

Aflatoxina M₁ em Produtos Lácteos e Uso de Bactérias Ácido Láticas para Biocontrole em Leite

Aflatoxin M₁ in Dairy Products and Acid Lactic Bacteria as Biocontrol Agent in Milk

Joice Sifuentes dos Santos^{ab*}; Werner Okano^b; Bárbara Camilla Domingues Arrais^b; Ijoni Hilda Costabeber^c; Elsa Helena Walter Santana^a

^aUniversidade Norte do Paraná, Mestrado em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados, PR, Brasil

^bUniversidade Norte do Paraná, Mestrado em Saúde e Produção de Ruminantes, PR, Brasil

^cUniversidade Federal de Santa Maria, Departamento de Morfologia, RS, Brasil

*E-mail: joice.sifuentes@gmail.com

Resumo

Alimentos isentos de contaminantes tóxicos constituem assunto de preocupação crescente nas entidades de pesquisa e de ensino, bem como de consumidores. As micotoxinas são metabólitos secundários fúngicos relevantes na toxicologia humana e animal. Entre espécies fúngicas associadas à produção de micotoxinas, *Aspergillus flavus* e *A. parasiticus* apresentam grande importância. Estas espécies são as principais responsáveis pela produção de aflatoxinas, classificadas como carcinogênicas para humanos pela *International Agency of Research on Cancer* (IARC). As aflatoxinas apresentam ocorrência mundial, principalmente nas áreas de clima tropical e subtropical. *Aspergillus* spp. é capaz de crescer em uma ampla variedade de substratos, como cereais, especiarias, oleaginosas e frutas secas, e sob diversas condições ambientais, principalmente em climas quente e úmido. Entre os análogos de aflatoxinas identificados até o momento, a aflatoxina B₁ (AFB₁) é a mais prevalente e a mais tóxica. Quando a AFB₁ é ingerida por animais domésticos, entre eles o gado leiteiro, através do consumo de rações contaminadas, esta sofre biotransformação hepática, convertendo-se em aflatoxina M₁ (AFM₁), que é excretada no leite, tecidos e fluidos biológicos desses animais. A contaminação do leite por AFM₁ traz sérios riscos a saúde, pois apresenta alta atividade carcinogênica. A legislação brasileira, através da Resolução RDC n° 7, de 18 de fevereiro de 2011, limita a presença de AFM₁ a 0,5 µg/kg em leite fluido, 5 µg/kg em leite em pó e 2,5 µg/kg em queijos. Esta revisão enfoca alguns aspectos toxicológicos da aflatoxina M₁, bem como sua presença em produtos lácteos brasileiros e sua degradação por bactérias ácido láticas.

Palavras-chave: Aflatoxina M₁. Aflatoxina B₁. Toxicologia.

Abstract

Foodstuffs free of toxic contaminants are a growing concern of research and teaching institutes, as well of the consumers. Mycotoxins are secondary fungal metabolites relevant to human and animal toxicology. Among fungal species associated to mycotoxins production, *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus* are of great importance. These species are the major responsible for aflatoxins synthesis, and classified as carcinogenic to humans according International Agency of Research on Cancer (IARC). Aflatoxins occur worldwide, mainly in tropical and subtropical areas. *Aspergillus* spp. are capable of growing in a variety of substrates, as cereals, spices, nuts and dried fruits, as well as under a variety of environmental conditions, mainly in hot and humid climate. Among aflatoxins analogues identified to date, aflatoxin B₁ (AFB₁) is the most prevalent and the most toxic. When AFB₁ is ingested by domestic animals, as dairy cattle, through contaminated feed intake, aflatoxin M₁ (AFM₁) is produced by hepatic biotransformation. AFM₁ is excreted in milk, tissues and biological fluids of these animals. Milk contamination by AFM₁ is responsible for serious health issues, due to its carcinogenic activity. Brazilian regulation RDC n.7, dated 18 February 2011 limits the presence of AFM₁ at 0.5 µg/kg in fluid milk, 5 µg/kg in milk powder, and 2.5 µg/kg in cheese. This review focus on toxicological aspects of aflatoxin M₁, as well as its presence in dairy products from Brazil and its degradation by lactic acid bacteria.

Keywords: Aflatoxin M₁. Aflatoxin B₁. Toxicology.

1 Introdução

Alimentos isentos de contaminantes tóxicos constituem assunto prioritário na saúde humana, cuja crescente preocupação tem exigido rigoroso controle. As micotoxinas são metabólitos secundários fúngicos relevantes na toxicologia humana e animal, sendo classificados na categoria de “toxinas naturais” (KUIPER-GOODMAN, 1995). *Aspergillus* spp. é um fitopatógeno frequente em grãos como milho, trigo, cevada, entre outros. Espécies como *A. flavus* e *A. parasiticus* são capazes de produzir aflatoxinas, contaminando grãos ou rações produzidas a partir de materiais contaminados. Entre os análogos de aflatoxinas, a B₁ (AFB₁) é a mais frequente e a mais tóxica. Uma vez ingerida pelo gado leiteiro, AFB₁ é

biotransformada no fígado em aflatoxina M₁ (AFM₁), e pode ser excretada no leite. O leite é produto essencial na nutrição humana, especialmente para crianças, assim, o seu controle é essencial para garantir a segurança da população.

