

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO  
AMBIENTE**

**DETERMINAÇÃO DA AFLATOXINA M1 EM QUEIJOS COLONIAIS  
COMERCIALIZADOS NA REGIÃO VALE DO TAQUARI -RS**

**Otávio Jaconi Saraiva**

**Orientador: Prof. Dr. Alexandre M. Fuentefria**

**Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO**  
**AMBIENTE**

**DETERMINAÇÃO DA AFLATOXINAS M1 EM QUEIJOS COLONIAIS**  
**COMERCIALIZADOS NA REGIÃO VALE DO TAQUARI -RS**

**Otávio Jaconi Saraiva**

**Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Microbiologia Agrícola e do Ambiente**

**Orientador: Prof. Dr. Alexandre Meneghello Fuentefria**

**Porto Alegre, Rio Grande do Sul- Brasil**  
**Dezembro/2017**

### CIP - Catalogação na Publicação

Saraiva, Otávio Jaconi

Determinação da Aflatoxina M1 em queijos coloniais comercializados na região Vale do Taquari-RS / Otávio Jaconi Saraiva. -- 2018.

71 f.

Orientador: Alexandre Meneghello Fuentefria.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Porto Alegre, BR-RS, 2018.

1. Aflatoxina M1. 2. Queijos coloniais. 3. Vale do Taquari. 4. ELISA. I. Fuentefria, Alexandre Meneghello, orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

## **AGRADECIMENTOS**

**Dedico esta conquista aos meus pais Paulo e Wanda (“in memoriam”) pela minha formação.**

**À minha companheira Lilian, que sempre me acompanhou e incentivou com seu carinho, amor e dedicação.**

**Aos meus filhos Paula e Filipe, que sempre compreenderam as muitas ausências para que este trabalho fosse realizado, sempre me incentivando.**

**Ao meu irmão e colega Paulo, por sua compreensão e incentivo diário.**

**Ao meu colega e orientador Alexandre pela oportunidade e pela dedicação no decorrer deste trabalho.**

**Aos meus amigos Ânderson e Giuliano que incansavelmente me ajudaram neste trabalho.**

**Aos meus colegas docentes Pedro Petrovick e José Carlos Germani pelo incentivo dado.**

**E, por fim, a Deus, que sempre me acompanhou em minha trajetória.**

**DETERMINAÇÃO DA AFLATOXINAS M1 EM QUEIJOS  
COLONIAIS COMERCIALIZADOS NA REGIÃO VALE DO TAQUARI –RS**

**Otávio Jaconi Saraiva**

**Alexandre Meneghello Fuentesfria (Orientador)**

**RESUMO**

A Aflatoxina M1 (AFM1) é um metabólito tóxico que pode ser secretado no leite de animais contaminados com Aflatoxina B1 (AFB1). A ingestão do produto contaminado pode causar efeitos adversos de forma aguda ou crônica, sendo necessária não somente sua detecção, mas quantificação para um consumo seguro dos alimentos. Como os queijos coloniais são oriundos de pequenas propriedades rurais, muitas sem uma efetiva fiscalização e que são não somente consumidos pela família, mas também comercializados principalmente em pequenos estabelecimentos às margens de rodovias, este trabalho visa justamente avaliar o índice de contaminação em queijos coloniais produzidos artesanalmente comercializados em estabelecimentos às margens de rodovias de grande fluxo no vale do Taquari. Foram analisadas 15 amostras de queijos comercializados em estabelecimentos comerciais às margens das rodovias BR 386 e RS 287 na região do vale do Taquari, no estado do Rio Grande do Sul. A metodologia empregada na análise de Aflatoxina M1 envolveu uma partição líquido-líquido na etapa de extração e purificação e Enzimaimunoensaio em fase sólida (ELISA) para detecção e quantificação. O limite mínimo de detecção foi 16 ng/Kg (0,016 µg/Kg) e a avaliação da eficiência do método foi superior a 90% no teste de recuperação. Todas as

amostras analisadas apresentaram níveis de AFM1, sendo que quatro delas apresentaram níveis superiores ao limite máximo tolerado estabelecido pela Comunidade Europeia (0,25 µg/Kg). Nenhuma das amostras apresentou níveis superiores ao limite máximo tolerado definido pela legislação nacional (2,5 µg/Kg). Estes dados indicam a necessidade de um melhor controle na produção de queijos coloniais, principalmente das condições em que foram obtidas a matéria prima para o seu manufaturamento.

