milk is subject to various types of contamination such as mycotoxins, particularly aflatoxins. In view of this, inhibition and /or decontamination of aflatoxins are studied, with emphasis on the fermentation with lactic acid bacteria (LAB), which provide improvements in nutritional value, bioavailability of nutrients and sensory characteristics of the products. In this research the objective was to evaluate the ability of four different LAB, in production and bioavailability of riboflavin in milk artificially contaminated with AFM₁ and B₁, submitted to fermentation, as well evaluate the reduction of these mycotoxins and their bioavailability and cytotoxicity after digestibility in a *in vitro* digestion model. LAB from four genera *Lactobacillus*, *Streptococcus* and *Bifdobacterium* were inoculated in spiked samples AFM₁ (2 µg.L⁻¹) and AFB₁ (10 µg.L⁻¹) isolated and combined, a total of 8 different assays. The whole homogenized pasteurized milk samples contamination interfered in Riboflavin production for LAB, not allowing significant increase in vitamin compared to the control (sample without LAB and aflatoxins). By contrast, the milk fermentation with LAB provided an increase of up to 65% of vitamin available to absorption. The sample milk fermentation with different LAB provided a reduction in the levels of aflatoxins in the spiked milk, especially the AFB₁ levels (9 to 100% reduction), and LAB *Lactobacillusacidophilus* was more effective. The tests used *L. delbruecki* subs. *bulgaricus* + *S. salivarius* ssp. *thermophilus* and *L. delbruecki* subs. *bulgaricus* + *S. salivarius* ssp. *thermophilus* + *L. acidophilus* showed the reduction in two types of spiked milk. The lactic acid bacteria also provided reduction in aflatoxins bioaccessibility and cytotoxicity of digested fermented exposed to the epithelial cells of human coloretal adenocarcinoma Caco-2.

Keywords: Fermentation. Vitamin. Mycotoxins. Bioaccessibility.

1 INTRODUÇÃO

As bactérias ácido-láticas (BAL) são um grupo de bactérias geneticamente diversas que, além de produzirem o ácido láctico são gram-positivas, não-esporogênicas, não se locomovem espontaneamente e negativas para catalase e oxidase (ONILUDE et al. 2005). Elas são amplamente utilizadas na indústria alimentícia para produção de queijos, iogurtes e leites fermentados, com destaque para os gêneros *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* e *Streptococcus*, pois seus benefícios vão além de aplicações tecnológicas (GOURAMA; BULLERMAN, 1995). As BALs podem contribuir com a produção e disponibilização de macronutrientes, micronutrientes (tais como vitaminas) ou compostos não nutritivos, bem como degradar contaminantes químicos, conforme a estirpe selecionada (HUGENHOLTZ; SMID, 2002). Tem sido evidenciada a capacidade de algumas BAL produzirem vitaminas em leite e esse fator é de extrema importância do ponto de vista nutricional e tecnológico.

As principais vitaminas constituintes do leite são as do complexo B, sendo este alimento a principal fonte da riboflavina, ou vitamina B₂ na dieta, no entanto, considerando-se que o leite contém entre 1 e 2 mg de riboflavina por litro, para suprir a necessidade dessa vitamina no organismo o consumo diário recomendado para uma pessoa adulta e mulheres grávidas é 1,0 e 1,6 L de leite, respectivamente, o que excede em muito o consumo *per capita* diário inclusive em países como os EUA, que é de 200 mL (PUTMAN; ALLSHOUSE, 2003). Aumentar os níveis de riboflavina em produtos como os derivados lácteos, seria, portanto a melhor estratégia para evitar doenças oriundas da deficiência da vitamina no organismo, como arriboflavonoses, decorrentes principalmente em regiões onde o consumo de leite é baixo (LEBLANC et al., 2011). Além de nutrientes as BAL produzem alguns compostos antagonistas capazes de controlar bactérias patogênicas e deteriorar microbiotas indesejáveis específicas, além de outros dois mecanismos que podem justificar sua eficiência como antimicrobianas: a produção de ácidos orgânicos e a competição por nutrientes.

O uso dessas bactérias como agente antibacteriano e antifúngico também é avaliado para substituir métodos físicos e químicos, que alteram a qualidade e características de alimentos, sendo assim eficazes no controle de toxinas (GOURAMA; BULLERMAN, 1995; MAGNUSSON et al., 2003). Dentre os contaminantes, cujos riscos de exposição podem ser minimizados pela ação das BAL, estão as micotoxinas, com destaque para as aflatoxinas que são as principais micotoxinas contaminantes do leite (EL KHOURY; ATOUI; YAGHI, 2011; ELSANHOTHY, et al., 2014; PIERIDES et al., 2000; SARIMEHMETOGLU; KÜPLÜLÜ, 2004).

As aflatoxinas (AFs) B₁, B₂, G₁ e G₂ são metabólitos secundários produzidos 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 (JIANG et al., 2005; PELTONEN et al., 2001). Elas têm propriedades mutagênicas, carcinogênicas, teratogênicas, hepatotóxicas e imunossupressoras (LEWIS et al., 2005; SOMORIN et al., 2012). A aflatoxina B₁ (AFB₁) é a mais tóxica e tem demandado estratégias para evitá-la, pois trata-se de um carcinogênico tipo grupo 1A da IARC (1993), além da frequente contaminação de diversos tipos de alimentos, principalmente rações destinadas a animais em fase de lactação (TENIOLA et al., 2005).

Desta contaminação origina-se a Aflatoxina M₁ (AFM₁), que é o principal composto hidroxilado da AFB₁ que possui de 2 a 10% da carcinogenicidade da sua molécula precursora (CREPPY, 2002) e é também classificada como provável carcinógeno humano, pertencendo ao grupo 2B da IARC. A AFM₁ é metabolizada no fígado do animal após ingestão de ração contaminada por AFB₁ e excretada em fluidos como o leite, em proporções ainda não comprovadas (BATTACONE et al., 2003; SHREEVE; PATTERSON; ROBERTS, 1979). A toxicidade das AFB₁ e M₁ em humanos está relacionada com células hepáticas, no entanto, estudos evidenciam a capacidade citotóxica e genotóxica dessas aflatoxinas em células intestinais, a partir de ensaios realizados em células Caco-2 de colo retal humano (CALONI et al., 2006; GUERRA et al., 2005; ZHANG et al., 2015). Aliado a este fato, está a incidência recorrente em leite e produtos derivados em diversos países em níveis maiores que os aceitáveis para o leite e seus derivados (BECKER-ALGERI et al., 2016).

Vários processos vêm sendo estudados para reduzir ou inibir a contaminação por aflatoxinas em alimentos, entretanto a maioria deles alteram as características da matéria prima. O uso de BAL foi largamente explorado em meios líquidos, como soluções tampão (EL NEZAMI et al.; 1998; HASKARD et al.; 2001; PIERIDES et al., 2000) no entanto, não existem informações quanto a aplicação de BAL para reduzir a contaminação com AFM₁ e sua precursora AFB₁ em leites destinados à produção de produtos fermentados lácteos.

A adição de micro-organismos apropriados em alimentos contaminados pode prevenir a absorção das micotoxinas durante a passagem no trato gastrointestinal a partir da formação do complexo bactéria-aflatoxina, e eliminá-las nas fezes (BUENO et al.; 2007; EL NEZAMI et al. 2000; GRATZ et al., 2004). Assim a aplicação dos micro-organismos pode, além de inibir a contaminação, diminuir a sua biodisponibilidade e citotoxicidade, a partir de mecanismos não totalmente elucidados, mas que estão relacionados com a capacidade de

ligação de compostos da parede celular (polissacarídeos e peptidoglicanos) de algumas cepas de BAL com as aflatoxinas M₁ e B₁ (SHETTY; JESPERSEN, 2006).

Tendo em vista os aspectos nutricionais e inibitórios das BAL, o objetivo deste trabalho foi avaliar a capacidade de quatro diferentes bactérias ácido lácticas, utilizadas de forma isolada e combinada, na produção de riboflavina em leites contaminados artificialmente por AFM₁ e B₁ e submetidos à fermentação, bem como avaliar a redução dessas micotoxinas e sua biodisponibilidade e citotoxicidade após digestibilidade em um modelo de digestão *in vitro*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MATERIAL E REAGENTES

Todos os reagentes utilizados possuíam pureza analítica e os meios de cultura padrão microbiológico adequado. Os padrões das micotoxinas AFM₁ e AFB₁, da riboflavina, as células de adenocarcinoma Caco-2 e as enzimas necessárias para a análise de digestibilidade *in vitro* foram adquiridos da *Sigma Chemical Company*®.

2.2 BACTÉRIAS, CONDIÇÕES DE CULTIVO E ENUMERAÇÃO

As bactérias ácido-láticas (BAL) foram originadas de cepas previamente certificadas, pertencentes aos gêneros *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* e *Streptococcus*. Os isolados de BAL foram provenientes da coleção de culturas lácteas do Instituto André Tozello (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*), da Christian Hansen® (*Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* STI 12 e *Lactobacillus acidophilus* La-5) e da Danisco® (*Bifidobacterium lactis* HN019).

As condições de cultivo e enumeração foram realizadas conforme descrito no item 2.5.1 do Artigo III (pag. 101 e 102).

2.3 PREPARO DOS FERMENTADOS

Após a incubação de cada cepa bacteriana em caldo MRS a 37°C por tempo previamente determinado a partir das curvas de crescimento, realizou-se a leitura em espectrofotômetro (PerkinElmer, Lambda XLS, Reino Unido) a 600 nm para determinação da

concentração de células bacterianas no meio através da equação gerada previamente (item 3.3; Artigo III; pag. 108). Os fermentados (Quadro 1) foram preparados a partir da inoculação das bactérias em 500 mL de leite homogeneizado pasteurizado integral ($\pm 3\%$ de lipídios) fortificado com $2 \mu\text{g.L}^{-1}$ de AFM_1 e/ou $10 \mu\text{g.L}^{-1}$ de AFB_1 , com concentração bacteriana previamente estimada de 10^{10} UFC.mL⁻¹ seguido de incubação a temperatura de $42^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$. Foram incubadas quatro amostras para os controles: leite sem BAL, denominada “Controle” (C) e uma amostra fortificada com cada tipo de micotoxina e sem as BAL, denominadas Controle Positivo $\text{AFM}_1 + \text{AFB}_1$, (CP $\text{AFM}_1 + \text{AFB}_1$) Controle Positivo AFM_1 (CP AFM_1) e Controle Positivo AFB_1 (CP AFB_1). Foram coletadas 100 mL de amostra no tempo zero (0 hora de incubação), após 4 horas e ao atingir pH entre 4,5 a 4,9 (pH referente à produção de iogurte e/ou leites fermentados), para realização das determinações de pH, acidez total em ácido láctico, aflatoxina M_1 e B_1 , riboflavina e digestibilidade *in vitro*. O esquema das determinações está descrito na Figura 1.

2.4 DETERMINAÇÕES DE pH E ACIDEZ

As determinações de pH e acidez total em ácido láctico foram realizadas por meio de pHmetro digital com eletrodo de vidro combinado (Hanna, Brasil) e titulação com solução de NaOH 0,1 N, respectivamente (BRASIL, 2006).

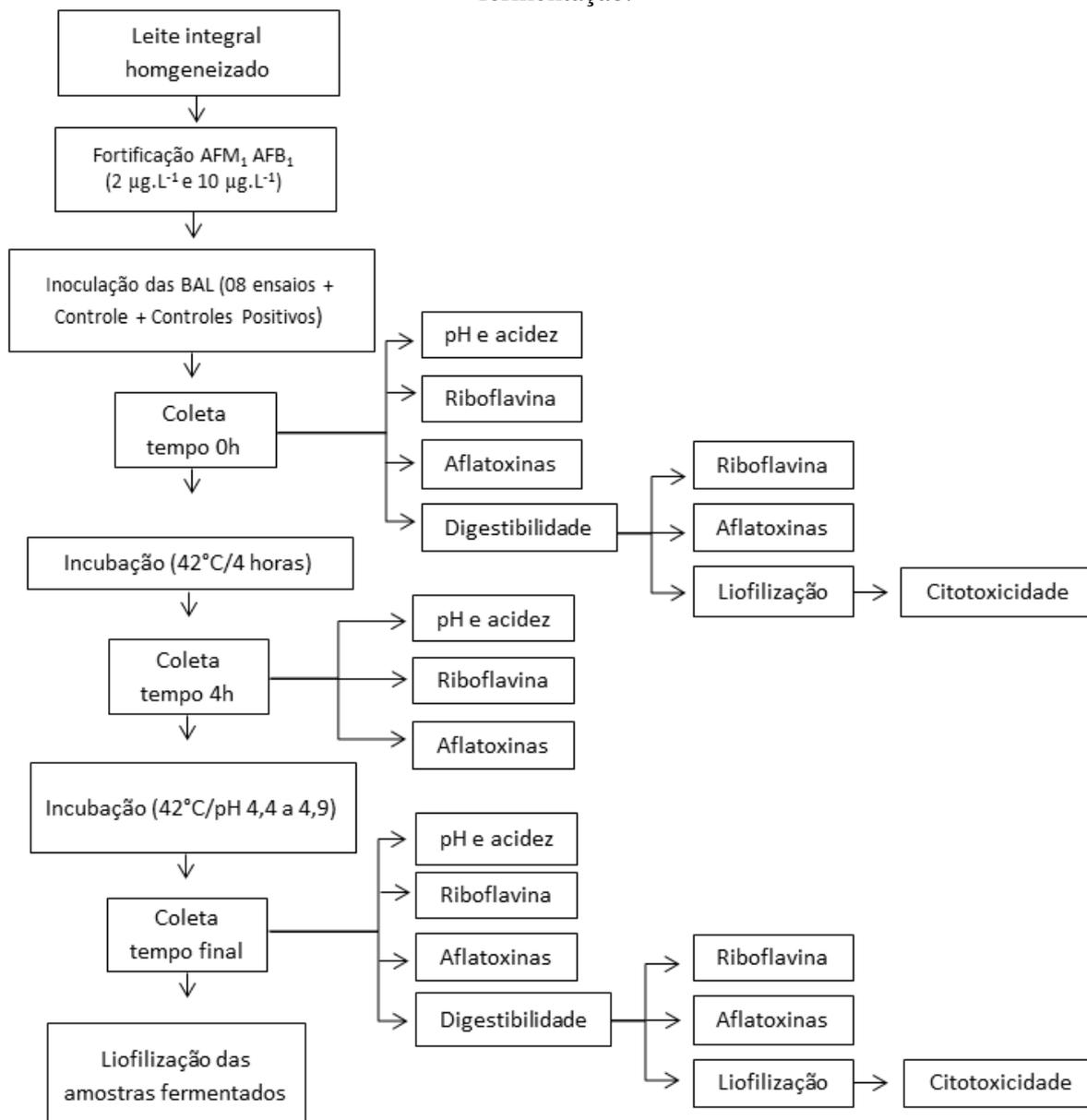
2.5 DETERMINAÇÃO DE RIBOFLAVINA

A validação do método de extração e quantificação da riboflavina nas amostras de leite, leite fermentado e fluido biológico foram realizadas de acordo com o método descrito por Bianchini e Penteado (2000) e Abranches et al. (2008), com modificações (APÊNDICE 2). Os procedimentos para construção da curva padrão, validação e extração da vitamina estão descritos no item 2.2 do Artigo III (pag. 100 e 101).

Quadro 01 - Delineamento do estudo da estabilidade de micotoxinas em amostras de leite fermentadas com bactérias ácido lácticas.

Tratamento	Micotoxina	Micro-organismo
Controle	-	-
CP AFM₁+ AFB₁	Aflatoxina M ₁ + B ₁	-
1	Aflatoxina M ₁ + B ₁	<i>L. delbruecki</i> subs. <i>Bulgaricus</i>
2	Aflatoxina M ₁ + B ₁	<i>L. acidophilus</i>
3	Aflatoxina M ₁ + B ₁	<i>B. lactis</i> HN019
4	Aflatoxina M ₁ + B ₁	<i>S. salivarius</i> ssp. <i>Thermophilus</i>
5	Aflatoxina M ₁ + B ₁	<i>L. delbruecki</i> subs. <i>bulgaricus</i> + <i>S. salivarius</i> ssp. <i>Thermophiles</i>
6	Aflatoxina M ₁ + B ₁	<i>L. delbruecki</i> subs. <i>bulgaricus</i> + <i>S. salivarius</i> ssp. <i>thermophilus</i> + <i>L. acidophilus</i>
7	Aflatoxina M ₁ + B ₁	<i>L. delbruecki</i> subs. <i>bulgaricus</i> + <i>S. salivarius</i> ssp. <i>thermophilus</i> + <i>B. lactis</i> HN019
8	Aflatoxina M ₁ + B ₁	<i>L. delbruecki</i> subs. <i>bulgaricus</i> + <i>S. salivarius</i> ssp. <i>thermophilus</i> + <i>L. acidophilus</i> + <i>B. lactis</i> HN019
Controle	-	-
CP AFM₁	Aflatoxina M ₁	-
1	Aflatoxina M ₁	<i>L. delbruecki</i> subs. <i>Bulgaricus</i>
2	Aflatoxina M ₁	<i>L. acidophilus</i>
3	Aflatoxina M ₁	<i>B. lactis</i> HN019
4	Aflatoxina M ₁	<i>S. salivarius</i> ssp. <i>Thermophilus</i>
5	Aflatoxina M ₁	<i>L. delbruecki</i> subs. <i>bulgaricus</i> + <i>S. salivarius</i> ssp. <i>Thermophiles</i>
6	Aflatoxina M ₁	<i>L. delbruecki</i> subs. <i>bulgaricus</i> + <i>S. salivarius</i> ssp. <i>thermophilus</i> + <i>L. acidophilus</i>
7	Aflatoxina M ₁	<i>L. delbruecki</i> subs. <i>bulgaricus</i> + <i>S. salivarius</i> ssp. <i>thermophilus</i> + <i>B. lactis</i> HN019
8	Aflatoxina M ₁	<i>L. delbruecki</i> subs. <i>Bulgaricus</i> + <i>S. salivarius</i> ssp. <i>thermophilus</i> + <i>L. acidophilus</i> + <i>B lactis</i> HN019
CP AFB₁	Aflatoxina B ₁	-
1	Aflatoxina B ₁	<i>L. delbruecki</i> subs. <i>Bulgaricus</i>
2	Aflatoxina B ₁	<i>L. acidophilus</i>
3	Aflatoxina B ₁	<i>B. lactis</i> HN019
4	Aflatoxina B ₁	<i>S. salivarius</i> ssp. <i>Thermophilus</i>
5	Aflatoxina B ₁	<i>L. delbruecki</i> subs. <i>bulgaricus</i> + <i>S. salivarius</i> ssp. <i>Thermophiles</i>
6	Aflatoxina B ₁	<i>L. delbruecki</i> subs. <i>bulgaricus</i> + <i>S. salivarius</i> ssp. <i>thermophilus</i> + <i>L. acidophilus</i>
7	Aflatoxina B ₁	<i>L. delbruecki</i> subs. <i>bulgaricus</i> + <i>S. salivarius</i> ssp. <i>thermophilus</i> + <i>B. lactis</i> HN019
8	Aflatoxina B ₁	<i>L. delbruecki</i> subs. <i>bulgaricus</i> + <i>S. salivarius</i> ssp. <i>thermophilus</i> + <i>L. acidophilus</i> + <i>B. lactis</i> HN019

Figura 1- Esquema das determinações para acompanhamento dos experimentos de fermentação.



2.6 DETERMINAÇÃO DE AFLATOXINA M₁ E B₁

2.6.1 Preparo dos Padrões de Aflatoxinas

Os padrões das aflatoxinas foram preparados conforme proposto pela Portaria n. 49 (BRASIL, 1999) e o Manual de garantia analítica (BRASIL, 2011). Para tanto, 10 µg do padrão da AFM₁ foram diluídos em 10 mL de benzeno:acetonitrila (98:2), divididos em frascos âmbar previamente higienizados (1 µg mL⁻¹) e evaporados em corrente de N₂ (solução

estoque). Para obtenção da solução de trabalho, 1 µg foi diluído em 2 mL de fase móvel (0,5 µg mL⁻¹). Para o preparo do padrão de AFB₁, 5 mg do padrão foram diluídos em 100 mL de benzeno:acetoneitrila (98:2), divididos em frascos âmbar (50 µg mL⁻¹) e evaporados em corrente de N₂ (solução estoque). Após sucessivas diluições foi obtida solução de trabalho de 0,5 µg mL⁻¹. Para as corridas cromatográficas foram preparadas soluções com concentração de 5 µg L⁻¹ (0,005 µg mL⁻¹) de cada aflatoxina, a partir das respectivas soluções de trabalho. A determinação da concentração dos padrões foi realizada em espectrofotômetro UV-VIS, utilizando-se para tanto os parâmetros descritos no Quadro 2.

Quadro 2 - Parâmetros para quantificação das aflatoxinas.

Micotoxina	Peso Molecular	Comprimento de onda (nm)	Absortividade de	Solvente
Aflatoxina B ₁	312	360	21800	Metanol
Aflatoxina M ₁	328	350	18900	Acetonitrila

Fonte: Brasil, 2011.

As concentrações foram calculadas a partir da equação 01:

$$\mu gAF mL^{-1} = \frac{A \times MW \times 1000}{\varepsilon} \quad (01)$$

Em que:

A = absorvância

MW = peso molecular do composto

ε = absortividade molar

Para utilização na fortificação das amostras, a solução de trabalho foi ressuspensa em benzeno:acetoneitrila e submetida a nova quantificação em espectrofotômetro, para monitorar a estabilidade delas.

2.6.2 Extração simultânea das Aflatoxinas M₁ e B₁

A extração das aflatoxinas M₁ e B₁ foi realizada conforme procedimento descrito por Sartori et al. (2015), com modificações do método tipo QuEChERS (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe*) (APÊNDICE 3). Para tanto, 5 mL de amostra foram adicionadas

à tubos falcon de 50 mL com 10 mL de hexano e 15 mL de acetonitrila (1% ácido acético, v/v) e submetidos à agitação vigorosa durante 30 s. Foram adicionados à mistura, 6 g de sulfato de magnésio e 1,5 g de cloreto de sódio, e os tubos foram imediatamente agitados em vortex (LS Logen, LSM 56/4, Brasil) durante 1 min e centrifugados (Cientec, CT 5000 R, Brasil) a 3000 rpm durante 7 min. A fase hexano foi removida e uma alíquota de 10 mL da fase acetonitrila foi recolhida e submetida a secagem em corrente de nitrogênio a 45°C em concentrador de amostras (Tecnal, TE-019, Brasil). Após total evaporação do solvente, o resíduo foi ressuspensionado em 1 mL da composição da fase móvel (ACN:MetOH:H₂O_{Acid.}, 35:10:55, v/v/v), novamente centrifugada a 9000 rpm e submetida a determinação cromatográfica.

O método foi validado para extração de AFM₁ e AFB₁ em leite homogeneizado pasteurizado, leite fermentado e fluido biológico considerando a estimativa do limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), linearidade seletividade, repetibilidade (desvio padrão relativo - RSD%) e recuperação (%R), conforme proposto pela legislação vigente (BRASIL, 2003).

2.6.3 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Foi utilizado cromatógrafo a líquido de ultra alta eficiência acoplado de detector de fluorescência (UHPLC-FLD) (*Dionex Corporation, UltiMate 3000, Sunnyvale, Estados Unidos*) e processamento no *software Chromeleon 7.2*. Para a separação das micotoxinas AFM₁ e AFB₁ foi utilizada fase móvel composta por Acetonitrila:Metanol:Ácido Acético 1% (H₂O ultrapura), na proporção 35:10:55 (ACN:MetOH:H₂O_{Acid.}, v/v/v), em método isocrático de eluição. A fase móvel foi filtrada e desgaseificada previamente. A corrida cromatográfica foi realizada em coluna de fase reversa C18 *Acclaim PA2*, 5 µm Analítica (4,6 x 250 mm), com vazão de fase móvel de 1,0 mL.min⁻¹ e temperatura da coluna de 35°C. Os comprimentos de onda de excitação e emissão foram 360 e 450 nm, respectivamente e o volume de injeção da amostra de 20 µL. O tempo de eluição foi de 10 min.

2.7 DIGESTIBILIDADE *IN VITRO*

O modelo de digestão *in vitro* desenvolvido pelo Instituto Nacional de Saúde Pública e Meio Ambiente (RIVM, Bilthoven, Holanda) (KABAK; OZBEY, 2012a; OOMEN et al., 2003; VERSANTVOORT et al., 2005) (APÊNDICE 4), foi modificado para avaliar a bioacessibilidade das aflatoxinas M₁ e B₁ e da vitamina riboflavina, bem como a influência das BAL estudadas na bioacessibilidade desses compostos. As amostras foram coletadas no tempo 0 e após atingir o tempo final (T_f - tempo final da fermentação - pH entre 4,4 e 4,9), submetidas à digestão e na sequência quantificados os compostos mencionados. O modelo é baseado nas três principais etapas da digestão do leite no organismo humano. Primeiramente foi realizada a simulação do alimento na fase inicial da digestão, mantendo em contato com a saliva artificial durante 5 min, posteriormente o mesmo foi mantido sob condições gástricas durante 2 horas, seguido da simulação da digestão em intestino delgado durante 2 horas. Todas as etapas foram realizadas sob temperatura de 37°C.

Uma solução orgânica e uma inorgânica foram preparadas para a saliva, suco gástrico, suco duodenal e bile. Os constituintes e suas concentrações estão apresentados na Tabela 1. Cada solução orgânica e inorgânica foi aumentada para 500 mL com água destilada e posteriormente, as soluções de cada suco digestivo foram misturadas e alguns constituintes adicionados. Os valores de pH dos sucos digestivos foram verificados e, quando necessário, ajustados para o intervalo apropriado com solução de NaOH 1 M ou HCl concentrado. As soluções de CaCl₂+2H₂O e NH₄Cl eram preparadas no dia da determinação para se obter a mudança de pH instantânea do compartimento do estômago e do intestino, respectivamente. Os sucos gástricos foram preparados com no máximo 24 horas de antecedência.

Um esquema de representação do modelo de digestão *in vitro* está apresentado na Figura 2. A digestão foi iniciada a partir da adição de 6 mL de saliva (pH 6,5± 0,5) à tubos falcon de 50 mL contendo 4,5 mL da amostra e incubadas durante 5 min a 37°C. Subsequentemente, 12 mL de suco gástrico (pH 2,5± 0,5) foram adicionados e a mistura submetida à agitação durante 2 h a 37°C. Finalmente, 12 mL de suco duodenal (pH 6,5± 0,5), 6 mL de bile e 2 mL de NaHCO₃ foram adicionados simultaneamente e a mistura foi agitada durante 2 h a 37°C. O quimo (sobrenadante) e a amostra digerida (peletes) foram obtidos por centrifugação durante 5 min a 2750 x g. O sobrenadante foi avaliado quanto aos níveis de AFM₁, AFB₁ e riboflavina, e o restante (aproximadamente 70 mL) foi liofilizado (LabConco, FreeZone 6, Estados Unidos) para posterior determinação da citotoxicidade dos compostos em células Caco-2.

A bioacessibilidade dos compostos foi calculada a partir da equação 02.

$$\text{Bioacessibilidade (\%)} = \frac{\text{composto determinado no quimo (\mu g)}}{\text{composto determinado na amostra antes da digestão (\mu g)}} \times 100 \quad (02)$$

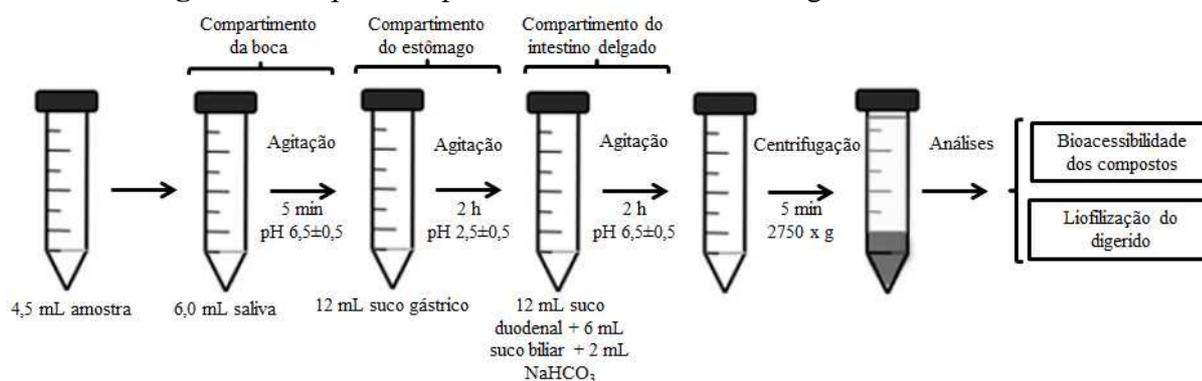
Tabela 1 - Constituintes e concentrações dos sucos sintéticos do modelo de digestão *in vitro*.

	Saliva	Suco gátrico	Suco duodenal	Suco biliar
Solução inorgânica	10mL KCl 89,6 g.L ⁻¹	15,7mL NaCl 175,3 g.L ⁻¹	40mL NaCl 175,3 g.L ⁻¹	30mL NaCl 175,3 g.L ⁻¹
	10mL KSCN 20 g.L ⁻¹	3,0mL NaH ₂ PO ₄ 88,8 g.L ⁻¹	40mL NaHCO ₃ 84,7 g.L ⁻¹	68,3mL NaHCO ₃ 84,7 g.L ⁻¹
	10mL NaH ₂ PO ₄ 88,8 g.L ⁻¹	9,2mL KCl 89,6 g.L ⁻¹	10mL KH ₂ PO ₄ 8 g.L ⁻¹	4,2mL KCl 89,6 g.L ⁻¹
	10mL NaSO ₄ 57 g.L ⁻¹	18mL CaCl ₂ + 2H ₂ O 22,2 g.L ⁻¹	6,3mL KCl 89,6 g.L ⁻¹	150μL HCl 37% g/g
	1,7mL NaCl 175,3 g.L ⁻¹	10mL NH ₄ Cl 30,6 g.L ⁻¹	10mL MgCl ₂ 5g.L ⁻¹	
	20mL NaHCO ₃ 84,7 g.L ⁻¹	6, mL HCl 37% g/g	180μL HCl 37%g/g	
	Solução orgânica	8mL ureia 25 g.L ⁻¹	10mL glicose 65g.L ⁻¹ 10mL ácido glucurônico 2 g.L ⁻¹ 3,4mL ureia 25 g.L ⁻¹ 10mL glicosamina hidrocloreto 33 g.L ⁻¹	4 mL ureia 25 g.L ⁻¹
Adicionar à mistura orgânica + inorgânica	290 mg α-amilase	1 g BSA	9 mL CaCl ₂ +2H ₂ O 22,2 g.L ⁻¹	10 mL CaCl ₂ +2H ₂ O 22,2 g.L ⁻¹
	15 mg ácido úrico 25 mg mucina	2,5 g pepsina 3 g mucina	1 g BSA 9 g pancreatina 1,5 g lipase	1,8 g BSA 30 g bile
pH	6,8±0,2	1,3±0,02	8,1±0,2	8,2±0,2

As soluções orgânicas e inorgânicas foram aumentadas para 500 mL com água destilada. Após misturar a solução orgânica e inorgânica, alguns constituintes foram adicionados e dissolvidos. Quando necessário, o pH foi ajustado para o intervalo apropriado.

Fonte: Adaptado de Versantvoort et al. (2005).

Figura 2 - Esquema representativo da análise de digestibilidade *in vitro*.



Fonte: Adaptado de Kabak e Ozbey (2012a).

2.8 CITOTOXICIDADE

Os ensaios de citotoxicidade foram realizados a partir da avaliação da viabilidade celular de células epiteliais humanas de adenocarcinoma coloretal Caco-2 (ATCC® HTB-37™), seguindo para tanto a metodologia descrita por Zhang et al. (2015) (APÊNDICE 5). A cultura das células Caco-2, exposição das amostras às células e os ensaios de citotoxicidade foram realizados no Laboratório de Ensaios Tecnológicos em Áreas Limpas (LETAL) no Campus Tecnológico e Nuclear (CTN) do Instituto Superior Técnico de Lisboa (IST - Lisboa) em Portugal, sob a supervisão da pesquisadora Dr^a Sandra Cabo Verde.

2.8.1 Cultura de células

As células epiteliais humanas de adenocarcinoma coloretal Caco-2 (ATCC® HTB-37™) foram cultivadas em atmosfera modificada (Incubadora ESCO, *CelCulture* CO₂ *Incubator*, Singapura) contendo 5% de CO₂ a 37°C em meio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado com 100 unidades.mL⁻¹ de penicilina e 100 µg.mL⁻¹ de estreptomicina, 4mM de L-glutamina, 1% de aminoácidos não essenciais (NEAA) e 10% de soro fetal bovino (FBS). As células Caco-2 foram semeadas em placas contendo meio DMEM suplementado e incubadas até atingir 100% de confluência (Figura 3).

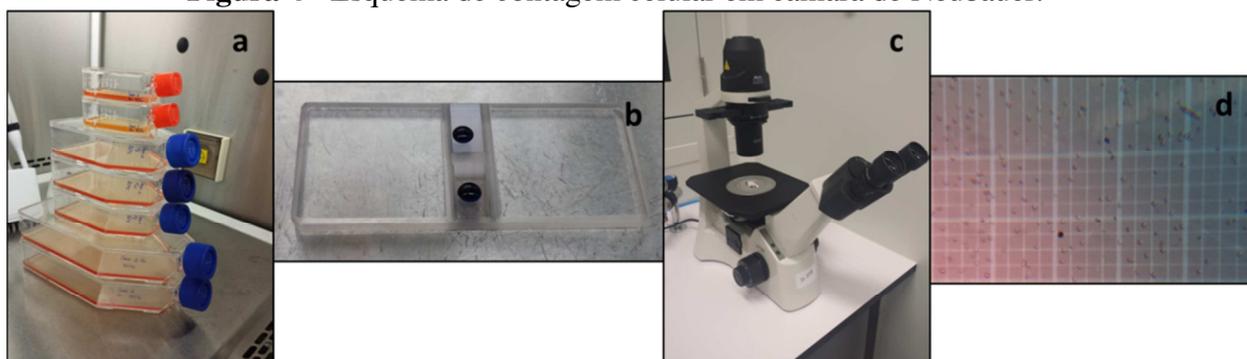
O meio era substituído a cada 3 dias, durante 21 dias. A concentração celular foi determinada em câmara de Neubauer utilizando azul de tripano como indicador de viabilidade celular (Figura 4). As células foram transferidas para placas de 96 poços, com concentração celular estimada em 1 x 10⁶ células/poço, para realização do teste citotóxico por meio do ensaio de sal tetrazólio MTT.

Figura 3 - Cultivo celular de células Caco-2 com >90% confluência.



Visualização de uma placa contendo células Caco-2 em microscópio invertido.

Figura 4 - Esquema de contagem celular em câmara de Neubauer.



a) cultivos celulares em diferentes tempos de incubação. b) adição do corante azul de tripano em câmara de Neubauer contendo extrato celular. c) visualização em microscópio invertido (Motic, AE20, China). d) contagem de células viáveis: células coradas = células mortas; células sem coloração = células viáveis.

2.8.2 Preparo das amostras

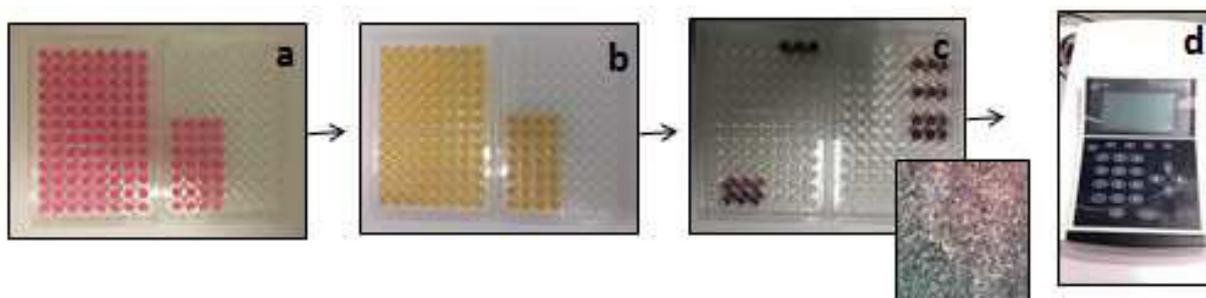
Para a realização dos ensaios de citotoxicidade as amostras digeridas e liofilizadas foram reconstituídas em água ultrapura, centrifugadas a 3000 rpm/ 15 min (Centrífuga para eppendorf Ecncifuge, 5417R, Reino Unido), filtradas em filtros de nylon 0,22 μm (para retirar as BAL do meio) e o pH do filtrado foi ajustado a 6,5 a 7,0 para posterior adição às células Caco-2 durante 24 horas.

