



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE - FURG
ESCOLA DE QUÍMICA E ALIMENTOS – EQA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM QUÍMICA TECNOLÓGICA E AMBIENTAL - PPGQTA**

**OCORRÊNCIA DE AFLATOXINAS B₁ e M₁ EM LEITE
EM PÓ E UAT, CONSUMIDO EM CABO VERDE E REGIÃO
SUL DO BRASIL**

Keven David Moreira Gonçalves

PPGQTA

Rio Grande, RS - Brasil

2018

Ocorrência de aflatoxinas B₁ e M₁ em leite em pó e UAT, consumido em Cabo Verde e Região Sul do Brasil

Elaborado por:

Keven David Moreira Gonçalves

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química Tecnológica e Ambiental da Universidade Federal do Rio Grande (RS), como requisito parcial para obtenção do título de Mestre EM QUÍMICA.

PPGQTA

Rio Grande, RS - Brasil

2018

Universidade Federal do Rio Grande - FURG

Escola de Química e Alimentos

Programa de Pós-Graduação em Química
Tecnológica e Ambiental

Ocorrência de aflatoxinas B₁ e M₁ em leite em pó e UAT, consumido em Cabo Verde e região sul do Brasil

Elaborada por:

Keven David Moreira Gonçalves

Como requisito parcial para a obtenção do título de
Mestre em Química

Profa. Dr. Jaqueline Garda Buffon (Universidade Federal do Rio Grande – RS)

Profa. Dra. Eliana Badiale Furlong (Universidade Federal do Rio Grande – RS)

Dra. Priscila Scaglioni (Universidade Federal de Pelotas - RS)

Dra. Larine Kupsk (Universidade Federal do Rio Grande do Sul - RS)

Rio Grande, 28 de Fevereiro de 2018

Dedico:

A memória e a vida da minha mãe Joana Moreira.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a **Deus Pai Todo Poderoso**, pela benção de viver, onde o Teu amor cobriu minhas fraquezas e a Tua fidelidade é maior do que todos os obstáculos da minha vida. Obrigado meu Senhor!

À minha **mãe Joana**, agradeço por ter sido mãe e pai ao mesmo tempo, por sempre me manter focado nos estudos, motivando e ensinando. Queria eu que existissem mais e melhores palavras para que pudesse com maior justiça lhe agradecer e prestar a devida homenagem. Mãe, você me trouxe ao mundo, a você eu devo tudo, e julgo que até a própria vida. Pois se não tivesse sido resgatado pelo seu coração de tamanho e generosidade infinitas, talvez eu não estivesse aqui. A saudade ainda é tamanha mas o meu carinho e amor por você terá sempre a capacidade de alcançar as grandes conquistas. Eterno descanso mãe amada.

À minha **irmã Nádia**, por me apoiar sempre mostrando disponibilidade em me ajudar sempre que eu precisava, me motivando nas minhas decisões, se hoje cheguei até aqui foi graças a ti, pois foste a primeira pessoa a me incentivar a vir para o Brasil. Obrigado “maninha” te amo muito.

Ao meu **filho Nathan**, por ter resgatado a alegria de viver, servindo de motivação nos momentos crucias. À **Tairine Andrade** por ter me dado um filho tão amado. Essa conquista é para você meu filho!

À minha **família “Moreira”**, especialmente **Emanuel, Pedro, Odete, Maria Daluz, Alfredo, José, Milton e Anderson** por todo apoio e suporte durante toda a minha vida.

À minha orientadora **Prof. Jaqueline Garda Buffon** pela orientação durante estes dois anos de LAMCA. Agradeço por todas as oportunidades, ensinamentos, conselhos, apoio, mostrando uma enorme disponibilidade em ajudar na minha adaptação aqui no Brasil, agradeço pela confiança em meu trabalho, sempre me motivando e acreditando que eu era capaz. Muito obrigada professora!

À Prof. **Eliana Badiale Furlong**, agradeço pelas inúmeras contribuições durante a minha estadia no LAMCA. Prof. muito obrigada por me acolher no seu laboratório, por toda a torcida e carinho.

À Prof. **Ednei Gilberto Primel**, palavra alguma pode descrever a gratidão que sinto pela devota dedicação empenhada em nós deixar o mais confortável possível estando longe do nosso País. Obrigado por tudo professor!

À **Larine Kupski**, agradeço pelas contribuições no exame de qualificação e pelas várias ajudas na elaboração da dissertação.

À minha nova **família LAMCA**, agradeço a todos vocês que também me receberam de braços abertos. Agradeço a **Sabrina** por ter sido a pilar da minha adaptação no LAMCA e por toda ajuda durante os dois anos. À **Karen “Colombina”** por ser minha parceria do leite, por ter animado cada segundo, minuto e dias. Ao **Rafael “Uruguaio”** por ser um irmão e companheiro das cervas nos botecos. À **Priscila** por ter me mostrado o lado bom do Rio grande e por ser uma amiga de coração, obrigada por tudo “Pri”. À **Ana** pela grande ajuda durante todo o meu mestrado, “Aninha” palavras são poucas por tudo que fizeste por mim. À **Kelly, Marina e Taiana**, obrigado por me ajudarem nos momentos que eu precisava, levo vocês no meu coração. À **Veronica e Wesclen** apesar de serem novos na família demonstram ser grandes amigos. À **Maristela** por toda ajuda no laboratório e por ter me dado a chance de chegar cedo no laboratório, obrigado pelas caronas Maris. Ao **Manuel** pelas aulas de estatística. À **Anelise** por todo apoio e encorajamento.

À **Carol, Jacky e Sol** agradeço pela torcida e carinho. Fizeram de vossa família a minha também e me presentaram com um ambiente alegre. Jamais poderei esquecer, refeições deliciosas e dadas de coração. Um teto em comum, sorrisos e bons momentos.

À Prof. **Sandra Freire**, agradeço pela oportunidade que me deu, por tudo que aprendi com você. Agradeço por sempre ter me tratado com respeito e igualdade. Agradeço pela pessoa e profissional extraordinários que você é.

À **Dayana, Alaides, Sônia e Julson**, agradeço por me acolheram com todo o afeto, como se fosse um irmão, pelos momentos engraçados acompanhados com alta risadas, obrigado por tudo.

À “**Detroit La Grand Familia**” sou muito grato por termos "jogado a âncora" e fixado esta amizade, para sempre!

À **Rosane**, secretária do PPGQTA, agradeço por todos os esclarecimentos e atenção dispensada quando necessário.

À **FURG** pela oportunidade, por proporcionar um ensino gratuito e de qualidade. Aos **professores do Programa de Pós-Graduação em Química Tecnológica e Ambiental**, os quais contribuíram para a minha formação acadêmica.

E por fim, agradeço a todos que torceram por mim. Obrigada!!!

*Os Homens perdem a saúde para juntar dinheiro,
depois perdem o dinheiro para recuperar a saúde.
E por pensarem ansiosamente no futuro esquecem do presente
de forma que acabam por não viver nem no presente
nem no futuro. Vivem como se nunca fossem morrer
e morrem como se nunca tivessem vivido.*

“Dalai Lama”

RESUMO

Título: Ocorrência de aflatoxinas B₁ e M₁ em leite em pó e UAT consumido em Cabo Verde e região sul do Brasil

Autor: Keven David Moreira Gonçalves

Orientadora: Jaqueline Garda Buffon

As aflatoxinas compõem uma importante classe de micotoxinas, devido a sua presença e magnitude de contaminação em alimentos destinados ao consumo humano e animal. A partir da observação de que mamíferos que consomem ração contaminada com AFLAB₁ (aflatoxinas B₁) podem excretar AFLAM₁ (aflatoxinas M₁) em seu leite, faz-se necessário o desenvolvimento de métodos seguros e confiáveis para análise e controle deste contaminante. Neste trabalho foi validado um método para análise de AFLAM₁ e AFLAB₁ em leite UAT (ultra alta temperatura) integral, desnatado, semidesnatado, em pó e para uso infantil, comercializados em Rio Grande – RS (Brasil) e na Cidade de Assomada (Cabo Verde), baseado no método de QuEChERS e CLAE – FD (cromatografia líquida de alta eficiência com detecção de fluorescência). Para quantificar os níveis de aflatoxinas nas amostras usou-se uma curva de calibração na matriz, onde o efeito da matriz foi 61% e 96% para AFLAM₁ e AFLAB₁, respectivamente. Os LD_m e LQ_m (limite de detecção e quantificação do método) foram 0,013 e 0,043 ng mL⁻¹ para AFLAM₁, 0,06 e 0,10 ng mL⁻¹ para AFLAB₁, respectivamente. Os valores de recuperação para o método de extração das aflatoxinas foram de 100 - 105%, para AFLAM₁ e 89 - 120% para AFLAB₁. Em seguida ao desenvolvimento e validação do método analítico, foi realizado um estudo de ocorrência de aflatoxinas em amostras de leite fluido e de leite em pó. Um total de 112 amostras de diferentes marcas foram coletadas, sendo que as amostras de Rio grande – RS (Brasil) foram 26 amostras de leite UAT integral, 11 de leite desnatado, 12 de leite semidesnatado, 10 de leite em pó integral, 3 de leite em pó para uso infantil e 50 amostras de leite em pó integral, de três marcas diferentes oriundas da cidade de Assomada (Cabo Verde). Nas amostras de leites comercializadas na cidade de Rio Grande (RS), foi encontrada contaminação por AFLAM₁ em 68% das amostras em uma faixa de 0,04 – 3,67 ng mL⁻¹, onde 42% destas amostras excederam o LMT pelo Brasil (0,5 ng mL⁻¹). Para AFLAB₁ verificou-se uma contaminação em 24% das amostras em uma faixa de concentração de 0,1 – 0,6 ng mL⁻¹. Para as 50 amostras de leites em pó comercializadas em Cabo Verde os níveis de AFLAM₁ determinados foram na faixa de 0,24 – 20,3 µg kg⁻¹, onde 12% da marca I, 38% da marca II, e 83% da marca III, excederam o LMT pela ANVISA. O nível de ingestão diária estimado foi de 1,7 ng kg⁻¹ pc⁻¹ dia⁻¹ e 0,6 ng kg⁻¹ pc⁻¹ dia⁻¹ para AFLAM₁ e AFLAB₁, nas amostras de leite cidade de Rio Grande (RS), enquanto que nas amostras de leite da cidade de Assomada (Cabo Verde) foi de 2,4 ng kg⁻¹ pc⁻¹ dia⁻¹ para AFLAM₁. Conclui-se que o método validado foi adequado para determinação da ocorrência das micotoxinas nas diferentes amostras e que a incidência de AFLAM₁ no leite consumido nas duas regiões é alto, merecendo uma atenção das autoridades locais.

Palavras chave: aflatoxina M₁, aflatoxina B₁, leite, Cabo Verde, Brasil.

ABSTRACT

Title: Occurrence of aflatoxins B₁ and M₁ in milk powder and UAT consumed in Cape Verde and southern Brazil

Author: Keven David Moreira Gonçalves.

Advisor: Jaqueline Garda Buffon.

Aflatoxins make up an important class of mycotoxins, due to their presence and magnitude of contamination in food destined for human and animal consumption. From the observation that mammals that consume rations contaminated with AFLAB₁ (aflatoxins B₁) can excrete AFLAM₁ (aflatoxins M₁) in their milk, it is necessary to develop safe and reliable methods for the analysis and control of this contaminant. In this work a method for the analysis of AFLAM₁ and AFLAB₁ in UHT milk (ultra high temperature), skimmed, semi - skimmed, powdered and for infant use was commercialized in Rio Grande - RS (Brazil) and in the City of Assomada), based on the method of QuEChERS and HPLC - FLD (high performance liquid chromatography with fluorescence detection). To quantify aflatoxin levels in the samples, a calibration curve was used in the matrix, where the matrix effect was 61% and 96% for AFLAM₁ and AFLAB₁, respectively. The LDm and LQm (limit of detection and quantification of the method) were 0.013 and 0.043 ng mL⁻¹ for AFLAM₁, 0.06 and 0.10 ng mL⁻¹ for AFLAB₁, respectively. The recovery values for the aflatoxin extraction method were 100 - 105% for AFLAM₁ and 89 - 120% for AFLAB₁. After the development and validation of the analytical method, a study of the occurrence of aflatoxins in fluid milk and powdered milk samples was carried out. A total of 112 samples of different brands were collected, and the samples from Rio Grande - RS (Brazil) were 26 samples of UHT whole milk, 11 of skimmed milk, 12 of semi-skimmed milk, 10 of whole milk powder, 3 of milk powder for infant use and 50 samples of whole milk powder from three different brands from the city of Assomada (Cape Verde). In the samples of milks commercialized in the city of Rio Grande (RS), AFLAM₁ contamination was found in 68% of the samples in a range of 0.04 - 3.67 ng mL⁻¹, where 42% of these samples exceeded the LMT by Brazil (0.5 ng mL⁻¹). For AFLAB₁ a 24% contamination of the samples was found in a concentration range of 0.1 - 0.6 ng mL⁻¹. For the 50 samples of powdered milks commercialized in Cape Verde, the levels of AFLAM₁ determined were in the range of 0.24 - 20.3 µg kg⁻¹, where 12% of brand I, 38% of brand II, and 83% of brand III, exceeded the LMT by ANVISA. The estimated daily intake level was 1.7 ng kg⁻¹ pc⁻¹ day⁻¹ and 0.6 ng kg⁻¹ pc⁻¹ day⁻¹ for AFLAM₁ and AFLAB₁ in milk samples from the city of Rio Grande (RS), whereas in milk samples from the city of Assomada (Cape Verde) it was 2.4 ng kg⁻¹ pc⁻¹ day⁻¹ for AFLAM₁. It is concluded that the validated method was adequate to determine the occurrence of mycotoxins in the different samples and that the incidence of AFLAM₁ in the milk consumed in both regions is high, deserving attention of the local authorities.

Key words: Aflatoxin M₁, aflatoxin B₁, milk, Cape Verde, Brazil.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Legislação internacional para AFLAM ₁ em leite e derivados lácteos para consumo humano.....	26
Tabela 2 - Ocorrência de contaminação por AFLAs em leite bovino.	27
Tabela 3 - Técnicas para a detecção de AFLAM ₁ em leite e produtos lácteos.	31
Tabela 4 - Características cromatográficas de AFLAM ₁ e AFLAB ₁ no solvente.	43
Tabela 5 - Recuperação das AFLAB ₁ e AFLAM ₁ extraídas do leite pelos vários método.	44
Tabela 6 - Características cromatográficas de AFLAM ₁ e AFLAB ₁ na matriz.....	47
Tabela 7 - Recuperação das AFLAB ₁ e AFLAM ₁ usando curva de calibração na matriz.....	48
Tabela 8 - Incidência de AFLAB ₁ e AFLAM ₁ em diferentes amostras de leite.....	50
Tabela 9 - Análise de variância para AFLAM ₁	55
Tabela 10 - Análise de variância para AFLAB ₁	55

SUMÁRIO

RESUMO	8
ABSTRACT	9
LISTA DE TABELAS	10
SUMÁRIO	11
1. INTRODUÇÃO	13
2. OBJETIVOS	16
2.1. Geral	16
2.2. Específicos	16
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
3.1. Leite	17
3.2. Aflatoxinas	20
3.3. Biotransformação da aflatoxina B₁	22
3.4. Aflatoxina M₁	24
3.4.1. Legislação.....	25
3.4.2. Ocorrência de AFLAM ₁ em leite.....	26
3.4.3. Efeitos do processamento do leite na concentração de AFLAM ₁	28
3.4.4. Métodos para determinação de AFLAM ₁ e AFLAB ₁	30
3.4.4.1. Efeito de Matriz.....	32
4. MATERIAL E MÉTODOS	34
4.1. Material	34
4.1.1. Padrões de AFLAB ₁ e AFLAM ₁	34
4.1.2. Instrumentação e material.....	34
4.1.3. Reagentes e Solventes	35
4.2. Amostragem de leite	35
4.3. Preparo de amostra	37
4.4. Métodos de extração para AFLAB₁ e AFLAM₁ no leite	37

4.4.1.	Procedimento de Extração de AFLAS segundo A.O.A.C (2000)	37
4.4.2.	Procedimento da Extração de AFLAS segundo Anagnostopoulos et al., (2014).	37
4.4.3.	Procedimento da Extração de AFLAS segundo Flores et al., (2017).....	38
4.4.4.	Método de extração de AFLAS segundo Becker-Algeri (2016)	38
4.5.	Análise Cromatográfica	38
4.6.	Validação do Método	39
4.6.1.	Limite de detecção e limite de quantificação	39
4.6.2.	Linearidade e Curva Analítica.....	39
4.6.3.	Exatidão.....	39
4.6.4.	Precisão	40
4.6.5.	Efeito de Matriz.....	40
4.7.	Estimativa do Risco de exposição.....	41
4.8.	Tratamento de resíduos químicos e limpeza de vidraria	41
4.9.	Tratamento de dados	41
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
5.1.	Seleção do método de extração de AFLAB1 e AFLAM1	42
5.3.	Ocorrências de AFLAM ₁ e AFLAB ₁ no leite	49
5.4.	Estimativa do Risco de exposição.....	56
6.	CONCLUSÃO.....	57
7.	ANEXO	58
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	62

1. INTRODUÇÃO

A influência da alimentação animal na composição do leite foi, e continua sendo, o foco de muitos estudos. Quanto ao leite, este pode ter suas características alteradas para melhorar o valor nutritivo e qualidade sensorial, através da alteração da dieta animal (PAMQUIST et al., 1993; CASTAGNETTI et al., 2008). Este alimento fornece macro e micronutrientes, para o crescimento, desenvolvimento e manutenção da saúde humana. Porém, pode também ser o agente causador de diversas alterações fisiológicas nos indivíduos que o consomem, principalmente por ser veículo de contaminantes ambientais e alimentares. Dentre estes, os micro-organismos e metabólitos secundários, como as micotoxinas, têm destaque por serem contaminantes dos fluidos ou dos tecidos animais, causando danos à saúde, principalmente para crianças e recém-nascidos, que são mais susceptíveis que os adultos aos efeitos tóxicos de contaminantes, tendo destaque as aflatoxinas (KWIATKOWSKI; ALVES, 2007).

As micotoxinas são metabólitos secundários produzidos por espécies toxigênicas de fungos filamentosos, causando resposta tóxica quando ingeridas por seres humanos e animais. *Fusarium*, *Aspergillus* e *Penicillium*, são os gêneros fúngicos mais comumente encontrados, sendo produtores de micotoxinas em alimentos para humanos e rações para animais, através do desenvolvimento de fungos pré e pós-colheita e também no armazenamento inadequado (FLORES-FLORES et al., 2015). As micotoxinas podem entrar na cadeia alimentar humana direta ou indiretamente. Diretamente, através do consumo de cereais e derivados, ou indiretamente quando, por exemplo, os animais se alimentam com rações previamente contaminadas excretando micotoxinas no leite, carne e ovos (MAZIERO; BERSOT, 2010).

As aflatoxinas (AFLAs) são metabólitos secundários de fungos das espécies *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus* e *A. nomius*, que contaminam plantas e seus produtos. Entre os contaminantes naturais de produtos agrícolas estão as AFLAs B₁ (AFLAB₁); B₂ (AFLAB₂); G₁ (AFLAG₁); G₂ (AFLAG₂). As AFLAs M₁ (AFLAM₁) e M₂ (AFLAM₂) são metabólitos hidroxilados das AFLAB₁ e AFLAB₂ e podem ser encontrados em produtos lácteos obtidos de animais que ingeriram ração contaminada (CREPPY, 2002).

As AFLAs têm sido identificadas como vetores envolvidos na etiologia do câncer hepático no homem, como consequência da ingestão de alimentos contaminados. Além disso, a teratogênese provocada por determinadas concentrações de AFLAs foi observada em animais,

principalmente durante a primeira fase embrionária, causando má formação do feto e reabsorção de embriões (ZHAO, et al., 2010).

A contaminação de rações e outros alimentos por micotoxinas pode variar de acordo com as condições ambientais, (umidade, e temperatura) pelas características da micota, métodos de processamento, produção e armazenamento dos produtos. A temperatura é um dos principais fatores envolvidos nesse processo. A qualidade do leite, em relação aos contaminantes tóxicos, está diretamente relacionada com o tipo e qualidade da ração destinada ao animal (FEREIRA et al, 2009). O nível de excreção de micotoxinas no leite é afetado pela massa molar e lipofilicidade dessas. A taxa de transporte também é influenciada pelo gradiente de pH entre o plasma do sangue e leite, o que pode alterar de acordo com o estado de saúde do animal. A absorção de micotoxinas pela glândula mamária pode ocorrer através de filtração intercelular, difusão passiva através da membrana celular, ou de transporte ativo, o que depende da estrutura química da micotoxina, seu estado iônico, entre outros (KALAC, 2011, YIANNIKOURIS et al., 2002).

As AFLAs representam uma séria ameaça para a saúde humana, o que causa grande impacto na indústria de alimentação humana e animal. Em animais, a exposição à AFLAs resulta em efeitos tóxicos agudos, mutagênicos, carcinogênicos, teratogênicos, insuficiência hepática e reduzida ingestão de alimentos, o que também pode explicar a redução na produção de leite em bovinos leiteiros (FINK-GREMMELS, 2008). Portanto, a contaminação por AFLAs em leite e animais não é apenas um problema de saúde humana, mas também econômico, causando perdas aos agricultores devido aos efeitos adversos que causam baixa produtividade dos animais (PEREYRA et al., 2008).