Esta revisão enfoca alguns aspectos toxicológicos de aflatoxina M₁, bem como sua presença em produtos lácteos brasileiros e sua degradação por bactérias láticas.

2 Desenvolvimento

2.1 Leite

Segundo Amiot (1991), o leite é o melhor alimento natural, contendo aproximadamente 55 nutrientes essenciais para o homem. Dentre esses nutrientes, pode-se citar o cálcio que,

além de ser importante para a integridade óssea, participa no controle da excitabilidade nervosa e na contração muscular, na coagulação do sangue e regulação de sistemas enzimáticos, como o da tripsina. O consumo anual médio de leite fluido e produtos lácteos no Brasil é de 172 L, no entanto, este consumo deveria ser da ordem de 250 L/ano (LEITEBRASIL, 2013).

A produção leiteira tem uma grande importância cultural e econômica para o Brasil e, de acordo com o último censo agropecuário (IBGE, 2006), movimentou um mercado de aproximadamente 20,16 milhões de toneladas anuais. O Estado do Paraná é responsável por aproximadamente 1,9 milhões de toneladas/ano (IBGE, 2006). No primeiro trimestre de 2013 (IBGE, 2013), a aquisição de leite cru foi de 5,686 bilhões de litros, por estabelecimentos sob inspeção federal (92,5 %), estadual (6,7 %) ou municipal (0,8 %). Minas Gerais foi o principal produtor (25,7% do total nacional), seguido por Rio Grande do Sul (14,6 %) e Paraná (12,5 %).

No entanto, o leite pode ser veículo de diversos contaminantes, como micotoxinas, resíduos de antibióticos, antiparasitários e pesticidas organoclorados (HECK *et al.*, 2007, PICININ, 2013). A Portaria nº 50, de 20 de fevereiro de 2006 (BRASIL, 2006), através do Plano de Controle de Resíduos em Leite - PCRL, estipula o envio de amostras de leite ou gordura, pelos estabelecimentos sob Inspeção Federal, para o Laboratório de Referência Animal – LARA, para pesquisa de antibióticos, aflatoxina M₁, antiparasitários e pesticidas organoclorados.

A contaminação do leite se dá de forma indireta, através da metabolização de contaminantes pelo organismo animal e excreção sob a forma hidrossolúvel no leite. Assim, a principal fonte de contaminantes, como as micotoxinas, se dá através da dieta animal. A alimentação do gado bovino é essencialmente composta por alimentos volumosos (baixo teor energético, alto teor de fibra ou água, como as pastagens, silagem, feno), concentrados (alto teor energético, como milho, soja, farelos, farinhas de origem animal), minerais e vitaminas. Em criações extensivas, as pastagens respondem por uma grande proporção da dieta, e a ingestão de concentrados é limitada. Em contraste, em criações intensivas, a proporção de concentrado pode chegar a 70 % do consumo diário. Uma consequência direta da complexidade e variedade dos componentes de dietas para ruminantes é o risco a exposição de micotoxinas (FINK-GREMMELS, 2008). Em alimentos concentrados, as principais micotoxinas encontradas são aflatoxinas, fumonisinas, zearalenona, tricotecenos e alcalóides do ergot. Já nas pastagens, encontram-se lolitremos, paspalitremos, penitrem A, ergovalina, alcalóides do ergot e tricotecenos.

A conservação de forragens na forma de silagem é a prática mais difundida pelo mundo para suplementação volumosa de ruminantes. As plantas utilizadas para esse fim compreendem leguminosas e gramíneas tais como alfafa, capins tropicais e de clima temperado, cana de açúcar, milho,

sorgo, entre outras (NOVINSKI, 2013; SCUDAMORE; LIVESEY, 1998).