2.8.3 Citotoxicidade

A viabilidade celular foi determinada por meio do ensaio de MTT que consiste em uma técnica quantitativa para determinar a interrupção de uma função bioquímica crítica por meio da quantificação da atividade mitocondrial, medindo-se a formação de cristais de formazan, produto formado pela redução de tetrazólio, MTT. A redução de MTT ocorre principalmente na mitocôndria pela ação da succinato desidrogenase fornecendo portanto um indicativo da função mitocondrial (MOSMANN, 1983). As células foram semeadas em placas de 96 poços com densidade de 1×10^6 células/poço e incubadas ($37^\circ\text{C}/ 5\% \text{CO}_2/ 90\%$ umidade relativa (UR)/ 24 h). Posteriormente as células foram tratadas com as amostras (20 μL de amostra em 180 μL de meio DMEM) e incubadas ($37^\circ\text{C}/ 5\% \text{CO}_2/ 90\%$ UR/ 24 h). Após a incubação, as células foram lavadas com tampão fosfato salino (PBS) e submetidas ao ensaio de MTT.

Para a realização dos testes citotóxicos, após lavagem das células, 100 μL de solução de MTT (5mg/mL em meio DMEM fresco) foram adicionados a cada poço e incubados ($37^\circ\text{C}/ 5\% \text{CO}_2/ 90\%$ UR/ 4 h). Após a incubação o sobrenadante foi removido e os cristais de formazan insolúveis foram completamente dissolvidos em 100 μL de dimetilsulfóxido (DMSO) por meio de agitação durante 10 min. A absorvância foi determinada a 570 e 630 nm utilizando um leitor de microplacas (Biochrom, EZ Read 800, Reino Unido). As etapas da realização dos testes de citotoxicidade das amostras estão descritas na Figura 5.

Figura 5 - Esquema representativo da estimativa da viabilidade celular por meio do ensaio de MTT.



a) Cultivo celular das células Caco-2; b) exposição das amostras às células; c) formação dos cristais de formazan por meio da adição do sal de tetrazólio MTT; d) leitura em leitor de microplacas.

2.9 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

A análise estatística dos resultados obtidos foi realizada utilizando o *software Statistica* v. 7.0. Foram avaliadas as médias dos experimentos realizados em triplicata, e a significância de suas diferenças, empregando o teste de Tukey ao nível de confiança de 95%.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 RIBOFLAVINA

3.1.1 Ação das BAL nos níveis e na biodisponibilidade de riboflavina

A ação das BAL nos níveis de riboflavina foi avaliada a partir da fermentação dos leites fortificados com aflatoxinas M₁ e B₁, de forma isolada e simultânea. A Tabela 2 mostra o efeito da adição das bactérias nos níveis da vitamina considerando o Controle (amostra de leite sem as micotoxinas e não fermentadas).

Tabela 2 - Efeito da fermentação com bactérias ácido lácticas nos níveis de riboflavina em amostras de leite fortificadas com Aflatoxina M₁ e B₁.

Amostra	AFB ₁ +AFM ₁ Riboflavina (mg.100mL ⁻¹)	AFM ₁ Riboflavina (mg.100mL ⁻¹)	AFB ₁ Riboflavina (mg.100mL ⁻¹)
Controle	0,194 ^{cba}	0,194 ^{cba}	0,194 ^{cba}
Ensaio 01	0,201 ^a	0,181 ^{cba}	0,130 ^e
Ensaio 02	0,138 ^{ed}	0,199 ^{ba}	0,164 ^{dc}
Ensaio 03	0,197 ^{ba}	0,186 ^{cba}	0,196 ^{ba}
Ensaio 04	0,187 ^{cba}	0,136 ^{ed}	0,179 ^{cba}
Ensaio 05	0,196 ^{ba}	0,176 ^{cba}	0,203 ^a
Ensaio 06	0,186 ^{cba}	0,172 ^{cba}	0,184 ^{cba}
Ensaio 07	0,199 ^a	0,202 ^a	0,185 ^{cba}
Ensaio 08	0,162 ^{edc}	0,182 ^{cba}	0,180 ^{cba}

Para um mesmo parâmetro médias com letras minúsculas iguais indicam que não há diferença significativa entre as médias dos ensaios pelo teste de Tukey ($\alpha < 0,05$); Controle: amostra de leite sem micotoxinas e sem BAL.

Os teores médios de riboflavina nas amostras fermentadas variaram entre 0,130 e 0,203 mg.100 mL⁻¹ de leite (Ensaio 01 e Ensaio 05 fortificados com AFB₁, respectivamente). As amostras fortificadas com AFB₁ mostraram redução significativa nos níveis de riboflavina quando fermentadas com *L. delbruecki* subs. *bulgaricus* e *L. acidophilus* (Ensaio 01 e 02, respectivamente) indicando que a contaminação pela micotoxina pode ser um fator limitante na produção da vitamina pelo micro-organismo probiótico pois, quando o leite era isento de contaminação houve um aumento significativo nos teores da vitamina (Artigo III; item 3.3; Tabela 7; pag. 114).

A influência da AFB₁ no nível vitamínico também pode ser observada nos ensaios 02 e 08 onde o leite fortificado pelas duas micotoxinas após a fermentação apresentava a vitamina com valores entre 29 e 16% menores, respectivamente. Redução significativa da

riboflavina em leite fortificado por AFM₁ foi observada somente no ensaio 04, onde a fermentação foi realizada com *S. salivarius* ssp. *thermophilus*, e houve um decréscimo de 0,058 mg.100 mL⁻¹ da vitamina. Os ensaios 3, 5, 6 e 7 foram os que apresentaram os maiores níveis de riboflavina após fermentação, mas sem diferença significativa em relação ao controle (independente da contaminação por aflatoxinas).

A contaminação de alimentos por aflatoxinas pode reduzir os níveis de riboflavina no meio, bem como no plasma, bile e fígado de animais que ingeriram alimentos contaminados, indicando uma possível interação entre a vitamina e as micotoxinas (BAINS, 2002). A interação aflatoxinas-riboflavina é demonstrada pela ocorrência de dificuldades para a absorção de riboflavina em animais com aflatoxicose (HAMILTON et al, 1974). A deficiência da vitamina B₂ na alimentação diminui a capacidade do fígado para metabolizar xenobióticos, sugerindo que as condições simultâneas de baixos teores de vitamina e aflatoxicoses comprometem a capacidade animal de desenvolver mecanismos de desintoxicação (JARAMILLO, 2016; PATEL; PAWAR, 1974).

Nossos experimentos também sugerem a ocorrência de interação das aflatoxinas e da riboflavina pela menor atividade das BAL em disponibilizar riboflavina. Vários estudos *in vitro* e *in vivo* também demonstraram a importância de micronutrientes, como as vitaminas, para a redução da produção e concentração de aflatoxina em presença de micro-organismos. Este efeito redutor da riboflavina sobre a produção de aflatoxinas é comprovado no cultivo de fungos do gênero *Aspergillus*. Verma et al. (1996) testaram a eficácia da riboflavina e do ácido fólico no crescimento micelial e na produção de aflatoxina (B₁, B₂, G₁ e G₂) pelo *A. parasiticus* em meio SMKY e, observaram uma relação inversa entre a concentração de riboflavina e a quantidade de aflatoxina produzida, chegando à 99% de redução (10 mg.mL⁻¹ de vitamina). Esse efeito também foi observado no crescimento do fungo, que teve a massa micelial seca reduzida de 2884 para 1401 mg quando em cultivo com concentrações crescentes de riboflavina.

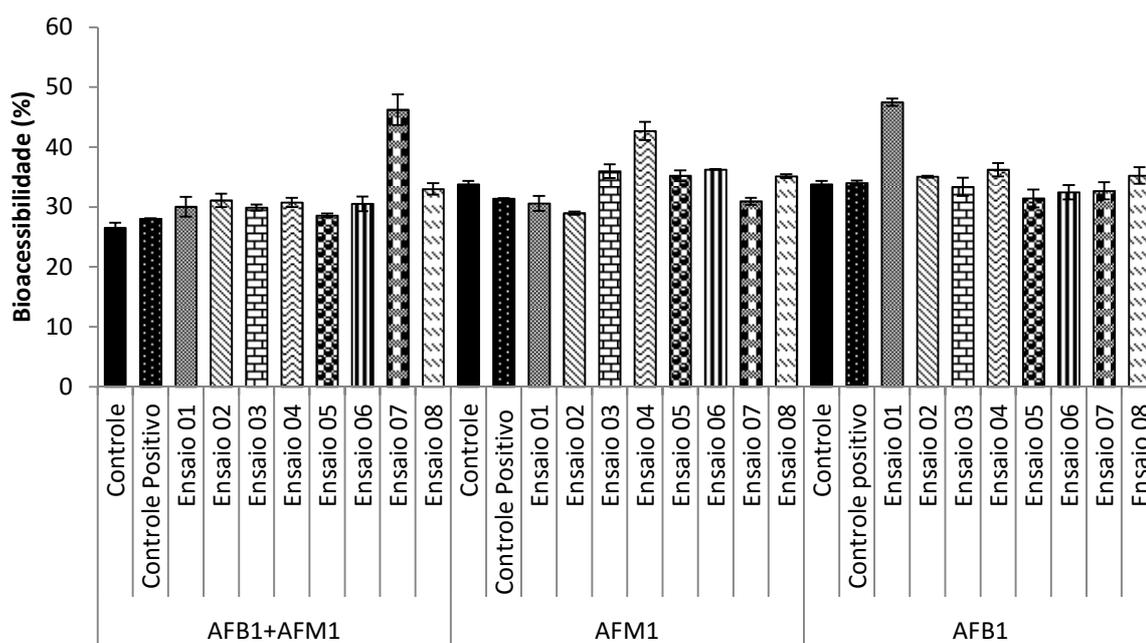
A interação da riboflavina com outros compostos *in vivo* foi avaliada por Joseph-Bravo, Findley e Newberne (1976) administrando uma única dose de aflatoxina (5 mg.kg⁻¹) em ratos e após 45 min do fornecimento de riboflavina (10 mg.kg⁻¹). Nas duas horas seguintes da administração da micotoxina os dois compostos estavam circulando ao mesmo tempo, e após 120 min, os níveis de riboflavina no sangue dos ratos baixaram de 37,8 para 27,63 µg.100 mL⁻¹ de sangue.

A riboflavina também já foi estudada quanto ao poder de inativação da contaminação por AFM₁ em leite por Applebaum e Marth (1982) que avaliaram três possíveis agentes

descontaminantes: peróxido de hidrogênio (H_2O_2), H_2O_2 acrescido de riboflavina e H_2O_2 adicionado de lactoperoxidase, em diferentes condições de tempo e temperatura para a inativação da AFM₁ em leite cru integral naturalmente contaminado. O máximo de redução (98%) ocorreu quando foi utilizado 1% H_2O_2 acrescido de riboflavina (0,05 mM) (30°C, 30 min) e aquecimento a 63°C por 30 min. Quando utilizada solução de H_2O_2 0,1% acrescido de lactoperoxidase (5 unidades) (4°C, 3 dias) a redução da contaminação foi de 85%.

A contaminação do leite por aflatoxinas alterou as condições de produção de riboflavina pelas bactérias ácido láctica avaliadas neste estudo, e por isso, as amostras fermentadas foram submetidas à digestão, a fim de avaliar a biodisponibilidade da vitamina após fermentação do leite (Figura 6 e Tabela 3).

Figura 6 - Efeito da fermentação com bactérias ácido lácticas na bioacessibilidade da riboflavina em amostras de leite fortificadas com aflatoxina M₁ e B₁



Controle: amostra de leite sem micotoxinas e sem BAL; Controle Positivo: Amostra de leite fortificada com a Aflatoxina M₁ e/ou B₁ e sem as BAL.

Tabela 3 - Efeito da fermentação com bactérias ácido lácticas na bioacessibilidade da riboflavina em amostras de leite fortificadas com Aflatoxina M₁ e B₁

Amostra	Riboflavina no leite (mg.100 mL ⁻¹)	Riboflavina no quimo (ng)	Bioacessibilidade (% média ± dp)
AFB₁+AFM₁			
Controle	0,198	2786,53	26,50±0,88 ^F
Controle Positivo	0,215	2715,18	28,03±0,09 ^{EF}
Ensaio 01	0,201	2719,90	30,87±0,55 ^{BCDE}
Ensaio 02	0,183	2565,96	31,74±0,05 ^{BC}
Ensaio 03	0,197	2650,50	29,90±0,51 ^{CDE}
Ensaio 04	0,205	2839,68	30,75±0,78 ^{BCDE}
Ensaio 05	0,197	2528,8	28,59±0,33 ^{DEF}
Ensaio 06	0,187	2563,33	31,17±0,37 ^{BCD}
Ensaio 07	0,214	4453,44	46,23±2,55 ^A
Ensaio 08	0,162	2402,59	33,01±0,96 ^B
AFM₁			
Controle	0,189	2983,02	33,79±0,56 ^{bcd}
Controle Positivo	0,204	2688,56	31,39±0,06 ^{cd}
Ensaio 01	0,181	2490,04	30,60±1,23 ^{cd}
Ensaio 02	0,199	2588,82	28,97±0,27 ^d
Ensaio 03	0,186	3012,55	35,97±1,15 ^{bcd}
Ensaio 04	0,136	2616,8	42,67±1,52 ^b
Ensaio 05	0,176	2783,73	35,20±0,92 ^{bc}
Ensaio 06	0,172	2802,27	36,25±0,05 ^{bcd}
Ensaio 07	0,202	2806,35	30,94±0,59 ^{cd}
Ensaio 08	0,181	2866,15	35,14±0,33 ^{bcd}
AFB₁			
Controle	0,189	2983,02	33,79±0,56 ^{bcd}
Controle Positivo	0,195	2872,44	33,99±0,42 ^{bcd}
Ensaio 01	0,129	2756,86	47,49±0,62 ^a
Ensaio 02	0,164	2585,39	35,06±0,16 ^{bcd}
Ensaio 03	0,196	2942,96	33,37±1,51 ^{cd}
Ensaio 04	0,178	2908,29	36,21±1,12 ^{bcd}
Ensaio 05	0,203	2867,87	31,43±1,50 ^{cd}
Ensaio 06	0,184	2682,57	32,45±1,21 ^{cd}
Ensaio 07	0,185	2727,95	32,69±1,45 ^{cd}
Ensaio 08	0,180	2847,09	35,24±1,39 ^{bcd}

Para um mesmo parâmetro médias com letras maiúsculas iguais indicam que não há diferença significativa entre as médias das amostras contaminadas com as aflatoxinas de forma combinada, pelo teste de Tukey ($\alpha < 0,05$); Para um mesmo parâmetro médias com letras minúsculas iguais indicam que não há diferença significativa entre as médias das amostras contaminadas com as aflatoxinas separadamente, pelo teste de Tukey ($\alpha < 0,05$); Controle: amostra de leite sem micotoxinas e sem BAL; Controle Positivo: Amostra de leite fortificada com a Aflatoxina M₁ e/ou B₁ e sem as BAL.

A fermentação do leite com as BAL proporcionou, na maioria dos casos, aumento da biodisponibilidade da riboflavina pelo modelo de digestão *in vitro*, sendo que, nenhum dos ensaios apresentou teores significativamente menores que o Controle (amostras sem contaminação micotoxicológica e sem BAL). Nos controles positivos, a contaminação por

micotoxinas não afetou significativamente a disponibilidade da vitamina no entanto o uso de BAL nos leites contaminados proporcionou um aumento de até 65% nesses valores (Ensaio 01 - AFB₁). A ação dos BALs foi diferente para cada tipo de leite contaminado, indicando a interação entre as BAL e as aflatoxinas. Quando o leite submetido à fermentação estava contaminado artificialmente com as duas micotoxinas, os ensaios que apresentaram maior aumento na biodisponibilidade do composto foram os 2, 6, 7 e 8 (*L. acidophilus*; *L. delbruecki* subs. *bulgaricus* + *S. salivarius* ssp. *thermophilus* + *L. acidophilus*; *L. delbruecki* subs. *bulgaricus* + *S. salivarius* ssp. *thermophilus* + *B. lactis* HN019; *L. delbruecki* subs. *bulgaricus* + *S. salivarius* ssp. *thermophilus* + *L. acidophilus* + *B. lactis* HN019, respectivamente) evidenciando mais uma vez a ação positiva do *L. acidophilus* (20% de aumento na biodisponibilidade) e a eficiência do uso conjunto das BAL. Neste caso, elas proporcionaram os maiores teores de riboflavina disponível para absorção após modelo de digestão *in vitro*. Nas amostras contaminadas separadamente pelas micotoxinas AFM₁ e AFB₁, os ensaios que apresentaram teores significativamente maiores de biodisponibilidade da riboflavina foram o 04 (*S. salivarius* ssp. *Thermophilus*) e 01 (*L. delbruecki* subs. *Bulgaricus*), respectivamente, com aumentos de 26,3% quando utilizado *S. salivarius* ssp. *Thermophilus* em amostra contaminada com AFM₁ e 40,5% para o leite contaminado com AFB₁ e fermentado com *L. delbruecki* subs. *Bulgaricus*.

Uma parte da riboflavina do leite existe na forma coenzima, ligada covalentemente à proteína, e o uso de culturas iniciadoras já foi comprovado quanto a capacidade de aumentar a vitamina no meio (LAXMINARAYANA; SHANKAR, 1980; SINGH; DEODHAR, 1994).

Os estudos avaliando a biodisponibilidade de riboflavina em leite por meio de modelos de digestão *in vitro* são escassos, e valores referentes aos teores de vitamina digeridos bem como a influência de fatores, como a matriz alimentícia digerida e a fase de digestão responsável pela absorção das vitaminas, ainda não foram completamente elucidados. No nosso estudo, os teores de riboflavina foram avaliados na etapa do intestino delgado, que compreende o duodeno, jejuno e íleo, local onde os constituintes alimentares são degradados em compostos menores e absorvidos através das paredes intestinais (PINHEIRO et al., 2013; THOMSON; SHAFFER; GONSKA, 2014). Nesta fase da digestão, foram obtidos valores médios de biodisponibilidade de riboflavina de aproximadamente 30%. Madalena et al. (2016) avaliaram a liberação da riboflavina nano-encapsulada com β -galactosidase nas fases da digestão usando um modelo *in vitro* e observaram que grande parte da vitamina encapsulada foi liberada nas fases duodeno, jejuno e íleo (35, 38% e 5% respectivamente)

indicando que a absorção dessa vitamina é realizada pelas paredes intestinais para a corrente sanguínea.

A ação inibitória da riboflavina sobre os níveis de aflatoxinas já foi comprovado (PRABHU; ABOOBAKER; BHATTACHARYA, 1989; VERMA et al., 1996), no entanto, não existem relatos na literatura que relacionam a contaminação do leite por essas micotoxinas e a biodisponibilidade de vitaminas de produtos lácteos (submetidos ou não a fermentação), salientando desta forma, a importância do estudo dos mecanismos de ação da vitamina sobre a contaminação com micotoxinas já comprovada em leites destinados ao consumo humano e à industrialização de produtos lácteos.

3.2 AFLATOXINAS

3.2.1 Validação de método para determinação das aflatoxinas B₁ e M₁

O método de extração da AFM₁ tipo QuEChERS foi adaptado e validado para a extração e determinação simultânea das aflatoxinas M₁ e B₁ em leite, leite fermentado e fluido biológico. A seletividade foi estimada por meio da fortificação de cada amostra com concentrações conhecidas das aflatoxinas (co-cromatografia) e posterior comparação com os respectivos brancos (amostras sem contaminação). Não foram verificados sinais de interferentes nos tempos de retenção da AFM₁ (~4,8 min) e da AFB₁ (~8,0 min). A curva de calibração foi linear para os intervalos de concentração estudados, com coeficientes de determinação satisfatórios ($R^2 = 0,99964$ para AFM₁ e $R^2 = 0,99768$ para AFB₁), evidenciando desta forma o ajuste ideal dos dados para a linha de regressão. As curvas de regressão linear para AFM₁ e AFB₁ foram $y = 225,73 x - 24,71$ e $y = 96,9 x + 0,39$, respectivamente.

O limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ) foram calculados a partir dos limites de detecção (LD_i) e quantificação (LQ_i) previamente determinados para o instrumento para a AFM₁ (0,1 e 0,3 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, respectivamente) e para a AFB₁ (0,30 e 1,0 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, respectivamente) (BRASIL, 2003). A repetibilidade do método foi expressa pela estimativa do desvio padrão relativo percentual (RSD%) ou coeficiente de variação (CV%) dos ensaios de recuperação (%R) do método (Tabela 4).

Os valores de recuperação (%R) variaram de 76,6 a 123,3% para a AFM₁ e 57,4 a 89,1% para a AFB₁ e a precisão foi comprovada a partir dos valores de RSD (%) que não

passaram de 18,9% atendendo desta forma, os padrões estabelecidos pela legislação vigente (BRASIL, 2003).

Tabela 4 – Valores de precisão, limite de detecção e limite de quantificação para determinação de AFM₁ e AFB₁ em leite, leite fermentado e fluido biológico.

Matriz	Aflatoxina Nível fortificação ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Repetibilidade ($n = 3$)		LD ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	LQ ($\mu\text{g.L}^{-1}$)
		Recuperação (%)	RSD%		
Leite	AFM ₁			0,03	0,09
	0,5	86,25	7,9		
	2,0	76,59	6,7		
	5,0	87,49	3,3		
	AFB ₁			0,1	0,3
	0,5	64,8	8,1		
	5,0	66,72	4,1		
10,0	68,25	0,2			
Leite fermentado	AFM ₁			0,03	0,09
	0,5	123,28	0,3		
	2,0	77,09	11,3		
	5,0	73,17	14,3		
	AFB ₁			0,1	0,3
	0,5	89,13	18,9		
	5,0	57,41	2,7		
10,0	60,0	3,0			
Fluido biológico*	AFM ₁			0,28	0,85
	2,0	93,37	12,6		
	5,0	101,53	5,6		
	AFB ₁				
	0,5	87,54	3,9		
	5,0	62,83	8,3		
	10,0	60,4	1,6		

*Os teores de LD e LQ para as amostras de fluido biológico correspondem à concentração mínima das aflatoxinas M₁ e B₁ que devem estar presentes na amostra inicial submetida à digestão, quando coletados 5 mL do digerido para extração pela metodologia de QuEChERS.

3.2.2 Efeito das bactérias ácido lácticas nos níveis de aflatoxinas em leite

O efeito da fermentação do leite com quatro diferentes BAL foi verificado e os resultados estão descritos na Tabela 5.

O efeito das BAL sobre a contaminação por aflatoxinas em leite foi visivelmente maior nos níveis de AFB₁, independente da fortificação ser realizada de forma simultânea ou separadamente da AFM₁. Os níveis de redução variaram de 8,96 e, quando as amostras foram fortificadas separadamente, atingiram a total remoção da micotoxina. Os menores níveis de redução foram observados nas amostras fortificadas simultaneamente com as duas aflatoxinas, e quando a fortificação foi realizada separadamente, somente o ensaio 05 (*L. delbruecki* subs.

Bulgaricus + *S. salivarius* ssp. *thermophilus*) apresentou redução inferior a 60%, mostrando que as culturas lácteas utilizadas na produção de iogurte reduziram em média somente 11% da contaminação inicial de AFB₁.

Tabela 5 - Efeito da fermentação com diferentes BAL em leites fortificados com AFB₁ e AFM₁.

Amostras fortificadas simultaneamente AFM ₁ +AFB ₁									
	Aflatoxina M ₁ ($\mu\text{g.L}^{-1}$) \pm dp				Red. (%)	Aflatoxina B ₁ ($\mu\text{g.L}^{-1}$) \pm dp			
	Tempo Incubação			Red. (%)		Tempo incubação			Red. (%)
	0 h	4 h	T _f			0 h	4 h	T _f	
01	1,89 \pm 0,01	2,66 \pm 0,09	2,69 \pm 0,18	-42,3	4,77 \pm 0,46	4,32 \pm 0,25	3,72 \pm 0,06	21,9	
02	2,2 \pm 0,008	1,87 \pm 0,05	2,21 \pm 0,25	-0,61	4,56 \pm 0,22	5,1 \pm 0,16	3,70 \pm 0,71	27,4	
03	1,9 \pm 0,04	2,25 \pm 0,06	2,37 \pm 0,01	-24,8	4,84 \pm 0,12	4,84 \pm 0,15	3,97 \pm 0,32	18,0	
04	2,25 \pm 0,05	2,06 \pm 0,04	1,97 \pm 0,03	12,5	4,01 \pm 0,14	3,47 \pm 0,19	2,62 \pm 0,04	34,7	
05	2,27 \pm 0,07	2,45 \pm 0,11	2,21 \pm 0,15	2,7	3,68 \pm 0,27	4,36 \pm 0,20	3,81 \pm 0,1	12,5	
06	2,21 \pm 0,07	2,11 \pm 0,11	2,0 \pm 0,14	9,1	4,59 \pm 0,25	5,59 \pm 0,25	4,18 \pm 0,26	9,0	
07	2,36 \pm 0,007	2,51 \pm 0,07	2,46 \pm 0,14	-4,3	3,74 \pm 0,27	4,20 \pm 0,22	3,54 \pm 0,08	15,7	
08	2,61 \pm 0,12	2,51 \pm 0,17	1,90 \pm 0,06	27,0	4,86 \pm 0,09	5,23 \pm 0,007	3,59 \pm 0,02	26,2	

Amostras fortificadas separadamente AFM ₁ e AFB ₁									
	Aflatoxina M ₁ ($\mu\text{g.L}^{-1}$) \pm dp				Red. (%)	Aflatoxina B ₁ ($\mu\text{g.L}^{-1}$) \pm dp			
	Tempo Incubação			Red. (%)		Tempo incubação			Red. (%)
	0 h	4 h	T _f			0h	4 h	T _f	
01	2,38 \pm 0,06	2,77 \pm 0,28	3,68 \pm 0,04	-54,6	2,69 \pm 0,1	1,41 \pm 0,1	<LQ	100	
02	2,33 \pm 0,21	2,56 \pm 0,05	0,61 \pm 0,2	73,7	4,04 \pm 0,09	2,41 \pm 0,41	<LQ	93,9	
03	1,9 \pm 0,08	2,50 \pm 0,05	3,00 \pm 0,04	-58,3	3,10 \pm 0,14	1,88 \pm 0,27	0,55 \pm 0,22	81,2	
04	2,17 \pm 0,02	2,53 \pm 0,29	2,96 \pm 0,35	-36,7	4,14 \pm 0,27	2,16 \pm 0,21	1,60 \pm 0,99	61,3	
05	2,55 \pm 0,28	2,73 \pm 0,05	0,29 \pm 0,07	88,4	4,94 \pm 0,08	2,85 \pm 0,51	4,43 \pm 0,8	10,3	
06	2,10 \pm 0,26	2,8 \pm 0,06	0,3 \pm 0,0008	83,4	4,07 \pm 0,12	3,22 \pm 0,33	0,73 \pm 0,11	82,1	
07	2,14 \pm 0,11	2,67 \pm 0,1	0,32 \pm 0,21	85,0	2,67 \pm 0,16	1,12 \pm 0,08	0,43 \pm 0,02	84,0	
08	2,00 \pm 0,31	3,19 \pm 0,31	2,42 \pm 0,16	-21,0	4,31 \pm 0,05	4,03 \pm 0,14	ND	100	

T_f: Tempo final da fermentação (pH entre 4,4 e 4,9). <LQ: abaixo do limite de quantificação; ND: Não Detectado.

Quando o leite foi fortificado simultaneamente com as duas aflatoxinas, as maiores reduções foram observadas nos ensaios 02, 04 e 08 (*L. acidophilus*, *S. salivarius* ssp. *Thermophilus* e *L. delbruecki* subs. *Bulgaricus* + *S. salivarius* ssp. *thermophilus* + *L. acidophilus* + *B. lactis* HN019, respectivamente) e quando a fortificação foi para cada

micotoxina os maiores níveis de redução foram observados nos ensaios 01, 02 e 08 (*L. delbruecki* subs. *Bulgaricus*, *L. acidophilus* e *L. delbruecki* subs. *Bulgaricus* + *S. salivarius* ssp. *thermophilus* + *L. acidophilus* + *B. lactis* HN019, respectivamente).

Não existem trabalhos na literatura que avaliaram o efeito de BAL na contaminação do leite por AFB₁, embora, vários estudos tenham evidenciado o poder de ligação e inibição dessas bactérias sobre a aflatoxina B₁ em meio tampão que demonstrava que a ligação entre a AFB₁ e as bactérias ocorria desde os primeiros minutos de contato (EL NEZAMI et al.; 1998).

No nosso trabalho, o *L. acidophilus* se destacou pelo poder redutor da AFB₁. El Nezami et al. (1998) obtiveram valores de remoção de até 77% da AFB₁ incubada com *L. acidophilus* durante 72 horas e mostraram que a ligação foi instantânea. A acidificação do meio também afetou o poder de inibição da BAL sobre a aflatoxina B₁ em soluções tampão, atingindo teores de até 84,2 e 81,3% quando incubadas com *L. acidophilus* LC1 e *L. acidophilus* ATCC 4356, respectivamente (HASKARD et al.; 2001).

O *L. delbruecki* subsp. *bulgaricus* também se destacou quanto ao poder de redução da AFB₁ no leite. Os teores de redução nas amostras fortificadas simultaneamente e separadamente foram de 21,6 e 100%, respectivamente. Essa capacidade de ligação e inibição da micotoxina também já foi relatada em soluções tampão, acidificadas, submetidas a aquecimento, com células viáveis e/ou não viáveis, atingindo valores de até 75,8% quando as células não viáveis foram acidificadas (HASKARD et al.; 2001). Dados mostram ainda que a inativação das células pelo calor aumenta o poder de ligação da AFB₁, atingindo valores de 56%, enquanto que em células viáveis somente 50% da micotoxina fica ligada durante as 72 horas de incubação (OLUWAFEMI; DA-SILVA, 2009).

Poucos são os relatos sobre o uso de *B. lactis* (HN019), mas resultados sugerem a ligação dessas BAL com a AFB₁ é fraca com redução de aproximadamente 18% (PELTONEN et al., 2000), o que é consistente com os resultados obtidos durante os experimentos realizados com este micro-organismo em leite contaminado simultaneamente com as duas micotoxinas.

Quando utilizada a BAL *S. thermophilus*, foram obtidos reduções de 34,7 e 61,3%, da AFB₁ fortificada na forma simultânea e separada, respectivamente. Haskard et al. (2001), usando essa BAL em meio acidificado, observaram que a bactéria fazia uma interação estável com a AFB₁, que mesmo após lavagens sucessivas, 63,8% da micotoxina inicial ainda permanecia ligada à bactéria.

As fermentações realizadas com as bactérias separadas e combinadas apresentaram valores satisfatórios de redução. O ensaio 08, que consistia na fermentação com as quatro

BAL simultaneamente, proporcionou 100% de redução na AFB₁ quando a micotoxina foi aplicada ao leite. A fortificação do leite com as duas micotoxinas interferiu na capacidade das BAL reduzir os níveis de contaminação. Esses resultados diferem dos obtidos por Pizzolitto, Salvano e Dalcerro (2012) que estudaram a interferência da fumonisina B₁ (FB₁) no complexo aflatoxina-bactéria, cuja capacidade de ligação da AFB₁ com *L. acidophilus* 24 em presença de FB₁, não apresentava diferença significativa nos níveis de AFB₁. A presença e os teores de aflatoxina também não interferiram significativamente nos níveis de redução da fumonisina.

O mecanismo de ligação e redução da AFB₁ pelas BAL ainda não está elucidado, mas alguns estudos sugerem que a capacidade da formação do complexo aflatoxina-bactéria está relacionada aos carboidratos constituintes da parede celular, que ocorrem de três diferentes formas na célula: polissacarídeos, peptidoglicanas da parede celular e ácido lipoteicóico ou ácido teicóico (HWANG et al., 2005). Hernandez-Mendoza, Guzman-de-Peña e Garcia (2009) avaliaram a habilidade de ligação à AFB₁ de cinco bactérias probióticas e observaram maior eficiência do *L. reuteri* e o *L. casei Shirota*. Os autores observaram que o mecanismo de ligação foi influenciado principalmente pela estrutura e integridade da parede celular. Os complexos bactéria-aflatoxina são formados por ligações fracas, não covalentes e parcialmente reversível com o ácido teicóico, componente das paredes celulares de *L. reuteri* e *L. casei Shirota*.

Os percentuais de redução da AFM₁ foram menores que da AFB₁, e nem todos os ensaios proporcionaram esses resultados, corroborando com estudos anteriores realizados em soluções tampão, que evidenciaram que a ligação da AFB₁ com as BAL é maior que a ligação da AFM₁ (GRATZ; MYKKÄNEN; EL-NEZAMI, 2005; KABAK; VAR, 2004). Esta redução no poder de ligação pode estar relacionada com o fato de a AFM₁ ser um derivado da AFB₁ e ter um grupamento hidroxila adicional e hidrofobicidade inferior, por isso, não é removida de forma tão eficiente quanto a AFB₁ (HASKARD et al.; 2001).

Os teores de redução da AFM₁ também foram influenciados pela presença da AFB₁ na matriz. A AFM₁ sofreu reduções entre 73,7 e 88%, quando fortificada separadamente no leite, e quando adicionada juntamente com a AFB₁, os níveis de redução variaram entre 2,7 e 27%. Ao contrário dos níveis de redução observados nas contaminações por AFB₁, quando o leite foi fermentado com apenas uma BAL, os níveis de redução foram menores, e em alguns casos, não ocorreram (ensaios 01 e 03 para ambas amostras). Nas amostras fortificadas distintamente com AFM₁, somente o *L. acidophilus* proporcionou redução da micotoxina (ensaio 02, 73,7%) e quando utilizadas BAL combinadas, os teores de redução foram maiores (ensaios 05, 06 e 07, com reduções de em média, 85%).

Nas amostras fortificadas com as duas aflatoxinas, a maior redução foi obtida no ensaio 08, em que o leite foi fermentado com as quatro BAL em conjunto, que proporcionou redução de 27,0%. A BAL *S. thermophilus* foi a única bactéria que proporcionou redução nos níveis da AFM₁ (12,5%) de forma isolada e as fermentações 05 e 06 também apresentaram resultados positivos após atingir pH 4,5 a 4,9 (2,7 e 9,1%, respectivamente).

Estudos anteriores avaliaram o poder de ligação das BAL sobre os níveis de AFM₁ em soluções tampão e em leite, e observaram que a ligação com a BAL foi melhor quando a bactéria estava viável e em leite, do que em tampão fosfato salino (*Phosphate buffered saline* – PBS). O efeito da matriz neste caso é desconhecido, mas pode estar relacionado com o conteúdo de caseína do leite, proteína em que a AFM₁ é ligada (BRACKETT; MARTH, 1982) ou com a aplicação de bactérias viáveis (ORRHAGE et al., 1994), que é o caso deste trabalho.

A eficiência das bactérias do gênero *Lactobacillus* quanto ao poder de ligação e inibição da AFM₁ já foi comprovada em outros estudos. Em PBS, o *L. acidophilus* LA1 apresentou poder de ligação de 18,3% e 25,5% quando utilizadas células viáveis e inativadas, respectivamente (PIERIDES et al., 2000). Elsanhothy et al. (2014) também avaliaram a eficiência de diferentes BAL na diminuição dos teores iniciais de AFM₁ em leite fortificado com 50 µg.L⁻¹ da micotoxina, e dentre as 5 bactérias estudadas o *L. acidophilus*, *L. bulgaricus* e *S. thermophilus* apresentaram reduções de 51,4, 41,8 e 43%, respectivamente, e, quando utilizados de forma combinada, essas BAL reduziram até 72,8% da contaminação inicial. El Khoury, Atoui e Yaghi (2011) avaliaram a habilidade das BAL *L. bulgaricus* e *S. thermophilus* na redução dos níveis iniciais de AFM₁ em leite (50 µg.L⁻¹) e obtiveram reduções de, em média, 30% da contaminação inicial, esta última bactéria também foi utilizada por Sarimehmetoglu e Küplülü (2004) na fermentação de leites contaminados por AFM₁ e proporcionou 60% de redução do contaminante.

As reduções da contaminação por AFM₁ nas amostras incubadas com culturas iniciadoras de iogurte (*L. delbruecki* subs. *Bulgaricus* + *S. salivarius* ssp. *Thermophiles*) foram de 2,7 e 88,4%, na presença e ausência da AFB₁, respectivamente, sendo semelhantes aos resultados observados na contaminação das amostras por AFB₁, e na contaminação do leite por AFM₁ avaliada por outros autores (EL KHOURY; ATOUI; YAGHI, 2011; SARIMEHMETOGLU; KÜPLÜLÜ, 2004).