Em Cabo Verde não existe uma produção de leite para comercialização como também não existe uma legislação para definir os limites máximos toleráveis (LMT) para AFLAs. O leite consumido no país é importado (União Europeia, Ásia e América). Com isso, torna-se necessário a avaliação da ocorrência das AFLAs no leite consumido na região para verificar o risco de exposição humana a contaminação. Em contrapartida, o Brasil é um dos maiores produtores de leite no mundo, estando este entre os seis produtos mais importantes da agropecuária brasileira. O agronegócio do leite desempenha um papel relevante no suprimento de alimentos, na geração de emprego e renda para a população (IBGE, 2017). Por estes motivos, a contaminação por AFLAs em leite é um fato que vem gerando grande preocupação para os órgãos reguladores, devido à exposição humana pela ingestão diária dos diferentes tipos de leite, bem como de produtos à base dele. Portanto estabelecer um procedimento confiável para

determinar a ocorrência das aflatoxinas em leite e estimar o risco de ingestão é a primeira etapa para tomada de medidas efetivas de prevenir danos a saúde humana.

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

Estudar a ocorrência de AFLAB₁ e AFLAM₁ em amostras de leite comercializadas na região sul do Brasil e na cidade de Assomada em Cabo Verde.

2.2. Específicos

- Comparar os métodos de extração de AFLAB₁ e AFLAM₁ em leite citados na literatura em termos de recuperação dos analitos;
- Validar um método para extração de AFLAB₁ e AFLAM₁ no leite fluido e em pó;
- Aplicar o método validado para extração de AFLAB₁ e AFLAM₁ em amostras de leite consumido na região sul do Brasil e cidade de Assomada em Cabo Verde;
- Estimar o risco da exposição humana à contaminação das aflatoxinas através da avaliação de ingestão diária tolerável para a região sul do Brasil e para a cidade de Assomada em Cabo Verde;
- Disponibilizar os dados para órgãos regulamentadores do Brasil e de Cabo Verde para subsidiar a fiscalização e implementação de legislação com limites máximos tolerados.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Leite

A domesticação de animais como os bovinos tem desempenhado um papel fundamental no desenvolvimento das civilizações humanas. Estes tornaram-se o principal animal na produção leiteira (FAO, 2013). O leite bovino é o principal tipo de leite utilizado para consumo humano correspondendo a 85% da produção mundial de leite, seguido de leite de búfala com 11%, o leite caprina com 2%, leite ovino com 1% e leite de camelo 0,4%. A parte restante é produzida por outras espécies lácteas (FAO, 2015). O leite além de ser uma fonte vital de nutrição para as pessoas, apresenta oportunidades de subsistência para agricultores, processadores, comerciantes e outras partes interessadas na cadeia de valor dos produtos lácteos. Para conseguir isso, os consumidores, a indústria e os governos precisam de informações atualizadas sobre como o leite pode contribuir para a nutrição humana e como o desenvolvimento da indústria láctea pode contribuir para garantir a segurança alimentar e diminuir a pobreza.

Nos países desenvolvidos, a produção de leite da espécie bovina está diminuindo, juntamente com o número de operações leiteiras e animais, mas a produtividade por animal está aumentando, enquanto que nos países em desenvolvimento, a produção está aumentando, juntamente com o número de espécie bovinas em lactação. Os rendimentos médios do leite variam muito entre os países, principalmente devido às diferenças nos sistemas de produção (nutrição animal, raças). Em países como o Afeganistão, Bangladesh, Etiópia e Nigéria, o rendimento médio do leite de gado é ≤ 500 kg / ano. Porém, países com setores de lácteos em desenvolvimento, como a República Islâmica do Irã, Peru e Vietnã, o rendimento médio do leite de gado é $> 2\ 000$ kg / ano. Em grande parte da Ásia, o leite está se tornando o principal produto da produção de gado, sendo que os principais produtores de leite da espécie bovina são os Estados Unidos da América, Índia e China. Os países com maior número de gado leiteiro são a Índia, Brasil, China, Etiópia e Paquistão (FAO, 2018).

A produção de leite no Brasil ocorre em praticamente todo seu território, e as muitas condições climáticas exigem dos produtores adaptação da atividade conforme as peculiaridades de cada região. Por isso, a produção de leite no País é bastante heterogênea, bem como as características dos produtores e de suas propriedades (MAPA, 2017). O Brasil foi o quinto maior produtor mundial de leite em 2016 com uma produção de 23 bilhões de litros, num ranking liderado por Estados Unidos (CONAB, 2016; EMBRAPA, 2017). No 3º trimestre de 2017, a

produção de leite bovino cru no Brasil, feita pelos estabelecimentos que atuam sob algum tipo de inspeção sanitária (Federal, Estadual ou Municipal) foi de 6,16 bilhões de litros, onde os aumentos mais intenso de produção foram em Santa Catarina (+122,75 milhões de litros), Rio Grande do Sul (+71,44 milhões de litros), São Paulo (+64,44 milhões de litros) e Goiás (+31,03 milhões de litros). No ranking da produção nacional, Minas Gerais continua liderando a produção de leite, com 24,2% da produção nacional, seguido por Rio Grande do Sul (15,5%) e Santa Catarina (13,2%), que no 3º trimestre de 2017 ultrapassou São Paulo e Paraná (IBGE, 2017).

Milhares de pessoas em todo o mundo consomem leite bovino todos os dias, onde o consumo mundial em 2016, foi de 115 kg / per capita, e a produção foi de aproximadamente 650 milhões de toneladas (IDF, 2017). O consumo per capita de leite é; alto (> 150 kg / habitante / ano) na Argentina, Armênia, Austrália, Costa Rica, Europa, Israel, Quirguistão, América do Norte e Paquistão; médio (30 a 150 kg / capita / ano) na Índia, República Islâmica do Irã, Japão, Quênia, México, Mongólia, Nova Zelândia, África do Norte e do Sul, a maioria do Oriente Próximo e a maior parte da América Latina e Caribe; baixo (< 30 kg / habitante / ano) no Vietnã, no Senegal, na maior parte da África Central e na maior parte do Leste e Sudeste Asiático (FAO, 2018). A Ásia é o continente com maior produção de leite de gado com 30% da produção mundial seguido dá União Europeia (28 países) com 24%, América do Norte e Central com 18%, América do Sul e os restantes dos países Europeus com 9%, e pôr fim a África e Oceania com 5% (IDF, 2017).

O consumo do leite no Brasil no ano de 2016 foi de 175,9 litros per capita (CONAB, 2017). Segundo a USDA (2016), o Brasil foi o quarto país que mais produziu leite em pó integral no ano de 2016 com 12,6% da produção mundial, num “ranking” liderado pela China com 30% da produção mundial. Porém o Brasil é o segundo país que mais se consome leite em pó integral com 16,1% do consumo mundial também num “ranking” liderado pela China com 47,2% do consumo mundial.

Em Cabo Verde estudo relata que o consumo do leite tem aumentado nos últimos anos de acordo com o aumento do rendimento familiar. O estudo se refere apenas à ingestão do leite na sua forma líquida e sugere um maior consumo do leite em pó reconstituído pela população em comparação com o consumo do leite UAT. No entanto, realça que atualmente está situação tende a se inverter, especialmente nas famílias com maiores rendimentos. De acordo com os dados da importação da Direção das Alfândegas de Cabo Verde (DGAlf), no ano de 2016 e início de 2017, 4.956.509 kg de leite em pó entraram no país e ainda, cerca de 868.315 kg de queijo e 2.314.399 kg de iogurte e outros produtos lácteos foram importados em 2016. No que

tange à produção nacional, o relatório de estimativa da produção agropecuária do ano de 2014 do Ministério de Agricultura e Ambiente (MAA), indicou uma produção média de aproximadamente 11.159.131 litros de leite disponível para o consumo humano, provenientes das espécies bovina (31%) e caprina (69%) (ARFA, 2017).

Geralmente, o leite produzido em Cabo Verde é consumido cru, ou seja, sem passar por nenhum tipo de tratamento prévio que visa diminuir o nível de contaminantes iniciais, em especial os microbiológicos. Este cenário tem merecido especial atenção das autoridades sanitárias do país, nomeadamente da agência de Regulação e Supervisão dos Produtos Farmacêuticos e Alimentares (ARFA), uma vez que o leite um produto de origem animal, pode estar contaminado com micro-organismos patogênicos tais como: estirpes entorotoxigênicas de *E.coli*, *Shigella*, *Campylobacter*, *Staphylococcus*, *Salmonella spp.*, *Micobacteriumbovis*, *Brucellaabortus*, *Mycobacterium tuberculosis*, causadores de diversas doenças em humanos. O hábito de se consumir leite cru impõe que sejam considerados maiores cuidados não só com o leite como produto final, como também exige um controle mais efetivo dos animais produtores do leite, devendo garantir a sanidade dos mesmos (ARFA, 2017).

O leite é considerado um alimento completo, composto por uma mistura de nutrientes essenciais para a alimentação, 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). Segundo a FAOSTAT (2012), o leite apresenta em média 134 kcal de energia, 8 g de proteína e 7,3 g de gordura per capita por dia.

O leite é a melhor fonte de cálcio para o organismo. Este mineral apresenta importância na formação de ossos e dentes, na coagulação sanguínea e na regulação dos batimentos cardíacos. Sua carência provoca o raquitismo (fragilidade dos ossos), ocasionando fraturas com maior facilidade. Além disso, as proteínas do leite são completas, propiciando a formação e manutenção dos tecidos, balanceadas com vitamina A, B₁, B₂ e minerais que favorecem o crescimento e a manutenção de uma vida saudável. Possui elevado teor de fósforo, cerca de 960 mg L⁻¹, que também ajuda na formação dos ossos. Dois copos diários de leite atendem quase na totalidade a recomendação, por exemplo, de manganês, nutriente importante no aproveitamento das gorduras e no funcionamento do cérebro (EMBRAPA, 2011). 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 (BRASIL, 2011).

3.2. Aflatoxinas

As micotoxinas são metabolitos secundários fúngicos que exibem efeitos tóxicos tanto em seres humanos como em animais. Quando ingeridas, inaladas ou absorvidas causam efeitos imudepressivos, doença ou morte em humanos e animais (BANKOLE; ADEBANJO, 2003). Estas toxinas são de ocorrência mundial, porém predominam em climas tropicais e subtropicais, nos quais o desenvolvimento fúngico é favorecido pelas condições ambientais, como umidade e temperatura (LILLEJOH, 1991). Embora mais de 400 moléculas diferentes tenham sido descritas, apenas cerca de 20 micotoxinas são consideradas de importância econômica, devido aos seus níveis de contaminação em alimentos e produtos para alimentação animal. Os fungos micotoxigênicos são patógenos (por exemplo, espécies de *Fusarium*), patógenos secundários ou saprófitos e colonizadores secundários efetivos (por exemplo, espécies de *Aspergillus* e *Penicillium*) de uma variedade de cereais, nozes, frutas, café e cacau (MOHALE, 2017).

A micotoxicose é a consequência ou efeito (doença ou anormalidade patológica) de ingestão de alimentos contaminados com micotoxinas por homens e animais. Pode também resultar indiretamente do consumo de produtos animais expostos à contaminação por alimentação, como o leite (BANKOLE; ADEBANJO, 2003). O estudo científico das micotoxinas começou em 1960, quando um grande número de aves morreu na Inglaterra devido ao consumo de farinha de amendoim contaminada importada do Brasil. Um fungo toxigênico identificado como *Aspergillus flavus* foi isolado dos amendoins e o composto tóxico foi denominado aflatoxina, que significa “*A. flavustoxins*” (BLOUNT, 1961).

O gênero *Aspergillus*, um membro do *Phylum ascomycota*, inclui mais de 185 espécies conhecidas. Cerca de 20 delas foram relatadas como prejudiciais em seres humanos e animais. As espécies mais prejudiciais desse gênero são *A. flavus*, ao lado de *A. fumigatus*, este é o segundo mais comumente causador de aspergilose invasiva e não-invasiva em humanos e animais (DENNING, 1998). Na natureza, *A. flavus* é uma das espécies fúngicas mais abundantes, e com uma distribuição ampla no solo, além da possibilidade de ser encontrada em qualquer lugar da terra. *A. flavus* é um fungo saprofítico capaz de sobreviver em muitas fontes orgânicas de nutrientes, como folhas de árvores, madeira em decomposição, forragem animal, algodão, pilhas de adubo, cadáveres mortos e carcaças de animais, ao ar livre e ambiente de ar interior (sistema de ventilação do ar), grãos armazenados e mesmo em pacientes humanos e animais (KLICH, 1998).

O *A. flavus* pode crescer em uma ampla faixa de temperatura, de 12 - 48 °C. A sua tolerância ao calor contribui para a sua patogenicidade em humanos e outros animais de sangue

quente (JIUJIANG, 2005). As AFLAs são um grupo de micotoxinas produzidas principalmente por algumas espécies de *Aspergillus*, nomeadamente, *A. flavus*, *A. parasiticus* e *A. nomius*. Como característica biossintética *A. flavus* que só produz AFLAs B, enquanto *A. parasiticus* produz AFLAs B e G. A biossíntese de AFLAs depende dos alimentos em que ocorreu a proliferação fúngica, das condições de calor e umidade durante o crescimento, colheita e armazenamento das culturas (ARDIC, 2009; CREPPY, 2002).

Dentre as micotoxinas já identificadas, as AFLAs são as que podem causar maiores danos aos seres humanos e animais, pela sua alta toxicidade e ampla ocorrência, possuindo propriedades carcinogênicas, mutagênicas, teratogênicas e imunossupressoras. O fígado é o órgão alvo para esses compostos (BIEHL; BUCK, 1987).

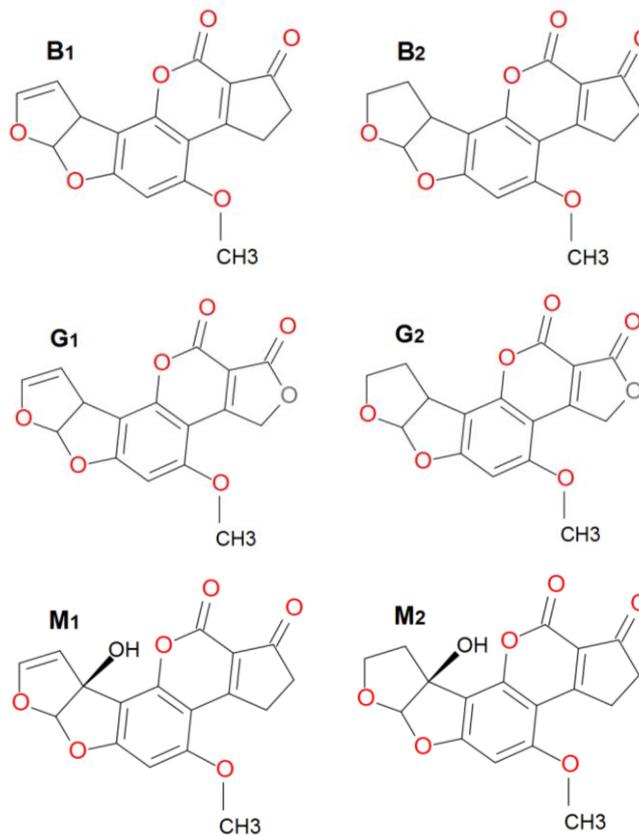
Os fatores de maior influência na multiplicação fúngica e a produção de AFLAs são: a umidade relativa, 88 a 95% (PARK & LIANG, 1993), e a temperatura de 25 a 27 °C, temperaturas essas diferentes das temperaturas necessárias para a multiplicação do micro-organismo, 36 a 38 °C (ABBAS, 2005). Outros fatores que podem ainda influenciar a produção de AFLAs são: composição do substrato, pH, atmosfera (teor de oxigênio e de dióxido de carbono), competição microbiana, danos mecânicos, linhagem do fungo contaminante e estresse da planta (GONÇALEZ, PINTO, & FELICIO, 2001).

Em estado puro, as AFLAs são extremamente estáveis a altas temperaturas (> 200 °C) e não são afetadas pelo frio. São solúveis em solventes como clorofórmio, benzeno, metanol e etanol. Além disso, são incolores, inodoras e não alteram o sabor dos alimentos (KWIATKOWSKI & ALVES, 2002). Os fatores de maior influência na multiplicação fúngica e a produção de AFLAs são: a umidade relativa, 88 a 95% (PARK & LIANG, 1993), e a temperatura de 25 a 27 °C, temperaturas essas diferentes das temperaturas necessárias para a multiplicação do micro-organismo, 36 a 38 °C (ABBAS, 2005). Outros fatores que podem ainda influenciar a produção de AFLAs são: composição do substrato, pH, atmosfera (teor de oxigênio e de dióxido de carbono), competição microbiana, danos mecânicos, linhagem do fungo contaminante e estresse da planta (GONÇALEZ, PINTO, & FELICIO, 2001).

As principais AFLAs são divididas nos grupos B e G, que se referem às suas propriedades de fluorescência. Sob luz ultravioleta de ondas longas, as AFLAs B₁ (AFLAB₁) e B₂ (AFLAB₂) apresentam fluorescência azul e as AFLAs G₁ (AFLAG₁) e G₂ (AFLAG₂) apresentam fluorescência verde. Os números 1 e 2 designam a mobilidade cromatográfica, ou fator de refração (Rf) dos compostos em CCD (cromatografia em camada delgada) (BRAGA, CARDOSO; MACÊDO, 2002). As AFLAs do grupo B possuem um anel ciclopentona e as do grupo G, uma lactona insaturada (Figura 1). Essas micotoxinas são substâncias que possuem

baixa massa molar, estão em grande parte relacionadas com produtos alimentares produzidos nos trópicos úmidos e subtropicais, como os cereais (milho, sorgo, arroz e trigo), oleaginosas (amendoim, soja, girassol e algodão), especiarias (pimenta, açafrão, coentro e gengibre), frutos de casca rijada (amêndoas, castanha do Brasil, pistache, nozes e coco), e leite (KWIATKOWSKI & ALVES, 2007). Entre as AFLAs (B_1 , B_2 , G_1 , G_2 , M_1 e M_2), a AFLA B_1 é a mais comumente detectada em alimentos além de ser considerada o agente cancerígeno de maior potencial tóxico por sua associação com o carcinoma hepatocelular (câncer de fígado) (BHATNAGAR-MATHUR, 2015).

Figura 1- Estruturas químicas das aflatoxinas B_1 , B_2 , G_1 , G_2 e M_1 .



Adaptado de NONES, 2010.

3.3. Biotransformação da aflatoxina B_1

As AFLAs são absorvidas no trato gastrointestinal e transformadas primariamente no fígado, por enzimas microssomais do sistema de funções oxidases mistas (BIEHL & BUCK, 1987). Estas enzimas, pertencentes à superfamília de enzimas do citocromo P-450, constituem parte do processo de detoxificação de uma ampla variedade de xenobióticos no organismo (FORRESTER, 1990). A transformação da AFLA B_1 , particularmente, tem sido estudada com

maior interesse, uma vez que possui estreita relação com seus mecanismos de ação tóxica. Existe consenso, entre grande número de especialistas, de que a AFLAB₁ é, na realidade, um pró-carcinógeno, o qual requer ativação metabólica para manifestar seus efeitos tóxicos. A forma ativada da AFLAB₁ é o composto identificado como 8,9-óxido de AFLAB₁, ou AFLAB₁epóxido (anteriormente denominado AFLAB₁-2,3 epóxido), originado da epoxidação da dupla ligação do éter vinílico, presente na estrutura bi-furanoide da molécula de AFLAB₁ (BIEHL & BUCK, 1987).

Este composto é altamente eletrofílico e capaz de reagir rapidamente, ligações covalentes, com sítios nucleofílicos de macromoléculas, como ácido desoxirribonucleico (DNA), ácido ribonucleico (RNA) e proteínas. Estas ligações determinam a formação de adutos, os quais representam a lesão bioquímica primária produzida pelas AFLAs (HSIEH & ATKINSON, 1991). A AFLAB₁-epóxido pode também ser conjugada enzimaticamente com glutathione reduzida, através de glutathione-S-transferase, constituindo importante via de detoxificação deste composto (HAYES et al., 1991). A ligação da AFLAB₁-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 AFLAB₁. A formação de adutos ocorre pela ligação com guaninas da molécula de DNA, na posição N₇, ao nível do códon 249, do gene supressor de tumores p53. A ocorrência deste tipo de alteração é característica de vários carcinomas no homem, sobretudo o hepático (BRESSAC, 1991).

Estudos efetuados em fígados de ratos demonstraram que os adutos AFLAB₁-N₇-guanina podem ser retirados após a sua formação, deixando sítios purínicos na molécula de DNA. Os sítios vagos e estes tendem a ser preenchidos com adenina, resultando em transversão de guanina para timina, o que origina um ponto de mutação bastante significativo. Os adutos de DNA, depois de sofrerem depuração espontânea, podem ser conjugados e excretados, sobretudo através da urina (GROOPMAN, et al., 1992). O processo de carcinogênese, fundamentado em trabalhos experimentais, envolve, geralmente, duas fases distintas, a iniciação e a promoção do câncer. A fase de iniciação é resultante de alterações mutagênicas nas células, ao passo que a de promoção relaciona-se com a expressão fenotípica das modificações ocorridas na primeira fase. Neste contexto, as mutações determinadas pelas AFLAs representam alterações genéticas permanentes nas células afetadas, o que possibilita a iniciação do processo cancerígeno (HARRIS, 1991).

Os adutos de RNA e de proteínas determinam lesões bioquímicas, as quais devem, provavelmente, estar envolvidas com os mecanismos de toxicidade aguda da AFLAB₁, dado que conduz à morte celular pela inativação de macromoléculas essenciais às células. A

formação destes adutos inicia-se com a hidrólise da AFLAB₁-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 AFLAB₁ inclui a hidroxilação, para formar as AFLAs M₁, Q₁ e B_{2a}; e, *O*-demetilação, para formar AFLAP₁. Todos estes compostos contém o grupo hidroxila na molécula, o que permite a conjugação com ácido glicurônico ou sulfatos. Consequentemente são bastante solúveis em água, possibilitando sua rápida excreção através do leite, urina ou bile e, em seguida, nas fezes. Este fato sugere que a formação destes derivados pode constituir parte do processo de detoxificação da AFLAB₁, embora alguns produtos, como a AFLAM₁, apresentem, também, toxicidade apreciável em modelos experimentais (BUSBY, 1984).