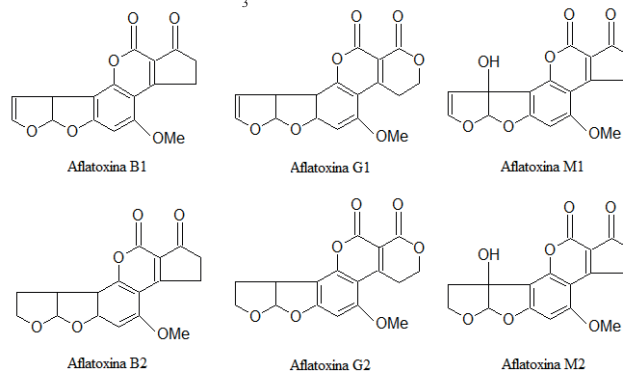
O processamento da silagem é baseado no princípio de conservação em condições anaeróbicas e desenvolvimento de bactérias ácido lácticas – BAL, que promovem uma fermentação natural, diminuindo o pH em níveis onde não haverá desenvolvimento de *Clostridium* spp. As condições associadas a uma silagem bem preservada, ou seja, baixo pH e anaerobiose, também são desfavoráveis ao crescimento da maioria dos fungos. A exclusão do ar assegura que fungos serão incapazes de crescer e sobreviver sob essas condições. Na realidade, a presença de fungos na silagem é indesejável, já que eles não apenas degradam açúcares e ácido lático, mas também metabolizam celulose e outros componentes da parede celular e podem produzir micotoxinas (SCUDAMORE; LIVESEY, 1998).

Poucos fungos anaeróbicos e leveduras são capazes de se desenvolver na silagem. A maioria de *Fusarium* spp. associado ao milho e pastagens no campo são aeróbicos, incapazes de crescer na silagem. *Geotrichum candidus* já foi observado (PELHATE, 1974), sendo responsável pelo desenvolvimento de micoses, sem produção de metabólitos tóxicos. Este fungo produz metabólitos com odor de ranço, que repelem os animais de consumi-lo, prevenindo exposição ao alimento estragado. *Aspergillus fumigatus*, *Byssoschlamys nivea*, *Monascus* spp., *Penicillium roquefortii* e *Trichoderma* spp. são os fungos isolados com maior frequência em silagens (CRUZ, 2012). As principais micotoxinas encontradas em silagens incluem aflatoxinas, especialmente AFB₁, além de ocratoxina A, fumonisinas B, tricotecenos como desoxinivalenol, e gliotoxina, entre outros (ALONSO *et al.*, 2013).

2.2 Aflatoxinas

Aflatoxinas são metabólitos tóxicos produzidos por fungos, especialmente *Aspergillus flavus* e *A. parasiticus*, e podem ser encontradas em diversos alimentos destinados tanto ao consumo humano quanto ao consumo animal. São conhecidos, atualmente, 20 compostos análogos de aflatoxina, porém, os principais de interesse médico-sanitário são B₁, B₂, G₁ e G₂ (Figura 1, HUSSEIN; BRASEL, 2001).

Figura 1: Estrutura química das principais aflatoxinas encontradas em alimentos. Me = CH₃.



As principais aflatoxinas recebem a denominação por letras, em razão da fluorescência emitida por estas substâncias, sendo observadas sob luz ultravioleta nas cores azul (*blue* – B) e verde (*green* – G). Aflatoxina B₁ (AFB₁) é o hepatocarcinógeno mais potente conhecido em mamíferos, sendo também a aflatoxina mais frequente. A toxicidade manifesta-se pela mutagenicidade, carcinogenicidade e teratogenicidade, dependendo da dose e tempo de exposição (ELLIS *et al.*, 1991). Efeitos agudos causam danos estruturais e funcionais no fígado devido à necrose celular, hemorragia, lesões, fibrose e cirrose. Adicionalmente, desencadeiam imunossupressão, infecção no trato respiratório inferior, hemorragia gastrointestinal, indisposição e febre. Exposição crônica a aflatoxinas pode resultar em câncer hepático, bem como carcinomas em rim, pulmão, cólon e sistema nervoso (BINDER *et al.*, 2007). A toxicidade das aflatoxinas segue a seguinte ordem: B₁ > M₁ > G₁ > B₂ > G₂ = M₂ (JAY, 2005).

O fígado é o órgão-alvo da ação das aflatoxinas, e o carcinoma hepatocelular - CHC, por sua etiologia multifatorial, pode ser influenciado pela co-exposição às aflatoxinas e ao vírus da hepatite B - VHB. Estudos epidemiológicos e modelos em animais têm demonstrado evidências de que estes dois fatores atuam sinergicamente, aumentando o risco de desenvolvimento de CHC (OLIVEIRA; GERMANO, 1997; YEH *et al.*, 1998; TURNER *et al.*, 2002). O mecanismo molecular para a indução do CHC, induzido por AFB₁, tem sido extensivamente estudado e demonstrou-se estar associado à mutação específica do códon 249 do p53, um supressor tumoral que acredita-se regular a expressão do microRNA (YANG *et al.*, 2014).

A exposição às aflatoxinas durante o desenvolvimento intrauterino foi avaliada pela quantificação do aduto aflatoxina-albumina (Af-Alb) em gestantes na Gâmbia, África. Observou-se um forte efeito da exposição materna durante a gestação, no crescimento (peso e altura) das crianças durante o primeiro ano de vida (TURNER *et al.*, 2007). Em revisão publicada por Khlangwiset, Shephard e Wu (2011), os autores associam o consumo de alimentos contaminados por aflatoxinas, entre outros fatores, ao retardo no crescimento de crianças, especialmente em países da África e da Ásia. Contudo, o mecanismo exato pelo qual aflatoxinas causam prejuízos no desenvolvimento de crianças ainda não está esclarecido.