**Palavras chave:** Aflatoxina M1, queijo colônial, vale do Taquari, ELISA.

# **DETERMINATION OF M1 AFLATOXINS IN COLONY CHEESE MARKETED IN THE TAQUARI VALLEY REGION -RS**

**Otávio Jaconi Saraiva**

**Alexandre Meneghello Fuentefria (Orientador)**

## **ABSTRACT**

Aflatoxin M1 (AFM1) is a toxic metabolite that can be secreted into the milk of animals infected with Aflatoxin B1 (AFB1). Ingestion of the contaminated product may cause acute or chronic adverse effects, requiring not only its detection, but quantification for safe consumption of food. As the colonial cheeses come from small rural properties, many without an effective inspection and that are not only consumed by the family, but also marketed mainly in small establishments along roadsides, this work aims precisely to evaluate the contamination index in produced colonial cheeses traded in establishments along the banks of high-flow roads in the Taquari valley. Fifteen samples of cheeses marketed in commercial establishments along the BR 386 and RS 287 highways in the Taquari valley region in Rio Grande do Sul State were analyzed. The methodology used in the analysis of Aflatoxin M1 involved a liquid-liquid partition in step extraction and purification and solid phase enzyme immunoassay (ELISA) for detection and quantification. The minimum detection limit was 16 ng / kg (0.016 µg / kg) and the efficiency evaluation of the method was over

90% in the recovery test. All samples analyzed showed levels of AFM1, four of which presented levels above the maximum tolerated limit established by the European Community (0.25  $\mu\text{g kg}$ ). None of the samples had levels above the maximum tolerated limit defined by national legislation (2,5  $\mu\text{g / kg}$ ). These data indicate the need for a better control in the production of colonial cheeses, mainly from the conditions in which the raw material was obtained for its manufacture.

Key words: aflatoxin M1, colony cheese, Taquari valley, ELISA.



## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1:** Evolução anual da quantidade de leite produzido entre 2000 e 2015 no Brasil e no RS.....pág. 8
- Tabela 2:** Limites máximos tolerados para micotoxinas no Brasil.....pág. 19
- Tabela 3:** Estudos envolvendo pesquisa de AFM1 em queijos no Mundo.....pág. 33
- Tabela 4:** Estudos envolvendo pesquisa de AFM1 em queijos no Brasil.....pág. 34
- Tabela 5:** Ocorrência de AFM1 em queijos coloniais.....pág. 44

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Mapa da produção de leite no RS entre 2013 e 2015.....pág. 10
- Figura 2:** Fluxograma de fabricação do queijo colonial.....pág. 14
- Figura 3:** Estrutura química das principais aflatoxinas encontradas em alimentos.....pág. 22
- Figura 4:** Vias metabólicas da AFB1 e AFM1.....pág. 24
- Figura 5:** Imagem destacando o Vale do Taquari e as principais rodovias da região.....pág. 36
- Figura 6:** Concentrações de AFM1 nos queijos analisados.....pág. 45

## **LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

AFB1: aflatoxina B1

AFM1: Aflatoxina M1

AFB2: Aflatoxina B2

AFM2: aflatoxina M2

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

CCD: Cromatografia em Camada Delgada

CLAE: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

ELISA: Enzima Imunoensaio em Fase Sólida

LARA: Laboratório de referência Animal

MAPA: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

OMS: Organização Mundial da Saúde

SEBRAE: Serviço de Apoio à Pequena e Micro Empresa

SIF: Serviço de Inspeção Federal

TMB: Tetrametilbenzidina

UHT: Ultra Alta Temperatura

### **UNIDADES:**

°C: graus Celsius

mm: milímetro

µg: micrograma

ng: nanograma

pg: picograma

Kg: quilograma

µl: microlitro

L: litro

%: por cento

ppm: partes por milhão

ppb: partes por bilhão

ppt: partes por trilhão

LMT: limite máximo tolerado

# SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	1
2. OBJETIVOS .....	5
2.1. Objetivo Geral .....	5
2.2. Objetivos Específicos .....	5
3. REVISÃO DA LITERATURA .....	6
3.1. Leite.....	6
3.2. Queijo .....	10
3.3. Queijos Coloniais .....	13
3.4. Micotoxinas .....	15
3.5. Aflatoxinas.....	20
3.5.1. Aflatoxinas – Estrutura Química .....	21
3.5.2. Biotransformação da aflatoxina B1 em aflatoxina M1 .....	22
3.5.3. Efeitos de processamento das aflatoxinas.....	28
3.5.4. Aflatoxinas - Legislação .....	31
3.5.5. Aflatoxina M1 no Brasil e no mundo .....	32
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	35
4.1. Amostras de queijos .....	35
4.2. Critérios de inclusão e exclusão da amostragem .....	36
4.3. Método de detecção e quantificação da aflatoxina M1 .....	37
4.4. Material utilizado: .....	38
4.4.1. Componentes do kit Agraquant Aflatoxin M1 Sensitive 25/500 COAK7-100. .....	38
4.4.2. Material utilizado não fornecido pelo fabricante do kit: .....	39
4.5. Preparação da amostra/ extração: .....	40
4.6. Teste de ELISA: .....	40
4.7. Controle de qualidade do kit reagente:.....	42