Diversos autores consideram que a potência dos efeitos da AFLAB₁, bem como de seus derivados, sobre células ou organismos, depende, entre outros fatores, do balanço integrado entre as múltiplas vias, tanto de ativação metabólica, quanto de detoxificação. Os padrões de biotransformação da AFLAB₁ variam consideravelmente entre as espécies animais, e mesmo entre indivíduos da mesma espécie, o que poderia justificar os diferentes graus de susceptibilidade à AFLAB₁ observados em cada uma delas (McLEAN, 1995).

3.4. Aflatoxina M₁

A introdução da AFLAM₁ na dieta humana ocorre principalmente pela ingestão de leite bovino. Esta associação é uma preocupação global porque o leite é um alimento importante para adultos e especialmente para crianças, que são os maiores consumidores e são mais susceptíveis aos efeitos adversos de micotoxinas. Tanto a AFLAB₁ como a AFLAM₁ são compostos cancerígenos, a AFLAM₁ é o metabolito secundário tóxico que é segregado no leite. AFLAM₁ é uma AFLA muito estável na qual nem armazenamento, processamento, como pasteurização, autoclave ou outros métodos utilizados na produção de leite, destrói a toxina (ZHENG, et al., 2013).

A AFLAM₁ possui alta atividade genotóxica, embora seja aproximadamente 10 vezes menos carcinogênica que a AFLAB₁. Segundo IARC (2002), a AFLAM₁ está classificada no grupo 1 possivelmente carcinogênica para humanos, tendo a Organização Mundial de Saúde recomendado a redução dos níveis de AFLAM₁ ao mínimo em leite e derivados, de modo a minimizar o risco potencial que representa. Os efeitos tóxicos e carcinogênicos têm sido extensivamente demonstrados em diversas espécies, sobretudo em animais jovens. Há, portanto, grande preocupação com relação à saúde das crianças, devido

ao consumo de leite e produtos derivados, devido à seu baixo peso corpóreo e sua maior suscetibilidade às AFLAs (IARC, 2002).

Os estudos mostraram que existe uma relação linear entre o conteúdo de AFLAM₁ no leite e o consumo de AFLAB₁ através de alimentos para animais e 0,5 á 6% de AFLAB₁ é convertido em AFLAM₁. Após a ingestão de AFLAB₁ em animais em lactação, AFLAM₁ aparece no leite em até 12 - 24 h, no entanto, seu nível alcançado poder ser indetectável dentro de 72 h, quando a ração contaminada for interrompida (GONZALEZ, 2008).

Estudos sugerem que a AFLAM₁ está associada à fração proteica do leite (caseína) (TANGO, 1974), ficando nela retida após o tratamento térmico e nos produtos derivados. Sendo a AFLAM₁ insolúvel na gordura do leite, na fabricação de produtos derivados, a desnatação afeta a distribuição da micotoxinas no produto final, ficando a maior parte da AFLAM₁ retida na fração desnatada (BAKIRCI, 2001). Para evitar ou minimizar a exposição de AFLAM₁ em leite e produtos lácteos, mais de sessenta países estabeleceram níveis máximos admissíveis.

3.4.1. Legislação

Vários países possuem regulamento para controlar os níveis de AFLAB₁ em rações e propõem limite máximo tolerado (LMT) de AFLAM₁ em leite e derivados para reduzir os riscos (CAMPAGNOLLO, et al., 2016), independentemente da produção do leite no País, como descritos na Tabela 1.

Tabela 1 - Legislação internacional para AFLAM₁ em leite e derivados lácteos para consumo humano.

País	P.L(t)	Leite (ng mL⁻¹)	Derivados de leite (ng mL⁻¹)
Argentina	10.192	0,05**	0,05 (leite em pó)**
Alemanha	32.676	0,05	-
Bulgária	1.019	0,5	0,1 (leite em pó); 0 (Leite em pó para dietas e alimentos infantis)
Brasil	34.781	0,5	2,5 (queijo); 5,0 (leite em pó)**;
China	36.020	0,5	0,5 (produtos lácteos)
Egito	4.575	0	0
EUA	98.339	0,5	-
França	25.197	0,05; 0,03 (para crianças < 3 anos)	0,03 (leite em pó)**
Honduras	-	0,05	0,25 (queijo)
Nigéria	-	1	-
República Tcheca	3.074	0,5	0,1 (alimentos infantis a base de leite)*
Romênia	4.303	0	-
Suíça	3.993	0,05	0,025 (soro de leite); 0,25 (queijo); 0,02 (manteiga) 0,1 (leite em pó)**
Turquia	16.786	0,05	0,25 (queijo)
União Europeia	152.500	0,05**	0,05**
Uruguai	2.154	0,5	0,5 (produtos lácteos)

*LMT para AFLAB₁ e AFLAM₁; ** - (µg / kg); P.L – produção de leite de vaca no ano de 2016; t – tonelada;
Fonte: (EMBRAPA, 2005; CDIC, 2016; BRASIL, 2011).

3.4.2. Ocorrência de AFLAM₁ em leite

A ocorrência de AFLAM₁ já foi relatada em diversas localidades (Tabela 2), com muitos dos estudos elevando a preocupação quanto aos níveis de contaminação por AFLAM₁, por estarem acima dos LMTs estabelecidos pela legislação da União Europeia (UE) e pelos países do MERCOSUL.

Tabela 2 - Ocorrência de contaminação por AFLAs em leite bovino.

País	Leite	Frequência (%)	Mín-Máx (ng mL⁻¹)	Referência
Brasil	Cru	(11/40)* 29 ^a		SCAGLIONI et al., 2014
	Pasteurizado	(16/40) 42 ^b ; (23/40) 58 ^a	(0,7 -1,5)	
	Concentrado	(26/40) 67 ^a	(>0.5)	
	UAT	(5/40) 13 ^b ; (26/40)67 ^a		
	Em pó	(0/40) ^{a, b}		
	UAT	(136/152) 90 ^a	0.018 - 0.08	SILVA et al., 2015
	UAT	(171/229) 75 ^a ; (58/229) 12 ^b	(0,3 - 4,62); (1,39 - 14,11)	BECKER- ALGERI, 2016
	Pasteurizado	(26/30) 87 ^a	0,009 – 0,437	ILHA, 2013
	UAT	(13/17) 76 ^a	0,008 – 0,215	
	c/ aditivos	(13/17) 76 ^a	0,009 - 0,061	
Em pó	(12/12) 100 ^a	0,020 – 0,760		
Infantil	(0/7) 0	-		
Cru	(26/65) 40 ^a	0,009 – 0,069	JADER, 2013	
Em Pó	(2/4) 50 ^a	0,500 – 0,810		
China	UAT	(23/75) 30,7 ^a	1,0 - 4,1	OLIVEIRA, 2013
	UAT	(84/153) 54,9 ^a	0.006-0,160	ZENG et al., 2013
	Pasteurizado	(25/26) 96,2 ^a	0.023-0.154	
Sérvia	Cru	(40/40) 100 ^a	0,08 – 1,2	KOS, 2014
	Pasteurizado	(35/36) 97,2 ^a	0,06 - 1,2	
	UAT	(69/70) 98,5 ^a	0,02 – 0,41	
	Orgânico	(6/6) 100 ^a	0,01 – 0,08	
Irã	Pasteurizado	(76/76) 100 ^a	0,0117-0,106	MOHAMMADI, 2015
Bósnia	Cru	(214/496) 43 ^a	0,003 – 0,0214	BILANDZIC , et al., 2016
	UAT	282/496) 57 ^a	0,0014 – 0,06	
México	Humano	(99/112) 89 ^a	0,003 – 0,034	CORNELIO et al., 2016
Jordânia	Pasteurizado	(5/60) 8 ^b	(<2,2) ^b	HERZALLAH, 2009)
Egito	n.r	(3/15) 20 ^a	5-8	EL-SAYED, 2000
Nigéria	Cru	(3/22) 15 ^a	0,2-0,4	ATANDA, 2007
Quênia	Pasteurizado	(473/613) 77 ^a	0,005-0,7	KANGÉTHE, 2009
	UAT			
Portugal	Pasteurizado e UAT	(11/40) 27,5 ^a	0,007 – 0,07	DUARTE, et al., 2013

País	Leite	Frequência (%)	Mín-Máx ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Referência
Marrocos	Pasteurizado	(54/61) 88,8 ^a	0,001 – 0,117	ZINEDINE, 2007
Croácia	Cru	(10/543) 2 ^a	0,006 – 0,027	BILANDZIC et al., 2010
Tailândia	Cru	(240/240) 100 ^a	0,05 – 0,101	RUANGWISES, 2010
Taiwan	Pasteurizado	(54/61) 88,8 ^a	0,001 – 0,117	LIN et al., 2004

AFLAM₁^a; AFLAB₁^b; nr - não reportado; * – amostra contaminada / amostra total.

Dados coletados a partir de estudos realizados nos últimos anos evidenciam que a incidência da AFLAM₁ em amostras de leite e derivados lácteos é relativamente menor em países da Europa (Portugal, Espanha, Bósnia e Croácia), independentemente do tipo de amostra. Em contrapartida, em estudos realizados em países asiáticos como China, Tailândia e Taiwan foi frequentemente observado a ocorrência de AFLAs em até 100% das amostras. No Brasil, devido à sua grande extensão, existem diferenças no clima e na produção de leite e seus derivados, os resultados geralmente variam quanto a porcentagem de ocorrência da micotoxinas (12 a 100%) e quanto aos níveis de contaminação encontrados (0,008 a 14,11 ng mL⁻¹).

3.4.3. Efeitos do processamento do leite na concentração de AFLAM₁

O leite é um alimento nutritivo importante, mas tem uma curta vida útil, exigindo uma manipulação rigorosa para evitar sua deterioração e transmissão de doenças aos consumidores. O processamento do leite garante a sua conservação por dias ou mais tempo dependendo do tipo de tratamento (refrigeração, aquecimento, fermentação, etc.), além da produção de diferentes produtos que são apreciados por consumidores, como queijos, iogurtes e manteiga. Laticínios diferem significativamente entre os países, dependendo dos hábitos alimentares e tradição, tecnologias acessíveis para processamento de leite, exigência do mercado e status social e cultural (CAMPADNOLLO, 2016).

A pasteurização do leite, de forma sistemática e obrigatória, contribui e reforça a segurança no aspecto sanitário, sendo um importante recurso industrial, uma vez que praticamente a totalidade dos patógenos não resiste ao binômio tempo - temperatura a que esta é processada, podendo ser lenta (63 °C / 30 min), rápida (72 °C / 15 s) ou Ultra Alta Temperatura (UAT – 140 a 150 °C / 2 a 4 s) (PRATA, 2001).

O leite quando passa por um processo UAT torna-se um produto de coloração mais branca, este efeito óptico está relacionado com a desnaturação das proteínas do soro e sua agregação com as caseínas, mas em parte também com a homogeneização da gordura. O valor nutritivo das proteínas pode ser reduzido durante o aquecimento devido à perda de lisina

disponível, isso ocorre durante a reação de *Maillard* (reação química entre um aminoácido ou proteína e um carboidrato redutor) com a formação do complexo lisina-alanina. As proteínas do soro desnaturam-se durante os processos UAT, em quantidade que depende das condições tempo / temperatura, tendo pouca influência no valor nutritivo. Contudo, a desnaturação das proteínas do soro, implica em mudanças muito importantes nas propriedades tecnológicas, como a diminuição da velocidade de coagulação pela quimosina e outras enzimas coagulantes. Esse fenômeno se deve à interação entre a β -lactoglobulina e as caseínas, em particular com a κ -caseína (FOX, 1994).

O leite em pó é um derivado do leite natural, obtido pela desidratação do leite. A água, que é o maior componente do leite “*in natura*”, aproximadamente 87,5%, é eliminada através de um processo que envolve operações unitárias, evaporação e secagem por pulverização (atomização, nebulização), restando o extrato seco do leite e uma pequena quantidade de água. Este processo é realizado sob pressão reduzida em baixa temperatura. O leite em pó pode ser classificado quanto a seu conteúdo de matéria gorda, sendo dividido em: integral (maior ou igual a 26%); parcialmente desnatado (entre 1,5 a 25,9 %) e desnatado (menor que 1,5%). Também pode ser classificado quanto ao tratamento térmico mediante o qual foi processado, classificando-se em: de baixo tratamento térmico, com conteúdo de nitrogênio proteico do soro não desnaturado maior ou igual a 6 mg g⁻¹; de médio tratamento térmico, com conteúdo de nitrogênio proteico do soro não desnaturado compreendido entre 1,51 e 5,99 mg g⁻¹; e de alto tratamento térmico, com conteúdo de nitrogênio proteico do soro não desnaturado menor que 1,50 mg g⁻¹. Além disso, de acordo com seu poder umectante e de dispersão, pode-se classificar em instantâneo ou não (MAPA, 2013).

Na literatura existe relatos de varias teorias sobre a concentração de AFLAM₁, no procesamento do leite, como por exemplo, Galvano et al., (1996) relataram que a concentração da AFLAM₁ varia de acordo com as operações unitárias utilizadas para processamento do leite (pasteurização, esterilização ou secagem), no entanto, Rouston, (1997) afirmou que AFLAM₁ é relativamente estável à secagem e processamento térmico porque as temperaturas de decomposição das AFLAs estão entre 237 - 306 °C.

Awasthi, et al., (2012), Jasutiene, Garmiene e Kulikauskiene (2006), Stoloff et al. (1975) e Pereira (2005) declararam que o processo de pasteurização (lenta e/ou rapida) não influencia nos níveis AFLAM₁ em leite bovino e a fervura de leite nas condições domésticas também não são capazes de diminuir a concentração de AFLAM₁ no leite, enquanto que Bakirci (2001), Sanli, Deveci e Sezgin (2012) e Deveci (2007), relataram que após a contaminação de leite

artificialmente por AFLAM₁, obtiveram reduções de aproximadamente 2% da concentração inicial, sendo que essas reduções foram estatisticamente significativas ($p < 0,01$).

Estudos sobre a estabilidade da AFLAM₁ em leite durante o armazenamento sob condições de resfriamento e congelamento também apresentaram resultados conflitantes: Mcknney et al. (1973) verificaram uma redução rápida na concentração da AFLAM₁ durante armazenamento de leite cru, naturalmente contaminadas à 0 °C por 4 e 6 dias, obtendo perdas na concentração da AFLAM₁ de 40 e 80%, respectivamente, enquanto que Stoloff et al., (1975) armazenaram amostras de leite naturalmente contaminadas com AFLAM₁ à -18 °C por 120 dias, e verificaram que até aos 53 dias não foi observado nenhum tipo de redução, sendo que foi verificada uma redução aos 120 dias com uma perda 45% da AFLAM₁.

Essas contradições segundo Ruston (1997), podem ser atribuídas ao fato de que existem diferenças no nível inicial de contaminação, na faixa de temperatura e nos métodos analíticos utilizados para extrair, limpar e quantificar a micotoxina. Além disso, o estado da contaminação pode influenciar os resultados porque em leite contaminado artificialmente é mais fácil inativar a AFLAM₁ do que no leite naturalmente contaminado.

3.4.4. Métodos para determinação de AFLAM₁ e AFLAB₁

Os resultados da maioria dos cromatógrafos dependem da eficiência da preparação prévia da amostra e extração, bem como tratamento posterior da extração, incluindo qualquer purificação. Além disso, para obter informações confiáveis e métodos de aplicação desejados, a presença de compostos que podem contaminar o extrato da amostra primária, deve ser evitada (KRSKA et al., 2015).

Para a determinação de aflatoxinas em alimentos geralmente a metodologia analítica é composta pelas etapas de extração, limpeza, separação, detecção, quantificação e confirmação (PALMA et al. 2007). A extração de AFLAM₁ e AFLAB₁ a partir do leite e produtos lácteos envolve misturas aquosas de solventes orgânicos polares, tais como acetonitrila, metanol ou acetona. A extração com clorofórmio tem sido reduzida ou substituída por solventes mais ecológicos um esforço para reduzir o consumo de solventes clorados (SHEPHARD, 2008). Segundo Hackbart et al (2012) é necessário além do desenvolvimento de novas tecnologias para análise de micotoxinas, métodos que minimizem o impacto ambiental, tempo de exposição dos analistas a solventes tóxicos e determinem uma ampla faixa de substância em uma única extração.

Os métodos de purificação de uso comum empregam coluna de cromatografia, extração na fase sólida (sílica gel, C18, silicato de magnésio), extração líquido líquido, colunas de

imunoafinidade e colunas de limpeza multifuncionais. Também tem sido relatado a utilização de sais como sulfato de cobre, sulfato de amônio, sulfato de magnésio geralmente associados a terra diatomácea (HEIDTMANN-BEMVENUTI et al., 2012; SOARES; RODRIGUES-AMAYA, 1989). Essas técnicas oferecem várias vantagens, como velocidade, simplicidade e eficiência, em alguns casos, aumento da recuperação (FUCHS et al., 2012). As descobertas anteriores documentaram que a cromatografia líquida (LC) com detecção de fluorescência (FD) e ELISA foram utilizados para analisar AFLAM₁ em leite e produtos lácteos, como apresentado na Tabela 3. O uso de CLAE (cromatografia líquida de alta eficiência) com detecção de fluorescência (FD) é muito comum e muitas vezes efetivamente empregado para análise de aflatoxinas.

Tabela 3 - Técnicas para a detecção de AFLAM₁ em leite e produtos lácteos.

País	Amostras	Técnicas	LOD (ng mL⁻¹)	LOQ (ng mL⁻¹)	Referencias
Argentina	Leite em pó	CLAE – FD	0,03	0,1	LONDONO et al., 2013
Brasil	Leite, iogurte	CLAE – FD	0,003	0,01	IHA et al., 2013
China	Leite	UHPLC- MS/MS	0,003	0,015	HUANG et al., 2014
Crocia	Leite	ELISA	0,001	0,0034	BILANDZC et al., 2010
Nigeria	Leite, sorvete	TLC	n.r	2	ATANDA et al., 2007
Paquistão	Leite	CLAE – FD	0,001	0,04	HUSSAIN et al, 2010
Turquia	Leite UAT	CLAE – FD	0,005	0,018	KABAK; OZBEY, 2012

LOD – Limite de detecção; LOQ – Limite de quantificação; n.r – não reportado.

A cromatografia em camada delgada (TLC) é um método muito antigo para a separação, avaliação de pureza e identificação de compostos orgânicos. Na verdade, foi uma das separações mais utilizadas. Além disso, em 1990, a Associação de Comunidades Analíticas (AOAC) incluiu TLC como método oficial e método de escolha para identificar e quantificar aflatoxinas em níveis tão baixos quanto 1 µg / g. No entanto, a CLAE com FD substituiu o TLC e atualmente está sendo usado em combinação com outras ferramentas, como MS (acoplada à espectrometria de massas). Durante a última década, a análise das micotoxinas dependeram em grande parte da CLAE empregando vários adsorventes. A separação de toxinas dependendo da sua polaridade tem sido realizado usando CLAE normal ou de fase reversa (IQBAL et al., 2015).

Os protocolos utilizados para CLAE para detecção de AFLAM₁ são similares com pequenas modificações ou variações na polaridade da fase móvel, dependendo da natureza do leite ou dos produtos lácteos. A detecção através por fluorescência depende sobre a presença de um cromóforo nas moléculas, e a maioria das micotoxinas já possuem fluorescência natural (aflatoxinas) e pode ser detectado diretamente com CLAE – FD (VALENTA, 1998). A principal vantagem de usar CLAE, juntamente com a alta qualidade de separação e baixo limite de detecção, é a opção de combinar detecção múltipla sistemas (fluorescência, ultravioleta), permitindo a detecção de compostos múltiplos de uma amostra (IQBAL et al., 2015).

As técnicas de ELISA tornaram-se muito popular devido à sua relativamente fácil aplicação. São comercializados como “kits” para detecção do AFLAM₁ e são geralmente baseados em um formato de ensaio competitivo que usa um anticorpo primário específico para a molécula alvo ou um conjugado de uma enzima e o alvo requerido (ERTAS et al., 2011). As vantagens da ELISA é que é simples de usar, bem como portátil, rápido e altamente específico. Contudo, uma desvantagem desses “kits” é que eles são de uso único, o que pode aumentar o custo do triagem em massa e o período de validade pouco aplicável para países não produtores dos reagentes. Além disso, um ensaio competitivo da ELISA tem uma faixa de detecção limitada devido ao estreito sensibilidade dos anticorpos e os ensaios da ELISA também podem ter falsos resultados (IQBAL et al., 2015).

3.4.4.1. Efeito de Matriz

A cromatografia líquida de alta eficiência é uma técnica analítica de separação de componentes de uma matriz, na qual a separação depende da distribuição molecular dos componentes da matriz em duas fases, fase móvel, que neste tipo de cromatografia é líquida, e a fase estacionária, que compreende uma coluna de separação com um tipo de enchimento poroso. Além disso, essas análises geralmente são rápidas e possibilitam quantificar um grande número de compostos como as AFLAs, simultaneamente (ROCHA, 2015). Nesse sentido, a exatidão e a precisão dos resultados obtidos nas análises são imprescindíveis. Qualquer fonte de erro em potencial deve ser investigada e caracterizada, como o efeito de matriz durante as análises. Esse efeito, também conhecido como “aumento da resposta cromatográfica induzida pela matriz”, é usado para explicar as taxas de recuperação que excederem 100% e a baixa precisão de resultados (POOLE, 2007).