Em geral, ruminantes são menos suscetíveis que outras espécies animais aos efeitos tóxicos associados à exposição a micotoxinas (WHITLOW; HAGLER; DIAZ, 2010). Isto ocorre devido à capacidade da microbiota ruminal em converter uma série de micotoxinas em compostos menos potentes ou mesmo biologicamente inativos a certos níveis de exposição.

O consumo de ração contaminada por AFB₁, pelo gado leiteiro, pode levar à excreção de aflatoxina M₁ (AFM₁, Figura 1) no leite, um produto de biotransformação hepática. A ingestão de aflatoxina B₂ (AFB₂) promove a metabolização

à aflatoxina M₂ (AFM₂, Figura 1). Segundo Fink-Gremmels (2008), parte da AFB₁ é degradada no rúmen, resultando na formação de aflatoxicol. A fração restante é absorvida pelo trato digestivo por difusão passiva, sendo hidroxilada no fígado, em AFM₁. Por sua vez, AFM₁ é conjugada com ácido glicurônico e excretada via bile ou transferida para o sistema circulatório. A AFM₁ circulante pode ser excretada na urina ou no leite.

De acordo com Bando *et al.* (2007), AFM₁ pode ser considerada um biomarcador da exposição humana à AFB₁, sendo que níveis urinários de AFM₁ possuem boa correlação com a dose de exposição de AFB₁. Em Piracicaba-SP, Romero *et al.* (2010) avaliaram os níveis de AFM₁ na urina de 69 doadores e detectaram esta toxina em 65% dos pacientes, em níveis variando entre não detectado e 0,04 µg/L, indicando a exposição desta população à AFM₁.

A concentração de AFM₁ encontrada no leite está altamente correlacionada com o nível de AFB₁ na ração (BAKIRCI, 2001). Estudos realizados com oito rebanhos diferentes, contendo entre uma e dez vacas, indicam que níveis de 300 µg/kg de AFB₁ na ração podem resultar em 1 µg/L de AFM₁ no leite (STOLOFF, 1980). AFM₁ pode ser encontrada no leite entre 12 e 24 h após a ingestão de AFB₁ (STOLOFF, 1977), e atinge níveis não detectáveis de 4 a 5 dias após a remoção da ração contaminada, independente dos níveis iniciais (STOLOFF, 1980).

A carcinogenicidade de AFM₁ é quase tão elevada quanto à de AFB₁ e suas propriedades toxicológicas são comparáveis (CREPPY, 2002). AFM₁ foi inicialmente classificada pela International Agency for Research on Cancer - IARC como possivelmente carcinogênica para humanos (Grupo 2B, IARC, 1993), mas foi reclassificada no Grupo 1: agente carcinogênico para humanos (IARC, 2012). Por essa razão, diversos países têm estabelecido limites máximos aceitáveis para presença de AFM₁ em leite e produtos lácteos. A legislação brasileira, através da Resolução RDC nº 7, de 18 de fevereiro de 2011 (BRASIL, 2011), limita a presença de AFM₁ a 0,5 µg/kg em leite fluido, 5 µg/kg em leite em pó e 2,5 µg/kg em queijos.

A preocupação sanitária acerca da contaminação do leite por AFM₁ se deve ao fato de que o leite pode constituir o principal nutriente de crianças em desenvolvimento, estágio mais vulnerável para indução de carcinogênese, assim, a exposição aos carcinógenos inevitáveis deve ser mantida nos menores níveis possíveis.

2.3 Níveis de aflatoxina M₁ em produtos lácteos

No Brasil, alguns trabalhos têm levantado os níveis de AFM₁ em leite e produtos lácteos. Em estudo como de Garrido *et al.* (2003), Oliveira *et al.* (2006); e Shundo *et al.* (2009), foi observada elevada frequência da toxina (79%; 82%; 95%, respectivamente), encontrada em baixas concentrações. Em trabalhos mais recentes (JAGER *et al.*, 2013; OLIVEIRA *et al.*, 2013), uma menor frequência foi observada (40%; 30%, respectivamente), com níveis abaixo do limite máximo

estabelecido pela legislação brasileira. No estado Paraná, Sassahara, Ponte Netto e Yanaka (2005) avaliaram 42 amostras de leite cru e encontraram 24% de amostras positivas, sendo que 7% apresentaram níveis de AFM₁ superiores a 0,5 µg/L, valor acima do máximo permitido pela legislação (BRASIL, 2011). No entanto, Baggio (2006) não observou nenhuma amostra com níveis superiores ao limite estabelecido pela legislação, nas 40 amostras de leite pasteurizado paranaenses analisadas (57,5% de amostras positivas). No Oeste do Paraná, Becker *et al.* (2010) avaliaram AFM₁ em amostras de leite informal, leite pasteurizado homogeneizado, leite esterilizado - UHT e leite em pó. De 20 amostras analisadas, três apresentaram níveis de contaminação acima do limite de quantificação do método, sendo que nenhuma estava acima do limite máximo permitido pela legislação.