Assim como para a AFB₁, o poder de ligação e inibição das BAL com a AFM₁ está relacionada com a composição da parede celular de cada bactéria, e os diferentes teores

obtidos para cada BAL estão relacionados com as diferentes paredes celulares e estruturas dos envelopes celulares (EL KHOURY; ATOUI; YAGHI, 2011).

O poder de ligação e inibição das BAL nas contaminações por AFB₁ e AFM₁ em amostras de leite submetidas à fermentação foi comprovado e, para que o risco da ingestão desses compostos possa ser estimado e avaliado quanto à biodisponibilidade no sistema digestivo, as amostras fermentadas foram submetidas a um modelo de digestão *in vitro* estático para estimar a possibilidade de absorção. Os valores obtidos após os ensaio de digestibilidade estão expressos na Tabela 6.

Tabela 6 - Bioacessibilidade de AFB₁ e AFM₁ em leite fermentado com BAL.

Ensaio	Aflatoxina M ₁			Aflatoxina B ₁		
	Quimo (ng)	Leite (ug.L ⁻¹)	Bioacessibilidade (%)	Quimo (ng)	Leite (ug.L ⁻¹)	Bioacessibilidade (%)
CP	13,59	2,54	107,4±5,98	13,72	2,733	101±6,3
01	4,25	2,82	30,2±1,42	13,28	3,72	71,4±1,24
02	2,96	2,03	41,2±3,73	5,899	3,70	28,0±1,18
03	3,95	2,37	33,2±0,09	11,16	3,97	53,0±0,54
04	4,27	1,97	43,6±0,39	9,82	2,62	75,0±0,4
05	7,64	2,21	71,9±3,49	10,88	3,81	57,4±3,92
06	7,91	2,01	82,0±4,13	14,73	4,18	70,5±1,69
07	3,44	2,46	27,3±0,96	ND	3,54	<LQ
08	ND	1,90	<LQ	9,76	3,59	54,5±0,36

CP: Controle Positivo (amostra de leite fortificada com a micotoxina e sem BAL). ND: Não detectado. <LQ: abaixo do limite de detecção do método.

Devido aos altos níveis de redução das AFB₁ e AFM₁ proporcionada pelas BAL quando a amostra foi fortificada separadamente, resultando em teores de aflatoxinas menores que o LD e LQ para fluido biológico, a bioacessibilidade dos compostos foi avaliada somente nas amostras fortificadas simultaneamente com as duas micotoxinas.

A bioacessibilidade das micotoxinas AFM₁ e AFB₁ nas amostras de leite que não foram fermentadas (CP) foram de 107% e 101%, respectivamente. A fermentação do leite por BAL promoveu reduções da bioacessibilidade em todos os experimentos e para a AFM₁ os valores variaram de 28 até 72,7%. Os maiores níveis de redução da micotoxina disponível para absorção foram obtidos nos fermentados produzidos com bactérias isoladas e no ensaio 07 (*L. delbruecki* subs. *bulgaricus* + *S. salivarius* ssp. *thermophilus* + *B. lactis* HN019) (27,3% de bioacessibilidade).

Para a AFB₁ os níveis de redução, quando comparados ao controle, variaram de 25 a 72% e os maiores níveis foram observados nas amostras fermentadas com *L. acidophilus* (ensaio 02), *B. lactis* HN019 (ensaio 03) e quando utilizada as quatro BAL simultaneamente

(ensaio 08). Esses resultados demonstraram a capacidade de ligação das BAL com as aflatoxinas M₁ e B₁ pois elas são liberadas da sua matriz para o fluido biológico. Nos ensaios 07 (*L. delbruecki* subs. *bulgaricus* + *S. salivarius* ssp. *thermophilus* + *B. lactis* HN019) e 08 (*L. delbruecki* subs. *bulgaricus* + *S. salivarius* ssp. *thermophilus* + *L. acidophilus* + *B. lactis* HN019) não foi possível avaliar os valores no quimo por estarem abaixo do limite de detecção do método.

A habilidade das BAL em reduzir os níveis de bioacessibilidade de AFM₁ em leites contaminados já foi comprovada por outros autores. Kabak e Ozbey (2012a) foram pioneiros nestes estudos e avaliaram a influência da fermentação de leites (naturalmente contaminados e fortificados com AFM₁) com bactérias do gênero *Bifidobacterium* (*longum* e *species* 420) e *Lactobacillus* (*acidophilus*, *acidophilus* NCFM 150B, *casei* Shirota e *rhamnosus*). As reduções da bioacessibilidade da micotoxina variaram de 15,5 a 31,6% em comparação com os controles. Das bactérias testadas, o *L. acidophilus* NCFM 150B demonstrou maior eficiência como agente ligante da AFM₁ e o *L. casei* Shirota (bactéria do Yakult) foi o que apresentou os menores níveis de redução, além disso os níveis de fortificação das amostras (0,042 a 0,882 µg.L⁻¹) não influenciaram significativamente na redução da bioacessibilidade, enfatizando a eficiência das BAL. Serrano-Niño et al. (2013) observaram reduções de 22,7 a 45,2% na bioacessibilidade da AFM₁ em leites fermentados, sendo a maior redução atribuída à fermentação com *B. bifidum* NRRL B-41410.

Não há relatos da avaliação da bioacessibilidade da AFB₁ por meio de modelos *in vitro* em amostras de leite, no entanto, os altos valores dessa micotoxina disponíveis após a digestão, já foram reportados para outros alimentos, tais como amendoim, pistache, avelã, figos secos, páprica, trigo e milho com 85,9 e 98,5% para a AFB₁ (KABAK; OZBEY, 2012b) e em amendoins com 94% da micotoxina disponível para absorção (VERSANTVOORT et al., 2005). Neste trabalho os ensaios mostraram redução da porcentagem de micotoxina disponível para absorção após fermentação com as BAL, indiferente se as bactérias foram empregadas isoladas ou combinadas, evidenciando desta forma o poder de ligação delas com as BAL com consequente diminuição do risco de absorção delas.

Considerando que o leite está contaminado por AFM₁ e/ou B₁ e o processo de digestão não diminui a disponibilidade dessas micotoxinas para absorção intestinal e a fim de avaliar o real risco da ingestão desses alimentos contaminados bem como a ação das BAL na citotoxicidade das micotoxinas, as amostras de leite fermentadas e não fermentadas foram submetidas a determinação de citotoxicidade por meio de exposição a células intestinais Caco-2 e avaliação da viabilidade celular por meio do ensaio de MTT.

Os resultados foram expressos em porcentagem de células viáveis (%) com relação ao controle (células tratadas somente com o meio), conforme descritos na Tabela 7.

Tabela 7 - Viabilidade celular de células expostas às amostras contaminadas.

Amostras	AFB ₁ +AFM ₁		AFB ₁		AFM ₁	
	0 h	T _f	0 h	T _f	0 h	T _f
	<i>Viabilidade Celular (%)</i>					
CNg	0	4,38	4,28	57,64	4,28	57,64
CP	0	4,23	1,90	42,46	0	33,71
01	0	3,79	0	1,90	0	28,60
02	0	3,65	0	0,15	0	22,62
03	0	2,92	0	0,73	0	19,99
04	0	4,82	0	0,97	0	35,60
05	0	5,99	0	2,33	0	11,96
06	0	3,79	0	4,09	0	53,26
07	0	5,69	0	2,48	0	18,53
08	0	5,84	1,17	2,92	1,17	60,70

CP: Controle Positivo (amostras fortificadas com as micotoxinas e sem bactérias); CNg: Controle Negativo (amostras sem fortificação e sem bactérias ácido lácticas); Tempo: Tempo de fermentação das amostras com as BAL.

As amostras submetidas à fermentação promoveram maior viabilidade celular quando comparadas aos leites não fermentados (tempo 0h de fermentação). Quanto aos valores de citotoxicidade da contaminação por micotoxinas, as amostras fortificadas com AFB₁ apresentaram maior citotoxicidade, com viabilidade celular variando de 0,15 a 4,1%, seguida das amostras fortificadas com as micotoxinas simultaneamente (2,9 a 6,0% de viabilidade celular) e das amostras fortificadas com AFM₁, que apresentaram a maior viabilidade celular após a fermentação (12 a 60,7%).

A toxicidade da AFB₁ é demonstradamente maior que da AFM₁ e também pode ser observada nos resultados de viabilidade celular dos nossos experimentos após a fermentação do leite, também empregadas por outros autores para estudar a toxicidade de aflatoxinas (ZHANG et al., 2015).

Para avaliar o efeito citotóxico são usados os testes de MTT, de liberação de lactato desidrogenase (LDH), Conteúdo Total de Proteína (do inglês, *Total Protein Content* - TPC) e *Neutral Red Uptake* (NRU) em células Caco-2. Os resultados mostram que a presença de compostos citotóxicos promove a diminuição de LDH e danos irreversíveis na membrana celular (CALONI et al., 2006; ZHANG et al., 2015).

O estudo do efeito citotóxico das aflatoxinas M₁ e B₁ a partir da exposição de soluções padrão com concentrações conhecidas das micotoxinas às células é de grande importância, no entanto, não proporciona uma real estimativa dos riscos de exposição do organismo a esses

metabólitos tóxicos. Simular o processo de digestão do alimento contaminado e expor as células Caco-2 a esse material viabiliza a estimativa do real risco desses contaminantes após ingestão, no entanto, são escassos os estudos que avaliam a toxicidade das afltoxinas após a aplicação de modelos de digestão *in vitro*.

Em recente estudo, Monaci et al. (2015), avaliaram a toxicidade de amostras digeridas de pão contaminado com as toxinas T-2 e HT-2, coletadas em diferentes etapas da digestão. Os ensaios de toxicidade foram realizados numa linha celular de linfócitos B e os fluidos digestivos foram coletados no início e término das fases gástricas, e após o final da fase duodenal. Os autores observaram que nas fases iniciais da digestão a toxicidade da toxina HT-2 foi maior, diminuindo para valores de aproximadamente 60% na fase gastro-duodenal, e associaram esse decréscimo na toxicidade a possíveis produtos de degradação gerados durante a digestão do alimento, uma vez que, o teor da toxina se manteve o mesmo em todas as fases.

No nosso trabalho, foi possível observar que a fermentação das amostras por BAL proporcionou uma diminuição da toxicidade dos compostos, aumentando a viabilidade celular após exposição das células com as amostras fermentadas. Estudos *in vivo* (EL NEZAMI et al.; 2000; GRATZ et al., 2004) e *in vitro* (GRATZ et al. 2004; GRATZ; MYKKÄNEN; EL-NEZAMI, 2005) evidenciam a habilidade das BAL em diminuir o poder de ligação das aflatoxinas à células intestinais e sugerem que essa redução é devido às BAL serem capazes de se ligar às micotoxinas em meio intestinal diminuindo assim a sua absorção (HERNANDEZ-MENDOZA et al., 2010). Kankaanpää et al. (2000) estudaram as propriedades de adesão de *L. rhamnosus* GG em células Caco-2 e observaram que a adesão das bactérias probióticas às células diminuiu de 30 para 5 % quando a AFB₁ foi removida do meio. Gratz et al. (2007) mostraram que, após 1 h de exposição as células de *L. rhamnosus* GG se ligaram a AFB₁ (61% ligadas) e que essa ligação ficava estável por 24 h.

4 CONCLUSÃO

Os níveis de vitamina produzidos pelas BAL em leite contaminado com as aflatoxinas não sofreram aumento significativo após a fermentação, indicando possível interação com as micotoxinas presentes nas amostras.

O uso de BAL na fermentação de amostras de leite contaminadas com as aflatoxinas B₁ e M₁ promoveu a diminuição dos teores de AFB₁ inicial, com destaque para o micro-organismo *L. delbruecki* e o uso combinado das 4 BAL que proporcionaram redução total da micotoxina. Os níveis de AFM₁ também sofreram redução, principalmente quando utilizadas

as 4 BAL de forma combinada (ensaio 08). Essas reduções também foram observadas nos níveis de bioacessibilidade e citotoxicidade das duas micotoxinas. O uso dessas bactérias também proporcionou aumento da bioacessibilidade da riboflavina presente naturalmente no leite utilizado na fermentação.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRANCHES, M. V.; DELLA LUCIA, C. M. ROCHA, F. I. G.; MORAES, V. B.; GONÇALVES, E. F.; NEVES, E. G. F.; SANT'ANA, H. M. P. Conteúdo de riboflavina em leite e produtos lácteos e comparação com o valor anunciado no rótulo. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v.19, n.3, p.307-314, 2008.
- APPLEBAUM R. S.; MARTH, E. H. Inactivation of Aflatoxin M₁ in Milk Using Hydrogen Peroxide and Hydrogen Peroxide plus Riboflavin or Lactoperoxidase. **Journal of Food Protection**, [S. I.], n. 6, p. 500-573, 1982.
- BAINS, B. S. Mycotoxins affect vitamin metabolism. **World Poltry**, [S. I.], v. 18, n. 5, p. 14-15, 2002.
- BATTACONE, G.; NUDDA, A.; CANNAS, A.; CAPPIO BORLINO, A.; BOMBOI, G.; PULINA, G. Excretion of aflatoxin M₁ in milk of dairy ewes treated with different doses of aflatoxin B₁. **Journal of Dairy Science**, [S. I.], v. 86, n. 8, p. 2667-2675, 2003.
- BECKER-ALGERI, T. A.; CASTAGNARO, D.; BORTOLI, K.; SOUZA, C.; DRUNKLER, D. A.; BADIALE-FURLONG, E. Mycotoxins in Bovine Milk and Dairy Products: A Review. **Journal of Food Science**, [S. I.], v. 81, n. 3, p. 544 – 552, 2016.
- BIANCHINI, R.; PENTEADO, M.D.V.C. Teores de tiamina, riboflavina e piridoxina em leites bovinos comercializados na cidade de São Paulo. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 20, n. 3, p. 291-298, 2000.
- BRACKETT, R. E.; MARTH, E. H. Association of aflatoxin M₁ with casein. **Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung**, [S. I.], v. 174, n. 6, p. 439-441, 1982.
- BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Secretaria de Defesa Agropecuária (SDA). Manual de garantia da qualidade analítica. Resíduos e Contaminantes em Alimentos. Brasília, 2011, 277 p.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução (ANVISA). Resolução n. 899, de 29 de maio de 2003. Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos. **Diário Oficial da União**, Brasília, 02 de junho de 2003.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Portaria n. 49, de 3 de setembro de 1999. Preparo de soluções padrões de aflatoxinas, ocratoxina A, zearalenona, tricotecenos e fumonisina B₁. **Diário Oficial da União**, de 15 de setembro de 1999.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Instrução Normativa nº 68, de 12 de dezembro de 2006. Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais Físico-

Químicos, para Controle de Leite e Produtos Lácteos. **Diário Oficial da União** de 14 de dezembro de 2006.

BUENO, D. J.; CASALE, C. H.; PIZZOLITTO, R. P.; SALVANO, M. A.; OLIVER, G. Physical adsorption of aflatoxin B₁ by lactic acid bacteria and *Saccharomyces cerevisiae*: A theoretical model. **Journal of Food Protection**, [S. I.], v. 70, n. 9, p. 2148-2154, 2007.

CALONI, F.; STAMMATI, A.; FRIGGÈ, G.; DE ANGELIS, I. Aflatoxin M₁ absorption and cytotoxicity on human intestinal in vitro model. **Toxicol**, [S. I.], v. 47, p. 409-415, 2006.

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

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**, [S.I.], v. 22, n. 10, p. 1695-1699, 2011.

EL NEZAMI, H.; MYKKÄNEN, H.; KANKAANPÄÄ, P.; SALMINEN, S.; AHOKAS, J. Ability of *Lactobacillus* and *Propionibacterium* strains to remove aflatoxin B₁ from the chicken duodenum. **Journal of Food Protection**, [S. I.], v. 63, n. 4, p. 549–552, 2000.

EL NEZAMI, H.; KANKAANPÄÄ, P.; SALMINEN, S.; AHOKAS, J. Ability of dairy strains of lactic acid bacteria to bind a common food carcinogen, aflatoxin B₁. **Food and Chemical Toxicology**, [S. I.], v. 36, n. 4, p. 321–326, 1998.

ELSANHOTY, R. M.; SALAM, S. A.; RAMADAN, M. F.; BADR, F. H. Detoxification of aflatoxin M₁ in yoghurt using probiotics and lactic acid bacteria. **Food Control**, [S. I.], v. 43, p. 129-134, 2014.

GOURAMA, H.; BULLERMAN, L. B. Inhibition of growth and aflatoxin production of *Aspergillus flavus* by *Lactobacillus* species. **Journal of Food Protection**, [S. I.], v. 58, n. 11, p. 1249–1256, 1995.

GRATZ, S.; MYKKÄNEN, H.; OUWEHAND, A.C.; JUVONEN, R.; SALMINEN, S.; EL-NEZAMI, H. Intestinal mucus alters the ability of probiotic bacteria to bind aflatoxin B₁ in vitro. **Applied and Environmental Microbiology**, [S. I.], v. 70, n. 10, p. 1–4, 2004.

GRATZ, S.; MYKKÄNEN, H.; EL-NEZAMI, H. Aflatoxin B₁ binding by a mixture of *Lactobacillus* and *Propionibacterium*: *in vitro* versus *ex vivo*. **Journal of Food Protection**, [S. I.], v. 68, n. 11, p. 2470–2474, 2005.

GRATZ, S.; WU, Q.; EL-NEZAMI, H.; JUVONEN, R.; MYKKÄNEN, H.; TURNER, P.C. *Lactobacillus rhamnosus* strain GG reduces aflatoxin B₁ transport, metabolism, and toxicity in Caco-2 cells. **Applied and Environmental Microbiology**, [S. I.], v. 73, n. 12, p. 3958–3964, 2007.

GUERRA, M.C.; GALVANO, F.; BONSI, L.; SPERONI, E.; COSTA, S.; RENZULLI, C.; CERVELLATI, R. Cyanidin-3-O-b-glucopyranoside, a natural free-radical scavenger against aflatoxin B₁- and ochratoxin A-induced cell damage in a human hepatoma cell line (Hep G2) and a human colonic adenocarcinoma cell line (CaCo-2). **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v. 94, n. 2, p. 211 - 220, 2005.

HAMILTON, P. B.; TUNG, H. T.; WYATT, R. D.; DONALDSON, W. E. Interaction of dietary aflatoxin with some vitamin deficiencies. **Poultry Science**, [S. I.], v. 53, n. 3, p. 871-877, 1974.

HASKARD, C. A.; EL-NEZAMI, H. S.; KANKAANPAA, P. E.; SALMINEN, S.; AHOKAS, J. T. Surface binding of aflatoxin B₁ by lactic acid bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, [S. I.], v. 67, n. 7, p. 3086-3091, 2001.

HERNANDEZ-MENDOZA, A.; GUZMAN-DE-PEÑA, D.; GARCIA, H. S. Key role of teichoic acids on aflatoxin B binding by probiotic bacteria. **Journal of Applied Microbiology**, [S. I.], v. 107, n.2, p. 395-403, 2009.

HERNANDEZ-MENDOZA, A.; GUZMAN-DE-PEÑA, D.; GONZÁLEZ-CÓRDOVA, A.F.; VALLEJO-CÓRDOBA, B.; GARCIA, H.S. *In vivo* assessment of the potential protective effect of *Lactobacillus casei* Shirota against aflatoxin B₁. **Dairy Science and Technology**, [S. I.], v. 90, n. 6, p. 729-740, 2010.

HUGENHOLTZ, J.; SMID, E. J. Nutraceutical production with food-grade microorganisms. **Current Opinion in Biotechnology**, [S. I.], v. 13, n. 5, p. 497-507, 2002.

HWANG, K. T.; LEE, W.; KIM, G. Y.; LEE, S. K.; LEE, J.; JUN, W. The binding of aflatoxin B₁ modulates the adhesion properties of *Lactobacillus casei* KCTC 3260 to HT29 colon cancer cell line. **Food Science and Biotechnology**, [S. I.], v. 14, n. 6, p. 866-870, 2005.

IARC. Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans: some naturally occurring substances. Food Items and Constituents, Heterocyclic Aromatic Amines and Mycotoxins, v. 56. Lyon, France, p. 397-444, 1993.

JARAMILLO, M. Interacciones Micotoxinas - Nutrientes Hallazgos Relevantes. Nutrición-Micotoxicología, Universidad Central de Venezuela - Venezuela. Disponível em: <http://www.micotoxinas.com.br/Boletim30.pdf>; acesso em abril, 2016.

JIANG, Y.; JOLLY, P. E.; ELLIS, W. O.; WANG, J.-S.; PHILLIPS, T. D.; WILLIAMS, J. H. Aflatoxin B₁ albumin adduct levels and cellular immune status in Ghanaians. **International Immunology**, [S. I.], v. 17, n. 6, p. 807-814, 2005.

JOSEPH-BRAVO, P. I.; FINDLEY, M.; NEWBERNE, P. M. Some interactions of light, riboflavin, and aflatoxin B₁ *in vivo* and *in vitro*. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, [S. I.], v. 1, n. 3, p. 353-376, 1976.

KABAK, B.; OZBEY, F. Aflatoxin M₁ in UHT milk consumed in Turkey and first assessment of its bioaccebility using an *in vitro* digestion model. **Food Control**, [S. I.], v. 28, n. 2, p. 338-344, 2012a.

KABAK, B.; OZBEY, F. Assessment of the bioaccessibility of aflatoxins from various food matrices using an *in vitro* digestion model, and the efficacy of probiotic bacteria in reducing bioaccessibility. **Journal of Food Composition and Analysis**, [S. I.], v. 27, n. 1, p. 21-31, 2012b.

KABAK, B.; VAR, I. Binding of aflatoxin M₁ by *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* sp. strains. **Milchwissenschaft**, [S. I.], v. 59, p. 301-303, 2004.

KANKAANPÄÄ, P., TUOMOLA, E., EL-NEZAMI, H., AHOKAS, J., SALMINEN, S.J. Binding of aflatoxin B₁ alters the adhesion properties of *Lactobacillus rhamnosus* strain GG in a Caco-2 model. **Journal of Food Protection**, [S. I.], v. 63, n. 3, p. 412–414, 2000.

LAXMINARAYANA, H.; SHANKAR, P. A. Fermented milk in human nutrition. **Indian Dairyman**, [S. I.], v. 32, p. 121-6, 1980.

LEBLANC, J. G.; LAIÑO, J. E.; JAREZ DEL VALLE, M.; VANNINI, V.; VAN SINDEREN, D.; TARANTO, M. P.; FONT DE VALDEZ, G.; SAVOY DE GIORI, G.; SESMA, F. B-Group vitamin production by lactic acid bacteria - current knowledge and potential applications. **Journal of Applied Microbiology**, [S. I.], v. 111, n. 6, p. 1297-1309, 2011.

LEWIS, L.; ONSONGO, M.; NJAPAU, H.; SCHURZ-ROGERS, H.; LUBER, G.; KIESZAK, S.; NYAMONGO, J.; BACKER, L.; DAHIYE, A. M.; MISORE, A.; DECOCK, K.; RUBIN, C. Aflatoxin contamination of commercial maize products during an outbreak of acute aflatoxicosis in eastern and central Kenya. **Environmental Health Perspective**, [S. I.], v. 113, n. 12, p. 1763-1767, 2005.

MADALENA, D. A.; RAMOS, O. L.; PEREIRA, R. N.; BOURBON, A. I.; PINHEIRO, A. C.; MALCATA, F. X.; TEIXEIRA, J. A.; VICENTE, A. A. *In vitro* digestion and stability assessment of B-lactoglobulin/riboflavin nanostructures. **Food Hydrocolloids**, [S. I.], v. 58, p. 89-97, 2016.

MAGNUSSON, J.; STRÖM, K.; ROOS, S.; SJÖGREN, J.; SCHNÜRER, J. Broad and complex antifungal activity among environmental isolates of lactic acid bacteria. **FEMS Microbiology Letters**, [S. I.], v. 219, n. 1, p. 129–135, 2003.

MONACI, L.; GARBETTA, A.; DE ANGELIS, E.; VISCONTI, A. Assessment of toxic potential of mycotoxin contaminated bread during *in vitro* human digestion on human B lymphoid cell line. **Toxicology Letters**, [S. I.], v. 232, n. 1, p. 106-112, 2015.

MOSMANN, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. **Journal of Immunological Methods**, [S. I.], v. 65, n. 1 – 2, p. 55-63, 1983.

OLUWAFEMI, F.; DA-SILVA, F.A. Removal of aflatoxins by viable and heat-killed *Lactobacillus* species isolated from fermented maize. **Journal of Applied Biosciences**, [S. I.], v. 16, p. 871–876, 2009.

ONILUDE, A. A.; FAGADE, O. E.; BELLO, M. M.; FADAHUNSI, I. F. Inhibition of aflatoxin-producing *Aspergilli* by lactic acid bacteria isolates from indigenously fermented cereal gruels. **African Journal of Biotechnology**, [S. I.], v. 4, n. 12, p. 1404 - 1408, 2005.

OOMEN, A. G.; ROMPELBERG, C. J. M.; BRUIL, M. A.; DOBBE, C. J. G., PEREBOOM, D. P. K. H.; SIPS, A. J. A. M. Development of an *In Vitro* Digestion Model for Estimating the Bioaccessibility of Soil Contaminants. **Arquives of Environmental Contamination and Toxicology**, [S. I.], v. 44, n. 3, p. 281-287, 2003.

ORRHAGE, K.; SILLERSTROM, E.; GUSTAFSSON, J. A.; NORD, C. E.; RAFTER, J. Binding of mutagenic heterocyclic amines by intestinal and lactic acid bacteria. **Mutation**

Research e Fundamental and Molecular Mechanism of Mutagenesis, [S. I.], v. 311, n.2, p. 239-248, 1994.

PATEL, J. M.; PAWAR, S. S. Riboflavin and drug metabolism in adult male and female rats. **Biochemical Pharmacology**, [S. I.], v. 23, n. 10, p. 1467-1477, 1974.

PELTONEN, K.; EL-NEZAMI, H.; HASKARD, C.; AHOKAS, J.; SALMINEN, S. Aflatoxin B₁ binding by dairy strains of lactic acid bacteria and bifidobacteria. **Journal of Dairy Science**, [S. I.], v. 84, n. 10, p. 2152-2156, 2001.

PELTONEN, K.D., EL-NEZAMI, H.S., SALMINEN, S.J., AHOKAS, J.T. Binding of aflatoxin B₁ by probiotic bacteria. **Journal of Science and Food Agriculture**, v. 80, n. 13, p. 1942–1945, 2000.

PIERIDES, M.; EL-NEZAMI, H.; PELTONEN, K.; SALMINEN, S.; AHOKAS, J. Ability of dairy strains of lactic acid bacteria to bind aflatoxin M₁ in a food model. **Journal of Food Protection**, [S. I.], v. 63, n. 5, p. 645–650, 2000.

PINHEIRO, A. C.; LAD, M.; SILVA, H. D.; COIMBRA, M. A.; BOLAND, M.; VICENTE, A. A. Unravelling the behaviour of curcumin nanoemulsions during *in vitro* digestion: effect of the surface charge. **Soft Matter**, [S. I.], v. 9, n. 11, p. 3147, 2013.

PIZZOLITTO, R.P.; SALVANO, M.A.; DALCERO, A.M. Analysis of fumonisin B₁ removal by microorganisms in co-occurrence with aflatoxin B₁ and the nature of the binding process. **International Journal of Food Microbiology**, [S. I.], v. 156, n. 3, p. 214–221, 2012.

PRABHU, A. L.; ABOOBAKER, V. S.; BHATTACHARYA, R. K. *In vivo* effect of dietary factor on the molecular action of aflatoxin B₁: role of riboflavin on the catalytic activity of liver fractions. **Cancer Letters**, [S. I.], v. 48, n. 2, p. 89-94, 1989.

PUTMAN, J.; ALLSHOUSE, J. **Trends in U.S. per capita Consumption of Dairy Products, 1909 to 2001**. Washington, DC: United States Department of Agriculture Economic Research Service, 2003.

SARIMEHMETOĞLU, B.; KÜPLÜLÜ, Ö. Binding ability of aflatoxin M₁ to yoghurt bacteria. **Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi**, [S. I.], v. 51, p. 195–198, 2004.

SARTORI, A. V.; MATOS, J. S.; MORAES, M. H. P.; N´OBREGA, 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 tandemMass spectrometry. **Food Analytical Methods**, [S. I.], v. 8, n. 9, p. 2321–30, 2015.

SERRANO-NIÑO, J. C.; CAVAZOS-GARDUÑO, A.; CANTÚ-CORNELIO, F.; GONZÁLEZ-CÓRDOVA, A. F.; VALLEJO-CÓRDOBA, B.; HERNÁNDEZ-MENDOZA, A.; GARCÍA, H. S. *In vitro* reduced availability of aflatoxin B₁ and Acrylamide by bonding interactions with teichoic acids from *Lactobacillus* strains. **LWT - Food Science and Technology**, [S. I.], v. 64, n. 2, p. 1334-1341, 2015.

SERRANO-NIÑO, J. C.; CAVAZOS-GARDUÑO, A.; HERNDANDEZ-MENDOZA, A.; APPLGATE, B.; FERRUZI, M. G.; SAN MARTIN-GONZÁLEZ, M. F.; GARCÍA, H. S. Assessment of probiotic strains ability to reduce the bioaccessibility of aflatoxin M₁ in

artificially contaminated milk using an in vitro digestive model. **Food Control**, [S. I.], v. 31, n. 1, p. 202-207, 2013.

SHETTY, P. H.; JESPERSEN, L. Saccharomyces cerevisiae and lactic acid bacteria as potential mycotoxin decontaminating agents. **Trends in Food Science & Technology**, [S. I.], v. 17, n. 2, p. 48-55, 2006.

SHREEVE, B. J.; PATTERSON, D. S. P.; ROBERTS, B. A. The 'carry-over' of aflatoxin, ochratoxin and zearalenone from naturally contaminated feed to tissues, urine and milk of dairy cows. **Food and Cosmetics Toxicology**, [S. I.], v. 17, n. 2, p. 151-152, 1979.

SINGH, R.; DEODHAR, A. D. Relative Bioavailability of Riboflavin in Cow's Milk and Fermented Milk using Rat Bioassay. **International Dairy Journal**, [S. I.], v. 4, n. 1, p. 59-71, 1994.

SOMORIN, Y. M.; BERTUZZI, T.; BATTILANI, P.; PIETRI, A. Aflatoxin and fumonisin contamination of yam flour from markets in Nigeria. **Food Control**, [S. I.], v. 25, n. 1, p. 53-58, 2012.

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**, [S. I.], v. 105, n. 2, p. 111-117, 2005.

THOMSON, A. B. R.; SHAFFER, E. A.; GONSKA, T. First principles of gastroenterology and hepatology in adults and children, [S. I.], vol. 1, CAPstone, 2014.

VERMA, R. J.; RAVAL, P. J.; MEHTA, D. N.; DUBE, H. C. Riboflavin and folic acid prevent aflatoxin production. **Indian Phytopathology**, [S. I.], v. 49, n. 1, p. 101-103, 1996.

VERSANTVOORT, C. H. M. ; OOMEN, A. G.; KAMP, E. V.; ROMPELBERG, C. J. M.; SIPS, A. J. A. M. Applicability of an *in vitro* digestion model in assessing the bioaccessibility of mycotoxins from food. **Food and Chemical Toxicology**, [S. I.], v. 43, n. 1, p. 31-40, 2005.

ZHANG, J.; ZHENG, N.; LIU, J.; LI, F.D.; LI, S.L.; WANG, J.Q. Aflatoxin B₁ and M₁ induced cytotoxicity and DNA damage in differentiated and undifferentiated Caco-2 cells. **Food And Chemical Toxicology**, [S. I.], v. 83, p. 54-60, 2015.

CAPÍTULO IV

CONCLUSÃO GERAL

Amostras provenientes dos estados de Santa Catarina e Paraná, perfazendo um total de 228, apresentaram 49,6% (113 amostras) e 3% (7 amostras) de contaminação por AFM₁ e AFB₁, respectivamente. As amostras coletadas na primavera e inverno foram as que apresentaram maior incidência de contaminação. Os maiores níveis das aflatoxinas foram relatados em amostras de leite integral oriundas do estado de Santa Catarina.

Os tratamentos térmicos convencionais (pasteurização e processo UAT) aplicados a amostras de leite proporcionaram redução nos níveis de proteínas, lactose, riboflavina e em menores proporções, de lipídeos. Uma alternativa para reduzir o impacto das perdas de riboflavina é a produção de derivados lácteos fermentados com BAL. A fermentação de diferentes tipos de leite (crus e processados termicamente - pasteurizado e UAT) com diferentes gêneros de BAL e bactérias probióticas, de forma combinada e isolada, proporcionou aumento nos níveis de riboflavina. Foram observados aumentos nos níveis da vitamina no produto fermentado, a partir de todos os tipos de leite, quando utilizada a bactéria *L. acidophilus*, e foi atribuído também a este micro-organismo e ao uso das quatro diferentes BAL de forma conjunta os maiores aumentos da vitamina no produto final.

Quando os produtos fermentados foram produzidos com leite pasteurizado homogeneizado contaminado com AFM₁ (2 µg.L⁻¹) e AFB₁ (10 µg.L⁻¹), a contaminação reduziu a capacidade das BAL aumentarem os níveis de riboflavina no fermentado lácteo, no entanto não interferiu na biodisponibilidade da vitamina, proporcionando um aumento de até 65% nos teores de riboflavina disponíveis para absorção, quando comparada ao controle (amostra não contaminada e não fermentada). A ação das BAL's na produção e biodisponibilidade da riboflavina foi diferente para cada tipo de leite contaminado, indicando a interação entre as BAL e as aflatoxinas.

O uso de bactérias ácido lácticas na fermentação dos leites contaminados também proporcionou a redução dos níveis iniciais das aflatoxinas, com destaque para a AFB₁, que, quando utilizada a bactéria *L. delbruecki* (ensaio 01) e as quatro BAL conjuntamente (ensaio 04), reduziu 100% da micotoxina. Os níveis de redução da AFM₁ variaram entre 2,7 e 88,4%, com destaque para o uso combinado das BAL, que proporcionaram os maiores níveis de redução. A biodisponibilidade das micotoxinas nos produtos fermentados foi significativamente menor do que nas amostras sem adição das BAL, comprovando a ação dessas bactérias também nos níveis das aflatoxinas disponíveis para absorção no organismo humano.

A fermentação das amostras de leite também proporcionou a redução da citotoxicidade das AFM₁ e AFB₁ em células de adenocarcinoma de colom retal humano. A ação das bactérias foi consideravelmente maior nas amostras contaminadas por AFM₁, que proporcionaram maior viabilidade celular após exposição das células Caco-2 às amostras contaminadas fermentadas e digeridas.

CAPITULO V

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, H. K.; CARTWRIGHT, R. D.; XIE, W.; SHIER, W.T. Aflatoxin and fumonisin contamination of corn (maize, *Zea mays*) hybrids in Arkansas. **Crop Protection**, [S. I.], v. 25, n.1, p. 1-9, 2006.

ABRANCHES, M. V.; DELLA LUCIA, C. M. ROCHA, F. I. G.; MORAES, V. B.; GONÇALVES, E. F.; NEVES, E. G. F.; SANT'ANA, H. M. P. Conteúdo de riboflavina em leite e produtos lácteos e comparação com o valor anunciado no rótulo. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v.19, n.3, p.307-314, 2008.

ADLER, S. A.; DAHL, A. V.; JENSEN, S. K.; THUEN, E.; GUSTAVSSON, A. M.; STEINSHAMN, H. Fatty acid composition, fat-soluble vitamin concentrations and oxidative stability in bovine milk produced on two pastures with different botanical composition. **Livestock Science**, [S. I.], v. 154, p. 93 - 102, 2013.

AFONSO, I. M.; HES, L.; MAIA, J. M.; MELO, L. F. Heat transfer and rheology of stirred yoghurt during cooling in plate heat exchangers. **Journal of Food Engineering**, [S. I.], v. 57, n. 2, p. 179-187, 2003.

AICHINGER, P. A.; MICHEL, M.; SERVAIS, C.; DILLMANN, M. L.; ROUVET, M.; D'AMICO, N.; ZINK, R.; KLOSTERMEYER, H.; HORNE, D. S. Fermentation of a skim milk concentrate with *Streptococcus thermophilus* and chymosin: structure, viscoelasticity and syneresis of gels. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, Amsterdam, v. 31, n. 1, p. 243-255, 2003.

ALBERTS, J. F.; GELDERBLOMB, W. C. A.; BOTHA, A.; ZYL, W. H. Degradation of aflatoxin B₁ by fungal laccase enzymes. **International Journal of Food Microbiology**, [S. I.], v. 135, n. 1, p. 47 - 52, 2009.