O efeito de matriz, além de gerar porcentagens de recuperação superiores a 100%, pode causar outras alterações na análise cromatográfica, como:

- Mascaramento do pico do analito de interesse, gerando um resultado falso negativo. Isso ocorre, por exemplo, quando há perdas no sistema de injeção, fornecendo baixa resposta e dificultando a integração (RANTAKOKKO, YRITYS, & VARTIAINEN, 2004);
- Erro na identificação do analito, pois componentes da matriz podem ser erroneamente identificados como o analito de interesse quando, na verdade, este está ausente, gerando resultado falso positivo (POOLE, 2007);
- Aumento no sinal do detector, levando à superestimação do resultado. Isso ocorre quando impurezas são eluídas, com mesmo tempo de retenção (CUADROS-RODRIGUEZ, 2003);
- Extinção do sinal no detector, ou seja, o sinal do analito é diminuído gerando uma subestimação do resultado (LEHOTAY & ELLER, 1995).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Material

4.1.1. Padrões de AFLAB₁ e AFLAM₁

Os padrões de AFLAB₁ e AFLAM₁ foram adquiridos da *Sigma-Aldrich Chemical Company* (Bellefonte, PA, USA). O preparo dos padrões das aflatoxinas foi realizado conforme proposto pela Portaria n°49 (Brasil, 1999) e pelo Manual de garantia analítica (Brasil, 2011). O preparo das soluções estoque partiu da dissolução de 5 µg do padrão da AFLAM₁ em 5 mL de acetonitrila, divididos em frascos âmbar previamente descontaminados, constituindo uma concentração final em cada vidro de 1 µg mL⁻¹, e estes foram então secos sob corrente de N₂. Posteriormente, 1 µg de AFLAM₁ foi diluído em 1 mL de acetonitrila para obtenção da solução de trabalho (1 µg mL⁻¹). Para AFLAB₁, o procedimento partiu da dissolução de 5 mg do padrão em 100 mL de tolueno: acetonitrila (98:2). Após o conteúdo foi dividido em frascos âmbar (50 µg mL⁻¹) e evaporados sob corrente de N₂ (solução estoque). Para as corridas cromatográficas foram preparadas soluções padrão contendo 5 ng mL⁻¹ de cada AFLA, a partir das respectivas soluções trabalho.

4.1.2. Instrumentação e material

- Balança analítica de precisão FA2104N (Bioprecisa, São Paulo, Brasil);
- Banho termostático com agitação – Quimis (São Paulo, Brasil);
- Banhos ultrassônicos 40 kHz, 150 W - UNIQUE (São Paulo, Brasil);
- Capela de exaustão;
- Centrífuga (Cientec, CT 5000 R, Brasil);
- Cromatógrafo a líquido de alta eficiência acoplado de detector de fluorescência (CLAE – FD) com derivatizador pós coluna fotoquímico (Romer Derivatization Unit RDU™);
- Coluna de fase reversa C18 AcclaimPA2, 5 µm Analítica (4,6 x 250 mm)
- Espectrofotômetros UV-VIS Fento Cirrus 80 (São Paulo, Brasil);
- Estufa (temperatura 120 °C) – Quimis (São Paulo, Brasil);
- Vórtex Mixer Vixar – (Coreia);
- Shaker incubadora Tecnal TE-420 – (São Paulo, Brasil);
- Sistema de purificação de água Milli-Q Direct-Q UV3 Millipore (Millipore, USA).

- Membrana de acetato de celulose 0,45 μm de diâmetro de poro de 47 mm de diâmetro (Millipore, São Paulo, Brasil) com utilização na filtração de solventes para CLAE.
- Micropipetadores automáticos com capacidade variável (Brand, Alemanha e Eppendorf, Canadá);
- Frascos de vidro âmbar com capacidade de 10, a 100 mL;
- Vidraria de rotina laboratorial (balões volumétricos, tubos falcon, béquer, ...).

4.1.3. Reagentes e Solventes

- Acetonitrila e metanol grau CLAE (J.T. Baker, USA)
- Acetato de Sódio, Cloreto de sódio e Sulfato de Magnésio (Synth, Brasil);
- Ácido acético glacial P.A. 99,7% (Synth, Brasil);
- Ácido fórmico (Sigma Aldrich, EUA);
- Água destilada;
- Água ultrapura purificada em sistema Direct-Q UV3 Millipore (resistividade de 18,2 $\text{M}\Omega\text{ cm}$);
- Benzeno P.A., Tolueno e Hexano (Vetec, Brasil);
- Celite (SIGMASUL);
- Clorofórmio P.A. (Proquimios, Brasil);
- Gás nitrogênio;
- Padrões analíticos: AFLAB₁ e AFLAM₁ adquiridos da *Sigma-Aldrich Chemical Company* (Bellefonte, PA, USA).

4.2. Amostragem de leite

As amostras de leite (integral, desnatado, semidesnatado e em pó) foram coletadas de acordo com o regulamento (CE) nº 401/2006 da comissão de 23 de fevereiro de 2006, que estabelece os métodos de amostragem e de análise para o controle oficial dos teores de micotoxinas nos alimentos. A amostragem (Figura 2) foi realizada no período de dezembro de 2016 a novembro de 2017, em estabelecimentos comerciais na cidade de Rio Grande (Brasil) e cidade de Assomada (Cabo Verde).

Um total 112 amostras de leite (18 marcas) de diferentes lotes foram coletadas, sendo 26 de leite integral, 11 de leite desnatado, 12 de leite semidesnatado, 10 de leite em pó integral, 3 de leite em pó para uso infantil de origem brasileira e 50 amostras de leite em pó integral, de três marcas diferentes oriundas da cidade de Assomada (Cabo Verde) conforme descrito na

Figura 2. Lotes brutos de 1% do produto disponível na prateleira dos estabelecimentos comerciais foram formados de maneira aleatória para cada tipo de embalagem. Destes, foram tomados 1% para comporem os lotes de laboratório. As amostras de leite líquido foram mantidas sob refrigeração até o momento de análise. Após abertura da embalagem, alguns critérios foram utilizados como padronização de amostragem, a unidade amostral foi constituída por embalagens fechadas, sem deformação aparente, dentro do prazo de validade, contendo 1 L de amostra, provenientes de lotes de fabricação distintos, escolhidas considerando a disponibilidade nos supermercados das cidades.

Figura 2 – Esquema de amostragem de leite na região sul do Brasil e na cidade de Assomada (Cabo Verde).



*Lotes diferentes

4.3. Preparo de amostra

As amostras de leite fluido em temperatura ambiente foram homogeneizadas e em seguida uma alíquota foi centrifugada por 10 min a 2330 xg (força gravitacional). Descartando-se o sobrenadante, procedeu-se com a extração utilizando o volume indicado pelo método.

As amostras de leite em pó foram homogeneizadas e quarteadas para obtenção da amostra analítica. Após, em tubos de polipropileno foram adicionado 3,2 g da amostra sendo reconstituída em 20 mL de água destilada aquecida a temperatura de 40 °C. Após reconstituição, a amostra foi centrifugada por 10 min a 2330 xg e a extração executada de acordo com procedimento utilizado para leite fluido.

4.4. Métodos de extração para AFLAB₁ e AFLAM₁ no leite

Para extração das AFLAs em leite realizou-se uma revisão da literatura e quatro métodos foram selecionados com base nas seguintes características, rapidez, simplicidade, limites de detecção e quantificação. Os ensaios de recuperação foram realizadas em níveis de fortificação (0,5; 1,0; 2,0 ng mL⁻¹).

4.4.1. Procedimento de Extração de AFLAS segundo A.O.A.C (2000)

Na amostra homogeneizada (5 mL) foram adicionados metanol (20 mL) e celite (2 g) para limpeza do extrato. Após agitação (30 min) foi adicionado cloreto de sódio 4% (15 mL) para separação de fases. A fase de metanólica foi desengordurada com hexano (10 mL) e após realizada partição líquido-líquido com clorofórmio (10 mL). A fração clorofórmica foi evaporada e o extrato ressuspenso na mistura de solvente que compõe a fase móvel para injeção. Após total evaporação do solvente, o resíduo foi dissolvido em 1 mL da composição da fase móvel (ACN:MetOH:H₂O, 25:15:60, v/v), novamente centrifugado a 6097 xg e armazenado até análise cromatográfica. (Apêndice 1).

4.4.2. Procedimento da Extração de AFLAS segundo Anagnostopoulos et al., (2014)

A extração foi realizada na amostra homogeneizada (4 mL) foi adicionando metanol acidificado (4 mL) (1% de ácido metanoico) seguida de agitação (30 s), e centrifugação a 4000 rpm (5 min). A fração metanólica foi separada e congelada (- 18 °C). Uma alíquota foi retirada, filtrada e injetada no CLAE – FD. Após total evaporação do solvente, o resíduo foi dissolvido em 1 mL da composição da fase móvel (ACN:MetOH:H₂O, 25:15:60, v/v), novamente centrifugado a 6097 xg e armazenado até análise cromatográfica. (Apêndice 2).

4.4.3. Procedimento da Extração de AFLAS segundo Flores et al., (2017)

Na amostra (1 mL) foi adicionado acetonitrila acidificada (2% de HCOOH) e o conteúdo foi homogeneizado em agitador rotativo durante 15 min. Em seguida, o conteúdo do tubo foi centrifugado durante 10 min a 3077 xg, permitindo a separação do sobrenadante. Quatro mililitros do sobrenadante foram separados e adicionados a um tubo com aproximadamente 60 mg de acetato de sódio, seguida de agitação e centrifugação. Em seguida, foi recolhida a fase de acetonitrila (fase superior), evaporada e o conteúdo foi ressuspensão na fase móvel para injeção cromatográfica. Após total evaporação do solvente, o resíduo foi dissolvido em 1 mL da composição da fase móvel (ACN:MetOH:H₂O, 25:15:60, v/v), novamente centrifugado a 6097 xg e armazenado até análise cromatográfica. (Apêndice 3).

4.4.4. Método de extração de AFLAS segundo Becker-Algeri (2016)

A extração foi realizada conforme procedimento utilizado por Sartori et al., (2015) com modificações feitos por Becker-Algeri, (2016) no método QuEChERS. Para tanto, 5 mL de amostra foram adicionadas à tubos falcon de 50 mL contendo 10 mL de hexano e 15 mL de acetonitrila acidificada (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 vórtex durante 1 min, e posteriormente centrifugados a 2330 xg durante 10 min. A fase orgânica contendo hexano foi removida e uma alíquota de 5 mL da fase contendo acetonitrila foi recolhida e submetida a secagem em corrente de nitrogênio a 45 °C. Após total evaporação do solvente, o resíduo foi dissolvido em 1 mL da composição da fase móvel (ACN:MetOH:H₂O, 25:15:60, v/v), novamente centrifugado a 6097 xg e armazenado até análise cromatográfica (Apêndice 4).

4.5. Análise Cromatográfica

Para quantificação das AFLAs foi utilizado um cromatógrafo a líquido de alta eficiência acoplado a detector de fluorescência (CLAE – FD) com derivatizador pós coluna fotoquímico (Romer Derivatization Unit RDU TM) e processamento no *software LC Solution*. Para a separação simultânea das micotoxinas AFLAM₁ e AFLAB₁ foi utilizada fase móvel composta por acetonitrila:metanol:água, na proporção de 25:15:60 (v/v), com modo de eluição isocrática (Becker-Algeri, 2016). A análise cromatográfica foi realizada em coluna *Kromasil C18* (5 µm, 15 cm x 4,6 mm), acoplado com aumento de intensidade, com vazão de fase móvel de 1 mL min⁻¹ e temperatura do forno de 40°C, 370 e 410 nm foram os comprimentos de onda de excitação e emissão, respectivamente, e o volume de injeção da amostra de 20 µL (SARLAK

et al., 2017). O tempo da análise cromatográfica foi de 12 min. Os compostos foram identificados com base no tempo de retenção relacionando com os padrões respectivos e para confirmação foi realizada co-cromatografia adicionando soluções padrão ($0,5 \text{ ng mL}^{-1}$) que promoviam o aumento de sinal.

4.6. Validação do Método

Após a seleção do método de extração, este foi validado avaliando as seguintes figuras de mérito: limite de detecção, limite de quantificação, curvas analíticas (calibração externa no solvente e superposição na matriz), faixa linear, exatidão (recuperação), precisão (repetibilidade e precisão intermediária) e efeito matriz (EM) (INMETRO, 2011).

4.6.1. Limite de detecção e limite de quantificação

Os limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) foram estimados pela calibração externa no solvente, obtidos pela injeção de soluções analíticas com diferentes concentrações preparadas em diluições sucessivas da solução padrão trabalho em estudo (2006/401/EC), estes valores foram relacionados com a relação sinal/ruído considerando, respectivamente a concentração que gerou no mínimo um sinal de 3 e 10 vezes maior que a razão do sinal pela linha de base (ruído).

4.6.2. Linearidade e Curva Analítica

Foram construídas duas curvas de calibração: (a) padrões diluídos em fase móvel e (b) concentrações conhecidas dos analitos adicionadas na matriz (leite). Em (a), a linearidade foi determinada por meio da construção de curvas de calibração na faixa de $0,1$ a 5 ng mL^{-1} para a AFLAM₁ e $0,1$ a 2 ng mL^{-1} para AFLAB₁. Foram utilizados seis níveis de concentração para a construção de cada curva de calibração no solvente: $0,1$; $1,0$; $2,5$; $3,5$; $4,0$ e $5,0 \text{ ng mL}^{-1}$ para AFLAM₁ e $0,1$; $0,3$; $0,6$; $1,0$; $1,5$ e $2,0 \text{ ng mL}^{-1}$ para AFLAB₁, a partir da solução padrão das AFLAs. Para a construção da curva de calibração na matriz (b) foram também utilizados seis níveis com as seguintes concentrações para AFLAM₁: $0,1$; $1,7$; $2,5$; $3,5$; $5,0$ e $9,0 \text{ ng mL}^{-1}$ e para AFLAB₁: $0,2$; $0,5$; $1,0$; $2,0$; $3,0$ e $5,0 \text{ ng mL}^{-1}$.

4.6.3. Exatidão

Neste estudo, a verificação do percentual de recuperação do método (Equação 1) foi realizada fortificando amostras de leite com os padrões de AFLAB₁ e AFLAM₁. Alíquotas de cada padrão foram transferidas para tubos falcon de 50 mL , após a evaporação do solvente, foram adicionadas alíquotas de leite (5 mL) aos tubos. Foram utilizados três níveis de

fortificação (0,5 ng mL⁻¹, 1,0 ng mL⁻¹ e 2,0 ng mL⁻¹) tendo como nível inferior o limite legislado para AFLAM₁ em leite pela ANVISA (0,5 ng mL⁻¹). O percentual de recuperação foi estimado relacionando a concentração das AFLAs quantificadas, com a concentração esperada, conforme indicado na Equação 1

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

Onde: R representa o percentual de recuperação; C₁ indica a concentração determinada na amostra fortificada; C₂ a concentração determinada na amostra não fortificada (branco) e C₃ a concentração do padrão utilizada para a fortificação.

4.6.4. Precisão

A precisão do método foi avaliada em função da repetibilidade e da precisão intermediária. Para a repetibilidade, as amostras foram fortificadas em diferentes níveis, em triplicata, seguindo todo o procedimento de extração, e injetadas em triplicata, pelo mesmo analista e nas mesmas condições cromatográficas. A partir das três determinações foi calculado o RSD (%). Para os cálculos dos RSD utilizou-se a Equação 2:

$$RSD(\%) = \frac{s}{X_m} \times 100 \quad \text{Equação (2)}$$

Onde: RSD – desvio padrão relativo; s - estimativa do desvio padrão absoluto; X_m - média das medidas em replicatas (n = 3 injetadas em triplicata).

4.6.5. Efeito de Matriz

A avaliação do efeito matriz pode ser realizada por meio de comparações das inclinações das curvas analíticas por padronização externa no solvente com a curva por superposição da matriz (ECONOMOU et al., 2009). O cálculo foi efetuado através da Equação 3.

$$EM = 100 \times \left(1 - \frac{S_m}{S_s}\right) \quad \text{Equação (3)}$$

Onde: EM é o efeito de matriz (%); S_s é a inclinação da curva no solvente e S_m é a inclinação da curva na matriz. Quando os valores encontrados para o efeito matriz estiverem entre -20 e +20%, considera-se que o efeito matriz é baixo; se estiverem entre -50 e +50% é considerado médio; e se os valores encontrados forem abaixo de -50% ou acima de +50%, o efeito matriz é considerado alto (ECONOMOU, et al. 2009).

4.7. Estimativa do Risco de exposição

O risco de exposição foi estimado através da ingestão diária de leite relacionado a ocorrência de aflatoxinas determinada neste estudo expresso pela equação 4 (PACIN et al., 2010; SOUZA et al., 2015).

$$DI = \frac{[AFLA] \cdot CD}{MC} \quad \text{Equação (4)}$$

Onde: DI – Ingestão diária; [AFLA] – Concentração média da aflatoxina encontrada no estudo; C.D – Consumo diário de leite; M.C – Massa corporal da população estimada.

4.8. Tratamento de resíduos químicos e limpeza de vidraria

A limpeza do material utilizado nos diferentes experimentos na presença de micotoxinas foi realizada, pela imersão deste em solução contendo a concentração de 1% de hipoclorito de sódio. Os resíduos orgânicos dos ensaios de degradação foram rotulados e armazenados de acordo com sua classificação, seguindo regulamento para tratamento de resíduos estabelecido na Escola de Química e Alimentos da Universidade Federal do Rio Grande.

4.9. Tratamento de dados

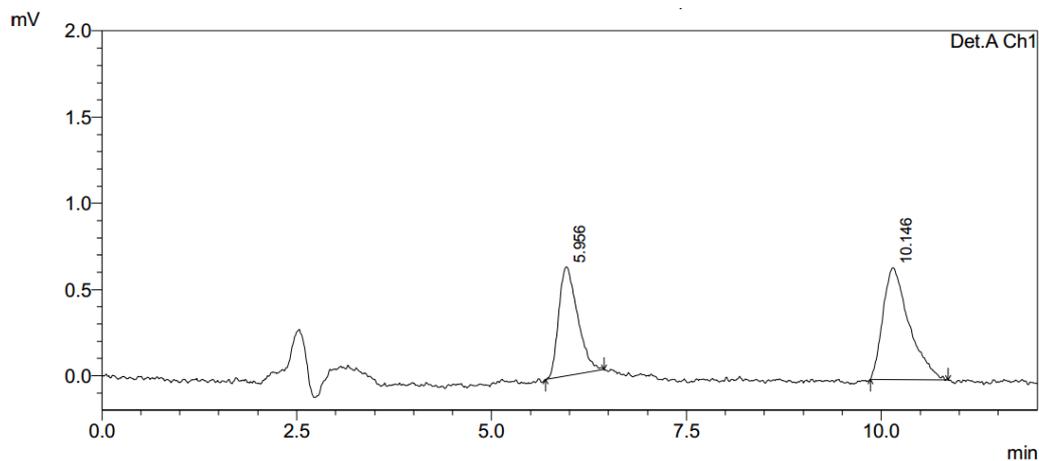
Os resultados foram avaliados através de análise de variância (ANOVA), utilizando o software *Statistica 5*.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Seleção do método de extração de AFLAB₁ e AFLAM₁

Na primeira etapa do estudo foram estabelecidas as condições cromatográficas para a separação da AFLAB₁ e AFLAM₁ em CLAE-FL. As condições de temperatura e vazão descritas no item 4.5 propiciaram a separação dos analitos conforme ilustra a Figura 3. Para a eluição de AFLAM₁ foram necessários 5,956 min e para AFLAB₁ 10,146 min.

Figura 3 - Cromatograma da AFLAB₁ e AFLAM₁ no solvente.



Com a separação de AFLAB₁ e AFLAM₁ concluída, foram construídas as curvas analíticas dos padrões e a estimativa dos indicadores de eficiência da relação quantitativa concentração versus sinal (Tabela 4). A curva de calibração evidentemente é uma parte fundamental do processo analítico afetando a aplicabilidade, a exatidão, a precisão e o custo global de uma análise. Na Tabela 4 estão apresentadas as equações das curvas analíticas com os parâmetros de validação do método. Os dados mostram que o método cromatográfico foi adequado para a quantificação das duas AFLAs, uma vez que seus indicadores cumprem as recomendações de análise de confiabilidade, tendo em vista que a INMETRO recomenda coeficiente de correlação (R) maior a 0,90.

Tabela 4 - Características cromatográficas de AFLAM₁ e AFLAB₁ no solvente.

Parâmetros analíticos	AFLAM ₁	AFLAB ₁
Equação da Curva no Solvente	$y = 17294x - 7989,1$	$y = 30970x - 4657,2$
Linearidade (ng mL⁻¹)	0,1 - 5	0,3 - 2
Coefficiente de correlação	0,9834	0,9801
LDi (ng mL⁻¹)	0,03	0,1
LQi (ng mL⁻¹)	0,1	0,3

LDi = limite de detecção do instrumento; LQi = limite de detecção do instrumento.

Para a avaliação da exatidão dos métodos foram realizados ensaios de recuperação em três níveis, nas concentrações correspondentes 0,5; 1,0; 2,0 ng mL⁻¹. A precisão do método foi expressa em termos de desvio padrão relativo (RSD). Os métodos demonstraram uma boa precisão uma vez que os valores de RSD foram menores que 20% para a repetibilidade.

O uso de uma técnica de extração mais seletiva e específica pode eliminar ou reduzir o número de etapas presentes em um método de extração (RIDGWAY, LALLJIE, & SMITH, 2007). O efeito da matriz pode ser um parâmetro importante para a reprodutibilidade dos resultados, assim como pode influenciar as taxas de recuperação do método. Devido ao fato do leite ser uma amostra natural e complexa (contendo proteínas e lipídios), as AFLAM₁ e AFLAB₁ não são facilmente extraídas, necessitando de um processo de extração eficiente e robusto para separar a AFLAM₁ e AFLAB₁ do leite (OLIVEIRA, 2010).