Em amostras de leite cru coletadas em Minas Gerais, Picinin *et al.* (2013) analisaram os níveis de AFM₁ em três diferentes períodos do ano: seco (precipitação pluviométrica de 7,9 mm e temperatura média de 19,3 °C), transição (100,3 mm e 20,3 °C) e chuvoso (187,6 mm e 22,3 °C). Os autores observaram níveis de AFM₁ superiores no período seco (0,036 µg/L), seguido pelo período de transição (0,017 µg/L) e período chuvoso (0,006 µg/L). Os autores justificaram as diferenças em razão da alimentação fornecida aos animais nos diferentes períodos. Durante o período seco, rações suplementares foram fornecidas para o gado em confinamento. Durante o período de transição, o gado era mantido sob confinamento e sob pastoreio. No entanto, durante o período chuvoso, quando os animais são geralmente livres para a pastagem, o risco de contaminação diminuiu.

Uma vez presente no leite, AFM₁ é resistente ao tratamento térmico, como pasteurização ou esterilização (GALVANO *et al.*, 1998). Por essa razão, o risco permanece não somente no leite disponível comercialmente, mas também nos seus produtos derivados. Também não é degradada no processamento para fabricação de queijo ou iogurte (STOLOFF, 1980; STUBBLEFIELD; SHANNON, 1974; VAN EGMOND *et al.*, 1977).

AFM₁ também tem sido detectada em produtos derivados do leite. Em amostras de leite em pó coletadas em 2012, na Argentina e no Brasil, por García Londoño *et al.* (2013), níveis médios similares de AFM₁ foram observados nos dois países (Argentina – 0,41 µg/kg; Brasil – 0,35 µg/kg). Todas as 28 amostras analisadas no estudo estavam contaminadas. Amostras de leite em pó coletadas no Rio Grande do Sul entre 2008 e 2010, por Oliveira (2010), apresentaram níveis médios de AFM₁ de 0,54 µg/L, com frequência de 100% (50 amostras).

Iha *et al.* (2011) analisaram amostras de queijo (58), iogurte (53) e bebidas lácteas (12) coletadas em 2010. AFM₁ foi detectada em 84% das amostras de queijo, sendo 67% com níveis entre 0,01 e 0,30 µg/kg, enquanto que 95% das amostras de iogurte e bebida láctea apresentaram AFM₁, com níveis variando de 0,01 a 0,53 µg/kg em 72% das amostras.

2.4 Controle de AFB₁ e AFM₁ por bactérias lácticas

Além da importância como contaminante alimentar e dos efeitos tóxicos que podem causar, as aflatoxinas também apresentam importância industrial, devido à perdas econômicas resultantes da condenação de safras, defeitos na produção de queijos e problemas de crescimento e eficiência alimentar em animais que consomem rações contaminadas (HASKARD *et al.*, 2001). Com isso, é grande a demanda por estratégias que previnam tanto a formação de aflatoxinas nos alimentos e rações, na tentativa de redução do impacto da contaminação existente, quanto a sua remoção em produtos já contaminados. Neste contexto, diversos trabalhos (CORASSIN *et al.*, 2013; EL-NEZAMI *et al.*, 1998; EL-KHOURY, ATOUI; YAGHI, 2011; HASKARD *et al.*, 2001; LAHTINEN *et al.*, 2004; PELTONEN *et al.*, 2001; OATLEY *et al.*, 2000) abordaram o efeito de bactérias ácido lácticas (BAL) no controle de contaminação de AFB₁ e AFM₁.

O mecanismo de remoção de aflatoxinas por BAL ainda é desconhecido, mas trabalhos indicam que estes compostos se ligam à parede celular bacteriana, e não são metabolicamente degradados (CORASSIN *et al.*, 2013; EL-NEZAMI *et al.*, 1998; LAHTINEN *et al.*, 2004). Haskard *et al.* (2001) sugerem que AFB₁ é ligada à bactéria através de interações não-covalentes fracas, como associação com regiões hidrofóbicas da superfície bacteriana.