ALBORZI, S.; POURABBAS, B.; RASHIDI, M.; ASTANEH, B. Aflatoxin M₁ contamination in pasteurized milk in Shiraz (south of Iran). **Food Control**, [S. I.], v. 17, n. 7, p. 582-584, 2006.

AMIOT, J. ALMUDI, R. O. **Ciencia y Tecnologia de la Leche**. [S. I.], Acribia, 1991. 547 p.

ANICETO, C.; CANAES, L. S.; FATIBELLO-FILHO, O.; CAVALHEIRO, C. C. S. Determinação espectrofotométrica de vitamina B₂ (riboflavina) em formulações farmacêuticas empregando sistema de análises por injeção em fluxo. **Química Nova**, São Paulo, v. 23, n. 5, p. 637-640, 2000.

AOAC. **Association of Official Analytical Chemists**. Official Methods of analysis international, 17 th, CD-ROM, Willian Horwitz, 2000.

APPLEBAUM R. S.; MARTH, E. H. Inactivation of Aflatoxin M₁ in Milk Using Hydrogen Peroxide and Hydrogen Peroxide plus Riboflavin or Lactoperoxidase. **Journal of Food Protection**, [S. I.], n. 6, p. 500-573, 1982.

ARDIC, M.; KARAKAYA, Y.; ATASEVER, M.; ADIGUZEL, G. Aflatoxin M₁ levels of Turkish white brined cheese. **Food Control**, [S. I.], v. 20, n.3, p. 196-199, 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**, [S. I.], v. 22, n. 12, p. 1856-1858, 2011.
- ATASEVER, M. A.; ATASEVER, M.; OZTURAN, K. Aflatoxin M₁ levels in retail yoghurt and ayran in Erzurum in Turkey. **Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences**, [S. I.], v. 35, n. 1, p. 59-62, 2011.
- AVANTAGGIATO, G., HAVENAAR, R., VISCONTI, A. Assessing the zearalenone-binding activity of adsorbent materials during passage through a dynamic *in vitro* gastrointestinal model. **Food and Chemical Toxicology**, [S. I.], v. 41, n. 10, p. 1283-1290, 2003.
- AVANTAGGIATO, G.; HAVENAAR, R.; VISCONTI, A. Evaluation of the intestinal absorption of deoxynivalenol and nivalenol by an *in vitro* gastrointestinal model, and the binding efficacy of activated carbon and other adsorbent materials. **Food and Chemical Toxicology**, [S. I.], v. 42, n. 5, p. 817-824, 2004.
- BACHER, A.; EBERHARDT, S.; FISCHER, M.; KIS, K.; RICHTER, G. Biosynthesis of vitamin b2 (riboflavin). **Annual Review of Nutrition**, v. 20, [S. I.], p. 153–167, 2000.
- BAINS, B. S. Mycotoxins affect vitamin metabolism. **World Poltry**, [S. I.], v. 18, n. 5, p. 14-15, 2002.
- BATA, A.; LASZTITY, R. Detoxification of mycotoxin - contaminated food and feed by microorganisms. **Trends Food Science Technology**, [S. I.], v. 10, n. 6 - 7, p. 223 - 228, 1999.
- BATTACONE, G.; NUDDA, A.; CANNAS, A.; CAPPIO BORLINO, A.; BOMBOI, G.; PULINA, G. Excretion of aflatoxin M₁ in milk of dairy ewes treated with different doses of aflatoxin B₁. **Journal of Dairy Science**, [S. I.], v. 86, n. 8, p. 2667-2675, 2003.
- BATTACONE, G.; NUDDA, A.; PALOMBA, A.; MAZZETTE, A.; PULINA, G. The transfer of aflatoxin M₁ in milk of ewes fed diet naturally contaminated by aflatoxins and effect of inclusion of dried yeast culture in the diet. **Journal of Dairy Science**, [S. I.], v. 92, n. 10, p. 4997–5004, 2009.
- BAYMAN, P.; BAKER, J. L. Ochratoxins: a global perspective. **Mycopathologia**, [S. I.], v. 162, n. 3, p. 215–23, 2006.
- BECKER, T. A.; NEGRELO, I. F.; RACOULTE, F.; DRUNKLER, D. A.. Avaliação da qualidade sanitária de leite integral informal, pasteurizado, UHT e em pó comercializados na cidade de Medianeira e Serranópolis do Iguaçu – Paraná. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 31, n. 3, p. 707-716, 2010.
- BECKER-ALGERI, T. A.; CASTAGNARO, D.; BORTOLI, K.; SOUZA, C.; DRUNKLER, D. A.; BADIALE-FURLONG, E. Mycotoxins in Bovine Milk and Dairy Products: A Review. **Journal of Food Science**, [S. I.], v. 81, n. 3, p. 544 – 552, 2016.
- BEDARD, L.; MASSEY, T. Aflatoxin B₁-induced DNA damage and its repair. **Cancer Letters**, [S. I.], v. 241, n. 2, p. 174 - 183, 2006.

BERSOT, L. S.; GALVÃO, J. A.; RAYMUNDO, N. K. L.; BARCELLOS, V. C.; PINTO, J. P. A. N.; MAZIERO, M. T.. Avaliação microbiológica e físico-química de leites UHT produzidos no Estado do Paraná – Brasil. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 31, n. 3, p. 645-652, 2010.

BEZTSINNA, N.; SOLÉ, M.; TAIB, N.; BESTEL, I. Bioengineered riboflavin in nanotechnology. **Biomaterials**, [S. I.], v. 80, p. 121-133, 2016.

BIANCHINI, R.; PENTEADO, M.D.V.C. Teores de tiamina, riboflavina e piridoxina em leites bovinos comercializados na cidade de São Paulo. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 20, n. 3, p. 291-298, 2000.

BIELECKA, M.; BIEDRZYCKA, E.; MAJKOWSKA, A. Selection of probiotics and prebiotics for synbiotics and confirmation of their in vivo effectiveness. **Food Research International**, Amsterdam, v. 35, n. 2 - 3, p. 125-131, 2002.

BILANDZIC, N.; VARENINA, I.; SOLOMUN, B. Aflatoxin M₁ in raw milk in Croatia. **Food Control**, [S. I.], v. 21, n. 9, p. 1279 -1281, 2010.

BILANDZIC, N.; VARENINA, I.; KOLANOVIC, B. S.; BOZIC, D.; DOKIC, M.; SEDAK, M.; TANKOVIC, S.; POTOENJAK, D.; CVETNIC, Z. Monitoring of aflatoxin M₁ in raw milk during four seasons in Croatia. **Food Control**, [S. I.], v. 54, p. 331-337, 2015.

BOLGER M.; COKER R.D.; DINOVI M.; GAYLOR, D., GELDERBLOM, W.C.A., OLSEN, M., PASTER, N., RILEY, R.T., SHEPHARD, G., SPEIJERS, G.J.A., 2001. Fumonisin. Safety Evaluation of Certain Mycotoxins in Foods. **FAO Food and Nutrition Paper 74**. World Health Organization, Geneva, pp. 103–279.

BOUDRA, H.; BARNOUIN, J.; DRAGACCI, S.; MORGAVI, D.P. Aflatoxin M₁ and Ochratoxin A in Raw Bulk Milk from French Dairy Herds. **Journal of Dairy Science**, [S. I.], v. 90, n. 7, p. 3197-3201, 2007.

BOVO, F. **Avaliação da eficiência de bactérias ácido-láticas para descontaminação de aflatoxina M1**. 2011. 69 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos). Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos. Universidade de São Paulo. Pirassununga.

BOVO, F.; CORASSIN, C. H.; KOBASHIGAWA, E.; ROSIM, R. E.; OLIVEIRA, C. A. F. Eficiência de Bactérias Ácido-Láticas para Descontaminação de Aflatoxina M1 em Solução Tampão Fosfato, **Revista Unopar Científica Ciências Biológicas e da Saúde**, [S. I.], v. 13, n. 3, p. 151-156, 2011.

BOVO, F.; CORASSIN, C. H.; ROSIM, R. E.; OLIVEIRA, C. A. F. Efficiency of Lactic Acid Bacteria Strains for Decontamination of Aflatoxin M₁ in Phosphate Buffer Saline Solution and in Skimmed Milk. **Food and Bioprocess Technology**, [S. I.], v. 6, n. 8, p. 2230-2234, 2013. .

BRACKETT, R. E.; MARTH, E. H. Association of aflatoxin M₁ with casein. **Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung**, [S. I.], v. 174, n. 6, p. 439-441, 1982.

BRASIL. Portaria n.370, de 04 de setembro de 1997. In: Regulamento Técnico para fixação de Identidade e Qualidade de leite UHT. **Diário Oficial da República**, República Federativa do Brasil, Brasília, n.172, 08 set.1997.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Portaria n. 49, de 3 de setembro de 1999. Preparo de soluções padrões de aflatoxinas, ocratoxina A, zearalenona, tricotecenos e fumonisina B₁. **Diário Oficial da União**, de 15 de setembro de 1999.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa N° 51, de 18 de setembro de 2002. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Cru Refrigerado. **Gabinete do Ministro**, Brasília, 18/09/2002. Anexo IV.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa N° 62, de 26 de agosto de 2003. Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água. **Diário Oficial da União**, 18/09/2003, Seção 01, Página 14, Anexo I.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução (ANVISA). Resolução n. 899, de 29 de maio de 2003. Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos. **Diário Oficial da União**, Brasília, 02 de junho de 2003.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Instrução Normativa n° 68, de 12 de dezembro de 2006. Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais Físico-Químicos, para Controle de Leite e Produtos Lácteos. **Diário Oficial da União**, Brasília, 14 de dezembro de 2006.

BRASIL. Instrução Normativa N° 46, de 23 de outubro de 2007. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento Gabinete do Ministro. **Diário Oficial da União** de 24/10/2007 (n° 205, Seção 1, pág. 4). Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leites Fermentados. Item 2.

BRASIL. Instrução Normativa n°62, de 29 de dezembro de 2011. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Gabinete do Ministro**. Anexo I - Regulamento técnico de produção, identidade e qualidade de leite tipo A. Item 2.1.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC N. 7, de 18 de fevereiro de 2011. Aprova o Regulamento Técnico sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos (p. 66). Brasília, DF: **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**. N. 46, Seção 1.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Secretaria de Defesa Agropecuária (SDA). **Manual de garantia da qualidade analítica. Resíduos e Contaminantes em Alimentos**. Brasília, 2011, 277 p.

BRASIL. Instrução Normativa N.º 11, de 22 de maio de 2012. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Publica o Subprograma de Monitoramento em Carnes (Bovina, Ave, Suína e Equina), Leite, Pescado, Mel, Ovos e Avestruz para o exercício de 2012, referente ao Plano Nacional de Controle de Resíduos Biológicos em Produtos de Origem Animal – PNCRB. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 25 de maio de 2012. Anexo I, Quadro 4.

BREITHOLTZ-EMANUELSSON, A.; OLSEN, M.; OSKARSSON, A.; PALMINGER, I.; HULT, K. Ochratoxin A in cow's milk and in human milk with corresponding human blood samples. **Journal of AOAC International**, [S. I.], v.76, n. 4, p. 842, 1993.

- BRUERTON, K. 2001. Finding practical solutions to mycotoxins in commercial production: a nutritionist's perspective. In: Alltech's 17th Annual Symposium, 2001. **Proceedings...** 2001. p. 161-168.
- 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, 2012.
- BRYDEN, W.L. **Mycotoxins and mycotoxicoses: significance, occurrence and mitigation in the food chain**. In: Ballantyne, B., Marrs, T., Syversen, T. (Eds.), General and Applied Toxicology. , third ed. John Wiley & Sons Ltd, Chichester, UK, pp. 3529–3553, 2009.
- BUENO, D. J.; CASALE, C. H.; PIZZOLITTO, R. P.; SALANO, M.A.; OLIVIER, G. Physical adsorption of aflatoxin B₁ by lactic acid bacteria and *Saccharomyces cerevisiae*: a theoretical model. **Journal of Food Protection**, [S. I.], v.70, n. 9, p. 2148–2154, 2006.
- CALONI F.; SPOTTI M.; AUERBACH H.; OP DEN CAMP H., FINK-GREMMELS J.; POMPA G. *In vitro* metabolism of fumonisin B₁ by ruminal microflora. **Veterinary Research Communications**, [S. I.], v. 24, n. 6, p. 379–387, 2000.
- CALONI, F.; STAMMATI, A.; FRIGGÈ, G.; DE ANGELIS, I. Aflatoxin M₁ absorption and cytotoxicity on human intestinal in vitro model. **Toxicon**, [S. I.], v. 47, p. 409-415, 2006.
- CANO SANCHO, G.; MARIN, S.; RAMOS, A. J.; PERIS-VICENT, J.; SANCHIS, V. Occurrence of aflatoxin M₁ and exposure assessment in Catalonia (Spain). **Revista Iberoamericana de Micología**, [S. I.], v. 27, n. 3, p. 130-135, 2010.
- CAPOZZI, V.; MENGA, V.; DIGESU, A. M.; DE VITA, P.; VAN SINDEREN, D.; CATTIVELLI, L.; FARES, C.; SPANO, G. Biotechnological production of vitamin B2-enriched bread and pasta. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [S. I.], v. 59, n. 14, p. 8013–8020, 2011.
- CARUSO, M.; MARIOTTI, A.; ZIZZADORO, C., ZAGHINI, A.; ORMAS, P.; ALTAFINI, A.; BELLOLI, C. A clonal cell line (BME-UV1) as a possible model to study bovine mammary epithelial metabolism: Metabolism and cytotoxicity of aflatoxin B₁. **Toxicon**, [S. I.], v. 53, n. 4, p. 400–408, 2009.
- CARVAJAL, M.; ROJO, F.; MÉNDEZ, I.; BOLAÑOS, A. Aflatoxin B₁ and its interconverting metabolite aflatoxicol in milk: the situation in Mexico. **Food Additives and Contaminants**, [S. I.], v. 20, n. 11, p. 1077-1086, 2003.
- CAST, 2003. **Mycotoxins: Risks in Plant, Animal and Human Systems**. Report No. 139. Council for Agricultural Science and Technology, Ames, IA, USA.
- CATTANEO, T. M. P.; MARINONI, L.; IAMETTI, S.; MONTI, L. Behavior of Aflatoxin M₁ in dairy wastes subjected to different technological treatments: Ricotta cheese production, ultrafiltration and spray-drying. **Food Control**, [S.I.], v. 32, n. 1, p. 77-82, 2013.
- EC - Comunidade Européia. **Regulamento CE nº 1525/98**. Jornal Oficial das Comunidades Européias. [S. I.], [S. N.], 1998. (Diretiva das Comunidades Européias).

CELIK, T. H.; SARIMEHMETOGLU, B.; KUPLULU, O. Aflatoxin M₁ contamination in pasteurised milk. **Veterinarski arhiv**, [S. I.], v. 75, n. 1, p. 57–65, 2005.

CHARMLEY, E.; TRENHOLM, H. L.; THOMPSON, B. K.; VUDATHALA, D.; NICHOLSON, J.W.G.; PRELUSKY, D. B.; CHARMLEY, L.L. Influence of level of Deoxynivalenol in the diet of dairy cows on feed intake, milk production, and its composition. **Journal of Dairy Science**, [S. I.], v. 76, n. 11, p. 3580-3587, 1993.

CHARTERIS, W. P., KELLY, P. M., MORELLI, L., COLLINS, J. K. Antibiotic susceptibility of potentially probiotic *Lactobacillus* species. **Journal Food Protection**, [S. I.], v. 61, n. 12, p. 1636–1643. 1998

CHEN, B.; LEWIS, M. J.; GRANDISON, A. S. Effect of seasonal variation on the composition and properties of raw milk destined for processing in the UK. *Food Chemistry*, [S. I.], v. 158, p. 216-223, 2014.

COALLIER-ASCAH, J.; IDZIAK, E.S. Interaction between *Streptococcus lactis* and *Aspergillus flavus* on production of aflatoxin. **Applied and Environmental Microbiology**, [S. I.], v. 49, n. 1, p. 163-67, 1985.

COFFEY, R.; CUMMINS, E.; WARD, S. Exposure assessment of mycotoxins in dairy milk. **Food Control**, [S. I.], v. 20, n. 3, p. 239–249, 2009.

CCE - Conselho Da Comunidade Europeia. Sanitary Regulations and Standards SanPiN 2.3.4.551-96. Food and Processing Industry Enterprises (Technological Processes. Raw Materials). Production Of Milk And Milk products. Disponível em: <http://ec.europa.eu/food/safety/international_affairs/eu_russia/sps_requirements/docs/cu_sps_req_sanpin_2-3-4-559-96_en.pdf>. Acesso em: 01 de junho, 2015.

COSTA, A. M. C. ; MOURA, C. J. ; OLIVEIRA, M. B. . Avaliação da Qualidade Físico-Química no Leite UHT (UAT) Produzido no Estado de Goiás. In: VI CONPEEX - Congresso de Pesquisa Ensino E Extensão - VI Seminário de Pós-graduação Mestrado, 2009, Goiânia. VI, p. 566-568, 2009.

COSTA, M. P.; BALTHAZAR, C. F.; MOREIRA, R. V. B. P.; CRUZ, A. G.; JÚNIOR, C. A. C. Leite fermentado: potencial alimento funcional. **Enciclopédia Biosfera**, Goiânia, v. 9, n.16, p. 1287 - 1408, 2013.

CÔTÉ, L. M.; DAHLEM, A. M.; YOSHIKAWA, T.; SWANSON, S. P.; BUCK, W. B. Excretion of deoxynivalenol and its metabolites in milk, urine, and feces of lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, [S. I.], v. 69, n. 9, p. 2416– 2423, 1986.

COULOMBE, R.A. Aflatoxins. In: Sharma, R.P.; Salunkhe, D.K. Mycotoxins and phytoalexins. Boca Raton, CRC Press, 1991. p.103-43.

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

CROWLEY, S.; MAHONY, J.; VAN SINDEREN, D. Current perspectives on antifungal lactic acid bacteria as natural bio-preservatives. **Trends in Food Science & Technology**, [S. I.], v. 33, n. 2, p. 93 – 109, 2013.

CROY, R. G., WOGAN, G. N. Quantitative comparison of covalent aflatoxin–DNA adducts formed in rat and mouse liver and kidneys. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [S. I.], v. 66, n. 4, p. 761–768, 1981.

CUNHA, T. M.; CASTRO, F. P.; BARRETO, P. L. M.; BENEDET, H. D.; PRUDÊNCIO, E. S. Avaliação físico-química, microbiológica e reológica de bebida láctea e leite fermentado adicionados de probióticos. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 29, n. 1, p. 103-116, 2008.

DALIÉ, D. K. D., DESCHAMPS, A. M., RICHARD-FORGET, F. Lactic acid bacteria – Potential for control of mould growth and mycotoxins: A review. **Food Control**, [S. I.], v. 21, n. 4, p. 370-380, 2010.

DAMODARAN, S.; PARKIN, D. L.; FENNEMA, O. R. **Química de Alimentos de Fennema**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

DANICKE, S.; BREZINA, U. Kinetics and metabolism of the Fusarium toxin deoxynivalenol in farm animals: Consequences for diagnosis of exposure and aintoxication and carry over. **Food and Chemical Toxicology**, [S. I.], v. 60, p. 58 - 75, 2013.

DASHTI, B.; AL-HAMLI, S.; ALOMIRAH, H.; AL-ZENKI, S.; ABBAS, A. B.; SAWAYA, W. Levels of aflatoxin M₁ in milk, cheese consumed in Kuwait and occurrence of total aflatoxin in local and imported animal feed. **Food Control**, [S. I.], v. 20, n.7, p. 686-690, 2009.

DEETH, H. C.; TAMIME, A. Y.. Yogurt: Nutritive and therapeutic aspects. **Journal of Food Protection**, [S. I.], v. 44, n. 1, p. 78-86, 1981.

DEGEN, G.H., NEUMANN, H.-G. Differences in aflatoxin B₁ susceptibility of rat and mouse are correlated with the capability in vitro to inactivate aflatoxin B₁ epoxide. **Carcinogenesis**, [S. I.], v. 2, n. 4, p. 229–306, 1981.

DIAZ, D. E.; HAGLER JR, W. M.; BLACKWELDER, J. T.; EVE, J. A.; HOPKINS, B. A.; ANDERSON, K. L.; JONES, F. T.; WHITLOW, L. W. Aflatoxin binders II: reduction of aflatoxin M₁ in milk by sequestering agents of cows consuming aflatoxin in feed. **Mycopathologia**, [S. I.], v. 157, n. 2, p. 233–41, 2004.

DIAZ, G. J.; BOERMANS, H. J. Fumonisins toxicoses em domestic animals: a review. **Veterinary and human toxicology**, [S. I.], v. 36, n. 6, p. 548–55, 1994.

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

DIVYA, J. B.; VARSHA, K. K.; NAMPOOTHIRI, K. M. Newly isolated lactic acid bacteria with probiotic features for potential application in food industry. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. [S. I.], v. 167, n. 5, p. 1314 – 1324, 2012.

DIVYA, J. B.; VARSHA, K. K.; NAMPOOTHIRI, K. M.; ISMAIL, B.; PANDEY, A. Probiotic fermented foods for health benefits. **Engineering Life Sciences**, [S. I.], v. 12, n. 4, p. 377-390, 2012.

DUARTE, S. C.; ALMEIDA, A. M.; TEIXEIRA, A. S.; PEREIRA, A. L.; FALCÃO, A. C.; PENA, A.; LINO, C. M. Aflatoxin M₁ in marketed milk in Portugal: Assessment of human and animal exposure. **Food Control**, [S. I.], v. 30, n. 2, p. 411-417, 2013.

EC - EUROPEAN COMMISSION. 2001. **Regulation (EC) No. 466/2001 of 8 March 2001**, setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. O J L77:1–13.

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**, [S.I.], v. 22, n. 10, p. 1695-1699, 2011.

EL NEZAMI, H.; MYKKÄNEN, H.; KANKAANPÄÄ, P.; SALMINEN, S.; AHOKAS, J. Ability of *Lactobacillus* and *Propionibacterium* strains to remove aflatoxin B₁ from the chicken duodenum. **Journal of Food Protection**, [S. I.], v. 63, n. 4, p. 549–552, 2000.

ELGERBI, A. M.; AIDOO, K. E.; CANDLISH, A. A. G.; TESTER, R. F. Occurrence of aflatoxin M₁ in randomly selected North African milk and cheese samples. **Food Additives and Contaminants**, [S. I.], v. 21, n. 6, p. 592-597, 2004.

EL NEZAMI, H.; KANKAANPAA, P.; SALMINEN, S.; AHOKAS, J. Ability of dairy strains of lactic acid bacteria to bind a common food carcinogen, aflatoxin B₁. **Food and Chemical Toxicology**, [S.I.], v. 36, n. 4, p. 321-326, 1998.

ELSANHOTY, R. M.; SALAM, S. A.; RAMADAN, M. F.; BADR, F. H. Detoxification of aflatoxin M₁ in yoghurt using probiotics and lactic acid bacteria. **Food Control**, [S. I.], v. 43, p. 129-134, 2014.

ELZUPIR, A. O.; ELHUSSEIN, A. M. Determination of aflatoxin M₁ in dairy cattle milk in Khartoum State, Sudan. **Food Control**, [S. I.], v. 21, n. 6, p. 945-946, 2010.

ERTAS, N.; GONULALAN, Z.; YILDIRIM, Y.; KARADAL, F. A survey of concentration of aflatoxin M₁ in dairy products marketed in Turkey. **Food Control**, [S. I.], v. 22, n. 12, p. 1956-1959, 2011.

ESALQ. **Microbiologia do leite**. Disponível em: <http://www.esalq.usp.br/departamentos/lan/pdf/TecnologiaLeite.pdf>. Acesso em janeiro 2016.

EC - European Commission. **Regulation 401/2006 of 23 February 2006** laying down the methods of sampling and analysis for the official control of the levels of mycotoxins in foodstuffs. Official Journal of the European Union, [S. I.], v. 70, n. 12, 34, 2006.

FABIAN, E.; MAJCHRZAK, D.; DIEMINGER, B.; MEYER, E.; ELMADFA, I. Influence of probiotic and conventional yoghurt on the status of vitamins B₁, B₂ and B₆ in young healthy women. **Annals of Nutrition and Metabolism**, [S. I.], v. 52, n. 1, p. 29–36, 2008.

FALETTO, M. B.; KOSER, P. L.; BATTULA, N.; TOWNSEND, G. K.; MACCUBBIN, A. E.; GELBION, H. V. Cytochrome P3-450 cDNA encodes aflatoxin B₁ hydroxylase. **The Journal of Biological Chemistry**, [S. I.], v. 263, n. 25, p. 12187–9, 1988.

FALLAH, A. A.; JAFARI, T.; FALLAH, A.; RAHNAMA, M. Determination of aflatoxin M₁ levels in Iranian white and cream cheese. **Food and Chemical Toxicology**, [S. I.], v. 47, n. 8, p.1872-1875, 2009.

FALLAH, A. A.; RAHNAMA, M.; JAFARI, T.; SAEI-DEHKORDI, S. S. Seasonal variation of aflatoxin M₁ contamination in industrial and traditional Iranian dairy products. **Food Control**, [S. I.], v. 22, n. 10, p. 1653-1656, 2011.

FALLAH, A. Assessment of aflatoxin M₁ contamination in pasteurized and UHT milk marketed in central part of Iran Aziz. **Food and Chemical Toxicology**, [S. I.], v. 48, n. 3, p. 988-991, 2010.

FANICETO, C. CANAES, L. S.; FATIBELLO-FILHO, O.; CAVALHEIRO, C. C. S. Determinação espectrofotométrica de vitamina B2 (riboflavina) em formulações farmacêuticas empregando sistema de análises por injeção em fluxo. **Química Nova**, São Paulo, v. 23, n. 5, p. 637-640, 2000.

FAO/WHO. **Report of a Joint FAO/WHO expert consultation on evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria, 2001**. Disponível em: <http://www.fao.org/food/food-safety-quality/a-z-index/probiotics/en/>. Acesso em janeiro 2016.

FAO. **Dairy Animals**. Disponível em: <http://www.fao.org/agriculture/dairy-gateway/milkproduction/dairy-animals/en/#.VS6myfB5JOY>. Acesso em abril 2015.

FAO/WHO. **Guidelines for the evaluation of probiotics in food**. **Food and Agriculture Organization - FAO/ World Health Organization (WHO)**, 2002. 11p. Disponível em <ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/wgreport2.pdf>. Acesso em janeiro, 2016.

FARIAS, A. X. de; FREITAS-SILVA, O.; MORAES, M. H. de; SOUZA, M. de L. M. de; MONTELLO, A. P. Aflatoxina M₁ em Leite: Um Risco para a Saúde Pública. **Documentos da EMBRAPA**, p. 10-20, ISSN 0103-6068 67, Dezembro, 2005.

FAZELI, M. R.; HAJIMOHAMMADALI, M.; MOSHKANI, A.; SAMADI, N.; JAMALIFAR, H.; KHOSHAYAND, M. R.; VAGHARI, E.; POURAGHI, S. Aflatoxin B₁ binding capacity of autochthonous strains of lactic acid bacteria. **Journal of Food Protection**, v. 72, n. 1, p. 189-92, 2009.

FEDDERN, V.; FURLONG, E. B; SOARES, L. A.S. Efeitos da fermentação nas propriedades físico-químicas e nutricionais do farelo de arroz. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 27 n. 4, p. 800 – 804, 2007

FERNANDES, A. M.; CORRÊA, B.; ROSIM, R. E.; KOBASHIGAWA, E.; OLIVEIRA, C. A. F. Distribution and stability of aflatoxin M₁ during processing and storage of Minas Frescal cheese. **Food Control**, [S. I.], v. 24, n. 1-2, p. 104-108, 2012.

FERREIRA, M. A. Controle de qualidade físico químico em leite fluido. Brasília: SBRT/CDT/UnB, 2007. 18 p. (Dossiê técnico).

FILHO, A. O. **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, EMBRAPA**. Produção de leite longa vida subirá 1,5% em 2015. Disponível em <http://www.canalrural.com.br/noticias/leite/producao-leite-longa-vida-subira-2015-59200>, Acesso em março de 2015.

FINK-GREMMELS, J. Mycotoxins in cattle feeds and carry-over to dairy milk: a review. **Food Additives & Contaminants**, [S. I.], v.25, n.2, p. 172- 80, 2008.

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.

FDA - Food and Drug Administration. Food labelling: Health claims and food label statements; folate and neural tube defects. **Federal Register**, v. 61, n. 192, p. 8752–8807, 1996.

FOOD AND NUTRITION BOARD. Institute of Medicine of the National Academies. **Dietary Reference Intakes for Dietary reference intakes for thiamin, riboflavin, niacin, vitamin B6, folate vitamin B12, pantothenic acid, biotin and choline**. Washington (DC): National Academies Press (US); 1998.

FOX, P. F.; MCSWEENEY, P. L. H. (2003). Advanced dairy chemistry, vol. 1, proteins (3rd ed.,). London: Kluwer Academic/Plenum Publishers. In: Chen, B.; Lewis, M. J.; Grandison, A. S. Effect of seasonal variation on the composition and properties of raw milk destined for processing in the UK. *Food Chemistry*, v. 158, p. 216-223, 2014.

FRANCO, G. **Tabela de composição química dos alimentos**. 9.ed. São Paulo: Atheneu, 2002. 307p.

FUCHS, S.; SONTAG, G.; STIDL, R.; EHRLICH, V.; KUNDI, M.; KNASMÜLLER, S. Detoxification of patulin and ochratoxin A, two abundant mycotoxins, by lactic acid bacteria. **Food and Chemical Toxicology**, [S. I.], v. 46, n. 4, p. 1398-1407, 2008.

GALTIER, P. Biological fate of mycotoxins in animals. **Revue de médecine vétérinaire**, [S. I.], v. 6, n. 149, p. 549-554, 1991.

GARDA, J.; MACEDO, R. M.; BADIALE-FURLONG, E. Determinação de Tricotecenos em Cerveja e Avaliação de Incidência no Produto Comercializado no Rio Grande Do Sul, **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 24, n. 4, p. 657-663, 2004.

GARRIDO, N. S.; IHA, M. H.; SANTOS ORTOLANI, M. R.; DUARTE FÁVARO, R. M. Occurrence of aflatoxins M₁ and M₂ in milk commercialized in Ribeirão Preto-SP, Brazil. **Food Additives and Contaminants**, [S. I.], v. 20, n. 1, p. 70-3, 2003.

GATTI, R.; GIOIA, M. G. Liquid chromatographic determination with fluorescence detection of B6 vitamers and riboflavin in milk and pharmaceuticals. **Alalytica Chimica Acta**, v. 538, n. 1 – 2, p. 135-141, 2005.

GAZZOTTI, T.; LUGOBONI, B.; ZIRONI, E.; BARBAROSSA, A.; SERRAINO, A.; PAGLIUCA, G. Determination of fumonisin B₁ in bovine milk by LC-MS/MS. **Food Control**, [S. I.], v. 20, n. 12, p. 1171-1174, 2009.

GELDERBLOM W. C.; GALENDO D.; ABEL S.; SWANEVELDER S.; MARASAS W. F.; WILD C. P. Cancer initiation by fumonisin B₁ in rat liverrole of cell proliferation. **Cancer Letter**, [S. I.], v. 169, n. 2, p.127-137, 2001.

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

GHAZANI, M. H. M. Aflatoxin M₁ contamination in pasteurized milk in Tabriz (northwest of Iran). **Food and Chemical Toxicology**, [S. I.], v. 47, n. 7, p. 1624-1625, 2009.

- GHIASIAN, S. A.; MAGHSOOD, A. H.; NEYESTANI, T. R.; MIRHENDI, S. H. Occurrence of aflatoxin M₁ in raw milk during the summer and winter seasons in Hamadan, Iran. **Journal of Food Safety**, [S. I.], v. 27, n. 2, p. 188-198, 2007.
- GHOLAMPOUR A. I.; KHOUSHNEVIS, S. H.; HASHEMI, S. J. Aflatoxin M₁ level in pasteurized and sterilized milk of Babol city. **Tehran University Medical Journal**, [S. I.], v. 65, n. 13, p. 20-24, 2008.
- GIOLO, M. P., OLIVEIRA, C. M., BERTOLINI, D. A., LONARDONI, M. V. C., GOUVEIA, M. S., PONTES-NETTO, D.; NIXDORF, S. L.; MACHINSKI JUNIOR, M.. Aflatoxin M₁ in the urine of non-carriers and chronic carriers of hepatitis B virus in Maringa, Brazil. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, São Paulo, v. 48, n. 3, p. 447-452, 2012.
- GLENN A. E. Mycotoxigenic *Fusarium* species in animal feed. In: Morgavi, D.P., Riley, R.T. (Eds.), *Fusarium and their Toxins: Mycology, occurrence, toxicity, control and economic impact*. **Animal Feed Science and Technology**, 2007.
- GOLDIN, B.R. Health benefits of probiotics. **British Journal of Nutrition**, London, v. 80, n. 4, p. S 203-207, 1998.
- GOLGE, O. A survey on the occurrence of aflatoxin M₁ in raw milk produced in Adana province of Turkey. **Food Control**, [S. I.], v. 45, p. 150-155, 2014.
- GOMES, A. M. P.; MALCATA, F. X. Agentes probióticos em alimentos: aspectos fisiológicos e terapêuticos, e aplicações tecnológicas. **Boletim de Biotecnologia**, Porto, v. 101, n. 64, p. 12-22, 1999.
- GORELICK, N. J. Risk assessment for aflatoxin B₁. I. Metabolism of aflatoxin B₁ by different species. **Risk Analysis**, [S. I.], v. 10, n. 4, p. 539-559, 1990.
- GOURAMA, H.; BULLERMAN, L. B. Anti-aflatoxigenic activity of *Lactobacillus casei pseudoplantarum*. **International Journal of Food Microbiology**, [S. I.], v. 34, n. 2, p. 131-143, 1997.
- GOURAMA, H.; BULLERMAN, L.B. Inhibition of growth and aflatoxin production of *Aspergillus flavus* by *Lactobacillus* species. **Journal of Food Protection**, [S. I.], v. 58, n. 11, p. 1249-1256, 1995.
- GOVARIS, A.; ROUSSI, V.; KOIDIS, P. A.; BOTSOGLOU, N. A. Distribution and stability of aflatoxin M₁ during production and storage of yoghurt. **Food Additives and Contaminants**, [S. I.], v. 19, n. 11, p. 1043-1050, 2002.
- GRATZ, S.; MYKKÄNEN, H.; OUWEHAND, A.C.; JUVONEN, R.; SALMINEN, S.; EL-NEZAMI, H. Intestinal mucus alters the ability of probiotic bacteria to bind aflatoxin B₁ in vitro. **Applied and Environmental Microbiology**, [S. I.], v. 70, n. 10, p. 1-4, 2004.
- GRATZ, S.; MYKKÄNEN, H.; EL-NEZAMI, H. Aflatoxin B₁ binding by a mixture of *Lactobacillus* and *Propionibacterium*: in vitro versus ex vivo. **Journal of Food Protection**, [S. I.], v. 68, n. 11, p. 2470-2474, 2005.