Os quatro métodos de extração de AFLAs descritos na literatura avaliados neste estudo quanto aos percentuais de recuperação das micotoxinas estão apresentados na Tabela 5. Segundo a diretriz da Comissão Europeia que faz recomendações específicas para performance de ensaios de recuperação de micotoxinas (2006/401/EC), para a AFLAM₁ utilizada em níveis de concentração maiores que 0,05 ng mL⁻¹ o valor de recuperação recomendado é de 70 – 120 %.

Tabela 5 - Recuperação das AFLAB₁ e AFLAM₁ extraídas do leite pelos vários métodos.

MÉTODO	Fortificação (ng mL ⁻¹)	Recuperação (%)	
		AFLAM ₁	AFLAB ₁
A.O.A.C (2000)	0,5	100 (2)	130 (8)
	1,0	200 (6)	221 (5)
	2,0	132 (3)	173 (8)
QuEChERS adaptado por Becker-Algeri, (2016)	0,5	120 (20)	109 (18)
	1,0	125 (17)	140 (12)
	2,0	121 (19)	134 (13)
ANAGNOSTOPOULOS et al. (2014)	0,5	82 (3)	28 (4)
	1,0	65 (8)	50 (1)
	2,0	50 (9)	59 (5)
FLORES et al. (2017)	0,5	83 (7)	36 (5)
	1,0	75 (2)	45 (7)
	2,0	60 (9)	50 (6)

Resultados expressos como média (RSD). RSD – desvio padrão relativo; n = 3.

A escolha do método analítico irá depender essencialmente da exatidão e precisão necessárias para a finalidade a que se destina a análise, mas também dos recursos disponíveis no laboratório. A relação custo benefício deve estar sempre em mente. Não se deve perder tempo e recursos matérias além do necessário para atingir o objetivo da análise. Outros fatores que entram nas considerações para escolha do método são a quantidade de amostra disponível, teor do componente de interesse na amostra, composição química da amostra e número de amostras a analisar (SOARES, 2006).

Nos métodos de A.O.A.C (2000) e QuEChERS modificado foram observado um aumento de recuperação, maior que 100% e o contrário foi observado para Anagnostopoulos et al. (2014) e Flores et al. (2017) onde as recuperações foram baixas. Recuperações médias de 65% para AFLAM₁, 46% para AFLAB₁, foram observadas para o método de extração descrito por Anagnostopoulos et al. (2014), enquanto que para o método de extração descrito por Flores et al. (2017) apresentaram recuperações médias de 73% para AFLAM₁ e 44% para AFLAB₁. A influência do solvente extrator, associado as etapas de limpeza, possivelmente tenham afetado nas recuperações, bem como em outros indicativos de confiabilidade do método.

Levando em consideração o número de amostras que foram analisadas nesse trabalho, foi escolhido o método QuEChERS modificado (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe*)

que tem como vantagens principais na avaliação de micotoxinas ser rápido, fácil, econômico, efetivo, robusto e seguro. Além disso, quando é necessário avaliar a recuperação de micotoxinas com diferentes polaridades, (onde as polaridades são expressas em termos de Log Kow, a $AFLAM_1 = 0,5$ e $AFLAB_1 = 1,23$, sendo $AFLAM_1$ a mais polar) a eficiência pode ser comprometida, isto pode ocorrer pela maior ou menor afinidade das micotoxinas pelo solvente, como pode ser verificado nos resultados de recuperação expressos na Tabela 5 (CHEMSPIDER, 2015).

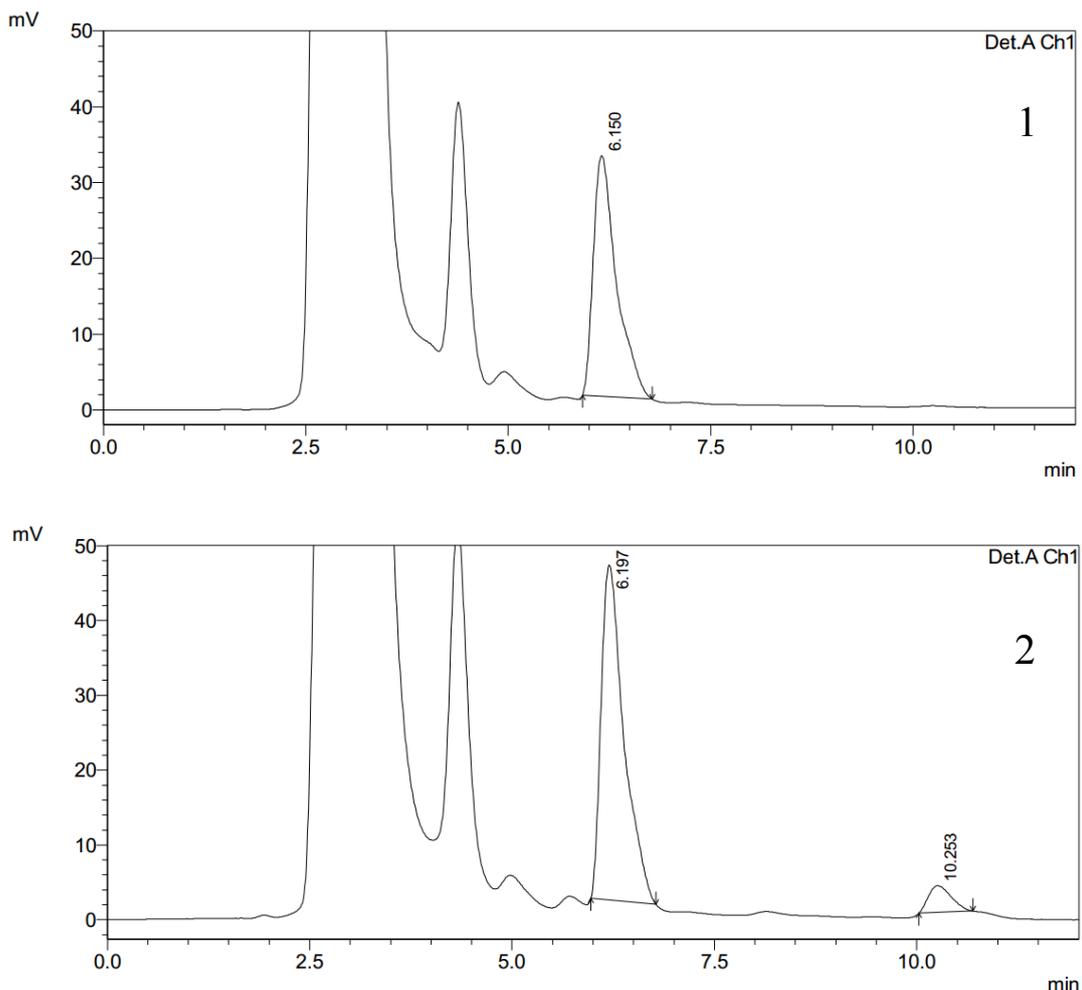
O método de QuEChERS explora as possibilidades oferecidas pela instrumentação analítica moderna. Visando alcançar os valores de LMTs estabelecidos por legislações internacionais, este método foi idealizado para gerar extratos que possam ser analisados por cromatografia líquida e/ou cromatografia gasosa acopladas à espectrometria de massas (LC-MS/MS e GC-MS/MS) (ANASTASSIADES, et al. 2003). O método de QuEChERS utiliza acetonitrila como solvente possibilitando a extração de uma menor quantidade de co-extrativos lipofílicos provenientes da amostra, como por exemplo, gorduras e pigmentos (LEHOTAY, MASTOVSKÁ, LIGHTFIELD, 2005). Outra grande vantagem é que a acetonitrila proporciona a extração de uma ampla faixa de compostos com diferentes polaridades e, quando acidificada, permite recuperações satisfatórias (ANASTASSIADES, et al. 2003). No método de QuEChERS, dependendo da natureza do solvente utilizado na etapa de partição, obtêm-se melhores percentuais de recuperação para analitos polares, uma vez que a adição de sais diminui a solubilidade destes compostos na fase aquosa, bem como, a quantidade de água na fase orgânica e vice-versa (PIZZUTTI, et al., 2007).

Becker-Algeri, (2016), avaliou a contaminação por $AFLAM_1$ em leite cru e fermentado pelo mesmo método de extração empregado no presente trabalho (QuEChERS), chegando a valores de recuperação que variaram de 76,6% a 123,3% para a $AFLAM_1$ e 57,4% a 89,1% para a $AFLAB_1$. Zhou et al. (2017) avaliaram a contaminação do leite por $AFLAM_1$ e $AFLAB_1$, consumido na província de Zhejiang (China), encontrando valores de recuperação que variaram de 70 a 105 %. No seu estudo uma das principais diferenças foi a utilização de combinações de sais, acetato de sódio, cloreto de sódio e sulfato de sódio. No entanto, Michlig et al., (2016) usou o método de QuEChERS para determinar a ocorrência de $AFLAM_1$ no leite bovino cru, utilizando combinações de sais de sulfato de magnésio anidro e acetato de sódio, obtendo percentagens de recuperações entre 70% e 95%. Já Rubert et al., (2014) analisou a ocorrência de $AFLAM_1$ e $AFLAB_1$ no leite humano coletado em Valencia (Espanha) utilizando as combinações de sais de sulfato de magnésio e cloreto de sódio, obtendo uma recuperação de 69 e 75% respectivamente.

5.2. Validação do método

O método QuEChERS utilizado para a extração da AFLAM₁ nesse estudo, foi adaptado e validado para a extração e determinação simultânea das AFLAs M₁ e B₁ em leite. A seletividade foi estimada por meio da fortificação de cada amostra com concentrações conhecidas das AFLAs (co-cromatografia) e posterior comparação com as respectivas amostras sem contaminação. Essa avaliação demonstrou a presença de sinais de interferentes nos tempos de retenção da AFLAM₁ e da AFLAB₁, com isso procedeu-se o estudo do efeito de matriz (EM). O cromatograma de CLAE da amostra de leite UAT sem e com fortificação de AFLAM₁ (9 ng mL⁻¹) e AFLAB₁ (5 ng mL⁻¹) é mostrado na Figura 4.

Figura 4 - Cromatogramas das AFLAB₁ e AFLAM₁ em CLAE – FD. Em que 1 é uma amostra com contaminação naturalmente por AFLAM₁ (6,150 min), e 2 com fortificação de AFLAM₁ (6,197 min, 2 ng mL⁻¹) e AFLAB₁ (10,253 min, 1 ng mL⁻¹).



Para validar o método de extração e quantificação e assim garantir que os dados sejam viáveis, foi construída uma curva de calibração na matriz (usando leite UAT integral) com seis

níveis de concentração das AFLAs (AFLAM₁ e AFLAB₁) (Tabela 6). Este método é usado para compensar o efeito da matriz ou de possíveis interferentes e é de suma importância em determinações quando a matriz pode interferir na pré-concentração, extração, separação ou detecção da substância de interesse. O estudo do efeito da matriz foi realizado de acordo com a Equação 3, comparando as inclinações da curva de calibração na matriz preparados em extratos em branco com a curva de calibração preparada no solvente (ECONOMOU, et al., 2009).

Tabela 6 - Características cromatográficas de AFLAM₁ e AFLAB₁ na matriz

Parâmetros analíticos	AFLAM ₁	AFLAB ₁
Equação da Curva na Matriz	$y = 6759,4x + 12023$	$y = 1255x - 1937,7$
Linearidade (ngmL⁻¹)	0,1 - 9	0,2 - 5
Coefficiente de correlação	0,9679	0,9808
LDm (ngmL⁻¹)	0,013	0,06
LQm (ngmL⁻¹)	0,043	0,1
EM (%)	61	96

LDm = limite de detecção do método; LQm= limite de detecção do método.

As linearidades das curvas apresentaram ampla faixa de aplicação, (SCAGLIONI et al, 2014). Os valores de LDm e LQm determinados no presente estudo foram considerados satisfatórios, tendo em vista que o LQm apresentou valor inferior ao legislado para a AFLAM₁ em leite no Brasil (0,5 ng mL⁻¹) e na União Europeia (0,05 ng mL⁻¹).

Os efeitos de matriz para ambas as AFLAs foram maiores que 50% (tabela 6). Segundo Economou et al. (2009), esse efeito é considerado alto e recomenda-se o uso da curva de calibração adaptada à matriz para garantir uma precisão aceitável na quantificação de qualquer substância, e com isso, o uso da curva de calibração na matriz resultou em recuperações satisfatórias conforme apresentado na Tabela 7. Flores-Flores et al. (2017), em seu estudo para validar método em LC-MS/MS (cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas sequencial) para quantificação de múltiplas micotoxinas em leite bovino cru, verificou um efeito da matriz entre 25,5 e 96,8%, para todas as micotoxinas (aflatoxina G₂, G₁, M₁, M₂, B₂, B₁, ocratoxina A, fumonisina B₁ e B₂, zearalenona, depoxy-deoxinivalenol), onde foram testados três níveis de fortificação (0,05; 0,5; 2,0 ng mL⁻¹) sendo que o EM (%) para AFLAM₁ foi 110%, 90%, e 89% enquanto que para AFLAB₁ foi 58%, 57% e 59%.

Michlig et al., (2016) e Rubert et al., (2014) usaram uma curva de calibração na matriz para determinar a concentração de AFLAM₁ e AFLAB₁ no leite bovino cru e leite humano pois teve um efeito matriz de maior que 70%, enquanto que, Mao et al., (2018) no seu estudo para

analisar micotoxinas em leite bovino cru usando UHPLC/Q-Orbitrap HRMS (Cromatografia líquida ultra-alta performance com sistema de espectrometria de massa de alta resolução) não teve necessidade de usar uma curva de calibração na matriz, pois verificou um efeito matriz de -2,2% e 4% para AFLAM₁ e AFLAB₁, respectivamente. Este comportamento difere no encontrado no presente trabalho pois foi realizada a purificação das micotoxinas extraídas do leite com uma coluna de imunoafinidade “*multi-mycotoxin AOZ*”, o que fez o efeito da matriz ser insignificante.

Tabela 7- Recuperação das AFLAB₁ e AFLAM₁ usando curva de calibração na matriz.

Fortificação (ng mL ⁻¹)	Recuperação (%)			
	Leite fluido		Leite em pó	
	AFLAM ₁	AFLAB ₁	AFLAM ₁	AFLAB ₁
0,5	100 (19)	89 (17)	70 (10)	69 (9)
1,0	105 (15)	120 (10)	93 (18)	95 (14)
2,0	101 (13)	114 (19)	89 (11)	103 (16)

Resultados expressos como média (CV). CV-- Coeficiente de variação; n = 3.

Seguindo-se a orientação para validação de métodos cromatográficos, no qual os valores de recuperação devem estar entre 70 e 120% com valores de RSD \leq 20%, os resultados foram considerados satisfatórios. Com relação a precisão, valores menores e iguais a 20% foram obtidos. O método de extração QuEChERS mostrou-se seletivo e preciso e exibiu um intervalo de recuperação de 100 - 105% (AFLAM₁) e 89 – 120% (AFLAB₁) para leite líquido e 70 – 93% (AFLAM₁) e 69 – 103% (AFLAB₁) para lei em pó. Os limites de detecção e quantificação foram 0,013 e 0,043 ng mL⁻¹ para AFLAM₁ e 0,06 e 0,1 ng mL⁻¹ para AFLAB₁, respectivamente (INMETRO, 2011; 2006/401/EC). Matrizes complexas (principalmente contendo proteínas e lipídios) e baixos níveis de AFLAs nas amostras, são desafios que devem ser superados pelo método de extração. Um método de extração para AFLAs deve ser capaz de eliminar interferências da matriz e determinar AFLAs com alto grau de precisão e sensibilidade. Eliminação de interferências como proteínas e lipídios na determinação cromatográfica, geralmente, requer pré-tratamento de amostras (ZAYAS-BLANCO et al., 2004).

Rejczak et al. (2017) para determinação de pesticidas no leite bovino usando o metodo de extração QuEChERS, utilizou combinações de sorventes como PSA (N-propiletlenodiamina) e sorventes à base de dióxido de zirconio “*Z-Sep*” (ZrO₂) no processo de limpeza (após extração com acetonitrila) para eliminar interferentes como lipídios no leite bovino, assim como, Michlig et al. (2016) no estudo da determinação de AFLAM₁ no leite

bovino, utilizou sulfato de magnésio ($MgSO_4$), PSA e C_{18} para eliminar lipídios nas amostras. Rúbies et al., (2016) utilizou C_{18} no processo de limpeza usando o mesmo método (QuEChERS) para eliminar lipídios no leite bovino, pois o autor afirma que, ao contrário do PSA, o C_{18} não produz uma diminuição na recuperação de pesticidas e é particularmente útil quando as matrizes com alto conteúdo lipídico são analisado. Por estes motivos, alguns métodos modificados apenas usaram C_{18} para remover gorduras evitando o uso de PSA.

Wang et al. (2011) para eliminar interferências na matriz do leite utilizaram métodos de pré-tratamento como extração de AFLAM₁ usando acetonitrila e em seguida uma alta velocidade na centrifugação, enquanto que Nász et al. (2012), utilizaram uma extração em fase sólida (SPE) assistida por micro-ondas para eliminar interferências na matriz do leite. Essas técnicas de pré-tratamento são realizadas por operação manual, contendo vários passos e podem sofrer graves desvantagens, como baixa recuperação, perda de analito, contaminação e durações analíticas prolongadas. (WANG & LI, 2015). No método em estudo (QuEChERS), para eliminar interferências como lipídios na amostra do leite adicionou-se o hexano, e ajustou-se com a utilização da curva de calibração na matriz para quantificação das AFLAs.

5.3. Ocorrências de AFLAM₁ e AFLAB₁ no leite

Amostras de leite UAT integral, desnatado, semidesnatado, em pó, e infantil foram analisadas quanto a sua contaminação natural por AFLAB₁ e AFLAM₁, utilizando o método QuEChERS para extração e quantificação em CLAE – FD, nas condições anteriormente determinadas (Tabela 8).

Tabela 8- Incidência de AFLAB₁ e AFLAM₁ em diferentes amostras de leite.

País	Leite	F.A	AP/TA	AFLAM ₁	AFLAB ₁	%C.O	Acima do LMT (%)*
BRASIL	Integral (ng mL ⁻¹)	F.	19/26	0,06 – 3,67	0,1– 0,15	10	38
	Desnatado (ng mL ⁻¹)	F.	7/11	0,04 – 1,05	0,2 – 0,6	5	45
	Semidesnatado (ng mL ⁻¹)	F.	9/12	0,09 – 1,4	nd	0	42
	Integral (µg kg ⁻¹)	P.	6/10	0,1 – 21,1	nd	0	20
	Infantil (µg kg ⁻¹)	P.	0/3	nd	nd	0	0
C.V.	M. I (µg kg ⁻¹)	P.	10/17	0,24 – 5,21	nd	0	12
	M. II (µg kg ⁻¹)	P.	8/16	1,6 – 18,7	nd	0	38
	M. III (µg kg ⁻¹)	P.	17/17	0,6 – 20,3	nd	0	83

LMT* - Limite máximo tolerado pela ANVISA; nd – não detectado; F.A- Forma da amostra. F- leite fluido. P- leite em pó; AP – amostras positivas; TA – total de amostras; %C.O – percentagem da co-ocorrência por ambas as AFLAs na amostra; C.V. – Cabo Verde; M. – Marca; A faixa de coeficiente de variação foi de 7% a 24%.

Para as amostras de leite UAT integral, analisadas verificou-se que 38% dessas excederam o limite máximo tolerado (LMT) para AFLAM₁ segundo resolução da ANVISA RDC (Resolução da Diretoria Colegiada) N° 7 de 18/02/11 (leite fluido $\leq 0,5 \text{ ng mL}^{-1}$; leite em pó $\leq 5 \text{ µg kg}^{-1}$), enquanto que para as amostras de leite desnatado e semidesnatado, 45% e 42% destas excederam este limite. Para AFLAB₁ verificou-se uma contaminação de 24% das 62 amostras de leites consumidos na região sul do Brasil (Rio grande) em uma faixa de concentração de $0,1 - 0,6 \text{ ng mL}^{-1}$, sendo que na literatura relatos sobre a incidência de AFLAB₁ em leite ainda são escassos, tendo em vista que a legislação da maioria dos países só impõe LMTs para AFLAM₁ em leite e seus derivados. Apesar disso, a avaliação da incidência da AFLAB₁ requer maior atenção, tendo em vista que foram quantificados níveis de AFLAB₁ maiores do que o legislado no Brasil, para seu composto hidroxilado (AFLAM₁) em amostras de leite.

Estudos realizados no Brasil também identificaram a presença de AFLAM₁ e AFLAB₁ em amostras de leite UAT. Oliveira et al. (2013) estudaram 75 amostras de leite UAT comercializadas em Minas Gerais e 31% dessas amostras possuíam níveis de AFLAs acima do LMT numa faixa de concentração de $1 - 4,1 \text{ ng mL}^{-1}$. Scaglioni et al. (2014) estudaram 40 amostras de leite adquiridas de produtores da região de Rio Grande (RS) (leite cru), do comércio local (leite integral pasteurizado e UAT) e de uma indústria de beneficiamento situada em Teutônia-RS (leite cru, pasteurizado, concentrado, em pó e UAT). Os autores detectaram a presença de AFLAB₁ em 42% das amostras de leite pasteurizadas e 13% das amostras de leite

UAT, em níveis de concentração de 0,7 – 1,5 ng mL⁻¹, enquanto que a AFLAM₁ estava presente em 29% das amostras de leite cru, 58% em leite pasteurizado, 67% em leite UAT e 67% em leite concentrado. Todas as amostras que apresentaram contaminação natural por ambas as AFLAs estavam acima do LMT. Enquanto que no estudo em questão 15% das amostras apresentaram contaminação natural por ambas as AFLAs.