Os estudos teóricos de Oatley *et al.* (2000) demonstraram que a remoção de AFB₁ não ocorre somente pela ligação da toxina com o *pellet* bacteriano durante a centrifugação, havendo ligação reversível de AFB₁ com sítios ativos da parede celular bacteriana. Peltonen *et al.* (2001) avaliaram o potencial de ligação de diversas cepas de BAL e bifidobactérias com AFB₁. Os autores observaram que todas as cepas estudadas foram capazes de ligação com AFB₁, mas em extensões diferentes, provavelmente devido às diferenças na parede celular bacteriana e estrutura do envelope celular. No entanto, esta ligação é reversível, havendo liberação gradual de AFB₁ pelo complexo após algumas lavagens aquosas. El-Khoury *et al.* (2011) observaram diferenças na redução de AFM₁ por *Lactobacillus bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus*, isolados e em associação, corroborando que a estrutura da parede celular é crucial para ligação de aflatoxinas.

El-Khoury *et al.* (2011) também estudaram a capacidade de ligação de AFM₁ por *Lactobacillus bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus* durante a fabricação de iogurte. Quando as BAL foram cultivadas em tampão PBS e leite desnatado, a ligação foi superior em leite. A razão principal é a propriedade de ligação da AFM₁ à caseína do leite. Brackett e Marth (1982) reportaram uma maior quantidade de AFM₁ em leite tratado com enzimas proteolíticas do que no leite não tratado, sugerindo que AFM₁ se liga à proteína do leite. Pierides *et al.* (2000) observaram que bactérias *starter* utilizadas na fabricação de queijos tinham capacidade de inativar AFM₁ através da ligação entre elas.

Além das BAL, estudos também têm sido realizados com leveduras, como *Saccharomyces cerevisiae*. Corassin *et al.* (2013) observaram redução dos níveis de AFM₁ em leite UHT desnatado, da ordem de 100%, quando *S. cerevisiae* foi utilizado juntamente com BAL (*Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus*, *L. rhamnosus* e *Bifidobacterium lactis*). Quando utilizadas apenas as BAL, a redução foi da ordem de 11%.

Estudo realizado por Fernandes *et al.* (2012) investigou a transferência de AFM₁ do leite para queijo Minas frescal, fabricado com leite contendo a micotoxina (0,25 e 0,50 µg/L). Observou-se que a passagem de AFM₁ variou entre 30 e 40 % da concentração original encontrada no leite, havendo uma concentração de até 2,5 vezes. No entanto, é importante salientar que os níveis encontrados em queijo foram inferiores ao limite máximo estabelecido pela Legislação Brasileira (2,5 µg/kg; BRASIL, 2011). O uso de cultura *starter* (*Lactococcus lactis* spp. *lactis* e *L. lactis* spp. *cremoris*, 1:1) não influenciou na concentração ou na estabilidade de AFM₁ nos queijos, após 30 dias de estocagem.

3 Conclusão

Devido à toxicidade da aflatoxina M₁ e sua inevitável biotransformação hepática nos animais, a melhor forma de prevenir a contaminação do leite por esta substância é evitar a oferta de rações contaminadas com aflatoxina B₁. Os produtos lácteos brasileiros apresentam contaminação por aflatoxina M₁, mas, em geral, em níveis inferiores ao estabelecido pela legislação brasileira. Uma das formas de diminuir os níveis de aflatoxina M₁ em produtos lácteos é o uso de bactérias ácido lácticas, que promovem ligação com essa substância e redução da sua exposição.

Referências

ALONSO, V.A. *et al.* Fungi and mycotoxins in silage: an overview. *J. Appl. Microbiol.*, v.115, n.3, p.637-643, 2013.

AMIOT, J. *Ciencia y tecnología de la leche*. Zaragoza: Acribia, 1991.

BAGGIO, E.C.M. *Determinação de aflatoxina M₁ em leite pasteurizado pelos métodos de CCD e CLAE utilizando coluna de imunoafinidade*. 2006. 95f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

BAKIRCI, I. A study on the occurrence of aflatoxin M₁ in milk and milk products produced in Van province of Turkey. *Food Control.*, v. 12, p. 41-51, 2001.

BANDO, E. *et al.* Biomarcadores para avaliação da exposição humana às micotoxinas. *J. Bras. Patol. Méd. Lab.*, v. 43, n. 3, p.175-180, 2007.

BECKER, T.A. *et al.* Avaliação da qualidade sanitária de leite integral informal, pasteurizado, UHT e em pó comercializados na cidade de Medianeira e Serranópolis do Iguauçu – Paraná. *Semina: Ciênc. Agrár.*, v. 31, n. 3, p.707-716, 2010.

BINDER, E.M. *et al.* Worldwide occurrence of mycotoxins in commodities, feeds and feed ingredients. *Anim. Feed Sci. Technol.*, v.137, p.265-282, 2007.

BRACKETT, R.E.; MARTH, E.H. Association of aflatoxin M₁ with casein. *Zeitschrift Lebensmittel-Untersuchung Forschung*, v.174, p.439-441, 1982.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, *RDC n° 7, de 18 de fevereiro de 2011*. Dispõe sobre limites máximos tolerados para micotoxinas em alimentos. 2011.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Secretaria de Defesa Agropecuária. *Portaria n° 50, de 20 de fevereiro de 2006*. Programas de Controle de Resíduos em Carne (Bovina, Aves, Suína e Equina), Leite, Mel, Ovos e Pescado, 2006.