- GRATZ, S.; WU, Q.; EL-NEZAMI, H.; JUVONEN, R.; MYKKÄNEN, H.; TURNER, P.C. *Lactobacillus rhamnosus* strain GG reduces aflatoxin B₁ transport, metabolism, and toxicity in Caco-2 cells. **Applied and Environmental Microbiology**, [S. I.], v. 73, n. 12, p. 3958–3964, 2007.
- GUARNER, F.; MALAGELADA, J. R. Gut flora in health and disease. **The Lancet**, [S. I.], v. 361, p. 512-518, 2003.
- GUERRA, M.C.; GALVANO, F.; BONSI, L.; SPERONI, E.; COSTA, S.; RENZULLI, C.; CERVELLATI, R.. Cyanidin-3-O-b-glucopyranoside, a natural free-radical scavenger against aflatoxin B₁- and ochratoxin A-induced cell damage in a human hepatoma cell line (Hep G2) and a human colonic adenocarcinoma cell line (CaCo-2). **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v. 94, n. 2, p. 211 - 220, 2005.
- HADDAD, G. S.; LOEWENSTEIN, M. Effect of Several Heat Treatments and Frozen Storage on Thiamine, Riboflavin, and Ascorbic Acid Content of Milk. **Journal of Dairy Science**, [S. I.], v. 66, n. 8, p. 1601 - 1606, 1981.
- HAMID, A. S., TEFAMARIAM, I. G., ZHANG, Y., AND ZHANG, Z. G. Aflatoxin B₁-induced hepatocellular carcinoma in developing countries: Geographical distribution, mechanism of action and prevention. **Oncology Letters**, [S. I.], v. 5, n. 4, p.1087–1092, 2013.
- HAMILTON, P. B.; TUNG, H. T.; WYATT, R. D.; DONALDSON, W. E. Interaction of dietary aflatoxin with some vitamin deficiencies. **Poultry Science**, [S. I.], v. 53, n. 3, p. 871-877, 1974.
- HAMMER, P.; BLÜTHGEN, A.; WALTE, H. G. Carry over of fumonisin B₁ into the milk of lactating cows. **Milchwissenschaft**, [S. I.], v. 51, n. 12, p. 691–695, 1996.
- HAN, R. W.; ZHENG, N.; WANG, J. Q.; ZHEN, Y. P.; XU, X. M.; LI, S. L. Survey of aflatoxin in dairy cow feed and raw milk in China. **Food Control**, [S. I.], v. 34, n. 1, p. 35-39, 2013.
- HASKARD, C. A.; EL-NEZAMI, H. S.; KANKAANPAA, P. E.; SALMINEN, S.; AHOKAS, J. T. Surface binding of aflatoxin B₁ by lactic acid bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, [S. I.], v. 67, n. 7, p. 3086-3091, 2001.
- HASSAIN, H. F.; KASSAIFY, Z. The risks associated with aflatoxins M₁ occurrence in Lebanese dairy products. **Food Control**, [S. I.], v. 37, p. 68–72, 2014.
- HECK, J. M. L.; VAN VALENBERG, H. J. F.; DIJKSTRA, J.; VAN HOOIJDONK, A. C. M. Seasonal variation in the Dutch bovine raw milk composition. **Journal of Dairy Science**, [S. I.], v. 92, n. 10, p. 4745–4755, 2009.
- HENGSTLER, J. G., VAN DER BURG, B., STEINBERG, P., OESCH, F. Interspecies differences in cancer susceptibility and toxicity. **Drug Metabolism Reviews**, [S. I.], v. 31, n. 4, p. 917–970, 1999.
- HERNANDEZ-MENDOZA, A.; GUZMAN-DE-PEÑA, D.; GARCIA, H. S. Key role of teichoic acids on aflatoxin B binding by probiotic bacteria. **Journal of Applied Microbiology**, [S. I.], v. 107, n.2, p. 395-403, 2009.

HERNANDEZ-MENDOZA, A.; GUZMAN-DE-PEÑA, D.; GONZÁLEZ-CÓRDOVA, A.F.; VALLEJO-CÓRDOBA, B.; GARCIA, H.S. *In vivo* assessment of the potential protective effect of *Lactobacillus casei* Shirota against aflatoxin B₁. **Dairy Science and Technology**, [S. I.], v. 90, n. 6, p. 729–740, 2010.

HERZALLAH, S. M. Determination of aflatoxins in eggs, milk, meat and meat products using HPLC fluorescent and UV detectors. **Food Chemistry**, [S. I.], v. 114, n. 3, p. 1141-1146, 2009.

HESHMATI, A.; MILANI, J. M. Contamination of UHT milk by aflatoxin M₁ in Iran. **Food Control**, [S. I.], v. 21, n. 1, p. 19-22, 2010.

HOLT, J.G. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology** 9 ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1994. 787 p.

HONG, S. H.; MARSHALL, R. T. Natural exopolysaccharides enhance survival of lactic acid bacteria in frozen dairy desserts. **Journal of Dairy Science**, [S. I.], v. 84, n.6, p. 1367-1374, 2001.

HORWITZ, W.; ALBERT, R.; NESHEIM, S. Reliability of mycotoxin assays--an update. **The Journal of AOAC International**, [S. I.], v. 76, n. 3, p. 461-491, 1993.

HORWITZ, W.; KAMPS, L. R.; BOYER, K. W. Quality assurance in the analysis of foods and trace constituents. **The Journal of AOAC International**, [S. I.], v. 63, n. 6, p. 1344-1354, 1980.

HUANG, L.C.; ZHENG, N.; ZHENG, B.Q.; WEN, F.; CHENG, J.B.; HAN, R.W.; XU, X.M.; LI, S.L.; WANG, J.Q. Simultaneous determination of aflatoxin M₁, ochratoxin A, zearalenone and α -zearalenol in milk by UHPLC–MS/MS. **Food Chemistry**, [S. I.], v. 146, p. 242-249, 2014.

HUGENHOLTZ, J.; SMID, E. J. Nutraceutical production with food-grade microorganisms. **Current Opinion in Biotechnology**, [S. I.], v. 13, n. 5, p. 497–507, 2002.

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

HWANG, K. T.; LEE, W.; KIM, G. Y.; LEE, S. K.; LEE, J.; JUN, W. The binding of aflatoxin B₁ modulates the adhesion properties of *Lactobacillus casei* KCTC 3260 to HT29 colon cancer cell line. **Food Science and Biotechnology**, [S. I.], v. 14, n. 6, p. 866-870, 2005.

IARC - International Agency For Research On C. 1993. **Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans**, 56. Some naturally occurring substances: Food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins.

IARC. Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans: some naturally occurring substances. **Food Items and Constituents, Heterocyclic Aromatic Amines and Mycotoxins**, v. 56. Lyon, France, p. 397–444, 1993.

IBRAHIM, G. A.; KAWTHER, E.S.; HODA, W.E.S.; SHARAF, O.M. Isolation, Identification and Selection of Lactic Acid Bacterial Cultures for Production of Riboflavin and Folate. **Middle East Journal of Applied Sciences**, [S. I.], v. 4, n. 4, p. 924-930, 2014.

ICH – **International Conference on Harmonisation**. Validation of Analytical Procedures: Methodology, Q2B (CPMP/ICH/281/95), 1995.

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**, [S.I.], v. 29, n. 1, p. 1-6, 2013.

INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. **Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos**. Doq-cg-cre- 008, 2003.

IQBAL, S. Z.; ASI, M. R.; JINAP, S. Variation of aflatoxin M₁ contamination in milk and milk products collected during winter and summer seasons. **Food Control**, [S. I.], v. 34, n. 2, p. 714-718, 2013.

ISIRI Institute - Institute of Standard and Industrial Research of Iran. Maximum tolerated limits of mycotoxins in foods and feeds. **National Standard 5925**, 2002.

ISO Standard 11843: Capability of Detection-1, ISO, Geneva, 1997

JAGER, A. V.; TEDESCO, M. P.; SOUTO, P. C. M. C.; OLIVEIRA, C. A. F. Assessment of aflatoxin intake in São Paulo, Brazil. **Food Control**, [S. I.], v. 33, n. 1, p. 87-92, 2013.

JARAMILLO, M. Interacciones Micotoxinas - Nutrientes Hallazgos Relevantes. Nutrición-Micotoxicologia, Universidad Central de Venezuela - Venezuela. Disponível em: <http://www.micotoxinas.com.br/Boletim30.pdf>; acesso em abril, 2016.

JAYASHREE, S.; JAYARAMAN, K.; KALAICHELVAN, G. Isolation, screening and characterization of riboflavin producing lactic acid bacteria from Katpadi, Vellore district. **Recent Research in Science and Technology**, [S. I.], v. 2, n. 1, p. 83–88, 2010.

JIANG, Y.; JOLLY, P. E.; ELLIS, W. O.; WANG, J.-S.; PHILLIPS, T. D.; WILLIAMS, J. H. Aflatoxin B₁ albumin adduct levels and cellular immune status in Ghanaians. **International Immunology**, [S. I.], v. 17, n. 6, p. 807-814, 2005.

JOBIM, C. C.; GONÇALVES, G. D.; SANTOS, G. T. Qualidade sanitária de grãos e de forragens conservadas “*versus*” desempenho animal e qualidade de seus produtos. P.242-261. **Simpósio Sobre Produção e Utilização de Forragens Conservadas (2001 – Maringá)** Anais do Simpósio Sobre Produção e Utilização de Forragens Conservadas / Maringá : UEM/CCA/DZO, 2001. 319P.

JOSEPH-BRAVO, P. I.; FINDLEY, M.; NEWBERNE, P. M. Some interactions of light, riboflavin, and aflatoxin B₁ *in vivo* and *in vitro*. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, [S. I.], v. 1, n. 3, p. 353-376, 1976.

JOUANY, J. P. **The impact of mycotoxins on performance and health of dairy cattle**. In: Alltech’s 17th Annual Symposium, 2001. Proceedings..., p. 191-222, 2001.

KABAK, B.; OZBEY, F. Assessment of the bioaccessibility of aflatoxins from various food matrices using an *in vitro* digestion model, and the efficacy of probiotic bacteria in reducing bioaccessibility. **Journal of Food Composition and Analysis**, [S. I.], v. 27, n. 2, p. 21-31, 2012a.

- KABAK, B., OZBEY, F.. Aflatoxin M₁ in UHT milk consumed in Turkey and first assessment of its bioaccessibility using an in vitro digestion model. **Food Control**, [S. I.], v. 28, n. 2, p. 338-344, 2012b.
- KABAK, B.; VAR, I. Binding of aflatoxin M₁ by *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* sp. strains. **Milchwissenschaft**, [S. I.], v. 59, p. 301-303, 2004.
- KALAC, P. The effects of silage feeding on some sensory and health attributes of cow's milk: A review. **Food Chemistry**, [S. I.], v. 125, n. 2, p. 307-317, 2011.
- KAMKAR, A. A study on the occurrence of aflatoxin M₁ in raw milk produced in Sarab city of Iran. **Food Control**, [S. I.], v. 16, n. 7, p. 593-599, 2005.
- KAMKAR, A. A study on the occurrence of aflatoxin M₁ in Iranian Feta cheese. **Food Control**, [S. I.], v. 17, n. 10, p. 768-775, 2006.
- KAMKAR, A.; KARIM, G.; ALIABADI, F. S.; KHAKSAR, R. Fate of aflatoxin M₁ in Iranian white cheese processing. **Food and Chemical Toxicology**, [S. I.], v. 46, n. 6, p. 2236-2238, 2008.
- KAN, C. A. Transfer of toxic substances from feed to food. **Revista Brasileira de Zootecnia**, São Paulo, v. 38, n. spe, p. 423-431, 2009.
- KANIOU-GRIGORIADOU, I.; ELEFThERIADOU, A.; MOURATIDOU, T.; KATIKOU, P. Determination of aflatoxin M₁ in ewe's milk samples and the produced curd and Feta cheese. **Food Control**, [S. I.], v. 16, n. 3, p. 257 - 261, 2005.
- KANKAANPÄÄ, P., TUOMOLA, E., EL-NEZAMI, H., AHOKAS, J., SALMINEN, S.J. Binding of aflatoxin B₁ alters the adhesion properties of *Lactobacillus rhamnosus* strain GG in a Caco-2 model. **Journal of Food Protection**, [S. I.], v. 63, n. 3, p. 412-414, 2000.
- KARDEL, G.; ANTUNES, L. A. F. Culturas lácticas e probióticas empregadas na fabricação de leites fermentados:leites fermentados. In: LERAYER, A. L. S.; SALVA, T. J. G. Leites fermentados e bebidas lácteas: tecnologia e mercado. Campinas: ITAL, 1997. Cap. 2, p. 26-33.
- KAWASHIMA, M. L.; VALENTE SOARES, L. M. Incidência de fumonisina B₁, aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂, ocratoxina e zearalona em produtos de milho. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n. 3, p. 516-521, 2006.
- KEUTH, S.; BISPING, B. Formation of vitamins by pure cultures of tempe moulds and bacteria during the tempe solid substrate fermentation. **Journal of Applied Bacteriology**, [S. I.], v. 75, n. 5, p. 427-434, 1993.
- KIESSLING, K.H.; PETTERSSON, H.; SHOLM, K.; OLSEN. Metabolism of aflatoxin, ochratoxin, zearalona, and three trichothecenes by intact rumen fluid, rumen protozoa, and rumen bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, [S. I.], v. 47, n. 5, p. 1070-1073, 1984.
- KNEIFEL, W.; ULBERTH, F.; ERHARD, F.; JAROS, D. Aroma profiles and sensory properties of yogurt and yogurt-related products. I. Screening of commercially available starter cultures, **Milchwissenschaft**, [S. I.], v. 47, n. 6, p. 362-365, 1992.

- KOS, J.; LEVI, J.; ĐURAGI, O.; KOKI, B.; MILADINOVI, I. Occurrence and estimation of aflatoxin M₁ exposure in milk in Serbia. **Food Control**, [S. I.], v. 38, p. 41–6, 2014..
- KOTAL, F.; HOLADOVÁ, K.; HAJLOVÁ, J.; POUSTKA, J.; RADOVÁ, Z. Determination of trichothecenes in cereal. **Journal of Chromatography**, [S. I.], v. 830, p. 2110-225, 1999.
- KRUVE, A.; LEITO, I.; HERODES, K. Combating matrix effects in LC/ESI/MS: The extrapolative dilution approach. **Analytica Chimica Acta**, [S. I.], v. 651, n. 1, p. 75–80, 2009.
- LAXMINARAYANA, H.; SHANKAR, P. A. Fermented milk in human nutrition. **Indian Dairyman**, [S. I.], v. 32, p. 121-6, 1980.
- LEBLANC, J. G.; LAIÑO, J. E.; JAREZ DEL VALLE, M.; VANNINI, V.; VAN SINDEREN, D.; TARANTO, M. P.; FONT DE VALDEZ, G.; SAVOY DE GIORI, G.; SESMA, F. B-Group vitamin production by lactic acid bacteria - current knowledge and potential applications. **Journal of Applied Microbiology**, [S. I.], v. 111, n. 6, p. 1297-1309, 2011.
- LEE, D.; LEE, K. G. Analysis of aflatoxin M₁ and M₂ in commercial dairy products using highperformance liquid chromatography with a fluorescence detector. **Food Control**, [S. I.], v. 50, p. 467–471, 2015.
- LEE, J. E.; KWAK, B. M.; AHN, J. H.; JEON, T. H. Occurrence of aflatoxin M₁ in raw milk in South Korea using an immunoaffinity column and liquid chromatography. **Food Control**, [S. I.], v. 20, n. 2, p. 136-138, 2009.
- LESLIE, J. F.; ZELLER, K. A.; LAMPRECHT, S. C.; RHEEDER, J. P.; MARASAS, W. F. O. Toxicity, pathogenicity, and genetic differentiation of 5 species of *Fusarium* from sorghum and millet. **Phytopathology**, [S. I.], v. 95, n. 3, p. 275–283, 2005.
- LEWIS, L.; ONSONGO, M.; NJAPAU, H.; SCHURZ-ROGERS, H.; LUBER, G.; KIESZAK, S.; NYAMONGO, J.; BACKER, L.; DAHIYE, A. M.; MISORE, A.; DECOCK, K.; RUBIN, C. Aflatoxin contamination of commercial maize products during an outbreak of acute aflatoxicosis in eastern and central Kenya. **Environmental Health Perspective**, [S. I.], v. 113, n. 12, p. 1763-1767, 2005.
- LIMA-PALLONE, J. A.; CATHARINO, R. R.; GODOY, H. T. Avaliação do comportamento do ácido fólico no processamento de leites enriquecidos. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 9, n.1, p. 57-62, 2006.
- LIN, L. C.; LIU, F. M.; FU, Y. M.; SHIH, D. Y. Survey of Aflatoxin M₁ Contamination of Dairy Products in Taiwan. **Journal of Food and Drug Analysis**, [S. I.], v. 12, n. 2, p. 154-160, 2004.
- LIN, W. H.; HWANG, C. F.; CHEN, L. W.; TSEN, H. Y. Viable counts, characteristic evaluation for commercial lactic acid bacteria products. **Food Microbiology**, London, v. 23, n. 1, p. 74-81, 2006.
- LINE, J. E.; BRACKETT, R. E. Factors affecting aflatoxin B₁ removal by *Flavobacterium aurantiacum*. **Journal of Food Protection**, [S.I.], v. 58, n. 1, p. 91-94, 1995.

- LOBATO, V. Tecnologia de fabricação de derivados do leite na propriedade rural. Lavras/MG: UFLA, 2000. 37 p. (Boletim Técnico). Disponível em: <http://www.editora.ufla.br/index.php/component/phocadownload/category/56-boletins-de-extensao?download=1118:boletinsextensao>. Acesso em: agosto de 2013.
- LUIZ, D. J.; SIMÕES, D. J.; TAMOSTU, S. R.; CASALE, A. A. L.; WALTER DE, S. E. H. Avaliação físico-química e microbiológica do leite UHT comercializado em três países do Mercosul (Brasil, Argentina e Paraguai). **Archivos Latinoamericanos de Nutricion**, [S. I.], v. 60, n. 3, p.261-269, 2010.
- MACHADO, F.M.S. **Estratégias de concorrência da indústria alimentícia e seus desdobramentos na dimensão nutricional**. 2003. 200 f. Tese (Doutorado em Nutrição Humana Aplicada – PRONUT) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Economia, Administração e Contabilidade, Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, 2003.
- MADALENA, D. A.; RAMOS, O. L.; PEREIRA, R. N.; BOURBON, A. I.; PINHEIRO, A. C.; MALCATA, F. X.; TEIXEIRA, J. A.; VICENTE, A. A. *In vitro* digestion and stability assessment of B-lactoglobulin/riboflavin nanostructures. **Food Hydrocolloids**, [S. I.], v. 58, p. 89-97, 2016.
- MAGAN, N. Mycotoxin contamination of food in Europe: Early detection and prevention strategies. **Mycopathologia**, [S. I.], v. 262, n. 3, p. 245–253, 2006.
- MAGNUSSON, J.; STRÖM, K.; ROOS, S.; SJÖGREN, J.; SCHNÜRER, J. Broad and complex antifungal activity among environmental isolates of lactic acid bacteria. **FEMS Microbiology Letters**, [S. I.], v. 219, n. 1, p. 129–135, 2003.
- MALEKINEJAD, H.; MAAS-BAKKER, R.; FINK-GREMMELS, J. Species differences in the hepatic biotransformation of zearalenone. **The Veterinary Journal**, [S. I.], v. 172, n. 1, p. 96–102, 2006.
- MARAGOS, C. H.; RICHARD, J. L. Quantitation and stability of fumonisin B₁ and B₂ in milk. **Journal of AOAC International**, [S. I.], v. 77, n. 5, p. 1162–1167, 1994..
- MARASAS, W. F. O.; RILEY, R. T.; HENDRICKS, K. A.; STEVENS, V. L.; SADLER, T. W.; GELINEAU-VAN WAES, J.; MISSMER, S. A.; CABRERA, J.; TORRES, O.; GELDERBLUM, W. C. A.; ALLEGOOD, J.; MARTINEZ, C.; MADDOX, J.; MILLER, J. D.; STARR, L.; SULLARDS, M. C.; ROMAN, A.; VOSS, K. A.; WANG, E.; MERRILL, A. H. Fumonisin disrupt sphingolipid metabolism, folate transport, and neural tube development in embryo culture and in vivo: a potential risk factor for human neural tube defects among populations consuming fumonisin contaminated maize. **Journal of Nutrition**, [S. I.], v. 134, n. 4, p. 711–716, 2004.
- MARCHIORI, E. Dia Internacional do Leite. **Revista Indústria de Laticínios**, São Paulo, v.12, n. 69, p. 22-23, 2007.
- MARTINS, A. M. C. V.; ROSSI JR, O. D.; SALOTTI, B. M.; BURGER, K. P.; CORTEZ, A. L. L.; CARDOZO, M. V. Efeito do processamento UAT (Ultra Alta Temperatura) sobre as características físico-químicas do leite. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.28, n. 2; p. 295-298, 2008.

- MARTINS, M. C.; OLIVEIRA, Y. P.; COITINHO, D. C.; SANTOS, L. M. P. Panorama das ações de controle da deficiência de vitamina A no Brasil. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 20, n. 1, p. 5-18, 2007.
- MAUL, R.; WARTH, B.; KANT, J.S.; SCHEBB, N.H.; KRŠKA, R.; KOCH, M.; SÜLYÖK, M. Investigation of the hepatic glucuronidation pattern of the fusarium mycotoxin deoxynivalenol in various species. **Chemical Research in Toxicology**, [S. I.], v. 25, n. 12, p. 2715–2717, 2012.
- MERCOSUL - Mercado Comum do Cone Sul. Regulamento técnico sobre limites máximos de aflatoxinas. Resolução nº56/94, 1994. (Publicação avulsa, MERCOSUL).
- MEUCCI, V.; RAZZUOLI, E.; SOLDANI, G.; MASSART, F. Mycotoxin detection in infant formula milks in Italy. **Food Additives and Contaminants**, [S. I.], v. 27, n. 1, p. 64-71, 2010.
- MEUCCI, V.; SOLDANI, G.; RAZZUOLI, E.; SAGGESE, G.; MASSAR, M. Mycoestrogen Pollution of Italian Infant Food. **Journal of Pediatrics**, [S. I.], v. 159, n. 2, p. 278–83, 2011.
- MINERVINI, F.; FORNELLI, F.; LUCIVERO, G.; ROMANO, C.; VISCONTI, A. T-2 toxin immunotoxicity on human B and T lymphoid cell lines. **Toxicology**, [S. I.], v. 210, n. 1, p. 81–91, 2005.
- MONACI, L.; GARBETTA, A.; DE ANGELIS, E.; VISCONTI, A. Assessment of toxic potential of mycotoxin contaminated bread during *in vitro* human digestion on human B lymphoid cell line. **Toxicology Letters**, [S. I.], v. 232, n. 1, p. 106-112, 2015.
- MORAIS, M. B. de; JACOB, C. M. A. The role of probiotics and prebiotics in pediatric practice. **Journal of Pediatrics**, [S. I.], v. 82, n. 5, p. S189 - S197, 2006.
- MOSMANN, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. **Journal of Immunological Methods**, [S. I.], v. 65, n. 1 – 2, p. 55-63, 1983.
- MOTAWEE, M. M.; BAUER, J.; MCMAHON, D. J. Survey of aflatoxin M₁ in cow, goat, buffalo and camel milks in Ismailia-Egypt. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, [S. I.], v. 83, n. 5, p. 766-769, 2009.
- MOZZI, F.; RAYA, R. R.; VIGNOLO, G. M.. Biotechnology of Lactic Acid Bacteria: Novel Applications. 1. ed. Wiley-Blackwell, 2010, 417p.
- MUÑOZ, A.; ORTIZ, R.; MURCIA, M. A. Determination by HPLC of changes in riboflavin levels in milk and nondairy imitation milk during refrigerated storage. **Food Chemistry**, [S. I.], v. 49, n. 2, p. 203-206, 1994.
- MURPHY, P. A.; HENDRICH, S.; LANDGREN, C.; BRYANT, C. M. Food Mycotoxins: An Update. **Journal of Food Science**, [S. I.], v. 71, n. 5, p. 51-65, 2006.
- NEAL, G.E.; EATON, D.L.; JUDAH, D.J.; VERMA, A. Metabolism and toxicity of aflatoxins M₁ and B₁ in human-derived *in vitro* systems. **Toxicology and Applied Pharmacology**, [S. I.], v.151, n.1, p.152-158, ISSN 0041-008X, 1998.

- NELSON, P. E. Taxonomy and biology of *Fusarium moniliforme*. **Mycopathologia**, [S. I.], v. 117, n. 1 – 2, p. 29–36, 1992.
- NIDERKON, V., BOUDRA, H., MORGAVI, D. P. Binding of Fusarium mycotoxins by fermentative bacteria *in vitro*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 101, n. 4, p. 849–856, 2006.
- NOGUEIRA, S.; OLIVEIRA, E. M. B. P. P. Prevalência de Ocratoxina A em alimentos e consequentes problemas de segurança alimentar. **Alimentação Humana**, Portugal, v. 12, n. 2, p. 69–75, 2006.
- NURYONO, N.; AGUS, A.; WEDHASTRI, S.; MARYUDANI, Y. B.; SIGIT SETYABUDI, F. M. C.; BOHM, J.; RAZZAZI-FAZELI, E. A limited survey of aflatoxin M₁ in milk from Indonesia by ELISA. **Food Control**, [S. I.], v. 20, n. 8, p. 721-724, 2009.
- OBREMSKI, K., ZIELONKA, L.; GAJECKA, M.; EWA JAKIMIUK, E.; GAJECKI, M. Mycotoxins - dairy cattle breeding problem. A case report. **Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy**, [S. I.], v. 53, n. 2, p. 221-224, 2009.
- O'BRIEN, K.; MOSS, E.; JUDAH, D.; NEAL, G. Metabolic basis of species difference to aflatoxin B₁ induced hepatotoxicity. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, [S. I.], v. 114, n. 2, p. 813–821, 1983.
- OLIVEIRA, A. F. A. **Qualidade e organização na produção de leites fermentados**. In: LERAYER, A. L. S.; SALVA, T. J. G. Leites fermentados e bebidas lácteas: tecnologia e mercado. Campinas: ITAL, 1997. Cap. 16, p. 1-14.
- OLIVEIRA, C. P.; SOARES, N. F. F.; OLIVEIRA, T. V.; BAFFA JR, J. C.; SILVA, W. A. Aflatoxin M₁ occurrence in ultra high temperature (UHT) treated fluid milk from Minas Gerais/Brazil. **Food Control**, [S. I.], v. 30, n. 1, p. 90-92, 2013.
- OLUWAFEMI, F.; DA-SILVA, F. A. Removal of aflatoxins by viable and heat-killed *Lactobacillus* species isolated from fermented maize. **Journal of Applied Biosciences**, [S. I.], v. 16, p. 871–876, 2009.
- ONILUDE, A. A.; FAGADE, O. E.; BELLO, M. M.; FADAHUNSI, I. F. Inhibition of aflatoxin-producing aspergilli by lactic acid bacteria isolates from indigenously fermented cereal gruels. **African Journal of Biotechnology**, v. 4, n. 12, p. 1404 - 1408, 2005.
- OOMEN, A. G.; ROMPELBERG, C. J. M.; BRUIL, M. A.; DOBBE, C. J. G., PEREBOOM, D. P. K. H.; SIPS, A. J. A. M. Development of an *in vitro* Digestion Model for Estimating the Bioaccessibility of Soil Contaminants. **Arquivos of Environmental Contamination and Toxicology**, [S. I.], v. 44, n. 3, p. 281-287, 2003.
- ORRHAGE, K.; SILLERSTROM, E.; GUSTAFSSON, J. A.; NORD, C. E.; RAFTER, J. Binding of mutagenic heterocyclic amines by intestinal and lactic acid bacteria. **Mutation Research e Fundamental and Molecular Mechanism of Mutagenesis**, [S. I.], v. 311, n. 2, p. 239-248, 1994.
- ORUC, H. H.; CIBIK, R.; YILMAZ, E.; KALKANLI, O. Distribution and stability of aflatoxin M₁ during processing and ripening of traditional white pickled cheese. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 23, n. 2, p. 190-195, 2006.

OTTO, M. **Chemometrics**. Weinheim: New York, [s. n], 1999, p.121-122.

OVEISI, M-R.; JANNAT, B.; SADEGHI, N.; HAJIMAHMOODI, M.; NIKZAD, A. Presence of aflatoxin M₁ in milk and infant milk products in Tehran, Iran. **Food Control**, [S. I.], v. 18, n. 10, p. 1216-1218, 2007.

PATEL, J. M.; PAWAR, S. S. Riboflavin and drug metabolism in adult male and female rats. **Biochemical Pharmacology**, [S. I.], v. 23, n. 10, p. 1467-1477, 1974.

PATTONO, D.; GALLO, P. F.; CIVERA, T. Detection and quantification of Ochratoxin A in milk produced in organic farms. **Food Chemistry**, [S. I.], v. 127, n. 1, p. 374-377, 2011.

PATTONO, D.; GROSSO, A.; STOCCO, P.P.; PAZZI, M.; ZEPPA, G.. Survey of the presence of patulin and ochratoxin A in traditional semi-hard cheeses. **Food Control**, [S. I.], v. 33, n. 1, p. 54-57, 2013.

PEI, S. C.; ZHANG, Y. Y.; EREMIN, S. A.; LEE, W. J. Detection of aflatoxin M₁ in milk products from China by ELISA using monoclonal antibodies. **Food Control**, [S. I.], v. 20, n. 12, p. 1080-1085, 2009.

PELTONEN, K.; EL-NEZAMI, H.; HASKARD, C.; AHOKAS, J.; SALMINEN S. Aflatoxin B₁ binding by dairy strains of lactic acid bacteria and bifidobacteria. **Journal of Dairy Science**, [S. I.], v. 84, n.10, p. 2152-2156, 2001.

PELTONEN, K.D., EL-NEZAMI, H.S., SALMINEN, S.J., AHOKAS, J.T. Binding of aflatoxin B₁ by probiotic bacteria. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, [S. I.], v. 80, n. 13, p. 1942–1945, 2000.

PENG, K. Y.; CHEN, C. Y. Prevalence of Aflatoxin M₁ in Milk and Its Potential Liver Cancer Risk in Taiwan. **Journal of Food Protection**, [S. I.], v. 72, n. 5, p. 1025-1029, 2009.

PERDIGÓN, G.; LOCASCIO, M.; MEDICI, M.; PESCE DE RUIZ HOLGADO, A.; OLIVER, G. Interaction of Bifidobacteria with the gut and their influence in the immune function. **Biocell**, [S. I.], v. 27, n. 1, p. 1-9, 2003.

PEREIRA, J. R.; TAMANINI, R.; RIOS, E. A.; OLIVEIRA, V. H. S.; YAMAMURA, A. A. M.; BELOTI, V. Microbiota Mesófila Aeróbia Contaminante do Leite UHT. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 68, n. 394, p. 25-31, 2013.

PEREIRA, M. M. G.; CARVALHO, E.P.; PRADO, G.; ROSA, C.A.R.; VELOSO, T.; SOUZA, L.A.F.; 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**, Lavras, v. 29, n. 1, p.106-112, 2005.

PERKINS, J. B.; PERO, J. **Vitamin biosynthesis. In: *Bacillus subtilis and its Closest Relatives from Genes to Cells*** eds SONENSHEIN, A.; HOCH, J.; LOSICK, R. Washington, DC, USA: ASM Press., 2002, p. 271–286.

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

PIERIDES, M.; EL-NEZAMI, H.; PELTONEN, K.; SALMINEN, S.; AHOKAS, J. Ability of dairy strains of lactic acid bacteria to bind aflatoxin M₁ in a food model. **Journal of Food Protection**, [S. I.], v. 63, n. 5, p. 645-50, 2000.

PINHEIRO, A. C.; LAD, M.; SILVA, H. D.; COIMBRA, M. A.; BOLAND, M.; VICENTE, A. A. Unravelling the behaviour of curcumin nanoemulsions during *in vitro* digestion: effect of the surface charge. **Soft Matter**, [S. I.], v. 9, n. 11, p. 3147, 2013.

PIZZOLITTO, R.P.; SALVANO, M.A.; DALCERO, A.M. Analysis of fumonisin B₁ removal by microorganisms in co-occurrence with aflatoxin B₁ and the nature of the binding process. **International Journal of Food Microbiology**, [S. I.], v. 156, n. 3, p. 214–221, 2012.

POMPA, G.; MONTESISSA, C.; DILAURO, F. M.; FADINI, L. The metabolism of zearalenone in subcellular fractions from rabbit and hen hepatocytes and its estrogenic activity in rabbits. **Toxicology**, v. 42, n. 1, p. 69-75, 1986.

PONG, R. S.; NOGAN, G. N. Toxicity and biochemical and fine structural effects of synthetic aflatoxin M₁ and B₁ in rat liver. **Journal of the National Cancer Institute**, [S. I.], v. 47, p. 585–590, 1971.

POWERS, H.J. Riboflavin (vitamin B₂) and health. **The American Journal of Clinical Nutrition**, [S. I.], v. 77, n. 6, p. 1352–1360, 2003.

PRABHU, A. L.; ABOOBAKER, V. S.; BHATTACHARYA, R. K. *In vivo* effect of dietary factor on the molecular action of aflatoxin B₁: role of riboflavin on the catalytic activity of liver fractions. **Cancer Letters**, [S. I.], v. 48, n. 2, p. 89-94, 1989.

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**, [S. I.], v. 47, n. 5, p. 984–991, 2009.

PRATA, L. F. Fundamentos de Ciência do Leite. Jaboticabal: FUNEP/UNESP, 2001. 287 p.

PROCTOR, R. H.; PLATTNER, R. D.; BROWN, D. W.; SEO, J. A.; LEE, Y. W. Discontinuous distribution of fumonisin biosynthetic genes in the *Gibberella fujikuroi* species complex. **Mycological Research**, [S. I.], v. 108, n. 7, p. 815–822, 2004.

PURCHASE, Y. F. H. Acute toxicity of aflatoxins M₁ and M₂ in one day-old duckling. **Food and Cosmetics Toxicology**, [S. I.], v. 5, n. 3, p. 339–342, 1963.

PUTMAN, J.; ALLSHOUSE, J. **Trends in U.S. Per Capita Consumption of Dairy Products**, 1909 to 2001. Washington, DC: United States Department of Agriculture Economic Research Service, 2003.

RADOVÁ, Z.; HOLADOVÁ, K.; HAJŠLOVÁ, J. Comparison of two clean-up principles for determination of trichothecenes in grain extract. **Journal of Chromatography A**, [S. I.], v. 829, n. 1 – 2, p. 259-267, 1998.

RAHIMI, E.; BONYADIAN, M.; RAFEI, M.; KASEMEINI, H. R. Occurrence of aflatoxin M₁ in raw milk of five dairy species in Ahvaz, Iran. **Food and Chemical Toxicology**, [S. I.], v. 48, n. 1, p. 129–131, 2010.

- RAHIMI, E.; KARIM, G.; SHAKERIAN A. Occurrence of aflatoxin M₁ in traditional cheese consumed in Esfahan, Iran. **World Mycotoxin Journal**, [S. I.], v. 2, n. 1, p. 91-94, 2009.
- RASTOGI, S.; DWIVEDI, P. D.; KHANNA, S. K.; DAS, M. Detection of Aflatoxin M₁ contamination in milk and infant milk products from Indian markets by Elisa. **Food Control**, [S. I.], v. 15, n. 4, p. 287-290, 2004.
- REGO, O. A. Influência da dieta sobre o perfil dos ácidos gordos da gordura do leite de vaca. **Vida Rural**, Portugal, p. 30-40, 2010.
- REIF, G. D., SHAHANI, K. M. e CROWE, L. K. Factors affecting B-complex vitamin content of cottage cheese. **Journal of Dairy Science**, [S. I.], v. 59, n. 3, p. 410 - 415, 1976.
- RIBANI, M.; BOTTOLI, C.B.G.; COLLINS, C.H.; JARDIN, I.C.S.F.; MELO, L.F.C. Validação de Métodos Cromatográficos e Eletroforéticos. *Química Nova*, São Paulo, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.
- RICHARD, J. L.; MEERDINK, G.; MARAGOS, C. M.; TUMBLESÓN, M.; BORDSON, G.; RICE, L. G.; ROSS, P. F. Absence of detectable fumonisins in the milk of cows fed *Fusarium proliferatum* (Matsushima) Nirenberg culture material. **Mycopathologia**, [S. I.], v. 133, n. 2, p. 123–126, 1996.
- RICHARD, J.L., 2000. **Mycotoxins: an overview**. In: Richard, J.L. (Ed.), *Romer Labs' Guide to Mycotoxins*, v. 1, p. 1–48.
- ROBISON, T. S.; MIROCHA, C. J.; KURTZ, H. J.; BEHRENS, J. C.; CHI, M. S.; WEAVER, G. A.; NYSTROM, S. D. Transmission of T-2 toxin into bovine and porcine milk. **Journal of Dairy Science**, [S. I.], v. 62, n. 4, p. 637, 1979.
- RODRÍGUEZ, A.; RODRÍGUEZ, M.; ISABEL LUQUE, M.; JUSTESEN, A. F.; CÓRDOBA, J. J. Quantification of ochratoxin A-producing molds in food products by SYBR Green and TaqMan real-time PCR methods. **International journal of food microbiology**, v. 149, n. 3, p. 226–235, 2011.
- RUANGWISES, N.; RUANGWISES, S. Aflatoxin M₁ Contamination in Raw Milk within the Central Region of Thailand. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, [S. I.], v. 85, n. 2, p. 195-198, 2010.
- RUBERT, J.; SOLER, C.; MAÑES, J. Application of an HPLC-MS/MS method for mycotoxin analysis in commercial baby foods. **Food Chemistry**, [S. I.], v. 133, n. 1, p. 176-183, 2012.
- SAAD, S. M. I. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, São Paulo, v. 42, n. 1, p. 01-16, 2006.
- SADIA, A.; JABBAR, M. A.; DENG, Y.; HUSSAIN, E. A.; RIFFAT, S.; NAVEED, S.; ARIF, M. A survey of aflatoxin M₁ in milk and sweets of Punjab, Pakistan. **Food Control**, [S. I.], v. 126, n. 2, p. 235-240, 2012.
- SAIDI, B. Effect of Heat and Homogenization on Riboflavin Photolysis in Milk. **International Dairy Journal**, [S. I.], v.5, n. 7, p. 635-645, 1996.