5. RESULTADOS .....	44
6.	
DISCUSSÃO.....	46
7.CONCLUSÃO.....	49
8. REFERÊNCIAS:.....	52
9. ANEXOS.....	69
9.1.Locais de coleta das amostras.....	69

## 1.INTRODUÇÃO

As micotoxinas, produtos metabólicos secundários de fungos filamentosos, podem estar presentes em uma série de alimentos, tais como o amendoim, milho, trigo, cevada, café, leite, arroz, farinhas, nozes, castanhas, frutas secas e outros. Existem mais de uma centena de micotoxinas que podem contaminar os alimentos, porém as de maior importância são as aflatoxinas, ocratoxina A, os tricocetenos, zearalenona, fumonisinas e a patulina.

As micotoxinas podem contaminar direta ou indiretamente os alimentos e seus derivados, constituindo-se em um sério problema de saúde pública e animal. A contaminação dos alimentos pode se dar no campo, antes, durante e após a colheita, no armazenamento, no transporte, no processamento e estocagem do produto final.

A detecção das micotoxinas é de suma importância para a saúde humana e animal, assim como para a economia de um país.

Do ponto de vista econômico, a presença das micotoxinas causa prejuízo aos produtores, processadores e comerciantes de alimentos e, de forma geral, à economia de um país. As micotoxinas afetam o agronegócio em diversos países, reduzindo ou inviabilizando a exportação de grão e alimentos processados ou não, reduzindo a produção animal e agrícola.

Do ponto de vista de saúde pública, a Organização Mundial da Saúde estima ao redor de 40% da redução da expectativa de vida em países cujos índices elevados de micotoxinas estejam contaminando os alimentos.

As micotoxinas podem entrar na cadeia alimentar humana e animal de forma direta ou indireta. A contaminação direta ocorre quando o produto, alimento ou ração são contaminados por um fungo toxigênico, com posterior formação de micotoxinas.

A contaminação indireta se dá quando um componente foi contaminado com um fungo toxigênico e mesmo após a eliminação do mesmo no processamento, as micotoxinas estarão presentes no produto final.

O consumo de micotoxinas através de alimentos contaminados pode ocasionar lesões na pele, sintomas de hepatotoxicidade, nefrotoxicidade, neurotoxicidade, hematotoxicidade ou genotoxicidade, podendo levar, inclusive, o indivíduo a óbito. Podem, ainda, ocasionar efeitos mutagênicos, teratogênicos, carcinogênicos ou imunossupressores. O consumo direto por animais pode ocasionar aumento na recusa da ração, baixa conversão alimentar, perda no ganho de peso, imunossupressão e diminuição da capacidade de reproduzir, o que gera uma perda econômica.

Entre as principais micotoxinas que contaminam os alimentos estão as aflatoxinas. As aflatoxinas são metabólitos secundários, produzidos por algumas cepas de fungos do gênero *Aspergillus*, principalmente das espécies *A. flavus*, *A. parasiticus* e *A. nomis*, os quais podem desenvolver-se naturalmente em produtos alimentícios, como amendoim, milho, feijão, arroz e trigo, entre outros. Os principais tipos de interesse médico-sanitário são identificados como B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub> e M1. Em saúde animal, várias espécies domésticas e de experimentação são sensíveis aos seus efeitos tóxicos agudos, mutagênicos, carcinogênicos e teratogênicos, sendo o fígado o principal órgão afetado.

A ocorrência de aflatoxina M1 no leite de vacas lactantes é uma questão de saúde pública, pois o leite e seus derivados são consumidos por bebês, crianças e adultos em todo mundo. Essa toxina é classificada como carcinogênica para o homem. Portanto, a Organização Mundial de Saúde recomenda a redução do consumo de aflatoxina M1 para um nível que minimize o risco potencial de sua

ingestão. Para isso, muitos países regulamentaram o limite máximo permitido de aflatoxina M<sub>1</sub> no leite e alguns derivados. Surge deste fato a importância da detecção de aflatoxina M<sub>1</sub> em leite cru e após a pasteurização, além de seus derivados, tais como queijos, iogurtes e outros. Cada país tem tentado estabelecer limites máximos de tolerância para a AFM<sub>1</sub>.