CORASSIN, C.H. *et al.* Efficiency of *Saccharomyces cerevisiae* and lactic acid bacteria strains to bind aflatoxin M₁ in UHT skim milk. *Food Control.*, v. 31, n. 1, p.80-83, 2013.

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

CRUZ, L.C.H. *Micotoxinas na criação de ruminantes*. 2012. Disponível em: <http://pt.engormix.com/MA-pecuaria-corte/administracao/artigos/micotoxinas-criacao-ruminantes-t1036/124-p0.htm>. Acesso em: 23 jan. 2014.

EL-KHOURY, A.; ATOUI, A.; YAGHI, J. Analysis of aflatoxin M₁ in milk and yogurt and AFM₁ reduction by lactic acid bacteria used in Lebanese industry. *Food Control.*, v.22, n.10, p.1695-1699, 2011.

ELLIS, W.O. *et al.* Aflatoxins in food: Occurrence, biosynthesis, effects on organisms, detection, and methods of control. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, v.30, n.4, p.403-439, 1991.

EL-NEZAMI, H.S. *et al.* Physicochemical alterations enhance the ability of dairy strains of lactic acid bacteria to remove aflatoxin from contaminated media. *J. Food. Prot.*, v. 61, p.446-448, 1998.

FERNANDES, A.M. *et al.* Distribution and stability of aflatoxin M₁ during processing and storage of Minas Frescal cheese. *Food Control.*, v. 24, n.1/2, p.104-108, 2012.

FINK-GREMMELS, J. Mycotoxins in cattle feeds and carry-over to dairy milk: A review. *Food Addit. Contam.*, v. 25, n. 2, p. 172-180, 2008.

GALVANO, F. *et al.* Survey of the occurrence of aflatoxin M₁ in dairy products marketed in Italy. *J. Food Prot.*, v. 61, p.738-741, 1998.

GARCÍA LONDOÑO, V.A. *et al.* Aflatoxin M₁ survey on randomly collected milk powder commercialized in Argentina and Brazil. *Food Control.*, v. 34, n. 2, p.752-755, 2013.

GARRIDO, N.S. *et al.* Occurrence of aflatoxins M₁ and M₂ in milk commercialized in Ribeirão Preto-SP, Brazil. *Food Addit. Contam.*, v.20, n.1, p.70-73, 2003.

HASKARD, C. *et al.* Surface binding of aflatoxin B₁ by lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 67, p.3086-3091, 2001.

HECK, M.C. *et al.* Estimation of children exposure to organochlorine compounds through milk in Rio Grande do Sul, Brazil. *Food Chemistry*, v. 102, p.288-294, 2007.

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

IARC. International Agency for Research on Cancer. *IARC Monogr. Eval. Carcinog. Risks Hum.*, v. 100F, 2012.

IARC. International Agency for Research on Cancer. Some naturally occurring substances: Food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. *IARC Monogr. Eval. Carcinog. Risks Hum.*, v.56, p.19-23, 1993.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. *Censo Agropecuário 2006*. 2006. Disponível em: <www.ibge.gov.br>. Acesso em: 12 fev. 2014.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. *Estatística da Produção pecuária, junho de 2013*. 2013. Disponível em: <<http://>