- SAIDI, B.; WARTHESEN, J. J. Effect of Milk Fermentation on Riboflavin Content and Stability. **International Dairy Journal**, [S. I.], v. 3, n. 8, p. 675-684, 1993.
- SARIMEHMETOĞLU, B.; KÜPLÜLÜ, Ö. Binding ability of aflatoxin M₁ to yoghurt bacteria. **Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi**, [S. I.], v. 51, p. 195–198, 2004.
- SARIMEHMETOĞLU, B.; KUPLULU, O.; CELIK, T. H. Detection of aflatoxin M₁ in cheese samples by ELISA. **Food Control**, [S. I.], v. 15, n. 1, p. 45-49, 2004.
- SARTORI, A. V.; MATOS, J. S.; MORAES, M. H. P.; N´OBREGA, 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**, [S. I.], v. 8, n. 9, p. 2321–30, 2015.
- SARUWTARI, J. H.; DUARTE, M.; DERISE, J. B. S.; CADIOLI, M. G. B.; RODAS, M. A. B. Avaliação físico-química e características sensoriais de leite UHT analisado no Instituto Adolfo Lutz (2000-2006). **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 22, n.166 - 167, p.121-127, 2008.
- 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**, [S. I.], 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**, [S. I.], v. 829, p. 68–74, 2014.
- SCOTT, K. J.; BISHOP, D. R.; ZECHALKO, A.; EDWARDS-WEBB, J. D. Nutrient content of liquid milk. II: Content of vitamin C, riboflavin, folic acid, thiamin, vitamin B₁₂ and B₆ in pasteurized milk as delivered to the home and after storage in the domestic refrigerator. **Journal of Dairy Research**, [S.I.], v. 51,n. 2, p. 51-57, 1984.
- SCOTT, P. M. **The natural occurrence of trichothecenes**. In: Beasley, V. R., editor. *Trichothecene mycotoxicosis: pathophysiologic effects*, vol. I. Boca Raton, FL: CRC Press, 1989, Inc. p. 1-26.
- SCOTT, P. M.; DELGADO, T.; PRELUSKY, D. B.; TRENHOLM, H. L.; MILLER, J. D. Determination of fumonisins in milk. **Journal of Environmental Science and Health**, [S. I.], v. 29, n. 5, p. 989 – 998, 1994.
- SEELING, K.; BOGUHN, J.; STROBEL, E.; DANICKE, S.; VALENTA, H.; UEBERSCHAR, K. H.; RODEHUTSCORD, M. On the effects of Fusarium toxin contaminated wheat and wheat chaff on nutrient utilisation and turnover of deoxynivalenol and zearalenone in vitro (Rusitec). **Toxicology in Vitro**, [S. I.], v. 20, n. 5, p. 703-711, 2006b.
- SEELING, K.; DANICKE, S.; VALENTA, H.; VAN EGMOND, H. P.; SCHOTHORST, R. C.; JEKEL, A. A.; LEBZIEN, P.; SCHOLLENBERGER, M.; RAZZAZI-FAZELI, E.; FLACHOWSKY, G.. Effects of Fusarium toxin-contaminated wheat and feed intake level on the biotransformation and carry-over of deoxynivalenol in dairy cows. **Food Addites and Contaminants**, v. 23, n. 10, p. 1008–1020, 2006a.
- SENGUN, I. Y.; YAMAN, D. B.; GONUL, S. A. Mycotoxins and mould contamination in cheese: a review. **World Mycotoxin Journal**, [S. I.], v. 1, n. 3, p. 291-298, 2008.

SEO, J. A.; PROCTOR, R. H.; PLATTNER, M. R. Characterization of 4 clustered and co regulated genes associated with fumonisin biosynthesis in *Fusarium verticillioides*. **Fungal Genetics and Biology**, [S. I.], v. 34, n. 3, p. 155–165, 2001.

SEO, J. A.; LEE, Y. W. Natural occurrence of the C series of fumonisin in mouldy corn. **Applied and Environmental Microbiology**, [S. I.], v. 65, n. 3, p. 1331–1334, 1999.

SERRANO-NIÑO, J. C.; CAVAZOS-GARDUÑO, A.; CANTÚ-CORNELIO, F.; GONZÁLEZ-CÓRDOVA, A. F.; VALLEJO-CÓRDOBA, B.; HERNÁNDEZ-MENDOZA, A.; GARCÍA, H. S. *In vitro* reduced availability of aflatoxin B₁ and Acrylamide by bonding interactions with teichoic acids from *Lactobacillus* strains. **LWT - Food Science and Technology**, [S. I.], v. 64, n. 2, p. 1334-1341, 2015.

SERRANO-NIÑO, J. C.; CAVAZOS-GARDUÑO, A.; HERNDANDEZ-MENDOZA, A.; APLEGATE, B.; FERRUZI, M. G.; SAN MARTIN-GONZÁLEZ, M. F.; GARCÍA, H. S. Assessment of probiotic strains ability to reduce the bioaccessibility of aflatoxin M₁ in artificially contaminated milk using an *in vitro* digestive model. **Food Control**, [S. I.], v. 31, n. 1, p. 202-207, 2013.

SGARBIERI, V. C. Revisão: Propriedades Estruturais e Físico Químicas das Proteínas do Leite. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 8, n. 1, p. 43-56, 2005.

SHAH, N.P. Functional foods from probiotics and prebiotics. **Food Technology**, Chicago, v. 55, n. 11, p. 46-52, 2001.

SHEPHARD, G. S.; BURGER, H. M.; GAMBACORTA, L.; GONG, Y. Y.; KRŠKA, R.; RHEEDER, J. P.; SOLFRIZZO, M.; SREY, C.; SULYOK, M.; VISCONTI, A.; WARTH, B.; WESTHUIZEN, L. V. D. Multiple mycotoxin exposure determined by urinary biomarkers in rural subsistence farmers in the former Transkei, South Africa. **Food and Chemical Toxicology**, [S. I.], v. 62, p. 217–25, 2013.

SHETTY, P. H.; JESPERSEN, L. *Saccharomyces cerevisiae* and lactic acid bacteria as potential mycotoxin decontaminating agents. **Trends in Food Science & Technology**, [S. I.], v. 17, n. 2, p. 48-55, 2006.

SHETTY, P. H.; JESPERSEN, L. *Saccharomyces cerevisiae* and lactic acid bacteria as potential mycotoxin decontaminating agents. **Trends in Food Science & Technology**, [S. I.], v. 17, n. 2, p. 48–55, 2006.

SHREEVE, B. J.; PATTERSON, D. S. P.; ROBERTS, B. A. The 'carry-over' of aflatoxin, ochratoxin and zearalenone from naturally contaminated feed to tissues, urine and milk of dairy cows. **Food and Cosmetics Toxicology**, [S. I.], v. 17, n. 2, p. 151-152, 1979.

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**, [S. I.], v. 20, n. 7, p. 655-657, 2009.

SIGNORINI, M. L.; GAGGIOTTI, M.; MOLINERI, A.; CHIERICATTI, C. A.; ZAPATA DE BASÍLICO, M. L.; BASÍLICO, J. C.; PISANI, M. Exposure assessment of mycotoxins in cow's milk in Argentina. **Food and Chemical Toxicology**, [S. I.], v. 50, n. 2, p. 250-257, 2012.

- SILVA, D. R. T. **Avaliação da Qualidade de Presuntos de Suíno, Ovino e Caprino Relativamente à Contaminação por Micotoxinas**. 2013. Dissertação (Mestrado em Qualidade e Segurança Alimentar). Escola Superior Agrária de Bragança, Bragança.
- SILVA, F. F. P.; BISCOLA, V.; LEBLANC, F. G.; FRANCO, B. D. G. M. Effect of indigenous lactic acid bacteria isolated from goat milk and cheeses on folate and riboflavin content of fermented goat milk. **LWT - Food Science and Technology**, [S. I.], v. 71, p. 155 - 161, 2016.
- SILVA, M. V.; JANEIRO, V.; BANDO, E.; MACHINSKI Jr, M. Occurrence and estimative of aflatoxin M₁ intake in UHT cow milk in Parana State, Brazil. **Food Control**, [S. I.], v. 53, p. 222–225, 2015.
- SINGH, R.; DEODHAR, A. D. Relative Bioavailability of Riboflavin in Cow's Milk and Fermented Milk using Rat Bioassay. **International Dairy Journal**, [S. I.], v. 4, n. 1, p. 59-71, 1994.
- SOLEIMANY, F.; JINAP, S.; FARIDAH, A.; KHATIB, A. A UPLC-MS/MS for simultaneous determination of aflatoxins, ochratoxin A, zeralenone, DON, fumonisins, T-2 toxin and HT-2 toxin in cereals. **Food Control**, [S. I.], v. 25, n. 2, p. 647-653, 2012.
- SOMORIN, Y. M.; BERTUZZI, T.; BATTILANI, P.; PIETRI, A. Aflatoxin and fumonisin contamination of yam flour from markets in Nigeria. **Food Control**, [S. I.], v. 25, n. 1, p. 53-58, 2012.
- SORENSEN, L. K.; ELBAEK, T. H. Determination of mycotoxins in bovine milk by liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Journal of chromatography B**, [S. I.], v. 820, n. 2, p. 183-196, 2005.
- SOUZA, A. C. S.; FERREIRA, C. V.; JUCÁ, M. B.; AOYAMA, H.; CAVAGIS, A. D. M.; PEPPELENBOSCH, M. P. Riboflavina: uma vitamina multifuncional. **Química Nova**, São Paulo, v. 28, n. 5, p. 887-891, 2005.
- SPOTTI, M.; CALONI, F.; FRACCHIOLLA, L.; POMPA, G.; VIGO, D.; MAFFEO, G. Fumonisin B₁ *carry-over* into milk in the isolated perfused bovine udder. **Veterinary and Human Toxicology**, [S. I.], v. 43, n. 2, p. 109–111, 2001.
- SPOTTI, M.; POMPA, G.; CALONI, F. Fumonisin B₁ metabolism by bovine liver microsomes. **Veterinary Research Communications**, [S. I.], v. 25, n. 6, p. 511–516, 2001.
- SWANSON, S.P., CORLEY, R.A. **The distribution, metabolism, and excretion of trichothecene mycotoxins**. In: Beasley, V.R. (Ed.), *Trichothecene Mycotoxicosis Pathophysiologic Effects*, vol. I. CRC Press, Boca Raton, 1989, p. 37–61.
- TAJKARIMI, M.; ALIABADI-SH, F.; NEJAD, A. S.; POURSOLTANI, H.; MOTALLEBI, A. A.; MAHDAVI, H. Aflatoxin M₁ contamination in winter and summer milk in 14 states in Iran. **Food Control**, [S. I.], v. 19, n. 11, p. 1033-1036, 2008.
- TAMANINI, R.; BELOTI, V.; RIBEIRO JR, J. C.; SILVA, L. C. C.; YAMADA, A. K.; SILVA, F. A. Contribuição ao Estudo da Qualidade Microbiológica e Físico-Química Do Leite UHT. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 66, n. 382, p. 27-33, 2011.

TAMIME, A.Y.; ROBISONS, R.K. Chapter 1 Historical background. In Tamime and Robinson's Yogurt: Science and Technology, 3rd ed.; Woodhead Publishing LTD: Cambridge, UK, 2007; pp. 1–10.

TAVAKOLI, H. R.; RIAZIPOUR, M.; KAMKAR, A.; SHALDEHI, H. R.; NEJAD A. H. M. Occurrence of aflatoxin M₁ in white cheese samples from Tehran, Iran. **Food Control**, [S. I.], v. 23, n. 1, p. 293-295, 2012.

TEKINSEN, K. K.; UÇAR, G. Aflatoxin M₁ levels in butter and cream cheese consumed in Turkey. **Food Control**, [S. I.], v. 19, n. 1, p. 27-30, 2008.

TEKINSEN, K.; EKEN, H. S. Aflatoxin M₁ levels in UHT milk and kashar cheese consumed in Turkey. **Food and Chemical Toxicology**, [S. I.], v. 46, n. 10, p. 3287-3289, 2008.

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**, [S. I.], v. 105, n. 2, p. 111-117, 2005.

THOMPSON, M.; ELLISON, S. L. R.; WOOD, R. Harmonized Guidelines For Single Laboratory Validation of Methods of Analysis (IUPAC Technical Report). **IUPAC, Pure and Applied Chemistry**, [S. I.], v. 74, n. 5, p. 835-855, 2002.

THOMSON, A. B. R.; SHAFFER, E. A.; GONSKA, T. First principles of gastroenterology and hepatology in adults and children, [S. I.], vol. 1, CAPstone, 2014.

TOMASEVIC, I.; PETROVIC, J.; JOVETIC, M.; RAICEVIC, S.; MILOJEVIC, M.; MIOCINOVIC, J. Two year survey on the occurrence and seasonal variation of aflatoxin M₁ in milk and milk products in Serbia. **Food Control**, [S. I.], v. 56, p. 64 - 70, 2015.

TURRONI, F.; SINDEREN, V.D.; VENTURA, M. Genomics and ecological overview of the genus *Bifidobacterium*. **International Journal of Food Microbiology**, [S. I.], v.149, n. 1, p.37-44, 2011.

UNUSAN, N. Occurrence of aflatoxin M₁ in UHT milk in Turkey. **Food and Chemical Toxicology**, [S. I.], v. 44, n. 11, p. 1897-1900, 2006.

US FDA. Sec. 527.400 whole milk, low fat milk, skim milk-aflatoxin M₁ (CPG 7106.210). Washington, DC: **FDA compliance policy guides**. 1996, p 219.

USDA. **Nutrient survey**. National Food Review, Winter/Spring Issue. United States Department of Agriculture, Washington, DC, USA, 1987.

VALDERRAMA, L.; PAIVA, V.B.; MARÇO, P.H.; VALDERRAMA, P. Proposta experimental didática para o ensino de análise de componentes principais. **Química Nova**, São Paulo, v. 39, n. 2, p. 245-249, 2016

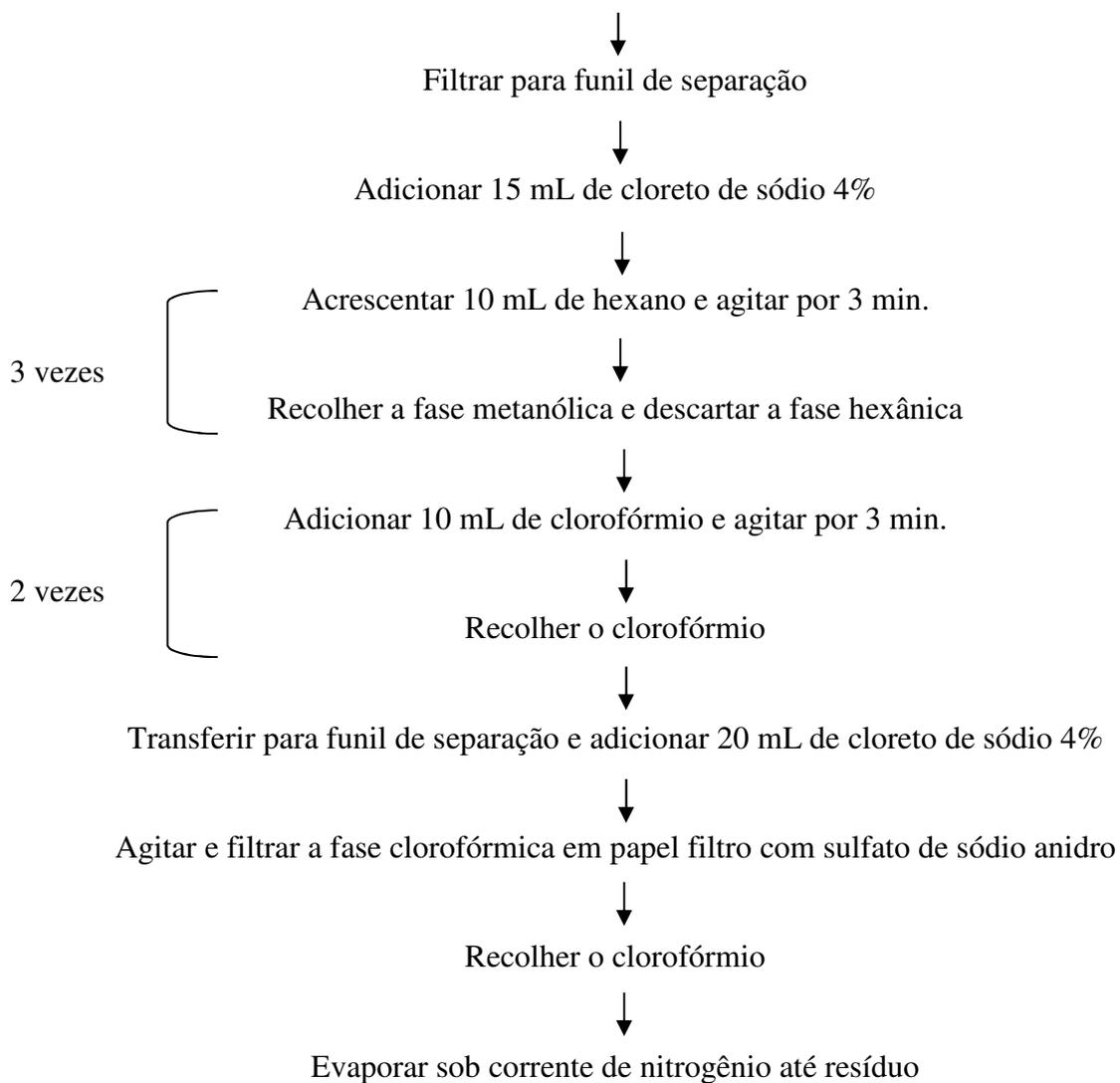
VAN EGMOND, H.P. Mycotoxins in Dairy Products. London: **Elsevier Applied Science**, 1989, p.11-55.

- VAN HET HOF, K. H.; WEST, C. E.; WESTSTRATE, J. A.; HAUTVAST, J. G. A. J. Dietary factors that affect the bioavailability of carotenoids. **Journal of Nutrition**, [S. I.], v. 130, n. 3, p. 503-506, 2000.
- VARNAM, A.H.; SUTHERLAND, J.P. Leche y productos lácteos: tecnología, química y microbiología. Zaragoza: Acribia, 1994. p. 63-72.
- VEISSEYRE, R. **Lactología técnica: composición, recogida, tratamiento y transformación de la leche**. 2o ed. Zaragoza: Acribia, 1988. 629p.
- VELDMAN, A. Effect of sorbentia on carry-over of aflatoxin from cow feed to milk. **Milchwissenschaft**, [S. I.], v. 47, p. 777-780, 1992.
- VERMA, R. J.; RAVAL, P. J.; MEHTA, D. N.; DUBE, H. C. Riboflavin and folic acid prevent aflatoxin production. **Indian Phytopathology**, [S. I.], v. 49, n. 1, p. 101-103, 1996.
- VERSANTVOORT, C. H. M. ; OOMEN, A. G.; KAMP, E. V.; ROMPELBERG, C. J. M.; SIPS, A. J. A. M. Applicability of an in vitro digestion model in assessing the bioaccessibility of mycotoxins from food. **Food and Chemical Toxicology**, [S. I.], v. 43, n. 1, p. 31-40, 2005.
- VÖLKEL, I.; SCHRÖER-MERKER, E.; CZERNY, C-L. The carry-over of mycotoxins in products of animal origin with special regard to its implications for the European food safety legislation. **Food Nutrition Science**, [S. I.], v. 2, n. 8, p. 852-867, 2011.
- WADA, Y. LONNERDAL, B. Effects of Different Industrial Heating Processes of Milk on Site-Specific Protein Modifications and Their Relationship to in Vitro and in Vivo Digestibility. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [S. I.], v. 62, n. 18, p. 4175-4185, 2014.
- WALSTRA, P.; WOUTERS, J. T. M.; GEURTS, T. J. **Dairy Science and Technology**. 2 ed. Boca Raton: CRC Press, 2006.
- WALSTRA, P.; WOUTERS, J.T.M.; GEURTS, T.J. **Chapter 7 Heat treatment**. In Dairy Science and Technology; Taylor & Francis Group, LLC: Boca Raton, FL, USA, 2006; p. 225-272.
- WANG E.; RILEY R.T.; MEREDITH F.I.; MERRILL A.H. JR. Fumonisin B₁ consumption by rats causes reversible, dose-dependent increases in urinary sphinganine and sphingosine. **Journal of Nutrition**, [S. I.], v. 129, n. 1, p. 214 – 220, 1999.
- WIENK, K. J. H.; MARX, J.J.M; BEYENEN, A. C. The concept of iron bioavailability and its assessment. **European Journal of Nutrition**, [S. I.], v. 38, n. 2, p. 51-75, 1999.
- WILLIAMS, J. H.; PHILLIPS, T. D.; JOLLY, P. E.; STILES, J. K.; JOLLY, C. M.; AGGARWAL, D. Human aflatoxicosis in developing countries: a review of toxicology, exposure, potential health consequences, and interventions. **American Journal of Clinical Nutrition**, [S. I.], v. 80, n. 5, p. 1106-1122, 2004.
- WOLD, S. Principal Component Analysis: Tutorial. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, [S. I.], v. 2, p. 37-52, 1987.

- WONG, Z. A.; HSIEH, D. P. H. The comparative metabolism and toxicokinetics of aflatoxin B₁ in the monkey, rat and mouse. **Toxicology and Applied Pharmacology**, [S. I.], v. 55, n. 1, p. 115–125, 1980.
- WOOLLARD, D. C.; INKYK, H. E. Rapid determination of thiamine, riboflavin, pyridoxine, and niacinamide in infant formulas by liquid chromatography. **Journal of AOAC International**, [S. I.], v. 85, n. 4, p. 945 - 951, 2002.
- WU, Q.; JEZKOVA, A.; YUAN, Z.; PAVLIKOVA, L.; DOHNAL, V.; KUCA, K. Biological degradation of aflatoxins. **Drug Metabolism Reviews**, [S. I.], v. 41, n.1, p.1-7, 2009.
- XIONG, J. L.; WANG, Y. M.; MAC, M. R.; LIU, J. X. Seasonal variation of aflatoxin M₁ in raw milk from the Yangtze River Delta region of China. **Food Control**, [S. I.], v. 34, n. 2, p. 703-706, 2013.
- YIANNIKOURIS, A.; JOUANY, J.P. Mycotoxins in feeds and their fate in animals: a review. **Animal Research**, [S. I.], v. 51, p. 81-99, 2002.
- YOSHIZAWA, T.; MIROCHA, C. J.; BEHRENS, J. C.; SWANSON, S. P. Metabolic fate of T-2 toxin in a lactating cow. **Food and Cosmetics Toxicology**, [S. I.], v. 19, p 31-39, 1981.
- ZAIN, M. E. Impact of mycotoxins on humans and animals. **Journal of Saudi Chemical Society**, [S. I.], v.15, n. 2, p. 129-144, 2011.
- ZHANG, J.; ZHENG, N.; LIU, J.; LI, F. D.; LI, S. L.; WANG, J. Q. Aflatoxin B₁ and M₁ induced cytotoxicity and DNA damage in differentiated and undifferentiated Caco-2 cells. **Food And Chemical Toxicology**, [S. I.], v. 83, p. 54-60, 2015.
- ZHENG, N.; SUN, P.; WANG, J. Q.; ZHEN, Y. P.; HAN, R. W.; XU, X. M. Occurrence of aflatoxin M₁ in UHT milk and pasteurized milk in China market. **Food Control**, [S. I.], v. 29, n. 1, p. 198-201, 2013.
- ZHENG, Z.; HANNEKEN, J.; HOUCHINS, D.; KING, R.S.; LEE, P.; RICHARD, J. L. Validation of an ELISA test kit for the detection of ochratoxin A in several food commodities by comparison with HPLC. **Mycopathologia**, [S. I.], v. 159, n. 2, p. 265–72, 2005.
- ZINEDINE, A.; SORIANO, J. M.; MOLTÓ, J. C.; MAÑES, J. Review on the toxicity, occurrence, metabolism, detoxification, regulations and intake of zearalenone: An oestrogenic mycotoxin. **Food and Chemical Toxicology**, v. 45, n. 1, p.1-18, 2007.

APÊNDICE 1 - EXTRAÇÃO DE AFLATOXINA B₁ e M₁ EM LEITE - AOAC**Figura 1** – Esquema de extração de AFB₁ e AFM₁ em leite – AOAC.

Agitar em shaker 5 mL leite + 20 mL metanol + 2 g celite por 30 min.



Fonte: Adaptado de AOAC (2000).

APÊNDICE 2 – EXTRAÇÃO DA RIBOFLAVINA EM LEITE

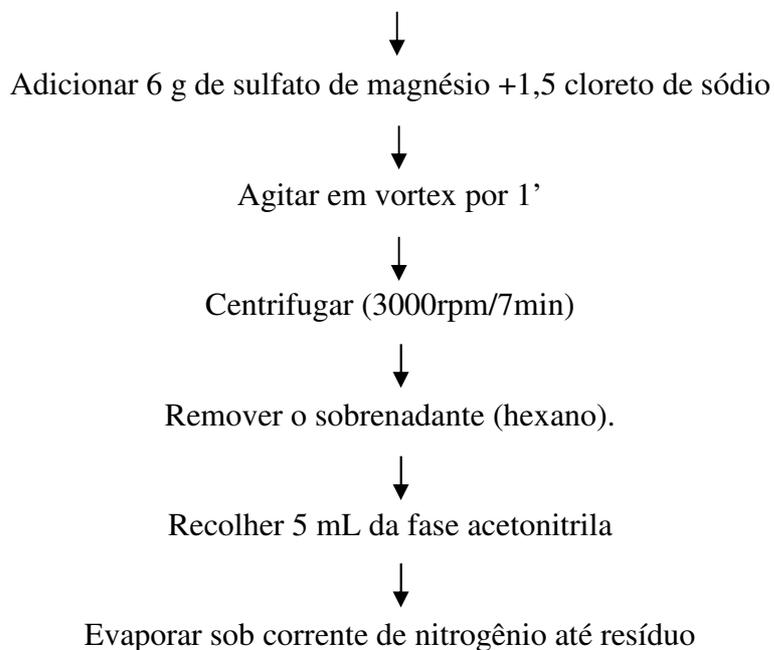
Método de extração da riboflavina em leite

- Realizar as análises em ambiente com pouca luminosidade, utilizando-se papel alumínio para cobrir as vidrarias e frascos de vidro âmbar;
- agitar em banho ultrassônico (1 h/ temperatura ambiente) 20 mL de leite com 20 mL de solução de ácido tricloro acético (TCA) 16%;
- filtrar a vácuo em funil de Büchner utilizando-se papel de filtro qualitativo;
- neutralizar vagarosamente o filtrado com NaOH 10% até pH 6,0 – 6,5, utilizando-se pipeta e agitação magnética. Utilizar HCl 37% caso necessário diminuir o pH;
- transferir o extrato neutralizado para balão volumétrico de 100 mL e completar o volume com água ultrapura;
- homogeneizar o extrato e transferir para frasco de vidro âmbar, manter sob refrigeração ($6 \pm 2^{\circ}\text{C}$), até o momento das análises cromatográficas;
- anteriormente à injeção, filtrar novamente o material em unidades filtrantes com $0,45 \mu\text{m}$ de porosidade.

Referência: BIANCHINI; PENTEADO (2000).

APÊNDICE 3 – EXTRAÇÃO DE AFLATOXINA B₁ e M₁ EM LEITE – QuEChERS**Figura 2** – Esquema de extração de AFB₁ e AFM₁ em leite – QuEChERS

Agitar em vortex por 30" 5 g leite UHT + 10 mL hexano + 15 mL de acetonitrila (1% ácido acético v/v).



Fonte: Adaptado de SARTORI et al., (2015).

APÊNDICE 4 – MODELO DE DIGESTÃO *IN VITRO*

Método de digestibilidade *in vitro*

- Preparar a saliva, sucos gástrico, duodenal e biliar conforme descrito na Tabela 1.

Tabela 1 - Constituintes e concentrações dos sucos sintéticos do modelo de digestão *in vitro*.

	Saliva	Suco gástrico	Suco duodenal	Suco biliar
Solução inorgânica	10mL KCl 89,6 g.L ⁻¹	15,7mL NaCl	40mL NaCl	30mL NaCl
		175,3 g.L ⁻¹	175,3 g.L ⁻¹	175,3 g.L ⁻¹
	10mL KSCN 20 g.L ⁻¹	3,0mL NaH ₂ PO ₄	40mL NaHCO ₃	68,3mL NaHCO ₃
		88,8 g.L ⁻¹	84,7 g.L ⁻¹	84,7 g.L ⁻¹
	10mL NaH ₂ PO ₄ 88,8 g.L ⁻¹	9,2mL KCl 89,6 g.L ⁻¹	10mL KH ₂ PO ₄	4,2mL KCl
			8 g.L ⁻¹	89,6 g.L ⁻¹
	10mL NaSO ₄ 57 g.L ⁻¹	18mL CaCl ₂ + 2H ₂ O	6,3mL KCl	150µL HCl
		22,2 g.L ⁻¹	89,6 g.L ⁻¹	37% g/g
	1,7mL NaCl	10mL NH ₄ Cl	10mL MgCl ₂ 5g.L ⁻¹	
	175,3 g.L ⁻¹	30,6 g.L ⁻¹		
	20mL NaHCO ₃	6, mL HCl 37% g/g	180µL HCl 37%g/g	
	84,7 g.L ⁻¹			
Solução orgânica	8mL ureia 25 g.L ⁻¹	10mL glicose 65g.L ⁻¹	4 mL ureia 25 g.L ⁻¹	10mL ureia 25 g.L ⁻¹
		10mL ácido glucurônico 2 g.L ⁻¹		
		3,4mL ureia 25 g.L ⁻¹		
		10mL glicosamina hidrocloreto 33 g.L ⁻¹		
Adicionar à mistura orgânica + inorgânica	290 mg α-amilase	1 g BSA	9 mL CaCl ₂ +2H ₂ O	10 mL CaCl ₂ +2H ₂ O
			22,2 g.L ⁻¹	22,2 g.L ⁻¹
	15 mg ácido úrico	2,5 g pepsina	1 g BSA	1,8 g BSA
	25 mg mucina	3 g mucina	9 g pancreatina	30 g bile
			1,5 g lipase	
pH	6,8±0,2	1,3±0,02	8,1±0,2	8,2±0,2

As soluções orgânicas e inorgânicas foram aumentadas para 500 mL com água destilada. Após misturar a solução orgânica e inorgânica, alguns constituintes foram adicionados e dissolvidos. Quando necessário, o pH foi ajustado para o intervalo apropriado.

Fonte: Adaptado de Versantvoort et al. (2005).

Procedimento

- Transferir 4,5 mL de leite fortificado com AFM₁ em tubos de digestão (tubos de centrífuga de 50 mL);
- Adicionar 6 mL de saliva artificial;
- Incubar por 5 min a 37° C;
- Adicionar 12 mL de suco gástrico

- incubar sob agitação 2 h a 37°C;
- Adicionar 12 mL de suco duodenal
- Adicionar 6 mL de bile;
- Adicionar 2 mL de NaHCO₃ 1 M;
- Incubar sob agitação por 2 h a 37°C;
- Para obtenção do quimo (sobrenadante) e da matriz digerida (concentrado), centrifugar a 2750 x g por 5 min.
- Quantificar o composto de interesse no sobrenadante.

Referências: (KABAK; OZBEY, 2012a; OOMEN et al., 2003; VERSANTVOORT et al., 2005)

APÊNDICE 5 – ENSAIO DE CITOTOXICIDADE – MÉTODO MTT

Cultivo celular

Procedimento

- adicionar 5 mL de meio meio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado e ambientado (37°C), à placa de 10 mL;
- adicionar 100 µL de células epiteliais humanas de adenocarcinoma coloretal Caco-2 (previamente descongeladas);
- incubar (37°C/ 5% CO₂/ 90% UR/ 24 h));
- criocongelar restante das células (-80°C);
- decorrido tempo de incubação, verificar o crescimento celular (em microscópio óptico de feixe duplo) por meio da visualização das células aderidas à placa (células viáveis);
- descartar o meio contendo as células inativas;
- proceder lavagem das células por meio da adição de 5 mL de tampão fosfato salino PBS (ph 7,2 a 7,3) na placa, agitar vagarosamente e descartar o PBS (repetir esse procedimento duas vezes);
- adicionar 5 mL de meio DMEM (37°C);
- incubar (37°C/ 5% CO₂/ 90% UR / 2 dias);
- renovar o meio de cultivo até obtenção de >90% de confluência;
- ao atingir valores acima de 90% de confluência, realizar a passagem das células para recipiente maior.

Passagem das células

- Proceder descarte do meio e lavagem das células com PBS, conforme descrito anteriormente;
- adicionar 1 mL (quantidade suficiente para cobrir a superfície da placa) de tripsina a 37°C para as células se desprenderem da superfície da placa;
- incubar (37°C/ 5% CO₂/ 90% UR / 2 min);
- parar a reação adicionando 2 mL (o dobro da quantidade de tripsina) de meio DMEM (37°C);

- passar o conteúdo para um frasco de cultivo celular (50 mL) com filtro contendo 20 mL de meio DMEM (37°C);

- incubar (37°C/ 5% CO₂/ 90% UR / 4 dias).

Repetir operação até obtenção de quantidade de células necessária para realização dos experimentos.

Estimativa da concentração celular

- Trypsinizar as células e parar a reação com meio DMEM conforme descrito anteriormente;

- coletar 200 µL de células e proceder coloração adicionando 200 µL de azul de tripano em câmara de Neubauer;

- visualizar em microscópio óptico de feixe duplo;

- células azuis indicam células viáveis;

- realizar contagem e estimativa da concentração celular (células.mL⁻¹);

- ajustar a concentração celular necessária para realização dos experimentos.

Exposição das células às amostras

- Semear as células em placas de 96 poços com densidade de 1 x 10⁶ células/poço;

- incubar (37°C/ 5% CO₂/ 90% UR/ 24 h);

- retirar o meio e realizar a lavagem das células com PBS (duas vezes);

- tratar as células com as amostras (20 µL de amostra em 180 µL de meio DMEM);

- incubar (37°C/ 5% CO₂/ 90% UR/ 24 h);

- após incubação, lavar as células com PBS e submeter ao ensaio de MTT.

Ensaio de MTT

- após lavagem das células, adicionar 100 µL de solução de sal de tetrazólio MTT (5 mg/mL em meio DMEM fresco) a cada poço;

- incubar (37°C/ 5% CO₂/ 90% UR/ 4 h);

- decorrido o tempo de incubação, remover o sobrenadante e dissolver completamente os cristais de formazan insolúveis adicionando 100 µL de dimetilsulfóxido (DMSO);

- agitar durante 10 min;

- determinar a absorvância a 570 e 630 nm utilizando um leitor de microplacas.
- estimar a porcentagem de viabilidade celular com relação ao controle (células tratadas somente com o meio DMEM = 100% de viabilidade celular).

Preparo do meio DMEM suplementado

- acrescentar em frasco estéril: meio DMEM, 100 unidades.mL⁻¹ de penicilina e 100 µg.mL⁻¹ de estreptomicina, 4mM de L-glutamina, 1% de aminoácidos não essenciais (NEAA) e 10% de soro fetal bovino (FBS).
- homogeneizar e filtrar em filtros de membrana de 0,22 µm.
- manter sob refrigeração (4°C) e ambientar antes do uso (37°C).

Referência: ZHANG et al. (2015).

**ANEXO 1 - ARTIGO PUBLICADO: MYCOTOXINS IN BOVINE MILK AND DAIRY
PRODUCTS: A REVIEW**

Mycotoxins in Bovine Milk and Dairy Products: A Review

Tania Aparecida Becker-Algeri, Denise Castagnaro, Kennidy de Bortoli, Camila de Souza, Deisy Alessandra Drunkler, and Eliana Badiale-Furlong

Abstract: This paper presents a literature review of the occurrence of several mycotoxins in bovine milk and dairy products, because it is the main type of milk produced and marketed worldwide. Mycotoxins are produced by different genera of filamentous fungi and present serious health hazards such as carcinogenicity and mutagenicity. Under favorable growth conditions, toxigenic fungi produce mycotoxins which contaminate the lactating cow's feedstuff. During metabolism, these mycotoxins undergo biotransformation and are secreted in milk. Data show that there is a seasonal trend in the levels of mycotoxins in milk, with these being higher in the cold months probably due to the prolonged storage required for the cattle feeds providing favorable conditions for fungal growth. Good agricultural and storage practices are therefore of fundamental importance in the control of toxigenic species and mycotoxins. Although aflatoxins (especially aflatoxin M₁) are the mycotoxins of greater incidence in milk and dairy products, this review shows that other mycotoxins, such as fumonisin, ochratoxin A, trichothecenes, zearalenone, T-2 toxin, and deoxynivalenol, can also be found in these products. Given that milk is widely consumed and is a source of nutrients, especially in childhood, a thorough investigation of the occurrence of mycotoxins as well the adoption of measures to minimize their contamination of milk is essential.