Gonçalez et al. (2005) detectaram AFLAM₁ em 40% das amostras de leite analisados (43 amostras de leite pasteurizados adquiridas no comércio de municípios do estado de São Paulo) em um índice de 0,04 – 4,64 ng mL⁻¹. Em outro estudo, 40 amostras de leite semidesnatado, pasteurizado e UAT comercializadas em Portugal, foi verificado a incidência de AFLAM₁ em 27,5% das amostras com valor médio de 0,0234 ng mL⁻¹, sendo que 5% destas apresentaram contaminação acima do LMT segundo a regulação da União Europeia (UE) 466/2001 (leite ≤ 0,05 ng mL⁻¹) (Duarte et al., 2013). Gurbay et al. (2010) verificaram a contaminação por ambas AFLAs em leite humano, oriundo da Turquia e em 100% das amostras analisadas foram encontrados níveis de 0,095 - 4,1 ng mL⁻¹ para AFLAB₁ e 0,061 - 0,3 ng mL⁻¹ para AFLAM₁, demonstrando que é possível ocorrer a excreção da AFLA na sua forma não hidroxilada através do organismo humano e animal. Fato que indica que o animal foi alimentado com dieta onde os níveis da aflatoxina são elevados e ultrapassam a capacidade metabólica do indivíduo.

Nas amostras de leite em pó oriundos dos supermercados da cidade de Rio Grande (integral e infantil) do presente estudo, verificou-se uma contaminação por AFLAM₁ em seis amostras de leite em pó integral onde 20% excedeu o LMT segundo resolução da ANVISA (5 µg kg⁻¹). No leite em pó infantil não foi detectada contaminação por AFLAM₁ e AFLAB₁, um fato importante considerando que o leite infantil é uma das alternativas mais populares à amamentação, constituindo uma fonte importante ou frequentemente única de alimento para recém nascidos e bebês durante os primeiros meses de vida. Estes dados estão de acordo com Kosacari (2014) que analisou 33 amostras de leite infantil comercializados no distrito de Burdur (Turquia) e não detectou AFLAM₁.

Estudos recentes mostram que a incidência da contaminação por AFLAM₁ ocorre em diversas partes do mundo, em diferentes amostras, tais como, Irão onde Tajkarimi et al., (2007) encontraram em 98 amostras de leite UAT, um nível de contaminação por AFLAM₁ na faixa de 0,05 – 0,10 ng mL⁻¹. Da mesma forma Siddappa et al., (2012), relataram uma contaminação por AFLAM₁ em 30 amostras de leite UAT da Índia com nível contaminação na faixa de 0,1 - 3,8 ng mL⁻¹. Xiong et al., (2013) observaram que 43 das 72 amostras de leite UAT da China apresentaram um nível de contaminação por AFLAM₁ na faixa de 0,01 – 0,42 ng mL⁻¹,

enquanto que no Sudão, Elzupir & Elhusein, (2010) relataram que 148 amostras de leite UAT estavam contaminados com AFLAM₁ na faixa de 0,22 – 6,90 ng mL⁻¹. Na Turquia, Tekinsen e Eken (2008) analisaram 100 amostras de leite UAT e relataram que 67 % dessas amostras de leite estavam contaminadas com AFLAM₁. Os níveis de AFLAM₁ variaram de 0,010 - 0,630 ng mL⁻¹.

Zeng et al. (2013) estudaram 152 amostras de leite UAT e 26 amostras de leite pasteurizado consumido em Beijing (China). Os autores detectaram AFLAM₁ em 55% das amostras de leite UAT com uma faixa de concentração de 0,006 – 0,160 ng mL⁻¹ e 96,2% das amostras de leite pasteurizado com níveis de contaminação de 0,023 – 0,154 ng mL⁻¹, porém estas contaminações estavam abaixo dos LMTs na China (0,5 ng mL⁻¹). Em contrapartida o conteúdo de AFLAM₁ em 20,3% das amostras de leite UAT e 65,4% de amostras de leite pasteurizado excedem o LMT pela UE.

Ghanem e Orfi (2009), analisaram 74 amostras de leite bovino cru, 10 amostras de leite vaca pasteurizado e 8 amostras de leite em pó, provenientes do norte, sul e leste da Síria. Onde 95% das amostras de leite bovino cru apresentaram um nível de contaminação entre 0,02 – 0,690 ng mL⁻¹, enquanto que as amostras de leite bovino pasteurizado apresentavam um índice de contaminação entre 0,089 – 0,765 ng mL⁻¹. Considerando a totalidade de amostras contaminadas, 22% (cru) e 80% (pasteurizado) destas ultrapassaram o LMT pela EU para AFLAM₁. Para o leite em pó apenas uma amostra apresentou contaminação com AFLAM₁, contendo uma concentração inferior (0,012 µg kg⁻¹). Iqbal et al. (2017), analisaram 76 amostras de leite cru, 60 de leite UAT e 32 amostras de leite em pó, consumidos em Punjab (Paquistão). Os resultados dos níveis de contaminação por AFLAM₁ mostraram que 38%, 32% e 13%, respectivamente, excederam o LMT pela UE.

Vários países realizaram estudos sobre a incidência de AFLAM₁ no leite. Quanto ao leite em pó, alguns estudos foram conduzidos de diferentes regiões. Londano et al. (2013) analisaram 30 amostras de leite em pó comprados nos mercados da Argentina e do Brasil, verificando a incidência de AFLAM₁ em todas as amostradas num intervalo de 0,1 – 0,92 µg kg⁻¹, sendo que estes valores encontram-se dentro do LMT pela ANVISA, mas excederam o LMT pela UE (0,05 µg kg⁻¹).

Em Cabo Verde não existe indústria de laticínios, com isso o leite consumido é importado de vários outros países do mundo. Assim, Cabo Verde é um país “fortemente” dependente da importação de produtos alimentares de primeira necessidade, sendo Portugal o seu maior fornecedor (46,5% das importações cabo-verdianas em 2016). Os produtos agrícolas e alimentares são o terceiro maior grupo de produtos exportados de Portugal para Cabo Verde

(ASemana, 2017). Três diferentes marcas de leite em pó foram avaliadas, sendo as marcas I e II oriundas da União Europeia e a marca III de origem desconhecida conforme ilustrado na Tabela 8.

Os resultados obtidos mostram que os níveis de contaminação por AFLAM₁ encontrados, 12% da marca I, 38% da marca II, 83% da marca III, excederam o LMT pela ANVISA RDC (leite em pó $\leq 5 \mu\text{g kg}^{-1}$), em contrapartida, das 50 amostras de leite consumido na cidade e Assomada (Cabo Verde), 85 % destas amostras excederam o LMT pela União Europeia ($0,05 \mu\text{g kg}^{-1}$). De acordo com Midio et al. (2000) e Viridis et al. (2008) com a redução de níveis de água durante a transformação do leite fluido para leite em pó ocorre aumentos na concentração de AFLAM₁, justificando assim os níveis elevados das aflatoxinas nessas amostras.

As amostras da marca III não continham nenhum dado relativo ao produto, pois são comercializadas a-granel. Em Cabo Verde, o controle de qualidade para laticínios ainda é precário, principalmente envolvendo nível de exposição a AFLAs. Segundo a Biomin (2017) Cabo Verde está no grupo de países que não tem nenhuma amostra testada sobre incidência de aflatoxinas em diferentes matrizes. Em contrapartida, há vários estudos relatados na literatura sobre incidência de aflatoxinas em diferentes tipos de amostras na Europa, principalmente na Europa Meridional, com um risco de contaminação extremo (76 – 100%) acima do LMT pela UE.

Assem et al. (2011) avaliaram 14 amostras de leite em pó, comercializado no Líbano e encontraram 35,7% das amostras positivas para AFLAM₁ com uma média de $4,9 \mu\text{g kg}^{-1}$. Na China, Pei et al. (2009) relataram que 100% de 15 amostras de leite em pó apresentavam contaminação por AFLAM₁, 10 amostras apresentaram incidência entre $0,16 - 0,32 \mu\text{g kg}^{-1}$, e as outras cinco, em níveis superiores a $0,32 - 0,5 \mu\text{g kg}^{-1}$. Na Turquia (KABAK, 2012), a AFLAM₁ foi detectada em 8% das 62 amostras de leite infantil em uma concentração que variou de $0,016 - 0,022 \mu\text{g kg}^{-1}$. No Irã, Oveysi (2007) relatou que 96,6% das amostras de leite infantil estavam contaminadas com AFLAM₁ com uma média de $0,0073 \mu\text{g kg}^{-1}$.

Para Prandini et al. (2009) e Rahimi et al. (2010), a forma mais eficaz de controlar a incidência de AFLAM₁ no fornecimento de alimentos é reduzir a contaminação com AFLAB₁, em matérias-primas e suplementos na alimentação para gado leiteiro. De acordo com, Pei et al. (2009), amostras de alimentos de vários estábulos devem ser avaliadas rotineiramente para verificar a incidência de AFLAs e aquelas com contaminações excessivas, devem ser descartadas mantendo os alimentos da vaca leiteira longe da contaminação por fungos tanto quanto for possível. Ghazani (2009) concluiu que os produtores de leite devem ser informados

pelas autoridades governamentais sobre as potenciais consequências em relação a contaminação por AFLAs para a saúde animal e humana. Nuryono et al. (2009) sugeriram que uma vez que os processos de produção não afetam essencialmente a concentração de AFLAM₁, devido à sua estabilidade térmica, a principal estratégia para diminuir o risco de exposição, tanto para animais como para seres humanos, é um programa de monitoramento preventivo apropriado.

No entanto, o aspecto mais importante que deve ser considerado é a incidência de níveis de contaminação da AFLAM₁ no Brasil e principalmente em Cabo Verde onde não existe um LMT para AFLAM₁, em que o controle dos níveis de AFLAM₁ e AFLAB₁ são necessários não só para a proteção da saúde pública, como também para orientar as ações governamentais.

Para se obter mais informações sobre os dados e o efeito da interação entre lotes, marcas, países e tipo de leite, realizou-se uma ANOVA. Os valores obtidos (Tabela 9) mostram que em relação a contaminação por AFLAM₁, não existe uma diferença significativa ($p > 0,05$), entre os países (Cabo Verde e Brasil), enquanto que para País:Marca:lote, foi observado que existe uma diferença significativa ($p < 0,05$). Ou seja, essa diferença pode estar relacionada com a obtenção da matéria prima (leite cru) podendo a contaminação por AFLAB₁ em rações estar relacionado com tal efeito.

Em relação ao tipo de leite (integral, desnatado, semidesnatado) e a forma do leite (líquido e em pó) verificou-se uma diferença significativa de AFLAM₁ ($p < 0,05$). Segundo Deveci e Sezgin (2006) a concentração do leite e o processo da secagem podem influenciar a concentração de AFLAM₁ no leite. Galvano et al. (1996) e Prandini et al. (2009) afirmam que quando o leite desnatado for seco por pulverização, a concentração de AFLAM₁ é reduzida em torno de 59 a 68% em relação ao leite cru original, e que a distribuição de AFLAM₁ no leite não é homogênea. Ainda de acordo com os autores, 80% da proteína do leite é dividida na porção de leite desnatado ligada à caseína, assim a AFLAM₁ predomina na fração não gorda, o que pode ser explicado devido ao seu caráter semipolar. Outros estudos, defendem que o tratamento térmico é possivelmente a principal causa de redução de AFLAM₁ durante o processo de secagem porque pode causar a decomposição de proteínas do leite e a solubilidade de sais e, conseqüentemente, as interações hidrofóbicas entre AFLAM₁ e caseína são alteradas (DEVECI & SEZGIN, 2006).

A AFLAB₁ foi detectada em apenas 8% das 112 amostras. Os dados da Tabela 9 mostram que existe uma interação entre Lote:Tipo de leite, isso quer dizer que a variação da AFLAB₁ é diretamente associado ao tipo do leite.

Tabela 9 - Análise de variância para AFLAM₁.

Fator	G.L	S.Q	Q_{médio}	F	Valor - p
País	1	3,11	3,11	1,56	0,21
Forma	1	85,31	85,31	42,62	< 0,01
Marca	1	49,18	49,21	24,6	< 0,01
Lote	1	31,41	314	15,7	< 0,01
Tipo	2	1,01	0,53	0,23	< 0,01
Pais & Marca	1	275,03	275,03	137,42	< 0,01
Pais & Lote	1	176,06	176,1	87,93	< 0,01
Forma & Marca	1	2,50	2,502	1,25	0,3
Forma & Lote	1	0,04	0,04	0,01	0,8
Marca & Lote	1	22,42	22,42	11,20	< 0,01
Marca & Tipo	2	16,38	8,19	4,09	0,02
Lote & Tipo	2	1,91	0,96	0,48	0,62
Pais & Marca & Lote	1	11,70	11,69	5,84	0,02
Tipo & Marca & Lote	1	0,08	0,082	0,04	0,84
Marca & Lote & Tipo	2	33,59	16,8	8,39	< 0,01
Resíduos	301	602,42	2,001		

Tabela 10 - Análise de variância para AFLAB₁.

Fator	G.L	S.Q	Q_{médio}	F	Valor - p
Marca	1	0,10	0,11	26,7422	< 0,01
Lote	1	0,04	0,03	7,52	0,01
Tipo	1	0,06	0,05	13,84	< 0,01
Marca & Lote	1	0,01	1,55	0,006	0,23
Marca & Tipo	1	0,01	0,01	3,49	0,07
Lote & Tipo	1	0,07	0,06	16,94	< 0,01
Resíduos	20	0,08	0,004		

G.L – grau de liberdade; S.Q. – soma de quadrados; Q_{médio} – quadrado médio; F – constante de Fisher. País – Brasil, Cabo Verde; Tipo – Leite UAT integral, desnatado, semidesnatado e em pó; Forma – Fluido e em pó.

5.4. Estimativa do Risco de exposição

A exposição de AFLAM₁ e AFLAB₁ através do consumo de leite no Brasil do presente estudo foi estimada de acordo com Equação (4), onde a concentração média de AFLAM₁ e AFLAB₁ foi de 0,25 ng mL⁻¹ e 0,09 ng mL⁻¹ respectivamente. Estas concentrações são referentes a leite UAT e em pó consumidos no Brasil, onde dados mais atuais apontam um consumo de 175 litros de leite per capita (pc) durante o ano de 2016 (CONAB, 2017). A massa corporal (MC) foi estimada em 70 kg, conforme utilizado no estudo executado Souza et al., 2014 que também estimou o risco de exposição humana a micotoxinas para biscoitos. Para exposição de AFLAM₁ em cidade de Assomada (Cabo Verde) foram utilizado os mesmos dados do Brasil, pois não foram encontrado tais dados referentes a Cabo Verde.

Com base nos dados descritos a estimativa da ingestão diária (DI) da AFLAM₁ foi de 1,7 ng kg⁻¹ pc⁻¹ dia⁻¹, e 0,6 ng kg⁻¹ pc⁻¹ dia⁻¹ para AFLAB₁ na cidade Rio grande (Brasil) e 2,4 ng kg⁻¹ pc⁻¹ dia⁻¹ para AFLAM₁ na cidade de Assomada (Cabo Verde). O valor da DI para AFLAM₁ foi maior do que a DI dos cidadãos portugueses, brasileiros e francesa (≥ 15 anos) relatado por Duarte et al. (2013), Shundo et al., (2009) e Leblanc et al., (2015) onde o valor estimado foi 0,08 ng kg⁻¹ pc⁻¹ dia⁻¹, 0,19 ng kg⁻¹ pc⁻¹ dia⁻¹ e 0,01 ng kg⁻¹ pc⁻¹ dia⁻¹ respectivamente. Kos et al., (2014) encontrou valores de 2,90 ng kg⁻¹ pc⁻¹ dia⁻¹ (população masculina), 3,96 ng kg⁻¹ pc⁻¹ dia⁻¹ (população feminina) para a população adulta (> 55) de Sérvia. No entanto, valores mais elevados de DI para AFLAM₁ foi relatada anteriormente para a população adulta de Marrocos (3.26 ng kg⁻¹ pc⁻¹ dia⁻¹) (ZINEDINE et al., 2007), enquanto que valores mais baixos foram relatados na Espanha (0,305 ng kg⁻¹ pc / dia) (CANO-SANCHO et al., 2010).

Devido ao potencial carcinogênico das aflatoxinas, Comitês internacional de especialistas (JECFA, 2001) não especificaram um número ingestão diária tolerável (TDI) para aflatoxinas e concluiu que a exposição diária, mesmo < 1 ng kg⁻¹ pc / dia, contribuiu para o risco de câncer de fígado. Portanto, os níveis encontrados salientam a importância do estudo de métodos mais sensíveis e da ocorrência dessas micotoxinas em alimentos a fim de assegurar a segurança alimentar.

6. CONCLUSÃO

Dentre os métodos estudados, o QuEChERS mostrou-se um método rápido, sensível e confiável para determinação de AFLAM₁ e AFLAB₁ no leite líquido e em pó, apresentando valores dentro dos sugeridos pelos guias de validação para todas as figuras de mérito avaliadas, demonstrando exatidão (89 - 120%) e precisão (RSD < 20%). O estudo do efeito matriz indicou a necessidade da correção do mesmo, que neste caso foi realizado através da superposição da matriz.

Das amostras de leite comercializados no sul do Brasil, a AFLAM₁ foi detectada acima do LMT pela ANVISA em 38% das 62 amostras de leite, enquanto que para AFLAB₁ verificou-se uma contaminação de 24% em uma faixa de concentração de 0,1 – 0,6 ng mL⁻¹, já os leites em pó 20 % das amostras excederam o LMT pelo Brasil.

Os níveis de contaminação por AFLAM₁ encontrados nas amostras de leite em pó comercializados na cidade de Assomada (Cabo Verde), apresentam risco à saúde pública por estarem acima do LMT pela UE.

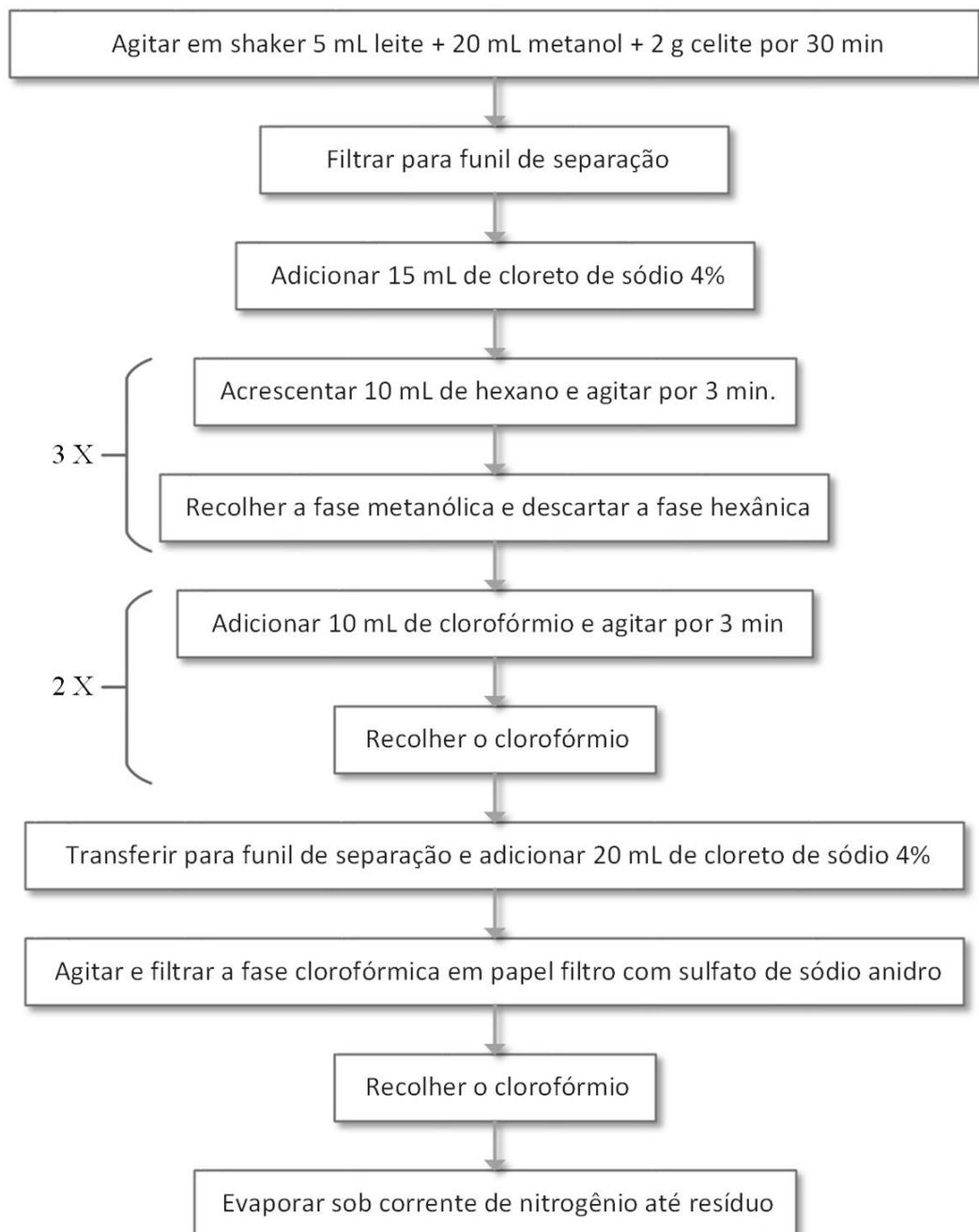
A Estimativa do risco de exposição da AFLAM₁ pelo consumo de leite no Brasil e Cabo Verde foi maior que limites internacionais para a ingestão diária aceitável.