- www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/producaoagropecuaria/abate-leite-couro-ovos_201301_publica_completa.pdf>. Acesso em: 12 fev. 2014.
- IHA, M.H. *et al.* Occurrence of aflatoxin M₁ in dairy products in Brazil. *Food Control*, v. 22, n. 12, p.1971–1974, 2011. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.05.013>
- JAGER, A.V. *et al.* Assessment of aflatoxin intake in São Paulo, Brazil. *Food Control*, v.33, p.1-6, 2013.
- JAY, J. M. *Microbiologia de alimentos*. Porto Alegre: Artmed, 2005.
- KHLANGWISSET, P.; SHEPHARD, G.S.; WU, F. Aflatoxins and growth impairment: a review. *Crit. Rev. Toxicol.*, v. 41, n.9, p.740-755, 2011.
- KUIPER-GOODMAN, T. Mycotoxins: risk assessment and legislation. *Toxicol. Lett.*, v.82/83, p.853-859, 1995.
- LAHTINEN, S.J. *et al.* Binding of aflatoxin B1 to cell wall components of *Lactobacillus rhamnosus* strain GG. *Food Addit. Contam.*, v.21, p.158-164, 2004.
- LEITEBRASIL. Após atingir o patamar, preço do leite ainda ETA alto. 2013. Disponível em: <<http://leitebrasil.com.br/siteblog/category/blog/todas/>>. Acesso em: 13 fev. 2014.
- NOVINSKI, C.O. *Composição de micotoxinas e bromatologia de silagens de milho em silos de grande porte utilizando imagens em infravermelho*. 2013. 85f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2013.
- OATLEY, J.T. *et al.* Binding of aflatoxin B1 to bifidobacteria in vitro. *J. Food Prot.*, v. 63, p.1133-1136, 2000.
- OLIVEIRA, C.A.F.; ROSMANINHO, J.; ROSIM, R. Aflatoxin M₁ and cyclopiazonic acid in fluid milk traded in São Paulo, Brazil. *Food Add. Contam.*, v.23, n.2, p.196-201, 2006.
- OLIVEIRA, C.A.F.; GERMANO, P.M.L. Aflatoxinas: conceitos sobre mecanismos de toxicidade e seu envolvimento na etiologia do câncer hepático celular. *Rev. Saúde Pública*, v.31, n.4, p.417-424, 1997.
- OLIVEIRA, C.P. *et al.* Aflatoxin M₁ occurrence in ultra high temperature (UHT) treated fluid milk from Minas Gerais/Brazil. *Food Control*, v.30, n.1, p.90-92, 2013.
- OLIVEIRA, M.S. *Validação de metodologia analítica para análise de aflatoxina M₁ e sua ocorrência em leite bovino comercializado no sul do Brasil*. 2010. 105f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2010.
- PELHATE, J. Mycoflore des mais-humides, déterminisme de son évolution. *Rev. Microbiol.*, v. 29, p.65-95, 1974.
- PELTONEN, K. *et al.* Aflatoxin B₁ binding by dairy strains of lactic acid bacteria and bifidobacteria. *J. Sci. Dairy*, v. 48, p.2152-516, 2001.
- PICININ, L.C.A. *et al.* Influence of climate conditions on aflatoxin M₁ contamination in raw milk from Minas Gerais State, Brazil. *Food Control*, v.31, n.2, p.419-424, 2013.
- PICININ, L.C.A. *Resíduos de produtos de uso veterinário e contaminantes em leite*. 2013. 172f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2013.
- PIERIDES, M. *et al.* Ability of dairy strains of lactic acid bacteria to bind aflatoxin M₁ in a food model. *J. Food Pro.*, v. 63, p.645-650, 2000.
- ROMERO, A.C. *et al.* Occurrence of AFM₁ in urine samples of a Brazilian population and association with food consumption. *Food Control*, v.21, p.554-558, 2010.
- 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 Paraná State. *Food Chem. Toxicol.*, v. 43, p.981-984, 2005.
- SCUDAMORE, K.A.; LIVESE, C.T. Occurrence and significance of mycotoxins in forage crops and silage: a review. *J. Sci. Food Agric.*, v. 77, p.1-17, 1998.
- SHUNDO, L. *et al.* Estimate of aflatoxin M₁ exposure in milk and occurrence in Brazil. *Food Control*, v. 20, p.655–657, 2009.
- STOLLOFF, L. Aflatoxin M₁ in perspective. *J. Food Prot.*, v. 43, p.226-230, 1980.
- STOLOFF, L. *Aflatoxins: an overview*. In: PROCEEDINGS OF A CONFERENCE ON MYCOTOXINS IN HUMAN AND ANIMAL HEALTH. Pathotox Publishers Inc., Park Forest South, Illinois, p. 7–28, 1977.
- STUBBLEFIELD, R.D.; SHANNON, G.M. Aflatoxin M₁ analysis in dairy products and distribution in dairy foods made from artificially contaminated milk. *J. AOAC Int.*, v.57, p.847-851, 1974.
- TURNER, P.C. *et al.* Aflatoxin exposure in utero causes growth faltering in Gambian infants. *Int. J. Epidemiol.*, v.36, p.1119-1125, 2007.
- TURNER, P.C. *et al.* The role of aflatoxins and hepatitis viruses in the etiopathogenesis of hepatocellular carcinoma: a basis for primary prevention in Guinea-Conakry, West Africa. *J. Gastroenterol. Hepatol.* v.17, p.441-448, 2002.
- VAN EGMOND, H.P. *et al.* The effect of processing on the aflatoxin M₁ content of milk and milk products. *Arch. l'Institute Pasteur*, v.54, p.381, 1977.
- WHITLOW, L.W.; HAGLER JR, W.M.; DIAZ, D.E. Mycotoxins in feeds. *Feestuffs*, v.15, p.74-84, 2010.
- YANG, W. *et al.* Genome-wide miRNA-profiling of aflatoxin B1-induced hepatic injury using deep sequencing. *Toxicol. Lett.*, v.226, n.2, 2014.
- YEH, F.S. *et al.* Hepatitis B virus, aflatoxins, and hepatocellular carcinoma in Southern Guangxi, China. *Cancer Res.*, v.49, p.2506-9, 1989.