Keywords: cow's milk, occurrence, toxicity

Introduction

Mycotoxins are a group of highly toxic compounds produced by fungi or yeast, which commonly develop in places with low water availability and unsuitable for bacterial growth (Jouany 2001). The preparation and storage methods of animal feedstuffs, such as grains and silage, can propitiate mycotoxin contamination (Bryden 2012). When animals ingest contaminated foodstuffs, mycotoxins are metabolized, biotransformed, and transferred to animal products, such as milk or meat, thus becoming a risk to human health (Bruerton 2001).

The concern for mycotoxin contamination in dairy products began in the 1960s, with the 1st reported cases of contamination by aflatoxin M₁ (AFM₁), which is an aflatoxin B₁ (AFB₁) metabolite produced in the animal rumen and secreted in milk. During the 1960s, the intake of feed contaminated with AFB₁ was relatively high, milk production was low, and analytical methods were poorly developed. Studies have indicated that values between 0.3% and 6.2% of AFB₁ in animal feed is metabolized, biotransformed, and secreted in milk in the form of AFM₁, although the rate of biotransformation varies between animals and other factors, including nutritional and physiological, such as diet, rate ingestion, digestion rate, animal health, biotransformation capacity liver, and dairy animal production (Creepy 2002; Unusan 2006; Iqbal and others 2013, Duarte and others 2013).

Other mycotoxins, such as ochratoxin (OTA; Breitholtz-Emanuelsson and others 1993; Boudra and others 2007; Pattono and others 2013), zearalenone (ZEN; Yiannikouris and Jouany 2002; Coffey and others 2009; Huang and others 2014), fumonisins (Gazzotti and others 2009), T-2 toxin and deoxynivalenol (DON; Swanson and Corley 1989; Sorensen and Elbæk 2005), have also been identified in milk samples and dairy products, although these have not been as extensively studied as AFM₁, and despite the amount of these mycotoxins and its conjugated derivatives in milk being small, the shortage of reports is of concern since milk is a source of nutrients, particularly in children.

Cow milk is the main milk type used for human consumption corresponding to 83% of world milk production, followed by buffalo milk with 13%, goat milk with 2%, sheep milk with 1% and camel milk provide 0.3%. The remaining share is produced by other dairy species such as equines and yaks (FAO 2015).

Thus, other than the most commonly found mycotoxin, AFM₁, there is a wide range of milk and dairy product contaminants; therefore, this study reviews the contamination and incidence of various mycotoxins in bovine milk and dairy products intended for human consumption.

Mycotoxin Contamination of Milk

Milk quality, in relation to toxic contaminants, is directly related to the type and quality of animal feed following the metabolism of mycotoxins and their subsequent excretion in milk (Jobim and others 2001). The level of excretion of mycotoxins in milk is generally low and is affected by the molecular weight and lipophilicity of a given mycotoxin. The transport rate is also influenced by the pH gradient between the blood plasma and milk, which changes according to the animal's health status (Yiannikouris and Jouany 2002; Kalac 2011). Mycotoxin absorption by the mammary gland can occur through intercellular filtration, passive diffusion across the cell membrane, or active transport (Jouany 2001; Yiannikouris and Jouany 2002), it depends on the mycotoxin, their ionic state, among others.

MS 20151347 Submitted 8/6/2015, Accepted 12/2/2015. Authors Becker-Algeri and Badiale-Furlong are with Post Graduate Program in Engineering and Science of Food, Dept. of Food Chemistry, Federal Univ. of Rio Grande (FURG), Av. Itália, Km 8, Bairro Carreiros, Rio Grande, RS, CEP 96203-900, Brazil. Authors Castagnaro and Drunkler are with Post Graduate Program in Food Technology, Dept. of Post Graduate Program in Food Technology (PPGTA), Federal Technological Univ. of Paraná (UTFPR), Av. Brasil, 4232, Bairro Independência, Medianeira, PR, CEP 85884-000, Brazil. Authors Bortoli and De Souza are with Graduation in Food Engineering, Federal Technological Univ. of Paraná (UTFPR), Av. Brasil, 4232, Bairro Independência, Medianeira, PR, CEP 85884-000, Brazil. Direct inquiries to author Becker-Algeri (E-mail: taniabecker86@yahoo.com.br).

When the animal feed is supplemented with silage, the main mycotoxin contaminants are DON and ZEA. Contamination contents can be reduced by the rumen microbiota in healthy animals, thus reducing the risk of milk contamination (Kalac 2011). The rumen fluid, containing protozoal microbiota and rumen bacteria is considered the first defense system against mycotoxins such as ZEA, OTA, T-2 toxin, and diacetoxyscirpenol (DAS), but is ineffective for AFB₁, fumonisin, and patulin (Kiesling and others 1984; Obrenski and others 2009; Prandini and others 2009). Nevertheless, the rumen barrier can be altered by animal diseases, changes in the diet or high mycotoxin contamination in the animal feed. An example is that different feed destiny to dairy cows with high genetic potential for milk production could induce a lowering of rumen pH which, in its turn, may also influence the rate of OTA degradation (Pattono and others 2011).

Legislation

Many countries have regulations to control AFB₁ levels in food-stuff and to establish the maximum permissible levels of AFM₁ in milk and dairy products in order to reduce disease risks (Rastogi and others 2004), as described in Table 1.

Mycotoxin Occurrence

Aflatoxins in milk

Aflatoxins are polycyclic structures belonging to the furanocoumarin class of compounds, which are hepatotoxic, carcinogenic, and immunosuppressive fungal metabolites (Williams and others 2004) mainly produced by *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* (Prandini and others 2009). When lactating mammals, such as cows, are fed with AFB₁-contaminated feed, the ingested mycotoxin is metabolized in the liver by cytochrome P450 enzyme into several metabolites (Figure 1). Through hydroxylation of the tertiary carbon of the di-furanocoumarin ring, AFB₁ is converted to its major metabolite, AFM₁ (Faletto and others 1988). Due to the hydroxyl group, these compounds are very soluble in water, allowing their rapid excretion through urine, bile, feces, and milk (Van Egmond 1983).

AFM₁ is thermally resistant and is not completely inactivated by pasteurization, sterilization, or other milk treatment processes (Assem and others 2011). Thus, because milk is a primary nutrient of significant human consumption, especially by children, control of the incidence of AFM₁ in this food is of paramount importance.

Although AFM₁ is the most frequent aflatoxin in milk (Coffey and others 2009), the concept that AFB₁ is completely converted to AFM₁ is refuted by some studies. Carvajal and others (2003) reported the presence of AFB₁ (0 to 0.4 µg/L) in heat-treated milk samples and Scaglioni and others (2014) detected in pasteurized and UHT milk, with averaging contamination of 1.476 and 0.690 µg/L, respectively. Because AFB₁ is more toxic than AFM₁ (Zain 2011), the presence of AFB₁ in milk should also be examined. Aflatoxin M₂ (AFM₂), another AFB₁ metabolite, has also been investigated in milk, although a previous study did not detect it (Garrido and others 2003), Sartori and others (2015) detected, respectively, in 17 (24%) of the powdered milk samples (>0.08 µg/kg) and in 3 (18%) of the UHT milk samples (>0.009 µg/kg) commercialized in Brazil; Lee and Lee (2015) also detected AFM₂ in UHT and pasteurized milk.

Factors of influence in AFM₁ milk contamination

AFM₁ contamination in milk and dairy products shows variations according to geographical region, season, environmental

conditions, level of development, farming systems diversity, green forage availability, and consumption of feed concentrates, among others (Tajkarimi and others 2008; Dashti and others 2009; Ghazani 2009; Pei and others 2009; Bilandzic and others 2010; Heshmati and Milani 2010; Rahimi and others 2010; Xiong and others 2013). It has been shown that milk produced during the warm seasons is less contaminated by AFM₁ than that produced in the cold seasons (Ghiasi and others 2007; Peng and Chen 2009). According to Dashti and others (2009), the higher contamination incidence in the cooler months is due to the prolonged storage of cattle feed, which provides favorable conditions for fungal growth. Furthermore, environmental factors, such as temperature and humidity, agricultural products used in feed and seasonal effects in the country of origin can all affect feed AFB₁ contamination levels (Dashti and others 2009).

Xiong and others (2013) evaluated raw milk contamination during different seasons and found that the occurrence of AFM₁ in milk was significantly higher during winter (0.123 µg/L; $P < 0.05$) compared to the remaining seasons, that there was no significant difference (spring 0.029 µg/L, summer 0.032 µg/L, and autumn 0.032 µg/L; $P > 0.05$). In Croatia, Bilandzic and others (2010) also verified the concentration distribution of AFM₁ in milk during the different seasons and found that the concentration was statistically higher between January and April (0.036 to 0.059 µg/L), corresponding to winter and spring, than between June and September (0.012 to 0.015 µg/L), corresponding to summer and autumn. According to the authors, fresh feed, such as pasture, grass, weeds, and raw feed, is available during the spring and summer. However, during the cold months, dried or concentrated preparations are frequently used. Furthermore, in the cold seasons, animals are often fed with dry hay which, in inappropriate storage conditions, can lead to the appearance of aflatoxigenic fungi and aflatoxins (Kamkar 2005; Tajkarimi and others 2008; Heshmati and Milani 2010).

Through monitoring of AFM₁ levels in milk, Veldman (1992) demonstrated that the AFB₁ conversion rate can be up to 6.2%, with means of 1.8%. Because manufacturing processes do not affect the concentration of AFM₁ mainly due to its thermal stability, the most effective method to control AFM₁ concentration in milk is by reducing AFB₁ contamination of raw materials and cattle feed through the application of Good Agricultural and Storage Practices (Diaz and Espitia 2006; Nuryono and others 2009; Prandini and others 2009; Bilandzic and others 2010; Elzupir and Elhussein 2010; Rahimi and others 2010).

Han and others (2013) observed that, although all analyzed feed samples destined for cattle were within the AFB₁ levels allowed by the European Commission (EC; 5 µg/kg), the AFM₁ content in 3 out of 200 milk samples was above the maximum established levels by the EC (0.050 µg/L). Battacone and others (2009) also reported that there is no guarantee that the AFM₁ concentration in milk will always be lower than the EC legal limit when levels of AFB₁ in animal feed are within the limits.

In a study conducted in Portugal, higher levels of AFM₁ were detected in milk samples produced in the Azorean islands than in continental samples (Duarte and others 2013). According to the authors, this suggests the existence of local factors related to feed storage time and conditions that deserve more attention and may influence analysis. In the Azores, supplementation with conserved forages, mainly corn silage and grass, is needed given the cattle energy requirements and the shortage of seasonal pasture during the summer at low altitudes and during winter at high altitudes (Rego 2010). It is considered that milk production from fresh

Table 1—International limits for AFM₁ in milk and dairy products for human consumption.

Country	Raw milk ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Dairy derivatives ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
EUROPEAN UNION	0.05	0.05
Germany	0.05	—
Belgium	0.05	—
Italy	—	0.01 (foods for children)
Sweden	—	0.05 (fluid milk foods)
Uruguay	0.5	0.5
Barbados	0.05	—
Cyprus	0.5	0.5
Mauritius	10	10
Áustria	—	—
France	0.05; 0,01 (infant pasteurized milk)	0.02 (butter); 0.25 (cheese); 0.40 (powder milk)
Switzerland	0.05; 0,03 (for children <3 years old)	0.05; 0.03 (for children <3 years old) (powder milk)
Bulgaria	0.50	0.025 (whey and its products); 0.25 (cheese); 0.02 (butter); 0.10 (powder milk)
Romania	0	0.1 (powder milk); 0 (powder milk and infant foods); 0.02 (infant foods)
Czech Republic	0.50	—
EUA	—	5; 0.1 (infant foods)
Brazil	*—	0.50
Argentina	0.05	0.50 (fluid milk); 5.0 (powder milk); **2.5g/kg (cheese)
Honduras	0.05	0.50; 0.05 (powder milk)
Nigeria	1	0.25 (cheese); 0.02 (infant foods)
Egypt	0	—
Turkey	0.05	0
MERCOSUL	0.5	0.25 (cheese)
		5.0 (powder milk)

Source: Adapted from Kaniou-Grigoriadou and others (2005).

*There is no legislation for raw milk in Brazil.

^bLimit set by Brazil (2011).

pasture cattle presents a low risk of aflatoxin incidence (Fink-Gremmels 2008a; Motawee and others 2009) and that the risk is higher in milk from cattle fed concentrated feed (Duarte and others 2013).

Still, some studies emphasize that carry-over of AFB₁ is higher in cow's milk (0.03%) which sheep's and goat's milk, probably due extensive variability in the expression and catalytic activity of hepatic enzyme families (for example, cytochrome P450 and glutathione-transferase) involved in the biotransformation and detoxification of AFB₁ among this species (Battacone and others 2003; Diaz and others 2004; Hassain and Kassaifi 2014).

Occurrence of AFM₁ in milk

The occurrence of AFM₁ has been reported in various locations worldwide (Table 2), with many of the studies raising concerns

about AFM₁ contamination levels being higher than the maximum level set by European Union (EU) legislation (0.05 $\mu\text{g}/\text{kg}$; EC 2001). Nevertheless, AFM₁ levels are often lower than the maximum limits (0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ for fluid milk) established by national authorities, including the Institute of Standards and Industrial Research of Iran (ISIRI 2002), the Turkish Food Codex (TFC), the National Health Surveillance Agency in Brazil – ANVISA (Brasil 2011), and the Food and Drug Administration in the U.S.A. (FDA 1996), among others.

Collected data from studies conducted in recent years, evidence the incidence of AFM₁ in milk samples and milk products is relatively lower in European countries (Portugal, Turkia, Italy, and Croatia), independent of the sample type. In contrast, in studies in Asiatic countries like China, Thailand, and Taiwan were observed frequency of occurrence of mycotoxins in up to 100% of samples.

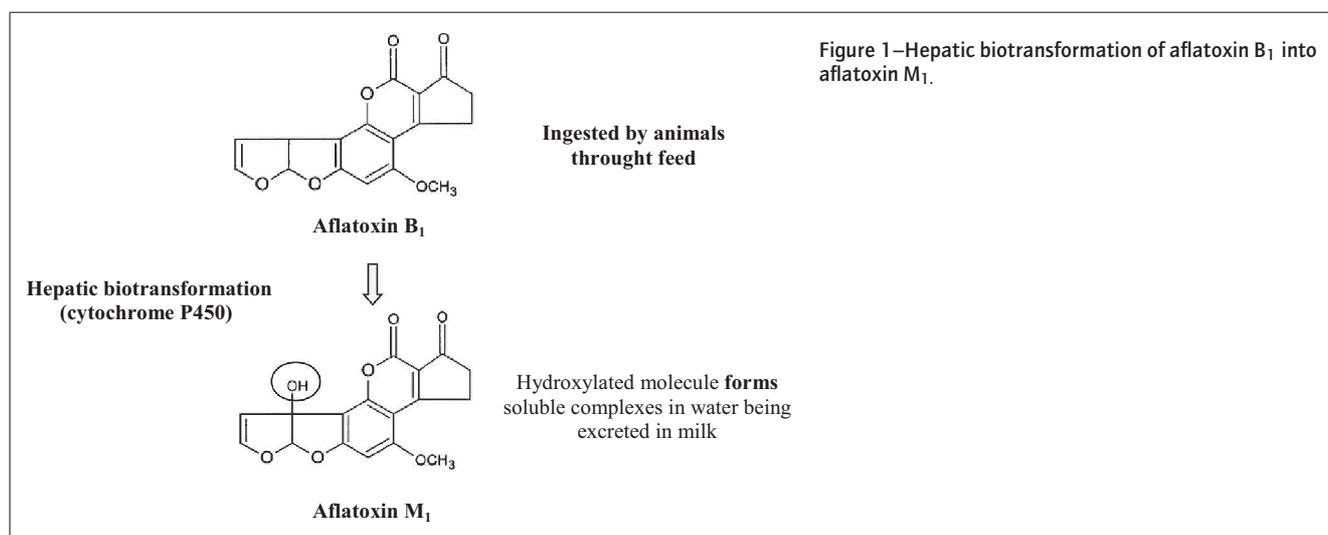


Figure 1—Hepatic biotransformation of aflatoxin B₁ into aflatoxin M₁.

Table 2—Occurrence of AFM₁ contamination in bovine milk.

Country	Sample	Frequency (%)	Min–Max ($\mu\text{g/L}$)	Reference
Serbia	Pasteurized milk	(35/36) 97.2	0.06–1.2	Kos and others (2014)
	UHT milk	(69/70) 98.5	0.02–0.41	
	Organic milk	(6/6) 100	0.01–0.08	
	Raw milk	(40/40) 100	0.08–1.2	
	Raw milk	(382/678) 56.3	0.282–0.358	
Lebanon	Heat treated milk	(143/438) 32.6	0.09–0.145	Tomasevic and others (2015)
	Raw milk	(28/38) 73.6	0.0026–0.126	
	Pasteurized milk	(17/25) 68.0	0.0033–0.084	
Spain	Powder milk	(5/14) 35.7	0.0092–0.016	Cano-Sancho and others (2010)
	UHT milk	(68/72) 94.4	0.002–0.014	
Brazil	Pasteurized milk	(26/30) 87	0.009–0.437	Iha and others (2013)
	UHT milk	(13/17) 76	0.008–0.215	
	Milk with additives	(13/17) 76	0.009–0.061	
	Powder milk	(12/12) 100	0.02–0.76	
	Infant formula	(0/7) 0	–	
	Fluid milk	(26/65) 40	0.009–0.069	
	Powder milk	(2/4) 50	0.5–0.81	
	UHT milk	(23/75) 30.7	1.0–4.1	
	UHT milk	(133/152) 87.5	0.002–0.121	
	UHT milk	(48/100) 48	0.002–0.08	
South corea	Raw milk	(48/100) 48	0.002–0.08	Lee and others (2009)
Portugal	UHT and pasteurized milk	(11/40) 27.5	0.007–0.07	Duarte and others (2013)
Italy	Infant formula	(2/185) 1.1	0.012–0.015	Meucci and others (2010)
Thailand	Raw milk	(240/240) 100	0.05–0.101	Ruangwises and Ruangwises (2010)
Turkey	Fluid milk	(43/50) 86	0.001–0.030	Ertas and others (2011)
	UHT milk	(75/129) 58.1	0–0.544	
	UHT milk	(67/100) 67	0.01–0.63	
Morocco	Pasteurized milk	(54/61) 88.8	0.001–0.117	Tekinsen and Eken (2008)
India	Infant formula	(17/18) 94	0.143–0.77	Zinedine and others (2007a)
Taiwan	Pasteurized milk	(44/48) 90.9	0.002–0.083	Rastogi and others (2004)
Iran	Raw milk	(85/111) 76.6	0.015–0.28	Kamkar (2006)
	Pasteurized milk	(83/116) 71.5	0.006–0.528	
China	UHT milk	(68/109) 62.3	0.006–0.516	Fallah (2010)
	Raw milk	(12/12) 100	0.16–0.5	
	Raw milk	(45/200) 32.5	0.005–0.06	
	UHT milk	(84/153) 54.9	0.006–0.16	
	Pasteurized milk	(25/26) 96.2	0.023–0.154	
Sudan	Raw milk	(42/44) 95.5	0.22–6.9	Elzupir and Elhussein (2010)
Pakistan	Raw milk	(76/107) 71	0.004–0.845	Iqbal and Asi (2013)
Croatia	Raw milk	(72/3543) 2	0.006–0.027	Bilandzic and others (2015)

In Brazil, due to its large extent, differences in climate and production of milk and dairy products, the results of frequency vary as the percentage of occurrence of the mycotoxin (30.7% to 100%) and about the levels of contamination found (0.0018 to 4.1 $\mu\text{g/L}$).

In a study carried out by Fallah (2010), in samples collected in Iran, when considering the AFM₁ limits established in milk by the FDA and ISIRI (0.5 $\mu\text{g/kg}$), only 1.7% of pasteurized milk samples and 2.7% of ultra-high temperature (UHT) milk samples were above the stipulated levels. However, according to the limits set by the EC (0.05 $\mu\text{g/kg}$), 27% and 17% of pasteurized and UHT milk samples, respectively, were above the acceptable limits. In Syria, 80% and 60% of pasteurized milk samples exceeded the limits set by the EC and FDA, respectively (Ghanem and Orfi 2009). In studies carried in Turkey, 47% and 3.2% of the UHT milk samples had levels above the limits allowed by EC and FDA, respectively (Unusan 2006), and 31% of UHT milk samples showed levels above the EC regulation (Tekinsen and Eken 2008). Furthermore, 64% (Çelik and others 2005) and 47% of UHT milk samples (Unusan 2006) exceeded 0.05 $\mu\text{g/kg}$. In Iran, 78% (Oveisi and others 2007), 80% (Kamkar and others 2008), and 18% (Alborzi and others 2006) of milk samples were detected to have AFM₁ concentrations greater than 0.05 $\mu\text{g/kg}$ and Gholampour and others (2008) examined 111 cartons of pasteurized and UHT milk produced during the winter and found that 100% of the samples

were contaminated with levels above the EC limits. In Sudan, 83.3% of raw milk samples showed substantially higher levels than the maximum allowed by the FDA (0.5 $\mu\text{g/kg}$), whereas 100% of the samples exceeded the upper limit set by the EC (Elzupir and Elhussein 2010).

In Brazil, Pereira and others (2005) detected AFM₁ in 38% of pasteurized milk samples with an average level of 0.059 $\mu\text{g/L}$, but the concentrations obtained were within the maximum limits established by Brazilian regulations (0.5 $\mu\text{g/L}$). However, recent results obtained by Oliveira and others (2013) are quite alarming, since 31% of UHT milk samples showed very high levels of AFM₁, ranging from 1.0 to 4.1 $\mu\text{g/L}$, which are equivalent to twice or more of the maximum tolerable limit by Brazilian regulations. Other studies conducted in Brazil detected the presence of AFM₁ in 95% (0.01 to 0.2 $\mu\text{g/L}$; Shundo and others 2009), 40% (0.009 to 0.069 $\mu\text{g/L}$; Jager and others 2013), 53% (mean level of 0.074 $\mu\text{g/L}$; Pereira and others 2005), and 24% (mean level 0.680 $\mu\text{g/L}$; Sassahara and others 2005) of milk samples collected in São Paulo, Pirassununga, Lavras, and northern Paraná, respectively.

Occurrence of AFM₁ in dairy products

The variations in AFM₁ concentration in cheese and other dairy derivatives observed in different studies (Table 3) may be explained by the different levels of milk contamination, cheese

Table 3—Occurrence of AFM₁ contamination in dairy products.

Country	Sample	Frequency (%)	Min–Max ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Reference
Kuwait	White cheese	(32/40) 80	0.024–0.452	Dashti and others (2009)
Turkey	Cheese	(68/72) 94.4	0.012–0.378	
	Yoghurt	(28/50) 56	0.0025–0.078	Ertas and others (2011)
	Dairy dessert	(26/50) 52	0.0015–0.08	
	Butter	(92/92) 100	0.01–7.0	Tekinsen and Uçar (2008)
	Cream cheese	(99/100) 99	0–4.1	
	Yoghurt	(70/80) 87.5	0.01–0.475	Atasever and others (2011)
Iran	White cheese	(93/116) 80.1	0.052–0.745	Fallah and others (2009)
	Cream cheese	(68/94) 72.3	0.058–0.785	
	Lighvan cheese	(49/75) 65.3	0.03–0.313	Fallah and others (2011)
	Cheese	(47/88) 53.4	0.082–1.254	Rahimi and others (2009)
	White cheese	(30/50) 60	0.041–0.374	Tavakoli and others (2012)
	Feta cheese	(66/80) 82.5	0.15–2.41	Kamkar (2006)
Libya	Cheese	(15/20) 75	0.11–0.52	Elgerbi and others (2004)
Brazil	Cheese	(3/10) 30	0.091–0.3	Jager and others (2013)
	Yoghurt	–	–	
Greece	Feta cheese	(0/54) 0	–	Kaniou-Grigoriadou and others (2005)
Pakistan	White cheese	(93/119) 78	0.004–0.595	
	Cream cheese	(89/150) 59	0.004–0.456	Iqbal and Asi (2013)
	Butter	(33/74) 45	0.004–0.413	
	Yoghurt	(59/96) 61	0.004–0.616	
Serbia	Milk products	(122/322) 37,8	0.268–0.952	Tomasevic and others (2015)

manufacturing practices, types of cheese, cheese ripening conditions, and the analytical methods employed (Sarimehmetoglu and others 2004; Fallah and others 2011). Considering the preferred affinity of AFM₁ for the casein fraction, a high concentration of this toxin in the curd may occur during the cheese manufacturing process (Sengun and others 2008), resulting in a 3-fold higher AFM₁ concentration in many soft cheeses and a 5-fold higher concentration in hard cheeses compared to the milk from which they were produced (Ardic and others 2009). The occurrence of AFM₁ in samples of dairy products such as cheese, yogurts, and butters is considerably high in several regions of the world. As shown in Table 3, except for samples in Greece, other studies showed occurrence frequency of the mycotoxin up to 100%, with contamination reaching 7.0 $\mu\text{g}/\text{L}$ (butter sample originated in Turkey).

Tavakoli and others (2012) observed a seasonal variation in cheese contamination, where the samples collected in winter were significantly ($P < 0.03$) higher than those collected during the summer.

Iha and others (2013) evaluated the stability of AFM₁ in dairy products and observed that there was a 3.2% decrease in AFM₁ concentration after 28 d in the Minas Frescal cheese, the authors attributed this decrease to possible analytical variations. These results are similar to those in the study by Oruc and others (2006), in which AFM₁ was seen to remain stable in 2 types of cheese (Kashar cheese for a period of 60 d and canned white cheese for 90 d) during the storage and maturation periods.

Govaris and others (2002), studying AFM₁ stability in artificially contaminated yogurt during 4 wk of storage at 4 °C and at 2 different pH values (4.0 and 4.6), observed a 6% concentration decrease in yogurt, which are conflicting results to those obtained by Iha and others (2013). The results showed that, at pH 4.6, AFM₁ levels did not change significantly ($P > 0.01$); however, yogurt at pH 4.0 showed a significant decrease in AFM₁ concentration ($P < 0.01$) after the 3rd and 4th wk of storage at both concentration levels (0.05 and 0.1 $\mu\text{g}/\text{L}$), probably associated with the low pH. Govaris and others (2002) further reported that during yogurt fermentation, AFM₁ levels decreased significantly

from the initial values in milk and attributed this to different factors such as low pH, formation of organic acids, the presence of *Lactobacillus* sp.

Studies have shown that lactic acid bacteria inhibit the biosynthesis of aflatoxins, and can even remove various mycotoxins either through the accumulation of fermentation products (lactic acid, diacetyl, acetaldehyde, acetic acid, hydrogen peroxide, bacteriocins, or hydrogen) reaching inhibitory levels in certain foods and beverages (Onilude and others 2005; Bovo and others 2012), or through their ability to bind mycotoxins (Dalié and others 2010). *Saccharomyces cerevisiae*, the yeast widely used in food fermentation, has been studied as a potential agent for mycotoxin decontamination in food (Shetty and Jespersen 2006).

Fumonisin

Fumonisin were discovered in 1988 through their isolation in cultures of *Fusarium verticillioides* (Gelderblom and others 1988), being also produced by *F. proliferatum* and other *Fusarium* species (Glenn 2007) like *F. fujikuroi* (Proctor and others 2004), *F. globosum* (Marasas and others 2004), *F. oxysporum* (Proctor and others 2004), and *F. nygamai* (Leslie and others 2005). Animal and human health problems related to these mycotoxins are almost exclusively associated with the consumption of contaminated maize or its derivatives (Bolger and others 2001; Wang and Merrill 2004; Abbas and others 2006). Eighteen different types of fumonisins have been isolated and identified all differing in their hydroxyl groups (Figure 2). The most toxicogenic and predominant molecular form, produced by *Fusarium moniliforme*, is fumonisin B₁ (FB₁; Seo and Lee 1999), which, together with fumonisin B₂ (FB₂), is responsible for about 70% of all fumonisin found in nature and food (Seo and others 2001; Niderkon and others 2009). FB₁ is classified by the Intl. Agency for Research on Cancer as a Group 2B possible carcinogen to humans.

Ruminants appear to be tolerant to FB₁ because this mycotoxin is barely metabolized by rumen microbiota of the liver (Caloni and others 2000; Spotti and others 2001a). However, the transfer of these contaminants to milk has been previously confirmed (Maragos and Richard 1994; Hammer and others 1996; Spotti and

others 2001b), although some studies found no FB₁ contamination in milk (Scott and others 1994; Richard and others 1996). Values of 0.05% have been reported for the secretion of FB₁ in milk, the animals were administered 3 mg of toxin per kg of feed (Hammer and others 1996).

The incidence of fumonisins in milk samples has not been extensively studied. It must be noted, however, that in all the latter cases the limits of quantitation of the methods used were considered high (between 1 and 50 µg/kg). Gazzotti and others (2009) developed a method to determine and quantify FB₁ in milk samples by means of liquid chromatography-mass spectrometry; of the 10 samples analyzed, 8 were contaminated above the limits of quantification (0.26 µg/kg).

Because FB₁ and FB₂ in milk samples are stable to heat treatments such as pasteurization (62 °C/30 min) and storage at 4 °C for 11 d (Maragos and Richard 1994), the incidence of these contaminants is a major issue for human health. Therefore, establishing methodologies for their detection and quantification and the subsequent regulation of the minimum levels allowed are of paramount importance.

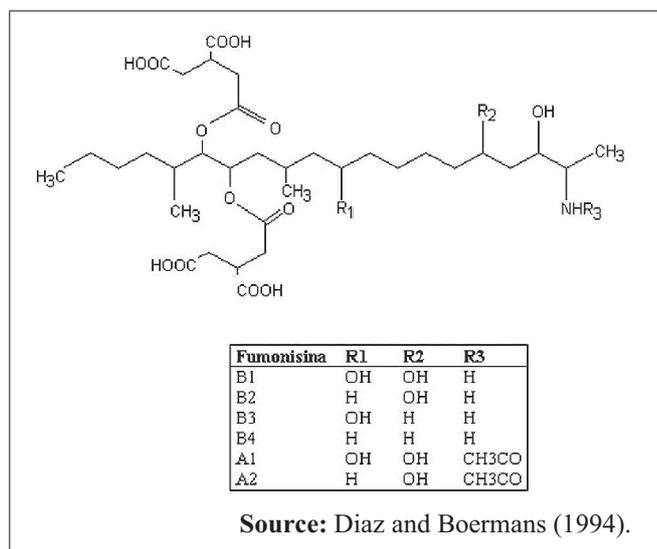


Figure 2—Molecular formula of fumonisins.

Zearalenone

Zearalenone (ZEN) is a lactone mycotoxin which can be produced by various *Fusarium* species, *Fusarium graminearum*, and *Fusarium culmorum* are its major producers (Zinedine and others 2007). The reduction of ZEA to its metabolites (Figure 3) primarily occurs in the liver, but it also can be converted by rumen protozoa (Malekinejad and others 2006).

Unlike the aflatoxins, ZEN is not considered carcinogenic. Nevertheless, this mycotoxin has estrogenic effects, with the estrogenic activity of α-ZEA being 3 to 4 times greater than the parent compound ZEN (Minervini and others 2005).

Although ZEN is not 1 of the higher mycotoxins of occurrence in milk and its derivatives, some studies have reported ZEN contamination. In a study conducted in Italy, Meucci and others (2011) detected ZEN in 9% (maximum 0.76 µg/L), α-ZEN in 26% (maximum 12.91 µg/L), and β-ZEN in 28% (maximum of 73.24 µg/L) of milk-based infant formula samples studied, and the authors obtained limits of detection (LOD) of 0.02, 0.02, and 0.2 µg/L for ZEN, α-ZEN, and β-ZEN, respectively. Furthermore, there were significant variations in the ZEN metabolite levels of the infant formula brands evaluated. According to the authors, this could be attributed to different manufacturing practices and probably the variation in the quality of the raw materials used. In Argentina, Signorini and others (2012) estimated that the concentration of ZEN was 0.125 µg/L in raw milk. In China, Huang and others (2014) observed the occurrence of ZEN in samples of raw milk, pasteurized milk, and powdered milk, and despite the LOD is approximately 10 times less than that obtained by Meucci, contaminated samples percentages were similar at 23.3%, 16.7%, and 25%, respectively.

Ochratoxin

Ochratoxin (OTA) is a mycotoxin synthesized by a variety of different species of fungi, mostly from the genera *Aspergillus* (*A. ochraceus*, *A. melleus*, *A. sulphureus*, *Aspergillus section Nigri*, *A. carbonarius*, *A. awamori*) and *Penicillium* (*P. verrucosum*, *P. crysogenum*, and *P. nordicum*; Zheng and others 2005; Bayman and Baker 2006; Magan 2006; Rodríguez 2011). This toxin has been shown to be nephrotoxic, hepatotoxic, teratogenic, and immunotoxic. The Intl. Agency for Research on Cancer classified OTA in 2B group (possibly carcinogenic agent; Intl. Agency for Research on 1993).

According to Nogueira and Oliveira (2006), the main route of contamination of OTA is the gastrointestinal tract, with the

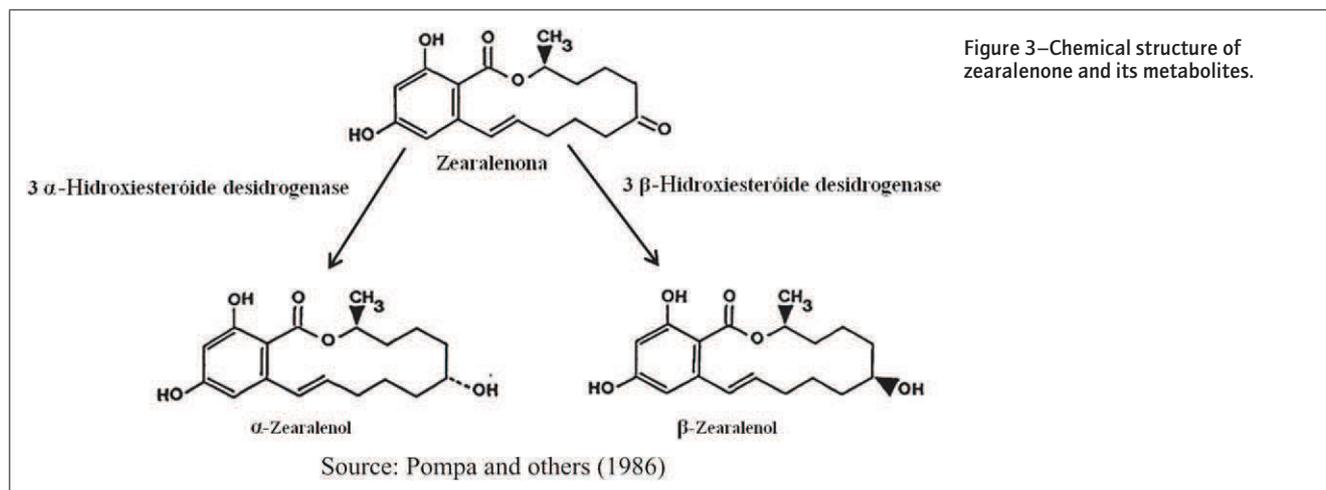


Figure 3—Chemical structure of zearalenone and its metabolites.

mycotoxin being slowly absorbed. This occurs in most species, there are a 1st and rapid absorption in the stomach due to its acid characteristics, followed by a slow absorption, intestinal level. According to Völkel and others (2011), only a small percentage of OTA remains in the blood stream. Nevertheless, due to OTA being degraded by microorganisms in the cattle rumen, it has been suggested that its rate of excretion in milk is minimal (Fink-Gremmels 2008b).