O leite existente no comércio é uma mistura de leites de diferentes procedências. Devido a isso, os níveis de aflatoxina M<sub>1</sub> são, muitas vezes, inferiores aos limites de detecção dos métodos de análise utilizados. A maioria dos resultados negativos obtidos em estudos sobre incidência de aflatoxina M<sub>1</sub> pode ser atribuída à baixa sensibilidade dos métodos analíticos empregados. Portanto, um controle eficiente da aflatoxina M<sub>1</sub> em leite requer métodos analíticos de elevada sensibilidade, especificidade, precisão e exatidão, além de rapidez e custo apreciável.

Os métodos para determinação de aflatoxina M<sub>1</sub> em leite utilizam, em sua maioria, extração com clorofórmio e purificação cromatográfica. Os métodos de cromatografia em camada delgada (CCD) e a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) constituem os mais convencionais para separação, detecção e quantificação de aflatoxina M<sub>1</sub> em leite e derivados lácteos. Entretanto, nos últimos anos outros métodos sensíveis e específicos como as técnicas imunoenzimáticas, tradicionalmente utilizados na detecção de analitos humanos ou animais, foram validados para a detecção das micotoxinas e, em especial, da AFM<sub>1</sub>. Estas técnicas têm sido utilizadas principalmente em triagens para determinação destes contaminantes, entretanto podem ser utilizados também como métodos quantitativos, uma vez que sua sensibilidade é igual ou superior às técnicas



cromatográficas de alta eficiência. O método imunoenzimático mais utilizado na análise das aflatoxinas é o ELISA.

O Vale do Taquari, na região central do Estado do Rio Grande do Sul é a segunda maior região leiteira do estado, além de ser provida de uma rede de rodovias por onde trafegam milhares de pessoas diariamente, as quais consomem e compram esses produtos nos estabelecimentos de estrada. Neste sentido, esse estudo objetivou analisar a incidência da AFM1 em queijos coloniais distribuídos e comercializados nas principais rodovias que compõem a malha rodoviária da região, permitindo assim estimar o risco de consumo desta importante micotoxina na população residente e turística do estado do Rio Grande do Sul.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo Geral**

Avaliar a incidência e os níveis da Aflatoxina M1 em queijos coloniais produzidos e comercializados no Vale do Taquari, região do interior do Rio Grande do Sul.

### **2.2. Objetivos Específicos**

- Determinar a incidência da aflatoxina M1 em queijos coloniais produzidos e comercializados em estabelecimentos localizados nas margens das principais rodovias do Vale do Taquari.
- Utilizar um novo reagente ultrasensível do método imunoenzimático ELISA a fim de melhorar a sensibilidade e especificidade na detecção da Aflatoxina M1 em amostras de queijo colonial.

### **3. REVISÃO DA LITERATURA**

#### **3.1. Leite**

O leite é considerado o melhor alimento natural, composto de uma quantidade considerável de nutrientes essenciais para o homem. Dentre esses nutrientes, o de maior importância é o cálcio que é fundamental para a manutenção da integridade óssea, participa no controle da excitabilidade nervosa e na contração muscular, na coagulação do sangue e regulação de sistemas enzimáticos (AMIOT, 1991). O consumo médio individual de leite fluido e produtos lácteos no Brasil é de 172 litros por ano, estando longe do consumo ideal que deveria ser na ordem de 250 litros por ano (LEITEBRASIL, 2013). A importância econômica e cultural da produção leiteira é fundamental para o Brasil. No Brasil, o estado de Minas de Gerais é o maior produtor com 27% do total. O Rio Grande do Sul é o segundo produtor nacional, contribuindo com cerca de 13% da produção ou 4,6 bilhões de litros em média no triênio 2013-2015 de acordo com a tabela 1 (pág. 8), ocupando o estado do Paraná a terceira colocação, respondendo por cerca de 12 % da produção. No Rio Grande do Sul a produção é bem distribuída pelo território, sendo que as regiões da Fronteira Noroeste, Vale do Taquari, Serra, Norte, Rio da Várzea e Celeiro são responsáveis pela metade da produção gaúcha, somando 2,4 bilhões de litro em média no período considerado (IBGE, 2016), como demonstra a figura 1 (pág.10).

No primeiro trimestre de 2016, a aquisição de leite cru foi de 5,686 bilhões de litros, por estabelecimentos sob inspeção federal (92,5 %), estadual (6,7 %) ou municipal (0,8 %) (IBGE, 2016).