O trabalho desenvolvido é de suma importância para o controle de qualidade do leite consumido na região sul do Brasil, e de um fator de impacto ainda maior abordando a contaminação destas toxinas em leite consumido em Cabo Verde, podendo ser uma base para criação de um LMT dessas toxinas.

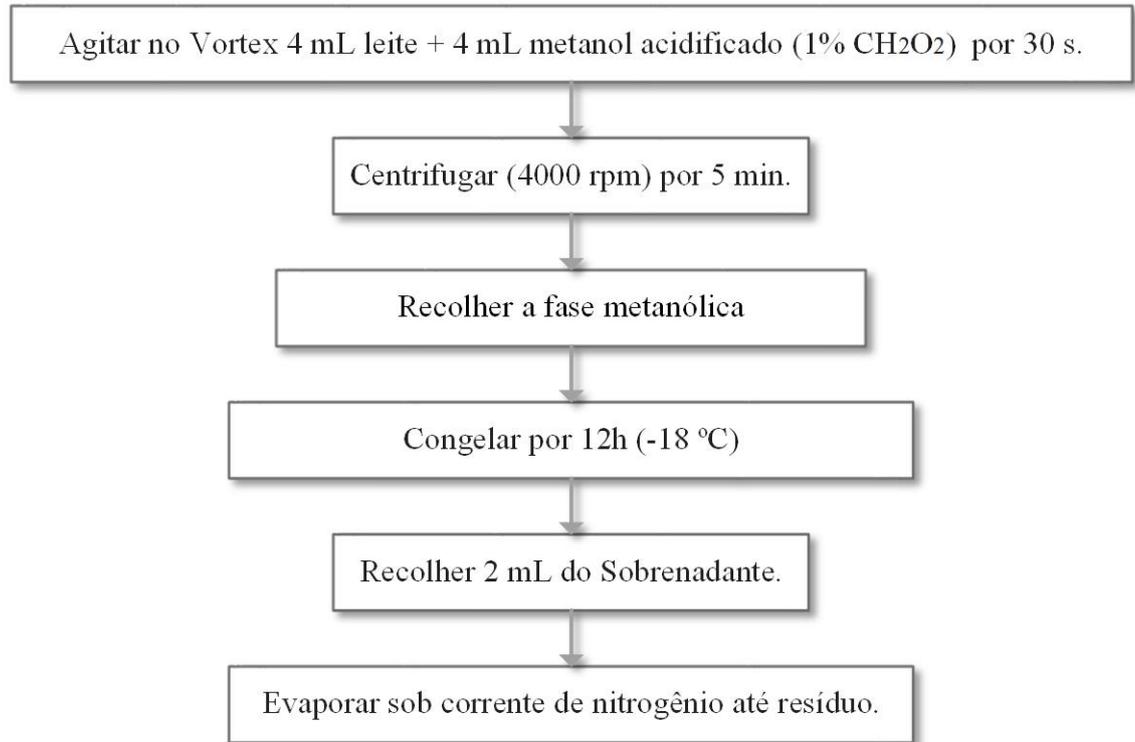
7. ANEXO

APÊNDICE 1- EXTRAÇÃO DE AFLATOXINA B₁ e M₁ EM LEITE – AOAC

Figura 5 – Esquema de extração de AFB₁ e AFM₁ em leite – AOAC

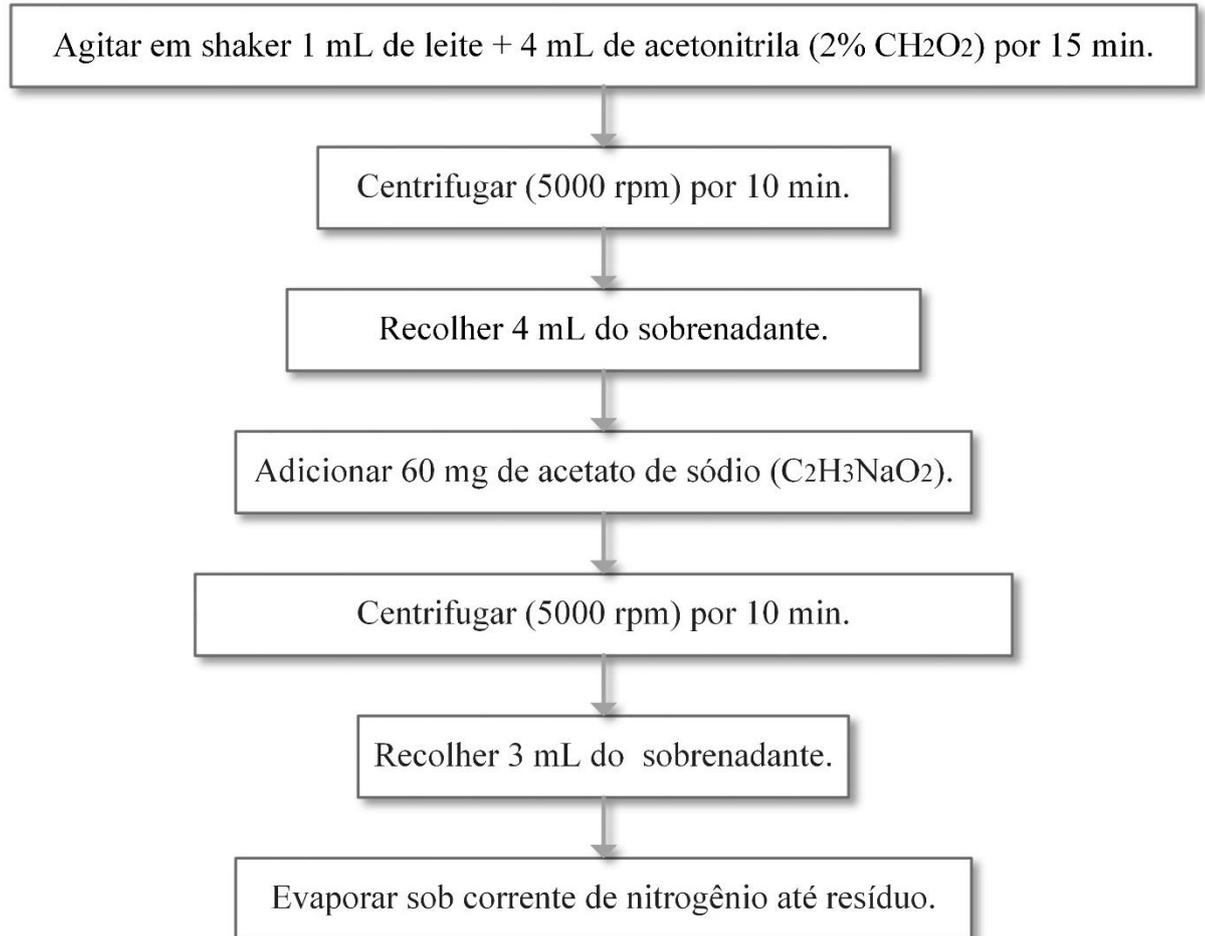


Fonte: Adaptado de AOAC (2000)

APÊNDICE 2 – EXTRAÇÃO SEGUNDO ANAGNOSTOPOULOS, et al. (2014).**Figura 6** – Esquema de extração de AFB₁ e AFM₁ em leite.

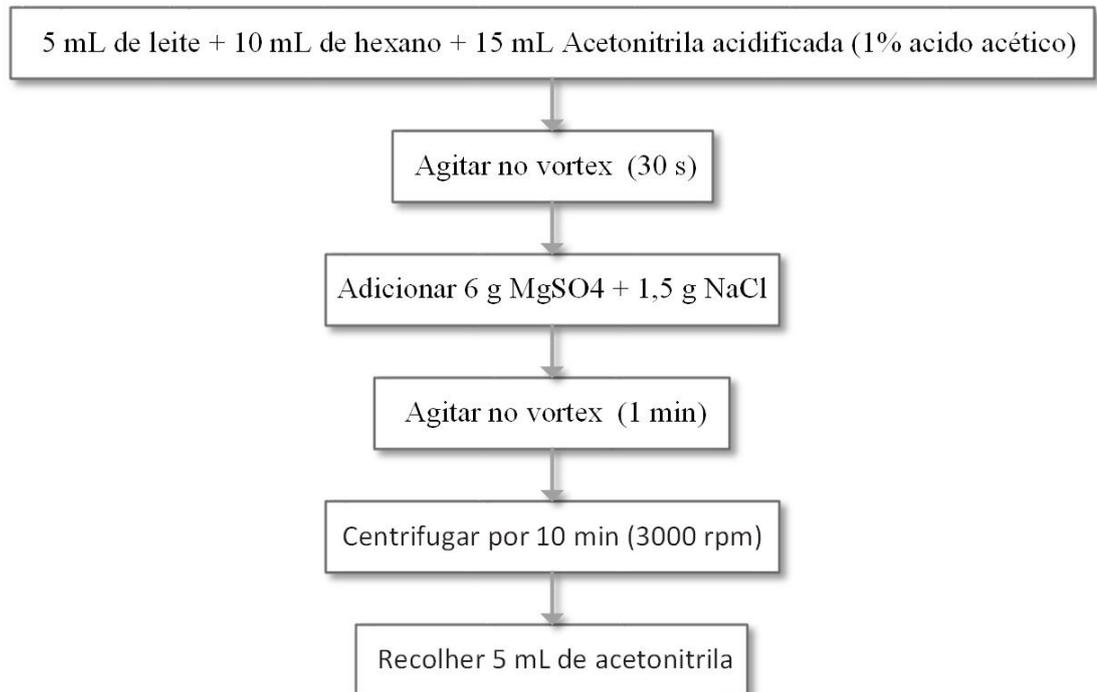
Fonte: Anagnostopoulos, et al. (2014).

APÊNDICE 3 – EXTRAÇÃO SEGUNDO FLORES-FLORES, et al. (2011).

Figura 7 – Esquema de extração de AFB₁ e AFM₁ em leite

Fonte: Flores-Flores, et all. (2017).

APÊNDICE 4 – EXTRAÇÃO SEGUNDO SEGUNDO BECKER-ALGERI (2016)

Figura 8 – Esquema de extração de AFB₁ e AFM₁ em leite

Fonte: Becker-Algeri (2016).

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, Hamed K. (Ed.). **Aflatoxin and food safety**. Crc Press, 2005.
- ANAGNOSTOPOULOS, C. et al. Determination of mycotoxins in feedstuffs and ruminant' s milk using an easy and simple LC–MS/MS multiresidue method. **Talanta**, v. 130, p. 8-19, 2014.
- ANASTASSIADES, Michelangelo et al. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid-phase extraction” for the determination of pesticide residues in produce. **Journal of AOAC international**, v. 86, n. 2, p. 412-431, 2003.
- ARDIC, Mustafa et al. Aflatoxin M1 levels of Turkish white brined cheese. **Food Control**, v. 20, n. 3, p. 196-199, 2009.
- ARFA. (2017). Agência de Regulação e Supervisão dos Produtos Farmacêuticos e Alimentares. Produção de leite em Cabo Verde e suas exigências higio-sanitárias; Disponível em: <http://www.arfa.cv/index.php/noticias/1099-producao-de-leite-em-cabo-verde-e-suas-exigencias-higio-sanitarias>; Acessado em 29/11/2017.
- ASemana. (2017). Cabo Verde aprova aumento de taxas de importação para laticínios e sumos. Disponível em: <http://asemana.publ.cv/?Cabo-Verde-aprova-aumento-de-taxas-de-importacao-para-lacticinios-e-sumos&ak=1>; Acessado em : 18/12/2017.
- ASSEM, Elkak et al. A survey on the occurrence of aflatoxin M1 in raw and processed milk samples marketed in Lebanon. **Food Control**, v. 22, n. 12, p. 1856-1858, 2011.
- ATANDA, Olusegun et al. Aflatoxin M 1 contamination of milk and ice cream in Abeokuta and Odeda local governments of Ogun State, Nigeria. *Chemosphere*, v. 68, n. 8, p. 1455-1458, 2007.
- AWASTHI, Vandana et al. Contaminants in milk and impact of heating: an assessment study. **Indian journal of public health**, v. 56, n. 1, p. 95, 2012..
- BAKIRCI, I. A study on the occurrence of aflatoxin M 1 in milk and milk products produced in Van province of Turkey. **Food control**, v. 12, n. 1, p. 47-51, 2001.
- BANKOLE, S. A.; ADEBANJO, A. Mycotoxins in food in West Africa: current situation and possibilities of controlling it. *African Journal of Biotechnology*, v. 2, n. 9, p. 254-263, 2003.
- BECKER-ALGERI, T. (2016). Ação de micro-organismos probióticos na composição nutricional e nos níveis de micotoxinas em leite. Rio grande (rs).
- BECKER-ALGERI, Tania Aparecida et al. Mycotoxins in bovine milk and dairy products: a review. **Journal of food science**, v. 81, n. 3, 2016.
- BHATNAGAR-MATHUR, Pooja et al. Biotechnological advances for combating *Aspergillus flavus* and aflatoxin contamination in crops. **Plant Science**, v. 234, p. 119-132, 2015.
- BIEHL, MICHAEL L.; BUCK, WILLIAM B. Chemical contaminants: their metabolism and their residues. **Journal of Food Protection**, v. 50, n. 12, p. 1058-1073, 1987.
- BILANDŽIĆ, Nina et al. Aflatoxin M1 in raw and UHT cow milk collected in Bosnia and Herzegovina and Croatia. **Food control**, v. 68, p. 352-357, 2016.

BILANDŽIĆ, Nina; VARENINA, Ivana; SOLOMUN, Božica. Aflatoxin M 1 in raw milk in Croatia. **Food Control**, v. 21, n. 9, p. 1279-1281, 2010.

BIOMIN. Levantamento Mundial sobre Micotoxinas. Disponível em: <http://www.biomin.net/pt/artigos/pesquisa-mundial-sobre-a-ocorrencia-de-micotoxinas-biomin-q1-2017/>; Acessado em: 21/12/2017, (2017).

BLOUNT, P. Turkey 'X' disease. J. Brit. **Turkey Federation** 9, 52-61, (1961).

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

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. Diário Oficial da União, (2003).

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Santária (ANVISA). Resolução RDC N° 7. Diário Oficial [da] Republica Federativa do Brasil 7, de 18 de fevereiro de 2011. Dispõe sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos. Diário Oficial [da] União, Brasília, DF, 18 de fevereiro de 2011, Seção 1, p. 72. Disponível em:<http://portal.anvisa.gov.br/legislacao>; Acessado em: 22 de janeiro de 2018.

BRESSAC, Brigitte et al. Selective G to T mutations of p53 gene in hepatocellular carcinoma from southern Africa. *Nature*, v. 350, n. 6317, p. 429, 1991BUSBY, W. &. (1984). Aflatoxins. In: Searle, C.E.,ed. Chemical carcinogens. **Washington, American Chemical Society**, 945-1136.

CAMPAGNOLLO, Fernanda Bovo et al. The occurrence and effect of unit operations for dairy products processing on the fate of aflatoxin M 1: **A review. Food Control**, v. 68, p. 310-329, 2016.

CANO-SANCHO, German et al. Occurrence of aflatoxin M 1 and exposure assessment in Catalonia (Spain). **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 27, n. 3, p. 130-135,

CASTAGNETTI, G. B. et al. The effect of extruded whole linseed flour intake on the variation of CLA (Conjugated Linoleic Acid) content in milk-The Reggiana cattle's case. **Progress in Nutrition**, v. 10, n. 3, p. 174-183, 2008.

CANTÚ-CORNELIO, F. et al. Occurrence and factors associated with the presence of aflatoxin M 1 in breast milk samples of nursing mothers in central Mexico. **Food Control**, v. 62, p. 16-22, 2016.

CDIC - HYPERLINK http://www.dairyinfo.gc.ca/index_e.php, Canadian Dairy Information Center. World production of cow's milk (' 000 metric tonnes) (2016). Disponível em: http://www.dairyinfo.gc.ca/index_e.php?s1=dff-fcil&s2=farm-ferme&s3=prod&s4=glob; Acessado em: 23 de janeiro de 2018.

CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento, LEITE E DERIVADOS; Disponível em: http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/16_04_12_14_04_46_leite_marco_2017.pdf; Acessado em: 18 de janeiro de 2018;

COMISSÃO EUROPEIA - Regulamento (CE) n° 401/2006 da Comissão, de 23 de Fevereiro de 2006, Métodos de amostragem e de análise para o controle oficial dos

teores de micotoxinas nos gêneros alimentícios. Disponível em <<http://eurlex.europa.eu/pt/index.htm>>. Acesso: 12/12/2017.

CHEMSPIDER, Royal Society of Chemistry - Search and share chemistry. Disponível em: <http://www.chemspider.com/>; Acessado em 22 de janeiro de 2018.

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

CUADROS-RODRIGUEZ, Luis et al. Correction function on biased results due to matrix effects: Application to the routine analysis of pesticide residues. **Analytica Chimica Acta**, v. 478, n. 2, p. 281-301, 2003.

DE ZAYAS-BLANCO, F.; GARCIA-FALCÓN, M. S.; SIMAL-GÁNDARA, J. Determination of sulfamethazine in milk by solid phase extraction and liquid chromatographic separation with ultraviolet detection. **Food Control**, v. 15, n. 5, p. 375-378, 2004.

Denning, D. Invasive aspergillosis. *Clin Infect Dis*, 781-805, (1998).

DEVECI, Orgun; SEZGIN, Emel. Changes in concentration of aflatoxin M1 during manufacture and storage of skim milk powder. **Journal of food protection**, v. 69, n. 3, p. 682-685, 2006.

DUARTE, S. C. et al. Aflatoxin M 1 in marketed milk in Portugal: assessment of human and animal exposure. **Food Control**, v. 30, n. 2, p. 411-417, 2013.

ECONOMOU, Anastasios et al. Determination of multi-class pesticides in wines by solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of chromatography A**, v. 1216, n. 31, p. 5856-5867, 2009.

El-Sayed, A., Neamat-Allah, A., & Soher, A. Situation of mycotoxins in milk, dairy products and human milk in Egypt. **Mycotoxin Research**, v. 16, n. 2, p. 91-100, 2000.

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

EMBRAPA. Aflatoxina M1 em Leite Um Risco para a Saúde Pública. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Agência de Informação. Disponível em: http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Agencia8/AG01/arvore/AG01_167_21720039245.html; Acessado em: 31/10/2017, (2005).

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Agência de Informação Valor - Nutritivo. Disponível em: http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Agencia8/AG01/arvore/AG01_167_2172003924; Acessado em 26/09/17, (2011).

Ertas, N., Gonulalan, Z., Yildirim, Y., & Karadal, F. A survey of concentration of aflatoxin M1 in dairy products marketed in Turkey. **Food Control**, 22, 1956 - 1959, (2011).

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/19511945/experts-believe-brazilian-milk-market-will-recover-this-year>; Acessado em: 18 de janeiro de 2018

FAO. Global Dairy Sector: Status and Trends. Disponível em: <http://www.fao.org/docrep/012/i1522e/i1522e02.pdf>; Acessado em: 13/11/2017, (2008).

- FAO. Milk and Dairy products in human nutrition. FAO, Disponível em : <http://www.fao.org/docrep/018/i3396e/i3396e.pdf>; Acessado em: 11 de Setembro de 2017, (2013).
- FAO. “Panorama Agrícola OECD-FAO”, estatísticas agrícolas da OECD (base de dados). Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1787/agr-outldata-en>; Acessado em: 13/11/2017, (2015).
- FAO. Dairy animals. Disponível em: <http://www.fao.org/resources/infographics/infographics-details/en/c/273893/>. Acessado em 12 de Setembro de 2017, (2016).
- FAO, Gateway to dairy production and products; Disponível em: <http://www.fao.org/dairy-production-products/production/dairy-animals/cattle/en/>; Acessado em 17 de Janeiro de 2018, (2018)
- FAOSTAT. FAO statistical database. Disponível em : <http://faostat.fao.org/>; Acessado em 26/09/2017, (2012).
- FERREIRA, Helder et al. Aflatoxinas: um risco a saúde humana e animal. *Ambiência*, v. 2, n. 1, p. 113-127, 2009.
- FLORES-FLORES, Myra E.; GONZÁLEZ-PEÑAS, Elena. An LC–MS/MS method for multi-mycotoxin quantification in cow milk. **Food chemistry**, v. 218, p. 378-385, 2017.
- FLORES-FLORES, Myra Evelyn et al. Presence of mycotoxins in animal milk: **A review. Food Control**, v. 53, p. 163-176, 2015.
- FINK-GREMMELS, Johanna. Mycotoxins in cattle feeds and carry-over to dairy milk: A review. **Food Additives and Contaminants**, v. 25, n. 2, p. 172-180, 2008.
- FORRESTER, Lesley M. et al. Evidence for involvement of multiple forms of cytochrome P-450 in aflatoxin B1 metabolism in human liver. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 87, n. 21, p. 8306-8310, 1990.
- FUCHS, E., BINDER, E. M., HEIDLER, D., & KRŠKA, R. Structural characterisation of metabolites after the microbial degradation of A-trichothecenes by the bacterial strain BBSH 797. **Food Additives and Contaminants**, 19, 379 - 386, (2002).
- FOX, P. F. *Advances in Dairy Chemistry: Lipids*. Elsevier Applied Science Publishers, (1994).
- GALVANO, Fabio; GALOFARO, Vittorio; GALVANO, Giacomo. Occurrence and stability of aflatoxin M1 in milk and milk products: a worldwide review. **Journal of Food protection**, v. 59, n. 10, p. 1079-1090, 1996.
- GHANEM, I.; ORFI, M. Aflatoxin M1 in raw, pasteurized and powdered milk available in the Syrian market. **Food Control**, v. 20, n. 6, p. 603-605, 2009.
- GHAZANI, Mohammad Hosein Movassagh. Aflatoxin M1 contamination in pasteurized milk in Tabriz (northwest of Iran). **Food and Chemical Toxicology**, v. 47, n. 7, p. 1624-1625, 2009.
- GONZALEZ, P., ALONSO, L., SAGER, R., MORLACO, M., & MAGNOLI, C. (2008). Fungi and selected mycotoxins from pre- and postfermented corn silage. **Journal of applied microbiology**, v. 104, n. 4, p. 1034-1041, 2008.
- GROOPMAN, John D. et al. Molecular dosimetry of urinary aflatoxin-DNA adducts in people living in Guangxi Autonomous Region, People's Republic of China. **Cancer Research**, v. 52, n. 1, p. 45-52, 1992.