In a study of OTA detection and quantification in Italian milk samples, Pattono and others (2011) analyzed 63 milk samples from organic farms and 20 nonorganic, commercially available milk samples. The limit of quantification (LOQ) of the method was 0.05 $\mu\text{g/L}$ and the results showed that only 3 organic samples were contaminated with OTA in amounts ranging from 0.07 to 0.11 $\mu\text{g/L}$. None of the nonorganic samples resulted positive for OTA. In a survey in France, Boudra and others (2007) evaluated 132 samples of bovine milk from farms in the northwest of the country in order to determine the presence of AFM₁ and OTA. Only 3 samples were found to contain OTA above the LOQ of the method (0.005 $\mu\text{g/L}$). Breitholtz-Emanuelsson and others (1993) found that from the 36 milk samples evaluated, 5 (14%) were positive for OTA (LOQ 0.005 $\mu\text{g/L}$). In a study of mycotoxins in animal feed, Galtier (1991) calculated that a cow fed with an oral dose of 1 g of OTA/d would result in 100 $\mu\text{g/kg}$ of OTA in milk, corresponding to a transfer ratio of 0.01%. Another study in Turin, Italy, examined OTA levels in colonial cheeses made with raw milk. Of these 32 cheese samples evaluated, 6 were positive for the presence of OTA with values between 18.4 and 146.0 $\mu\text{g/kg}$ in the interior part and between 1.0 and 262.2 $\mu\text{g/kg}$ in the cheese hull. The presence of mycotoxins on the surface of the cheese can be explained due to the environmental conditions of the ripening chamber (for example, temperature and water activity) during cheese maturation, which can be favorable for the metabolic activity of some mycotoxin-producing strains (Pattono and others 2013).

Trichothecenes

Trichothecenes are produced by several genera of fungi, including *Fusarium*, *Stachybotrys*, *Myrothecium*, *Trichothecium*, *Trichoderma*, *Cephalosporium*, *Cylindrocarpon*, *Verticimonosporium*, and *Phomopsis* (Scott 1989). Are mycotoxins which may be present in most cereals during harvest and storage. The fusaric acid, which is often present in cereals, increases the toxicity of trichothecenes through a synergistic mechanism (Yiannikouris and Jouany 2002). Despite the large number of these compounds found in nature, only a few have been detected by natural contamination in foods, for example, DON, nivalenol, T-2 toxin, HT-2, and diacetoxyscirpenol toxin (Radová and others 1998; Kotal and others 1999; Garda and others 2004). In general, milk is not considered a significant source of trichothecene toxins; however, high levels of contamination by feed and silage mycotoxins together with animal physiological imbalances can result in significant levels being present in milk. Recent studies have revealed that animals ingesting feed contaminated by type A or B trichothecenes (DON or T-2 toxin) showed mycotoxin biotransformation and excretion in fluids such as milk, thus classifying these as a risk to human health (Danicke and Brezina 2013).

Deoxynivalenol

DON, also known as vomitoxin, is mainly produced by *Fusarium graminearum* and, in some regions, by *Fusarium culmorum* (Richard 2000). The main product of the microbial metabolism of my-

cotoxin in the animal body is di-epoxy-DON (Figure 4), a less toxic metabolite that may be eliminated in both urine and stool and secretions such as milk (Maul and others 2012; Shephard and others 2013). In a study, Seeling and others (2006a) studied the "carry-over" (ratio of DON concentration or its metabolites in milk to DON concentration in animal feed) and found values between 0.0001 and 0.0002 for DON, and 0.0004 and 0.0024 for di-epoxy-DON, concluding that, in healthy cows, the mycotoxin is detected in blood and milk mainly as de-epoxy-DON.

Studies of DON metabolism and excretion in milk samples have been performed since the 1980s (Côté and others 1986; Charmley and others 1993). Nowadays, other metabolites arising from DON feed contamination have been studied in milk (Seeling and others 2006b; Danicke and Brezina 2013); however, there are few reports of the natural occurrence of these toxic compounds in milk samples for human consumption (Signorini and others 2012).

Despite the amount of DON and its conjugated derivatives in milk be very small, some authors evaluated the incidence of these mycotoxins in this food. Thus, Rubert and others (2012) developed and validated a methodology capable of extracting and simultaneously quantify and identify 21 different mycotoxins from foods intended for infants, including fluid milk. Among the mycotoxins studied, the authors evaluated the natural incidence of DON, 3-acetyldeoxynivalenol, and 15-acetyldeoxynivalenol in 3 types of baby food, but none of the milk samples were naturally contaminated by DON nor its metabolites.

The high incidence of DON in cereals for animal feed (Soleimanyand others 2012) reinforces the need for studies to evaluate the impact of this mycotoxin and its degradation products in milk samples for human consumption. Furthermore, laws to regulate the level of these contaminants in milk and its derivatives should be implemented.

T-2 toxin

The T-2 toxin is a mycotoxin produced mainly by fungi of the genus *Fusarium sporotrichioides* (Cast 2003) and belongs to the group of nonmacrocytic trichothecenes.

T-2 milk contamination through contaminated feed has been proven by several studies (Robison and others 1979; Yoshizawa and others 1981). These studies have also predicted the metabolic fate of this mycotoxin in the animal body and the possible compounds formed during food digestion (Yoshizawa and others 1981). Nevertheless, there are no reports in the literature describing the natural occurrence of this mycotoxin and its metabolites in milk samples intended for human consumption.

Conclusions

Given the extensive occurrence of different types of mycotoxins not only in milk but also in other dairy products, as well as concern regarding their animal and human toxicity and the fact that milk is a source of nutrients of particular importance for infants, it is essential to adopt measures to minimize food contamination by such mycotoxins. Thus, special care should be taken with lactating cow's feedstuff and in increasing the awareness of Good Agricultural and Storage Practices.

References

- Abbas HK, Cartwright RD, Xie W, Shier WT. 2006. Aflatoxin and fumonisin contamination of corn (maize, *Zea mays*) hybrids in Arkansas. *Crop Prot* 25:1-9.
- Alborzi S, Pourabbas B, Rashidi M, Astaneh B. 2006. Aflatoxin M₁ contamination in pasteurized milk in Shiraz (south of Iran). *Food Control* 17:582-4.
- Ardic M, Karakaya Y, Atasever M, Adiguzel G. 2009. Aflatoxin M₁ levels of Turkish white brined cheese. *Food Control* 20:196-9.

- Assem E, Mohamad A, Oula EA. 2011. A survey on the occurrence of aflatoxin M₁ in raw and processed milk samples marketed in Lebanon. *Food Control* 22:1856–8.
- Atasever MA, Atasever M, Ozturan K. 2011. Aflatoxin M₁ levels in retail yoghurt and ayran in Erzurum in Turkey. *Turk J Vet Anim Sci* 35:59–62.
- Battacore G, Nudda A, Cannas A, Cappio Borlino A, Bomboi G, Pulina G. 2003. Excretion of Aflatoxin M₁ in Milk of Dairy Ewes Treated with Different Doses of Aflatoxin B₁. *J Dairy Sci* 86:2667–75.
- Battacore G, Nudda A, Palomba A, Mazzetta A, Pulina G. 2009. The transfer of aflatoxin M₁ in milk of ewes fed diet naturally contaminated by aflatoxins and effect of inclusion of dried yeast culture in the diet. *J Dairy Sci* 92:4997–5004.
- Bayman P, Baker JL. 2006. Ochratoxins: a global perspective. *Mycopathologia* 162:215–23.
- Bilandzic N, Varenina I, Solomun B. 2010. Aflatoxin M₁ in raw milk in Croatia. *Food Control* 21:1279–81.
- Bolger M, Coker RD, Dinovi M, Gaylor D, Gelderblom WCA, Olsen M, Paster N, Riley RT, Shephard G, Speijers GJA. 2001. Fumonisin. In: *Safety Evaluation of Certain Mycotoxins in Food*, WHO Food Additives Series 47, FAO Food and Nutrition Paper 74, Prepared by the 56th Meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA), WHO, Geneva, Switzerland, 103–279.
- Boudra H, Barnouin J, Dragacci S, Morgavi DP. 2007. Aflatoxin M₁ and Ochratoxin A in raw bulk milk from French dairy herds. *J Dairy Sci* 90:3197–201.
- Bovo F, Corassin CH, Rosim RE, Oliveira CAF. 2012. Efficiency of lactic acid bacteria strains for decontamination of aflatoxin M₁ in phosphate buffer saline solution and in skimmed milk. *Food Bioprocess Tech* 5:1–5.
- Brasil. 2011. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC N. 7, de 18 de fevereiro de 2011. Aprova o Regulamento Técnico sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos (p. 66). Brasília, DF: Diário Oficial da República Federativa do Brasil. N. 46 Seção 1.
- Breitholtz-Emanuelson A, Olsen M, Oskarsson A, Palminger I, Hult K. 1993. Ochratoxin A in cow's milk and in human milk with corresponding human blood samples. *J AOAC Int* 76:842–6.
- Bruerton K. 2001. Finding practical solutions to mycotoxins in commercial production: a nutritionist's perspective. In: *Proceedings of the Altech's 17th Annual Symposium*, Queensland, Australia: 161–8.
- Bryden WL. 2012. Mycotoxin contamination of the feed supply chain: implications for animal productivity and feed security. *Anim Feed Sci Technol* 173:134–58.
- Caloni F, Spotti M, Auerbach H, Op Den Camp H, Fink-Gremmels J, Pompa G. 2000. *In vitro* metabolism of fumonisin B₁ by ruminal microflora. *Vet Res Commun* 24:379–87.
- Cano-Sancho G, Marin S, Ramos AJ, Peris-Vicent J, Sanchis V. 2010. Occurrence of aflatoxin M₁ and exposure assessment in Catalonia (Spain). *Rev Iberoam Micol* 27(3):130–5.
- Carvajal M, Rojo F, Méndez I, Bolaños A. 2003. Aflatoxin B₁ and its interconverting metabolite aflatoxicol in milk: the situation in Mexico. *Food Addit Contam* 20:1077–86.
- Cast. 2003. Mycotoxins: risks in plant, animal, and human systems. Report No. 139. Council for Agricultural Science and Technology, Ames, IA, USA.
- Çelik T H, Sarimehmetoğlu B, Küplülü Ö. 2005. Aflatoxin M₁ contamination in pasteurised milk. *Vet arhiv* 75:57–65.
- Charmley E, Trenholm HL, Thompson BK, Vudathal AD, Nicholson JWG, Prelusky DB, Charmley LL. 1993. Influence of level of deoxynivalenol in the diet of dairy cows on feed intake, milk production, and its composition. *J Dairy Sci* 76:3580–7.
- Coffey R, Cummins E, Ward S. 2009. Exposure assessment of mycotoxins in dairy milk. *Food Control* 20:239–49.
- Côté LM, Dahlem AM, Yoshizawa T, Swanson SP, Buck WB. 1986. Excretion of deoxynivalenol and its metabolites in milk, urine, and feces of lactating dairy cows. *J Dairy Sci* 69:2416–23.
- Creepy EE. 2002. Update of survey, regulation, and toxic effects of mycotoxins in Europe. *Toxicol Lett* 127:19–28.
- Dalié DKD, Deschamps AM, Richard-Forget F. 2010. Lactic acid bacteria – Potential for control of mould growth and mycotoxins: a review. *Food Control* 21:370–80.
- Danicke S, Brezina U. 2013. Kinetics and metabolism of the *Fusarium* toxin deoxynivalenol in farm animals: consequences for diagnosis of exposure and intoxication and carry over. *Food and Chem Toxicol* 60:58–75.
- Dashti B, Al-Hamli S, Alomirah H, Al-Zenki S, Abbas AB, Sawaya W. 2009. Levels of aflatoxin M₁ in milk, cheese consumed in Kuwait and occurrence of total aflatoxin in local and imported animal feed. *Food Control* 20:686–90.
- Diaz DE, Hagler Jr WM, Blackwelder JT, Eve JA, Hopkins BA, Anderson KL, Jones FT, Whitlow LW. 2004. Aflatoxin binders II: reduction of aflatoxin M₁ in milk by sequestering agents of cows consuming aflatoxin in feed. *Mycopathologia* 157:233–41.
- Diaz GJ, Boermans HJ. 1994. Fumonisin toxicoses in domestic animals: a review. *Vet Human Toxicol* 36(6):548–55.
- Diaz GJ, Espitia E. 2006. Occurrence of aflatoxin M₁ in retail milk samples from Bogotá, Colombia. *Food Addit Contam* 23:811–5.
- Duarte SC, Almeida AM, Teixeira AS, Pereira AL, Falcão AC, Pena A, Lino CM. 2013. Aflatoxin M₁ in marketed milk in Portugal: assessment of human and animal exposure. *Food Control* 30:411–7.
- Duarte SC, Almeida AM, Teixeira AS, Pereira AL, Falcão AC, Pena A, Lino CM. 2013. Aflatoxin M₁ in marketed milk in Portugal: assessment of human and animal exposure. *Food Control* 30:411–7.
- EC - EUROPEAN COMMISSION. 2001. Regulation (EC) No. 466/2001 of 8 March 2001, setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. *O J L* 77:1–13.
- Elgerbi AM, Aidoo KE, Candlish AAG, Tester RF. 2004. Occurrence of aflatoxin M₁ in randomly selected North African milk and cheese samples. *Food Addit Contam* 21:592–7.
- Elzupir AO, Elhussien AM. 2010. Determination of aflatoxin M₁ in dairy cattle milk in Khartoum State, Sudan. *Food Control* 21:945–6.
- Ertas N, Gonulalan Z, Yildirim Y, Karadal F. 2011. A survey of concentration of aflatoxin M₁ in dairy products marketed in Turkey. *Food Control* 22:1956–9.
- Faletto MB, Koser PL, Battula N, Townsend GK, Maccubbin AE, Gelbion HV. 1988. Cytochrome P3-450 cDNA encodes aflatoxin B₁ hydroxylase. *J Biol Chem* 263:12187–9.
- Fallah AA, Jafari T, Fallah A, Rahnama M. 2009. Determination of aflatoxin M₁ levels in Iranian white and cream cheese. *Food Chem Toxicol* 47:1872–5.
- Fallah A. 2010. Assessment of aflatoxin M₁ contamination in pasteurized and UHT milk marketed in central part of Iran. *Food Chem Toxicol* 48:988–91.
- Fallah AA, Rahnama M, Jafari T, Saei-Dehkordi SS. 2011. Seasonal variation of aflatoxin M₁ contamination in industrial and traditional Iranian dairy products. *Food Control* 22:1653–6.
- FAO. Dairy Animals. Available from: <http://www.fao.org/agriculture/dairy-gateway/milk-production/dairy-animals/en/#.VS6myB5JOY>. Accessed 2015 April 5.
- Garda J, Macedo RM, Badiale-Furlong E. 2004. Determinação de Tricocetenos em Cerveja e Avaliação de Incidência no Produto Comercializado no Rio Grande Do Sul. *Ciênc Tecnol Aliment* 24:657–63.
- Garrido NS, Iha MH, Santos Ortolani MR, Duarte Fávoro RM. 2003. Occurrence of aflatoxin M₁ and M₂ in milk commercialized in Ribeirão Preto-SP, Brazil. *Food Addit Cont* 20:70–3.
- Gazzotti T, Lugoboni B, Zironi E, Barbarossa A, Serraino A, Pagliuca G. 2009. Determination of fumonisin B₁ in bovine milk by LC-MS/MS. *Food Control* 20:1171–4.
- Gelderblom WCA, Jaskiewicz K, Marasas WFO, Thiel PG, Horak RM, Vleggar R, Kriek NP. 1988. Fumonisin novel mycotoxins with cancer promoting activity produced by *Fusarium moniliforme*. *Appl Environ Microbiol* 54:1806–11.
- Ghanem I, Orfi M. 2009. Aflatoxin M₁ in raw, pasteurized and powdered milk available in the Syrian market. *Food Control* 20:603–5.
- Ghazani MMH. 2009. Aflatoxin M₁ contamination in pasteurized milk in Tabriz northwest of Iran. *Food Chem Toxicol* 47:1624–5.
- Ghianian SA, Maghsood AH, Neyestani TR, Mirhendi SH. 2007. Occurrence of aflatoxin M₁ in raw milk during the summer and winter seasons in Hamadan. *Iran J Food Safety* 27:188–98.
- Gholampour AI, Khoushnevis SH, Hashemi SJ. 2008. Aflatoxin M₁ level in pasteurized and sterilized milk of Babol city. *Tehran Univ Med J* 65(13):20–4.
- Glenn AE. 2007. Mycotoxigenic *Fusarium* species in animal feed. *Toxicology & Mycotoxin Research Unit*, Russell Research Center, USDA, ARS, 950 College Station Road, Athens, GA 30605, United States. In: Morgavi DP, Riley RT, editors. *Fusarium and their toxins: mycology, occurrence, toxicity, control and economic impact*. Animal Feed Science and Technology.
- Govaris A, Roussi V, Koidis PA, Botsoglou NA. 2002. Distribution and stability of aflatoxin M₁ during production and storage of yoghurt. *Food Addit Contam* 19:1043–50.
- Hammer P, Blüthgen A, Walte HG. 1996. Carryover of fumonisin B₁ into the milk of lactating cows. *Milchwissenschaft* 51:691–5.
- Han RW, Zheng N, Wang JQ, Zhen YP, Xu XM, Li SL. 2013. Survey of aflatoxin in dairy cow feed and raw milk in China. *Food Control* 34:35–9.
- Hassain HF, Kassaify Z. 2014. The risks associated with aflatoxins M₁ occurrence in Lebanese dairy products. *Food Control* 37:68–72.
- Heshmati A, Milani JM. 2010. Contamination of UHT milk by aflatoxin M₁ in Iran. *Food Control* 21:19–22.
- Huang LC, Zheng N, Zheng BQ, Wen F, Cheng JB, Han RW, Xu XM, Li SL, Wang JQ. 2014. Simultaneous determination of aflatoxin M₁, ochratoxin A, zearalenone and α -zearalenol in milk by UHPLC-MS/MS. *Food Chem* 146:242–9.
- Iha ML, Barbosa CB, Okada IA, Trucksess MW. 2013. Aflatoxin M₁ in milk and distribution and stability of aflatoxin M₁ during production and storage of yoghurt and cheese. *Food Control* 29:1–6.
- International Agency For Research On C. 1993. International Agency For Research On C., 1993. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, 56. Some naturally occurring substances: Food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins.
- Iqbal SZ, Asi MR, Jinap S. 2013. Variation of aflatoxin M₁ contamination in milk and milk products collected during winter and summer seasons. *Food Control* 34:714–18.
- ISIRI Institute. 2002. Institute of Standard and Industrial Research of Iran. Maximum tolerated limits of mycotoxins in foods and feeds. National Standard 5925.
- Jager AV, Tedesco MP, Souto PCMC, Oliveira CAF. 2013. Assessment of aflatoxin intake in São Paulo, Brazil. *Food Control* 33:87–92.
- Jobim CC, Gonçalves GD, Santos GT. 2001. Qualidade sanitária de grãos e de forragens conservadas "in vitro" desempenho animal e qualidade de seus produtos. In: *Simpósio Sobre Produção e Utilização de Forragens Conservadas*, Anais do Simpósio Sobre Produção e Utilização de Forragens Conservadas. p 242–61. Maringá: UEM/CCA/DZO.
- Jouany JP. 2001. The impact of mycotoxins on performance and health of dairy cattle. In: *Altech's 17th Annual Symposium*. Proceeding 191–222.
- Kalac P. 2011. The effects of silage feeding on some sensory and health attributes of cow's milk: a review. *Food Chem* 125:307–17.
- Kamkar A. 2005. A study on the occurrence of aflatoxin M₁ in raw milk produced in Sarab city of Iran. *Food Control* 16:593–9.
- Kamkar A. 2006. A study on the occurrence of aflatoxin M₁ in Iranian Feta cheese. *Food Control* 17:768–75.
- Kamkar A, Karim G, Aliabadi FS, Khaksar R. 2008. Fate of aflatoxin M₁ in Iranian white cheese processing. *Food Chem Toxicol* 46:2236–8.
- Kaniou-Grigoriadou I, Eleftheriadou A, Mouratidou T, Katikou P. 2005. Determination of aflatoxin M₁ in ewe's milk samples and the produced curd and Feta cheese. *Food Control* 16:257–61.
- Kiessling KH, Petterson H, Sholm K, Olsen M. 1984. Metabolism of aflatoxin, ochratoxin, zearalenone, and three trichothecenes by intact rumen fluid, rumen protozoa, and rumen bacteria. *Appl Environ Microbiol* 47:1070–3.
- Kos J, Levi J, Duragi O, Koki B, Miladinovi I. 2014. Occurrence and estimation of aflatoxin M₁ exposure in milk in Serbia. *Food Control* 38:41–6.
- Kotal F, Holadová K, Hajlová J, Poustka J, Radová Z. 1999. Determination of trichothecenes in cereal. *J Chromatogr* 830:2110–25.
- Lee JE, Kwak BM, Ahn JH, Jeon TH. 2009. Occurrence of aflatoxin M₁ in raw milk in South Korea using an immunoaffinity column and liquid chromatography. *Food Control* 20:136–8.
- Lee D, Lee KG. 2015. Analysis of aflatoxin M₁ and M₂ in commercial dairy products using high-performance liquid chromatography with a fluorescence detector. *Food Control* 50:467–71.
- Leslie JF, Zeller KA, Lamprecht SC, Rheeeder JP, Marasas WFO. 2005. Toxicity, pathogenicity, and genetic differentiation of 5 species of *Fusarium* from sorghum and millet. *Phytopathology* 95:275–83.
- Magan N. 2006. Mycotoxin contamination of food in Europe: Early detection and prevention strategies. *Mycopathologia* 262:245–53.
- Malekinejad H, Maas-Bakker R, Fink-Gremmels J. 2006. Species differences in the hepatic biotransformation of zearalenone. *Vet J* 172:96–102.

- Maragos CH, Richard JL. 1994. Quantitation and stability of fumonisin B₁ and B₂ in milk. *J AOAC Int* 77:1162-7.
- Marasas WFO, Riley RT, Hendricks KA, Stevens VL, Sadler TW, Gelineau-van Waes J, Missmer SA, Cabrera J, Torres O, Gelderblom WCA, Allegood J, Martinez C, Maddox J, Miller JD, Starr L, Sullards MC, Roman AV, Voss KA, Wang E, Merrill Jr AH. 2004. Fumonisin disrupt sphingolipid metabolism, folate transport, and neural tube development in embryo culture and in vivo: A potential risk factor for human neural tube defects among populations consuming fumonisin-contaminated maize. *J Nutr* 134:711-16.
- Maul R, Warth B, Kant JS, Schebb NH, Krska R, Koch M, Sulyok M. 2012. Investigation of the hepatic glucuronidation pattern of the fusarium mycotoxin deoxynivalenol in various species. *Chem Res Toxicol* 25:2715-7.
- Meucci V, Razzuoli E, Soldani G, Massart F. 2010. Mycotoxin detection in infant formula milks in Italy. *Food Addit Contam* 27:64-71.
- Meucci V, Soldani G, Razzuoli E, Saggese G, Massart M. 2011. Mycoestrogen Pollution of Italian Infant Food. *J Pediatrics* 159:278-83.
- Minervini F, Fornelli F, Lucivero G, Romano C, Visconti A. 2005. T-2 toxin immunotoxicity on human B and T lymphoid cell lines. *Toxicol* 210:81-91.
- Motawee MM, Bauer J, McMahon DJ. 2009. Survey of aflatoxin M₁ in cow, goat, buffalo and camel milks in Ismailia-Egypt. *Bull Environ Contam Toxicol* 83:766-9.
- Nelson PE. 1992. Taxonomy and biology of *Fusarium moniliforme*. *Mycopathologia* 117:29-36.
- Niderkon V, Morgavi DP, Aboab B, Lemaire M, Boudra H. 2009. Cell wall component and mycotoxin moieties involved in the binding of fumonisin B₁ and B₂ by lactic acid bacteria. *J Appl Microbiol* 106:977-85.
- Nogueira S, Oliveira EMBPP. 2006. Prevalência de Ocratoxina A em alimentos e consequentes problemas de segurança alimentar. *Alimentação Humana* 12:69-75.
- Nuryono N, Agus A, Wedhastri S, Maryudani YB, Sigit Setyabudi FMC, Bohm J, Razzazi-Fazeli E. 2009. Limited survey of aflatoxin M₁ in milk from Indonesia by ELISA. *Food Control* 20:721-4.
- Obremski K, Zielonka L, Gajecka M, Jakimiuk E, Gajecki M. 2009. Mycotoxins - dairy cattle breeding problem. A case report. *Bull Vet Inst Pulawy* 53:221-4.
- Oliveira CP, Soares NFF, Oliveira TV, Júnior JCB, Silva WA. 2013. Aflatoxin M₁ occurrence in ultra-high temperature (UHT) treated fluid milk from Minas Gerais/Brazil. *Food Control* 30:90-2.
- Onilude AA, Fagade OE, Bello MM, Fadahunsi IF. 2005. Inhibition of aflatoxin-producing aspergilli by lactic acid bacteria isolates from indigenously fermented cereal gruels. *Afr J Biotechnol* 4(12):1404-8.
- Oruc HH, Cibik R, Yilmaz E, Kalkanli O. 2006. Distribution and stability of aflatoxin M₁ during processing and ripening of traditional white pickled cheese. *Food Addit Contam* 23:190-5.
- Oveisi MR, Jannat B, Sadeghi N, Hajimahmoodi M, Nikzad A. 2007. Presence of aflatoxin M₁ in milk and infant milk products in Tehran, Iran. *Food Control* 18(10):1216-8.
- Pattono D, Gallo PF, Civera T. 2011. Detection and quantification of Ochratoxin A in milk produced in organic farms. *Food Chem* 127:374-7.
- Pattono D, Grosso A, Stocco PP, Pazzi M, Zeppa G. 2013. Survey of the presence of patulin and ochratoxin A in traditional semi-hard cheeses. *Food Control* 33:54-7.
- Pei SC, Zhang YY, Eremin SA, Lee WJ. 2009. Detection of aflatoxin M₁ in milk products from China by ELISA using monoclonal antibodies. *Food Control* 20:1080-5.
- Peng KY, Chen CY. 2009. Prevalence of Aflatoxin M₁ in Milk and Its Potential Liver Cancer Risk in Taiwan. *J Food Prot* 72:1025-9.
- Pereira MMG, Carvalho EP, Prado G, Rosa CAR, Veloso T, Souza LAF, Ribeiro JMM. 2005. Aflatoxinas em alimentos destinados a bovinos e em amostras de leite da região de Lavras, Minas Gerais - Brasil. *Ciência Agrotec* 29:106-12.
- Prandini A, Tansini G, Sigolo S, Filippi L, Laporta M, Piva G. 2009. On the occurrence of aflatoxin M₁ in milk and dairy products. *Food Chem Toxicol* 47:984-91.
- Proctor RH, Plattner RD, Brown DW, Seo JA, Lee YW. 2004. Discontinuous distribution of fumonisin biosynthetic genes in the Gibberella fujikuroi species complex. *Mycol Res* 108:815-22.
- Radová Z, Holadová K, Hajslová J. 1998. Comparison of 2 clean-up principles for determination of trichothecenes in grain extract. *J Chromatogr A* 829:259-67.
- Rahimi E, Bonyadian M, Rafei M, Kazemeini HR. 2010. Occurrence of aflatoxin M₁ in raw milk of 5 dairy species in Ahvaz, Iran. *Food Chem Toxicol* 48:129-31.
- Rahimi E, Karim G, Shakerian A. 2009. Occurrence of aflatoxin M₁ in traditional cheese consumed in Esfahan, Iran. *World Mycotoxin J* 2:91-4.
- Rastogi S, Dwivedi PD, Khanna SK, Das M. 2004. Detection of Aflatoxin M₁ contamination in milk and infant milk products from Indian markets by Elisa. *Food Control* 15:287-90.
- Rego O. 2010. A. Influência da dieta sobre o perfil dos ácidos gordos da gordura do leite de vaca. *Vida Rural* 30-40.
- Richard JL, Meerdink G, Maragos CM, Tumbleson M, Bordson G, Rice LG, Ross PF. 1996. Absence of detectable fumonisin in the milk of cows fed *Fusarium proliferatum* (Matsushima) Nirenberg culture material. *Mycopathologia* 133:123-6.
- Richard JL. 2000. Mycotoxins: an overview. In: Richard JL, editor. *Romer labs' guide to mycotoxins*. Leicester: Anytime Publishing Services. p 1-48.
- Robison TS, Mirocha CJ, Kurtz HJ, Behrens JC, Chi MS, Weaver GA, Nystrom SD. 1979. Transmission of T-2 toxin into bovine and porcine milk. *J Dairy Sci* 62:637-41.
- Rodríguez A, Rodríguez M, Luque IM, Justesen AF, Córdoba JJ. 2011. Quantification of ochratoxin A-producing molds in food products by SYBR Green and TaqMan real-time PCR methods. *Int J Food Microbiol* 149:226-35.
- Ruangwises N, Ruangwises S. 2010. Aflatoxin M₁ Contamination in Raw Milk within the Central Region of Thailand. *Bull Environ Contam Toxicol* 85:195-8.
- Rubert J, Soler C, Mañes J. 2012. Application of an HPLC-MS/MS method for mycotoxin analysis in commercial baby foods. *Food Chem* 133:176-83.
- Sarimehmetoglu B, Kuplulu O, Celik TH. 2004. Detection of aflatoxin M₁ in cheese samples by ELISA. *Food Control* 15:45-9.
- Sartori AV, Matos JS, Moraes MHP, Nóbrega AW. 2015. 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 Anal Methods* 8:2321-30.
- Sassahara M, Pontes Netto D, Yanaka EK. 2005. Aflatoxin occurrence in foodstuff supplied to dairy cattle and aflatoxin M₁ in raw milk in the North of Parana state. *Food Chem Toxicol* 43:981-4.
- Scaglioni PT, Becker-Algeri TA, Drunkler D, Badiale-Furlong E. 2014. Aflatoxin B₁ and M₁ in milk. *Anal Chim Acta* 829(4):68-74.
- Scott PM, Delgado T, Prelusky DB, Trenholm HL, Miller JD. 1994. Determination of fumonisin in milk. *J Environ Sci Health* 29(5):989-98.
- Scott PM. 1989. The natural occurrence of trichothecenes. In: Beasley VR, editor. *Trichothecene mycotoxicosis: pathophysiological effects*, vol. 1. Boca Raton, FL: CRC Press, Inc. p. 1-26.
- Seeling K, Dänicke S, Valenta H, van Egmond HP, Schothorst RC, Jekel AA, Lebzien P, Schollenberger M, Razzazi-Fazeli E, Flachowsky G. 2006a. Effects of Fusarium toxin-contaminated wheat and feed intake level on the biotransformation and carry-over of deoxynivalenol in dairy cows. *Food Addit Contam* 23:1008-20.
- Seeling K, Boguhn J, Strobel E, Danicke S, Valenta H, Ueberschar KH, Rodehutschord M. 2006b. On the effects of Fusarium toxin contaminated wheat and wheat chaff on nutrient utilisation and turnover of deoxynivalenol and zearalenone in vitro (Rusitec). *Toxicol In-Vitro* 20:703-11.
- Sengun IY, Yaman DB, Gonul SA. 2008. Mycotoxins and mould contamination in cheese: a review. *World Mycotoxin J* 1:291-8.
- Seo JA, Lee YW. 1999. Natural occurrence of the C series of fumonisin in mouldy corn. *Appl Environ Microbiol* 65:1331-4.
- Seo JA, Proctor RH, Plattner MR. 2001. Characterization of 4 clustered and co regulated genes associated with fumonisin biosynthesis in *Fusarium verticillioides*. *Fungal Genet Biol* 34:155-65.
- Shepherd GS, Burger HM, Gambacorta L, Gong YY, Krska R, Rheeder JP, Solfrizzo M, Srey C, Sulyok M, Visconti A, Warth B, Westhuizen LVD. 2013. Multiple mycotoxin exposure determined by urinary biomarkers in rural subsistence farmers in the former Transkei, South Africa. *Food Chem Toxicol* 62:217-25.
- Shetty PH, Jespersen L. 2006. *Saccharomyces cerevisiae* and lactic acid bacteria as potential mycotoxin decontaminating agents. *Trends Food Sci Technol* 17:48-55.
- Shundo L, Navas SA, Lamardo LCA, Ruvieri V, Sabino M. 2009. Estimate of aflatoxin M₁ exposure in milk and occurrence in Brazil. *Food Control* 20:655-7.
- Signorini ML, Gaggiotti M, Molineri A, Chiericatti CA, Zapata De Basílico ML, Basílico JC, Pisani M. 2012. Exposure assessment of mycotoxins in cow's milk in Argentina. *Food Chem Toxicol* 50:250-7.
- Silva MV, Janeiro V, Bando E, Machinski Jr M. 2015. Occurrence and estimative of aflatoxin M₁ intake in UHT cow milk in Paraná State, Brazil. *Food Control* 53:222-5.
- Soleimany F, Jinap S, Faridah A, Khatib A. 2012. A UPLC-MS/MS for simultaneous determination of aflatoxins, ochratoxin A, zearalenone, DON, fumonisins, T-2 toxin and HT-2 toxin in cereals. *Food Control* 25:647-53.
- Sorensen LK, Elbaek TH. 2005. Determination of mycotoxins in bovine milk by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B* 820:183-96.
- Spotti M, Pomp G, Caloni F. 2001a. Fumonisin B₁ metabolism by bovine liver microsomes. *Vet Res Commun* 25:511-6.
- Spotti M, Caloni F, Fracchiolla L, Pompa G, Vigo D, Maffeo G. 2001b. Fumonisin B₁ carry-over into milk in the isolated perfused bovine udder. *Vet Hum Toxicol* 43:109-11.
- Swanson SP, Corley RA. 1989. The distribution, metabolism, and excretion of trichothecene mycotoxins. In: Beasley VR, editor. *Trichothecene mycotoxicosis pathophysiological effects*, vol. 1. Boca Raton: CRC Press. p 37-61.
- Tajkarimi M, Aliabadi-SH F, Nejad AS, Poursoltani H, Motallebi AA, Mahdavi H. 2008. Aflatoxin M₁ contamination in winter and summer milk in 14 states in Iran. *Food Control* 19:1033-6.
- Tavakoli HR, Riazipour M, Kamkar A, Shalidehi HR, Nejad AHM. 2012. Occurrence of aflatoxin M₁ in white cheese samples from Tehran, Iran. *Food Control* 23:293-295.
- Tekinsen KK, Eken HS. 2008. Aflatoxin M₁ levels in UHT milk and kashar cheese consumed in Turkey. *Food Chem Toxicol* 46:3287-9.
- Tekinsen KK, Uçar G. 2008. Aflatoxin M₁ levels in butter and cream cheese consumed in Turkey. *Food Control* 19:27-30.
- Tomasovic I, Petrovic J, Jovetic M, Raicevic S, Milojevic M, Mirocinovic J. 2015. Two year survey on the occurrence and seasonal variation of aflatoxin M₁ in milk and milk products in Serbia. *Food Control* 56:64-70.
- Unusan N. 2006. Occurrence of aflatoxin M₁ in UHT milk in Turkey. *Food Chem Toxicol* 44:1897-900.
- US FDA. 1996. Sec. 527.400 whole milk, low fat milk, skim milk-aflatoxin M₁ (CPG 7106.210). Washington, DC: FDA compliance policy guides. p 219.
- Van Egmond HP. 1983. Mycotoxins in Dairy Products. *Food Chem* 11:289-307.
- Veldman A. 1992. Effect of sorbentia on carry-over of aflatoxin from cow feed to milk. *Milchwissenschaft* 47:777-80.
- Völkel I, Schröder-Merker E, Czerny C-L. 2011. The carry-over of mycotoxins in products of animal origin with special regard to its implications for the European food safety legislation. *Food Nutr Sci* 2:852-67.
- Wang E, Merrill AH. 2004. Fumonisin disrupt sphingolipid metabolism, folate transport, and neural tube development in embryo culture and in vivo: a potential risk factor for human neural tube defects among populations consuming fumonisin contaminated maize. *J Nutr* 134:711-6.
- Williams JH, Phillips TD, Jolly PE, Stiles JK, Aggarwal D. 2004. Human aflatoxicosis in developing countries: a review of toxicology, exposure, potential health consequences, and interventions. *Am J Clin Nutr* 80:1106-22.
- Xiong JL, Wang YM, Mac MR, Liu JX. 2013. Seasonal variation of aflatoxin M₁ in raw milk from the Yangtze River Delta region of China. *Food Control* 34:703-6.
- Yiannikouris A, Jouany JP. 2002. Mycotoxins in feeds and their fate in animals: a review. *Anim Res* 52:81-99.
- Yoshizawa T, Mirocha CJ, Behrens JC, Swanson SP. 1981. Metabolic fate of T-2 toxin in a lactating cow. *Food Cosmet Toxicol* 19:31-9.
- Zain ME. 2011. Impact of mycotoxins on humans and animals. *J Saudi Chem Soc* 15:129-44.
- Zheng Z, Hanneken J, Houchins D, King RS, Lee P, Richard JL. 2005. Validation of an ELISA test kit for the detection of ochratoxin A in several food commodities by comparison with HPLC. *Mycopathologia* 159:265-72.
- Zinedine A, Soriano JM, Moltó JC, Mañes J. 2007. Review on the toxicity, occurrence, metabolism, detoxification, regulations, and intake of zearalenone: an oestrogenic mycotoxin. *Food Chem Toxicol* 45:1-18.