Entretanto, o leite pode ser veículo de diversos contaminantes, como micotoxinas, resíduos de antibióticos, antiparasitários e pesticidas organoclorados

(HECK et al., 2007, PICININ, 2013). A Portaria nº 50, de 20 de fevereiro de 2006 (BRASIL, 2006), através do Plano de Controle de Resíduos em Leite - PCRL, estabelece o envio de amostras de leite pelos estabelecimentos sob Inspeção Federal, para o Laboratório de Referência Animal – LARA, para pesquisa de antibióticos, aflatoxina M1, antiparasitários e pesticidas organoclorados. A contaminação do leite se dá de forma indireta, através da metabolização de contaminantes pelo organismo animal e excreção sob a forma hidrossolúvel no leite. Assim, a dieta animal é a principal responsável pelos contaminantes do leite, como as micotoxinas. A alimentação do gado bovino é preferencialmente composta por alimentos de grande volume (baixo teor energético, alto teor de fibra ou água, como as pastagens, silagem, feno), concentrados (alto teor energético, como milho, soja, farelos, farinhas de origem animal), minerais e vitaminas. Em criações extensivas, as pastagens respondem por uma grande proporção da dieta e a ingestão de concentrados é limitada. Em contraste, em criações intensivas, a proporção de concentrado pode chegar a 70 % do consumo diário (ALONSO et al., 2013)

**Tabela 1.** Evolução anual da quantidade de leite produzida no Brasil e no Rio Grande do Sul de 2000 a 2015.

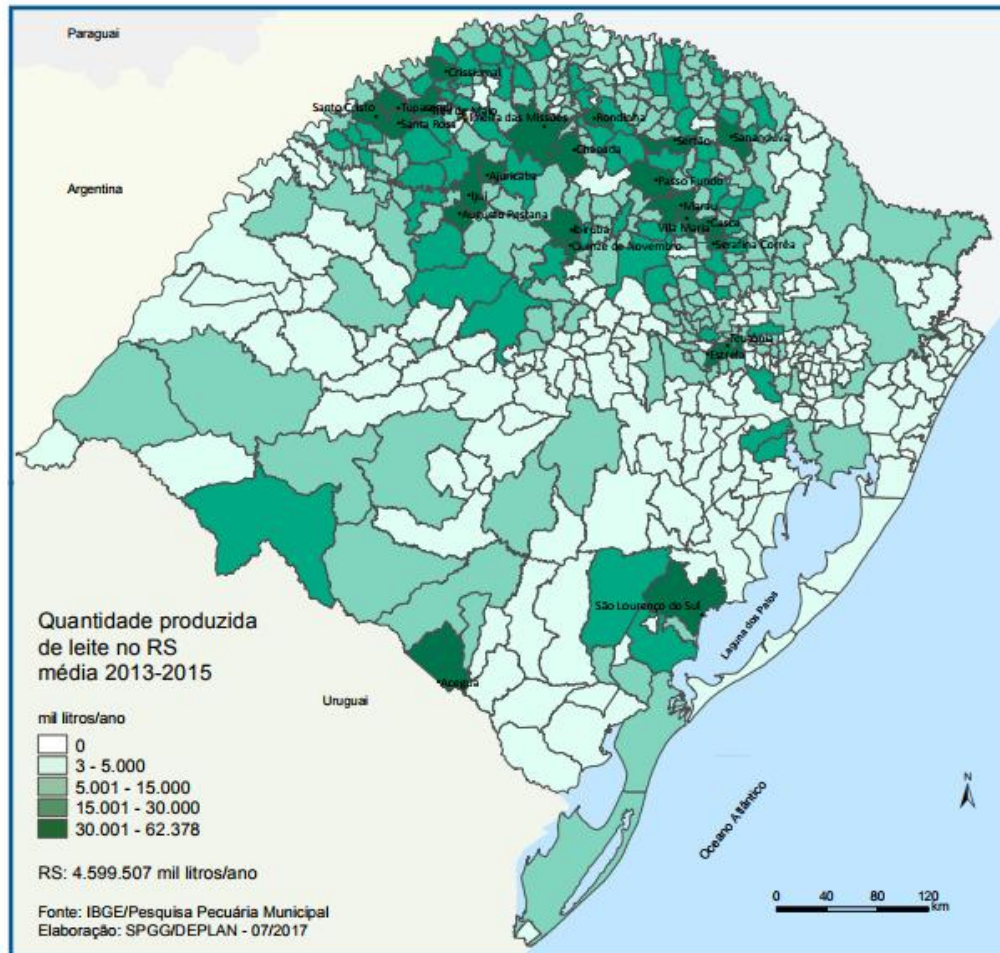
Ano	Produção de leite (mil litros)	
	Brasil	RS
2000	19.767.206	2.102.018
2001	20.509.953	2.222.054
2002	21.642.780	2.329.607
2003	22.253.863	2.305.758
2004	23.474.694	2.364.936
2005	24.620.859	2.467.630
2006	25.398.219	2.625.132
2007	26.137.266	2.943.684
2008	27.585.346	3.314.573
2009	29.085.495	3.400.179
2010	30.715.460	3.633.834
2011	32.096.214	3.879.455
2012	32.304.421	4.049.487
2013	34.255.236	4.508.518
2014	35.124.360	4.687.489
2015	35.000.227	4.599.925