GÜRBAY, A. et al. Exposure of newborns to aflatoxin M 1 and B 1 from mothers' breast milk in Ankara, Turkey. **Food and chemical toxicology**, v. 48, n. 1, p. 314-319, 2010.

HORWITZ, William. **Official methods of analysis of AOAC International**. 2000.

HACKBART, H.C.S.; PRIETTO, L.; PRIMEL, E.G.; GARDA-BUFFON, J.; BADIALEFURLONG, E. Simultaneous extraction and detection of ochratoxin A and Citrinin in rice. **Journal of the Brazilian Chemical Society**. v.23, n.1, 2012.

HARRIS, Curtis C. Chemical and physical carcinogenesis: advances and perspectives for the 1990s. **Cancer Research**, v. 51, n. 18 Supplement, p. 5023s-5044s, 1991.

HAYES, John D. et al. Contribution of the glutathione S-transferases to the mechanisms of resistance to aflatoxin B1. **Pharmacology & therapeutics**, v. 50, n. 3, p. 443-472, 1991.

HEIDTMANN-BEMVENUTI, R. Efeito do emprego de fungicidas no desenvolvimento e manifestação do potencial toxigênico de *Fusarium graminearum* em arroz. Dissertação 80 (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2011.

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

HSIEH, Dennis PH; ATKINSON, David N. Bisfuranoid mycotoxins: their genotoxicity and carcinogenicity. In: *Biological Reactive Intermediates IV*. Springer New York, 1991. p. 525-532.

HUANG, L. C. et al. Simultaneous determination of aflatoxin M1, ochratoxin A, zearalenone and α -zearalenol in milk by UHPLC–MS/MS. **Food chemistry**, v. 146, p. 242-249, 2014.

HUSSAIN, Imtiaz et al. Aflatoxin M1 contamination in milk from five dairy species in Pakistan. **Food control**, v. 21, n. 2, p. 122-124, 2010.

IARC WORKING GROUP ON THE EVALUATION OF CARCINOGENIC RISKS TO HUMANS; WORLD HEALTH ORGANIZATION; INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene. World Health Organization, 2002.

IBGE. Estatística da Produção Pecuária. Disponível em: ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Pecuaria/Fasciculo_Indicadores_IBGE/abate-leite-couro-ovos_201701caderno.pdf; Acessado em: 13 de Setembro de 2017: Adriana Dos Santos, (2017).

ILHA, Maria Helena et al. Aflatoxin M 1 in milk and distribution and stability of aflatoxin M 1 during production and storage of yoghurt and cheese. **Food Control**, v. 29, n. 1, p. 1-6, 2013.

IDF - International Dairy Federation. Bulletin of the IDF N° 489/2017: The World Dairy Situation 2017; Disponível em: <https://store.fil-idf.org/product/bulletin-idf-n-489-2017-world-dairy-situation-2017/>; Acessado em: 17 de Janeiro de 2018,

INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia. (s.d.). Normalização e Qualidade Industrial, Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaios Químicos. DOQ-CGCRE-008 2003.

INMETRO. (2011). Orientação sobre Validação de métodos analíticos . Disponível em: < http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/CGCRE/DOQ/DOQ-CGCRE-8_04.pdf >. Acesso em: 21/12/12. DOQ-CGCRE-008-Revisão 03–Fev. 2011.

- IQBAL, Shahzad Zafar; ASI, Muhammad Rafique; MALIK, Noeen. The seasonal variation of aflatoxin M 1 in milk and dairy products and assessment of dietary intake in Punjab, Pakistan. **Food Control**, v. 79, p. 292-296, 2017.
- IQBAL, Shahzad Zafar et al. Aflatoxin M 1 in milk and dairy products, occurrence and recent challenges: **A review. Trends in Food Science & Technology**, v. 46, n. 1, p. 110-119, 2015.
- JASUTIENE, Ina; GARMIENE, G.; KULIKAUSKIENE, M. Pasteurisation and fermentation effects on Aflatoxin M1 stability. **Milchwissenschaft**, v. 61, n. 1, p. 75-79, 2006.
- JIUJIANG et al. Aspergillus flavus genomics: gateway to human and animal health, food safety, and crop resistance to diseases. **Revista iberoamericana de micología**, v. 22, n. 4, p. 194-202, 2005.
- JECFA. (2001). Safety evaluation of certain mycotoxins in food. In Prepared by the 56th meeting of the food additives Series No. 47, Disponível em; www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v47je02.htm. Acessado em: 23 de janeiro de 2018
- KALAC, P. The effects of silage feeding on some sensory and health attributes of cow's milk: **A review. Food Chemistry**, v. 125, n. 2, p. 307-317, 2011.
- KABAK, Bulent. Aflatoxin M 1 and ochratoxin A in baby formulae in Turkey: Occurrence and safety evaluation. **Food Control**, v. 26, n. 1, p. 182-187, 2012.
- KLICH, Maren A. Soil fungi of some low-altitude desert cotton fields and ability of their extracts to inhibit Aspergillus flavus. **Mycopathologia**, v. 142, n. 2, p. 97-100, 1998.
- KRSKA, Rudolf et al. Advances in the analysis of mycotoxins and its quality assurance. **Food Additives and Contaminants**, v. 22, n. 4, p. 345-353, 2005.
- KOS, Jovana et al. Occurrence and estimation of aflatoxin M1 exposure in milk in Serbia. **Food Control**, v. 38, p. 41-46, 2014.
- KOCASARI, Fatma Sahindokuyucu. Occurrence of aflatoxin M1 in UHT milk and infant formula samples consumed in Burdur, Turkey. **Environmental monitoring and assessment**, v. 186, n. 10, p. 6363-6368, 2014.
- KWIATKOWSKI, Angela; DE FARIA ALVES, Ana Paula. Importância da detecção e do controle de aflatoxinas em alimentos. **SaBios-Revista de Saúde e Biologia**, v. 2, n. 2, 2007.
- LANÇAS, Fernando M. et al. A Cromatografia Líquida Moderna e a Espectrometria de Massas: finalmente "compatíveis". **Scientia chromatographica**, v. 1, n. 2, p. 35-61, 2009.
- LEHOTAY, Steven J.; ELLER, Konstantin I. Development of a method of analysis for 46 pesticides in fruits and vegetables by supercritical fluid extraction and gas chromatography/ion trap mass spectrometry. **Journal of AOAC international**, v. 78, n. 3, p. 821-830, 1995.
- LEHOTAY, Steven J.; MAŠTOVSKÁ, Kateřina; LIGHTFIELD, Alan R. Use of buffering and other means to improve results of problematic pesticides in a fast and easy method for residue analysis of fruits and vegetables. **Journal of AOAC International**, v. 88, n. 2, p. 615-629, 2005.
- LEBLANC, J.-C. et al. Estimated dietary exposure to principal food mycotoxins from the first French Total Diet Study. **Food Additives and Contaminants**, v. 22, n. 7, p. 652-672, 2005.
- LILLEHOJ, E. B. Aflatoxin: an ecologically elicited genetic activation signal. Mycotoxins and animal foods. CRC Press, **Boca Raton, Fla**, p. 2-30, 1991.

- LIN, Haw-Tarn; WONG, Sue-Sun; LI, Gwo-Chen. Heavy metal content of rice and shellfish in Taiwan. **Journal of food and drug analysis**, v. 12, n. 2, p. 167-174, 2004.
- LONDOÑO, Victor Alonso García et al. Aflatoxin M 1 survey on randomly collected milk powder commercialized in Argentina and Brazil. **Food control**, v. 34, n. 2, p. 752-755, 2013.
- MAO, Jianfei et al. Multi-mycotoxins analysis in raw milk by ultra high performance liquid chromatography coupled to quadrupole orbitrap mass spectrometry. **Food Control**, v. 84, p. 305-311, 2018.
- MAPA. Determinação de Umidade e Voláteis em Leite em Pó por Método Gravimétrico; Disponível em: <file:///C:/Users/Hygor/Downloads/MET%20POA%2021%2001%20Umidade,%20vol%C3%A1teis%20e%20s%C3%B3lidos%20totais%20em%20leite%20em%20p%C3%B3.pdf>; Acessado em: 12/10/2017. Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento, (2013).
- MAPA. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Leite em pó. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 146 de 07 de março de 1996; Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegisconsulta/servlet/VisualizarAnexo?id=4332>; Acessado em: 10/10/2017, (2013).
- MAPA, Publicação da Secretaria de política Agrícola do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/politica-agricola/todas-publicacoes-de-politica-agricola/revista-de-politica-agricola/revista-de-politica-agricola-no-2-2017/view>; Acessado em 18 de janeiro de 2018;
- MAZIERO, Maíke Taís; BERSOT, L. dos S. Micotoxinas em alimentos produzidos no Brasil. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 12, n. 1, p. 89-99, 2010.
- MCKINNEY, John D. et al. Effects of ammoniation on aflatoxins in rations fed lactating cows. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 50, n. 3, p. 79-84, 1973.
- MCLEAN, Michelle; DUTTON, Michael F. Cellular interactions and metabolism of aflatoxin: an update. **Pharmacology & therapeutics**, v. 65, n. 2, p. 163-192, 1995.
- MERCOSUL/GMC. (2002). Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/mercosul/alimentos/25-02.pdf>; Acessado 18/12/17.
- MIDIO, A., & MARTINS, D. Toxicologia de alimentos. São Paulo (SP): Varela, p. 295, 2000.
- MICHLIG, Nicolás et al. Multiclass Compatible Sample Preparation for UHPLC–MS/MS Determination of Aflatoxin M1 in Raw Milk. **Chromatographia**, v. 79, n. 17-18, p. 1091-1100, 2016.
- MOHALE, Angel et al. Biocontrol of mycotoxins: dynamics and mechanisms of action. **Current Opinion in Food Science**, 2017.
- MOHAMMADI, Hamidreza et al. Occurrence of aflatoxin M1 in commercial pasteurized milk samples in Sari, Mazandaran province, Iran. **Mycotoxin research**, v. 32, n. 2, p. 85-87, 2016.
- NÁSZ, Szilárd et al. Development and validation of a liquid chromatographic-tandem mass spectrometric method for determination of eleven coccidiostats in milk. **Food chemistry**, v. 133, n. 2, p. 536-543, 2012.
- NONES, Janaína et al. Avaliação da contaminação por micotoxinas em ingredientes e rações para suínos. 2010.

- NURYONO, N. et al. A limited survey of aflatoxin M1 in milk from Indonesia by ELISA. **Food Control**, v. 20, n. 8, p. 721-724, 2009.
- OLIVEIRA, Maurício Schneider. Validação de Metodologia Analítica Para Análise de Aflatoxina M 1 e sua Ocorrência em leite Bovino Comercializado no sul do Brasil. 2010. Tese de Doutorado. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos), Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria.
- OLIVEIRA, C. A. F.; FERRAZ, J. C. O. Occurrence of aflatoxin M 1 in pasteurised, UHT milk and milk powder from goat origin. **Food control**, v. 18, n. 4, p. 375-378, 2007.
- OLIVEIRA, Cristiane Patrícia et al. Aflatoxin M 1 occurrence in ultra high temperature (UHT) treated fluid milk from Minas Gerais/Brazil. **Food control**, v. 30, n. 1, p. 90-92, 2013.
- OPS. Organización Panamericana de la Salud. Micotoxinas. Critérios de Salud Ambiental, Washington, (1983).
- OVEISI, Mohammad-Reza et al. Presence of aflatoxin M 1 in milk and infant milk products in Tehran, Iran. **Food Control**, v. 18, n. 10, p. 1216-1218, 2007.
- PALMA, M.; LIAZID, A. BRIGUI, J. BARROSO, C.G. Investigation on Ochratoxin A stability using diferente extracton techiques. **Talanta**. v. 71, p. 976-980, 2007.
- PARK, Douglas L.; LIANG, Bailin. Perspectives on aflatoxin control for human food and animal feed. **Trends in Food Science & Technology**, v. 4, n. 10, p. 334-342, 1993.
- PACIN, A. et al. Effect of the bread making process on wheat flour contaminated by deoxynivalenol and exposure estimate. **Food Control**, v. 21, n. 4, p. 492-495, 2010.
- PEI, Shi Chun et al. Detection of aflatoxin M1 in milk products from China by ELISA using monoclonal antibodies. **Food control**, v. 20, n. 12, p. 1080-1085, 2009.
- PEREYRA, M. L. et al. Fungi and selected mycotoxins from pre-and postfermented corn silage. **Journal of applied microbiology**, v. 104, n. 4, p. 1034-1041, 2008.
- PEREIRA, Maria Marluvia Gomes et al. Aflatoxinas em alimentos destinados a bovinos e em amostras de leite da região de Lavras, Minas Gerais–Brasil. *Ciência e Agrotecnologia*, v. 29, n. 1, p. 106-112, 2005.
- PIZZUTTI, Ionara R. et al. Method validation for the analysis of 169 pesticides in soya grain, without clean up, by liquid chromatography–tandem mass spectrometry using positive and negative electrospray ionization. **Journal of Chromatography A**, v. 1142, n. 2, p. 123-136, 2007.
- POOLE, Colin F. Matrix-induced response enhancement in pesticide residue analysis by gas chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1158, n. 1, p. 241-250, 2007.
- PALMQUIST, D. L.; BEAULIEU, A. Denise; BARBANO, D. M. Feed and animal factors influencing milk fat composition1. **Journal of dairy science**, v. 76, n. 6, p. 1753-1771, 1993.
- PRANDINI, Aldo et al. On the occurrence of aflatoxin M1 in milk and dairy products. **Food and Chemical Toxicology**, v. 47, n. 5, p. 984-991, 2009..
- PRATA, L. F. Fundamentos de ciência do leite . São Paulo: Unesp, 287, (2001).
- RAHIMI, E. et al. Occurrence of aflatoxin M1 in raw milk of five dairy species in Ahvaz, Iran. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, n. 1, p. 129-131, 2010.

RANTAKOKKO, Panu; YRITYS, Miljamartta; VARTIAINEN, Terttu. Matrix effects in the gas chromatographic–mass spectrometric determination of brominated analogues of 3-chloro-4-(dichloromethyl)-5-hydroxy-2 (5H)-furanone. **Journal of Chromatography A**, v. 1028, n. 2, p. 179-188, 2004.

REJCZAK, Tomasz; TUZIMSKI, Tomasz. QuEChERS-based extraction with dispersive solid phase extraction clean-up using PSA and ZrO₂-based sorbents for determination of pesticides in bovine milk samples by HPLC-DAD. **Food chemistry**, v. 217, p. 225-233, 2017.

RUBERT, Josep et al. Evaluation of mycotoxins and their metabolites in human breast milk using liquid chromatography coupled to high resolution mass spectrometry. **Analytica chimica acta**, v. 820, p. 39-46, 2014.

RÚBIES, Antoni et al. Analysis of non-steroidal anti-inflammatory drugs in milk using QuEChERS and liquid chromatography coupled to mass spectrometry: triple quadrupole versus Q-Orbitrap mass analyzers. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 408, n. 21, p. 5769-5778, 2016.

ROCHA, Tiago André Marinho Caldeira. Desenvolvimento e validação de um método de HPLC-DAD-FLD para a determinação de inibidores da enzima fosfodiesterase tipo-5 (PDE-5) em suplementos alimentares à base de plantas. 2015.

RUANGWISES, Nongluck; RUANGWISES, Suthep. Aflatoxin M1 contamination in raw milk within the central region of Thailand. **Bulletin of environmental contamination and toxicology**, v. 85, n. 2, p. 195-198, 2010.

RUSTOM, Ismail YS. Aflatoxin in food and feed: occurrence, legislation and inactivation by physical methods. **Food chemistry**, v. 59, n. 1, p. 57-67, 1997.

ŞANLI, Tuba; DEVECI, Orgun; SEZGIN, Emel. Effects of Pasteurization and Storage on Stability of Aflatoxin M1 in Yogurt. *Kafkas Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi*, v. 18, n. 6, 2012.

SARLAK, Zahra et al. Probiotic biological strategies to decontaminate aflatoxin M 1 in a traditional Iranian fermented milk drink (Doogh). **Food Control**, v. 71, p. 152-159, 2017.

SANTANA, E. Pasteurização: qual a importância deste processo para o leite?; Disponível em:<http://m.milkpoint.com.br/industria/radar-tecnico/microbiologia/pasteurizacao-qual-a-importancia-deste-processo-para-o-leite-94246n.aspx>; Acessado em: 11/10/17. Milk Point Industria, (2015).

SARTORI, André Victor et al. 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**, 2015.

SCAGLIONI, P. T. et al. Aflatoxin B 1 and M 1 in milk. **Analytica chimica acta**, v. 829, p. 68-74, 2014..

SGARBIERI, Valdemiro Carlos. Revisão: propriedades estruturais e físico-químicas das proteínas do leite. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 8, n. 1, p. 43-56, 2005.

SHEPHARD, G. S. Impact of mycotoxins on human health in developing countries. **Food Additives and contaminants**, v. 25, n. 2, p. 146-151, 2008.

- SIDDAPPA, Vinutha; NANJEGOWDA, Divyashree Kallenahalli; VISWANATH, Prema. Occurrence of aflatoxin M 1 in some samples of UHT, raw & pasteurized milk from Indian states of Karnataka and Tamilnadu. **Food and chemical toxicology**, v. 50, n. 11, p. 4158-4162, 2012.
- SOUZA, Taiana Denardi et al. Exposure to deoxynivalenol, Ht-2 and T-2 toxins by consumption of wheat-based product in southern Brazil. **Food Control**, v. 50, p. 789-793, 2015.
- SOARES, Lúcia Valente. Curso básico de instrumentação para analistas de alimentos e fármacos. In: Curso básico de instrumentação para analistas de alimentos e fármacos. **Manole**, p.46, 2006.
- SOARES LMV, RODRIGUEZ-AMAYA DB. Survey of aflatoxins, ochratoxin A, zearalenone, and sterigmatocystin in some Brazilian foods by using multi-toxin thin-layer chromatographic method. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, v.72, p. 22 - 6, 1989.
- SHUNDO, Luzia et al. Estimate of aflatoxin M 1 exposure in milk and occurrence in Brazil. **Food Control**, v. 20, n. 7, p. 655-657, 2009.
- SILVA, Milena Veronezi et al. Occurrence and estimative of aflatoxin M 1 intake in UHT cow milk in Paraná State, Brazil. **Food Control**, v. 53, p. 222-225, 2015.
- STOLOFF, Leonard et al. Stability of aflatoxin M in milk. **Journal of dairy science**, v. 58, n. 12, p. 1789-1793, 1975.
- TANGO, J. Aflatoxina. *Boletim do Instituto de Tecnologia de Alimentos.*, 37-95, (1974).
- TAJKARIMI, M. et al. Seasonal study of aflatoxin M 1 contamination in milk in five regions in Iran. **International journal of food microbiology**, v. 116, n. 3, p. 346-349, 2007.
- TEKINŞEN, K. Kaan; EKEN, H. Semih. Aflatoxin M1 levels in UHT milk and kashar cheese consumed in Turkey. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 10, p. 3287-3289, 2008.
- USDA - United States Department of Agriculture. Brazil: U.S. Milk Powder Exports Gain Market Share in Brazil (2016); Disponível em: <https://www.fas.usda.gov/data/brazil-us-milk-powder-exports-gain-market-share-brazil>; Acessado em: 18 de janeiro de 2018;
- VIRDIS, S. et al. Occurrence of aflatoxin M1 in tank bulk goat milk and ripened goat cheese. **Food Control**, v. 19, n. 1, p. 44-49, 2008.
- WANG, Hao et al. Simultaneous determination of chloramphenicol and aflatoxin M1 residues in milk by triple quadrupole liquid chromatography– tandem mass spectrometry. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 59, n. 8, p. 3532-3538, 2011.
- WANG, Xiupin; LI, Peiwu. Rapid screening of mycotoxins in liquid milk and milk powder by automated size-exclusion SPE-UPLC–MS/MS and quantification of matrix effects over the whole chromatographic run. **Food chemistry**, v. 173, p. 897-904, 2015.
- YIANNIKOURIS, Alexandros; JOUANY, Jean-Pierre. Mycotoxins in feeds and their fate in animals: a review. **Animal Research**, v. 51, n. 2, p. 81-99, 2002.
- XIONG, J. L. et al. Seasonal variation of aflatoxin M 1 in raw milk from the Yangtze River Delta region of China. **Food Control**, v. 34, n. 2, p. 703-706, 2013.
- ZHAO, J. et al. Comparison of hydrated sodium calcium aluminosilicate and yeast cell wall on counteracting aflatoxicosis in broiler chicks. **Poultry Science**, v. 89, n. 10, p. 2147-2156, 2010.

ZHENG, N. et al. Occurrence of aflatoxin M1 in UHT milk and pasteurized milk in China market. **Food Control**, v. 29, n. 1, p. 198-201, 2013.

ZINEDINE, Abdellah et al. Review on the toxicity, occurrence, metabolism, detoxification, regulations and intake of zearalenone: an oestrogenicmycotoxin. **Food and chemical toxicology**, v. 45, n. 1, p. 1-18, 2007.

VALENTA, H. Chromatographic methods for the determination of ochratoxinA in animal and human tissues and fluids. **Journal of Chromatography A**, 815, 75 – 92, (1998).