Fonte: IBGE: Pesquisa Agropecuária 2016

Uma consequência direta da complexidade e variedade dos componentes de dietas para ruminantes é o risco à exposição de micotoxinas (FINK-GREMMELS, 2008). Em alimentos concentrados, as principais micotoxinas encontradas são aflatoxinas, fumonisinas, zearalenona e tricotecenos. A conservação de forragens na forma de silagem é a prática mais difundida pelo mundo para suplementação volumosa de ruminantes nos meses em que a pastagem natural se torna escassa. As plantas utilizadas para esse fim compreendem leguminosas e gramíneas tais como alfafa, capins tropicais e de clima temperado, cana de açúcar, milho, sorgo,

entre outras (NOVINSKI, 2013). O processamento da silagem é determinado pela conservação em condições anaeróbicas e desenvolvimento de bactérias produtoras de ácido láctico, que promovem uma fermentação natural, diminuindo o pH em níveis onde não haverá desenvolvimento de micotoxinas. As condições associadas a uma silagem bem preservada, ou seja, baixo pH e anaerobiose, também são desfavoráveis ao crescimento da maioria dos fungos. A ausência de ar garante que os fungos serão incapazes de crescer e sobreviver sob essas condições. Na realidade, a presença de fungos na silagem é indesejável, já que eles não apenas degradam açúcares e ácido láctico, mas também metabolizam celulose e outros componentes da parede celular vegetal e podem produzir micotoxinas (SCUDAMORE; LIVESEY, 1998). Poucos fungos anaeróbicos e leveduras são capazes de se desenvolver na silagem. *Aspergillus fumigatus*, *Byssoschlamys nívea*, *Monascus* spp., *Penicillium roquefortii* e *Trichoderma* spp. são os fungos isolados com maior frequência em silagens (CRUZ, 2012). As principais micotoxinas encontradas em silagens incluem aflatoxinas, especialmente AFB1, além de ocratoxina A, fumonsinas B, tricotecenos como desoxinivalenol, e gliotoxina, entre outros (ALONSO et al., 2013).

O Vale do Taquari é uma das principais regiões produtoras de leite no estado do Rio Grande do Sul, representando ao redor de 8,3 % da produção total do estado. Diariamente são produzidos nesta região aproximadamente 500 mil litros de leite (aproximadamente 15 milhões de litros por mês). Cerca da metade desta produção é destinada à agroindústria familiar. Houve, nos últimos anos, um incremento de produção de derivados lácteos nesta região em torno de 74 % (UNIVATES, 2016, IBGE, 2017).



**Figura 1:**Mapa da Produção de Leite no Rio Grande do Sul entre 2013 e 2015.

### 3.2. Queijo

A definição dada para o queijo pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) é de produto fresco ou maturado que é obtido pela separação parcial do soro do leite ou leite reconstituído integral, parcial ou totalmente desnatado, ou de soros lácteos, coagulados por ação física do coalho, de

enzimas específicas, de bactéria específica, de ácidos orgânicos isolados ou combinados, todos de qualidade apta ao consumo alimentar, com ou sem agregação de substâncias alimentícias e/ou especiarias e/ou condimentos aditivos especificamente indicados, substâncias aromatizantes e corantes. A denominação queijo está reservada aos produtos em que a base láctea não contenha gordura e/ou proteína de origem não láctea (BRASIL, 1996).

A produção de queijos se dá de forma industrial e colonial. A produção colonial começa desde o processo de imigração nesta região- Vale do Taquari- principalmente por colonos de origem germânica, obedecendo uma tradição familiar que é transferida através das gerações. É um dos produtos que garantem o abastecimento de alimentos não cultiváveis nas propriedades rurais, garantindo a subsistência das famílias através do seu consumo ou comercialização (UNIVATES, 2016).

Com o desenvolvimento proporcionado pelo aumento de interatividade entre as localidades através da abertura de uma malha rodoviária, a produção deixou de ser consumida localmente e teve uma maior amplitude. Porém, a produção continua seguindo uma tradição em termos tecnológicos através das gerações, geralmente não acompanhando as necessidades impostas pela legislação vigente (UNIVATES, 2016). Esta proximidade de relações entre produtores e consumidores se dá no modelo de redes alternativas de alimentos- feiras, estabelecimentos na orla de estradas, etc.- ou de cadeias curtas de produção, caracterizadas em termos de aproximação entre o produtor e o consumidor, baseando-se exclusivamente na qualidade, confiança, transparência e localidade (UNIVATES, 2016).

O mercado de queijos apresenta uma forte característica que é a existência de um grande número de pequenas propriedades agrícolas familiares que atuam



regionalmente e fora do âmbito da fiscalização realizada pelo Serviço de Inspeção Federal-SIF. Devido a esta situação, se torna difícil a obtenção de uma informação oficial sobre a produção de queijos no Brasil, uma vez que não há registros oficiais do que é produzido informalmente, além de não haver uma correta fiscalização. Uma estimativa realizada pelo SEBRAE em 2008 concluiu que aproximadamente 40 % da produção total de queijos era oriunda da informalidade(SEBRAE, 2008). A produção total de queijos no Brasil no ano de 2016 foi de 812 mil toneladas, o que leva a conclusão que a produção informal foi de cerca de aproximadamente 325 mil toneladas (IBGE, 2016). Nos países europeus, o consumo anual per capita chega à 13 kg, enquanto que no Estados Unidos é de 15 kg. Nos países asiáticos- Japão e Coréia do Sul- o consumo é baixo, em torno de 1,7 a 2 Kg per capita (IBGE, 2013). Mesmo com o aumento no consumo, este ainda é baixo no Brasil, cerca de 3,4 kg per capita. Comparação pode ser feita com a Argentina, onde o consumo é de cerca de 11,8 Kg per capita(IBGE, 2016).

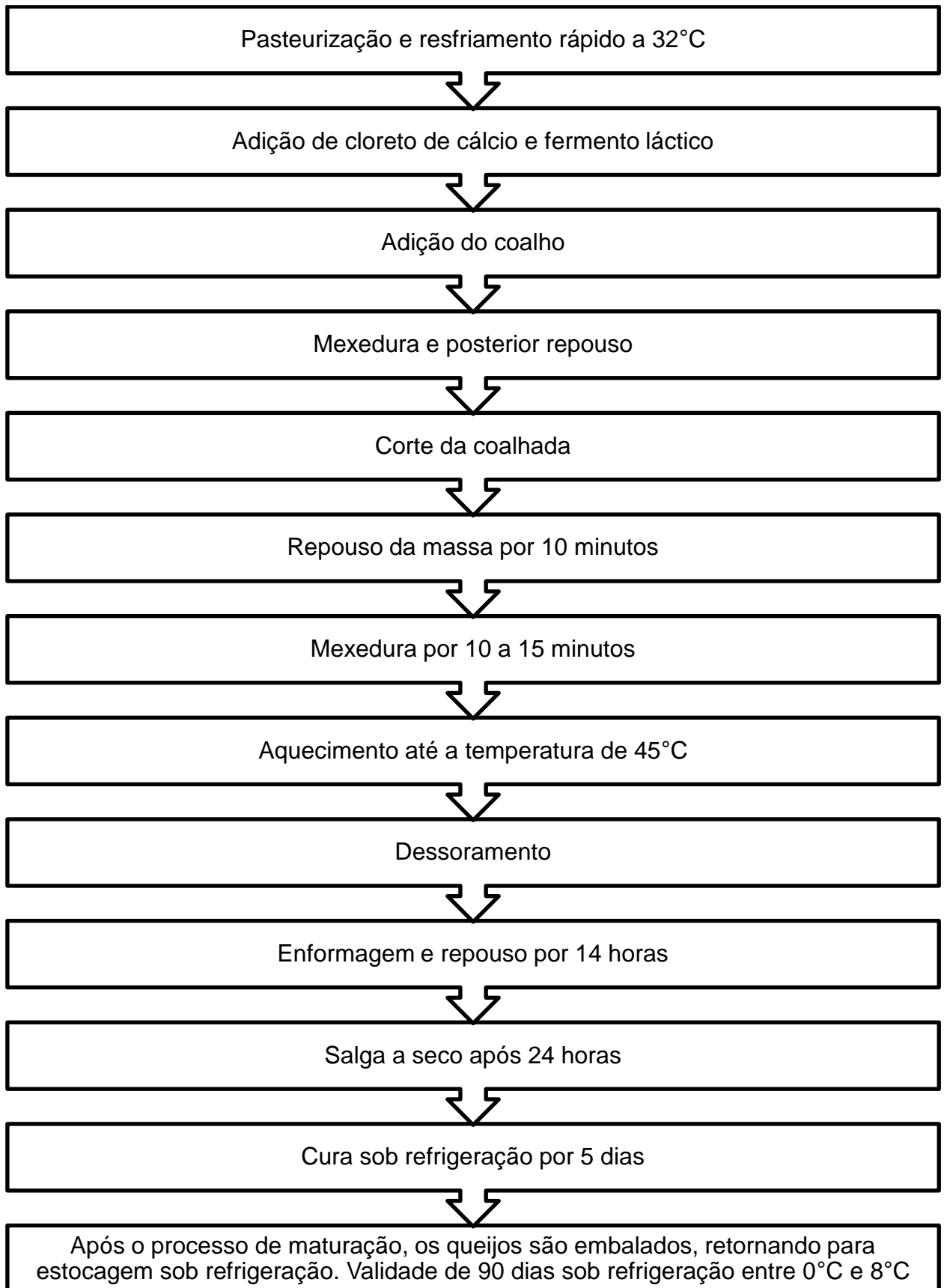
A fabricação de queijos é conhecida desde a Grécia Antiga, tendo um crescimento positivo na Idade Média (PERRY, 2004). Em vários locais, como na França, tradicional produtora de queijos, são produzidos diversos tipos de queijos a partir do leite cru. No Brasil, esta prática é utilizada frequentemente nas produções familiares, onde o conhecimento empírico é repassado através de gerações e acaba sendo fortalecido através do comportamento do consumidor (PINTO et al., 2008).

Embora o aspecto cultural existente na fabricação artesanal de queijos, há uma legislação específica no Brasil que estabelece um regramento na sua produção (BRASIL, 1996). No Brasil, a produção de queijos artesanais e sua comercialização está relacionada em grande parte à informalidade (IDE, BENEDET, 2001), tendo em vista o hábito dos brasileiros adquirirem estes alimentos sob o argumento de serem

mais saborosos e nutritivos que os similares produzidos pelas indústrias de laticínios (ZAFFARI et al., 2007, ABIQ, 2011).

### **3.3. Queijos Coloniais**

Uma relação de confiança empírica tem sido criada entre o produtor e o consumidor, devido a uma proximidade entre eles, sendo fundamental para o comércio e consumo dos queijos coloniais. Quando se pensa em alimentos tradicionais, como os queijos coloniais, as práticas de julgamento e os conhecimentos necessários para uma “boa escolha” do produto parecem evoluir com a própria história de sua produção, de forma que os consumidores assumem importante papel na definição de qualidade dos mesmos. Na ausência ou não observância dos critérios formais e legais de padrão qualidade, os consumidores definem atributos que, de certa forma, estabelecem um sistema importante de certificação (MENEZES et al., 2010). A figura 2 (pág. 14) define o fluxograma de fabricação do queijo colonial.



**Figura 2-** Fluxograma de Fabricação do Queijo Colonial. Fonte: Bezerra, 2008

O queijo colonial possui produção inteiramente artesanal e surgiu como uma alternativa de pequenos agricultores para agregar valor à produção de leite bem como um fator de aumento na renda familiar. Trata-se de um queijo que, apesar de grande comercialização, não possui padrões legais de identidade e qualidade, produzido de forma artesanal, usando leite cru como matéria prima (LUCAS et al., 2012).

O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), conforme instrução Normativa nº 57 de 16 de dezembro de 2011, permite a produção e comercialização de queijos maturados em um período de 60 dias de maturação desde que os vários requisitos determinados sejam atendidos (BRASIL, 2011). Apesar desta normativa estabelecer critérios de qualidade, o que se observa em diversos trabalhos realizados com queijos coloniais é que ainda existe uma quantidade considerável de queijos de baixa qualidade microbiológica, o que gera risco em potencial para o consumidor, conduzindo a um grave problema de saúde pública (IDE e BENEDET, 2001; CELSO et al. 2004; ZAFFARI et al. 2007; LUCAS et al. 2012).

### **3.4. Micotoxinas**

São metabólitos secundários produzidos por alguns fungos filamentosos, apresentambaixa massa molecular, formados por uma quantidade de compostos de toxicidade diversas ao homem e ao animal. Podem estar presentes, sob certas condições, em uma grande quantidade de alimentos, como o amendoim, o milho,o trigo, a cevada, o café, o leite, o arroz, farinhas, nozes, castanhas, frutas secas e outras. Existem cerca de duzentas micotoxinas, porém as mais estudadas são as aflatoxinas, ocratoxina A, os tricocetenos, zearalenona, fumonisinas e a patulina (BENNETT; KLICH, 2003). As micotoxinas podem estar presentes nos micélios e

nos esporos ou ainda serem excretadas como exotoxinas no substrato de crescimento (SERVARAJ et al., 2015).

As micotoxinas podem contaminar direta ou indiretamente os alimentos e seus derivados, constituindo-se em um sério problema de saúde pública e animal, principalmente em países onde o agronegócio é a principal fonte de riqueza (BENNETT; KLICH, 2003). Estas toxinas provenientes dos fungos podem estar presentes nos alimentos e derivados mesmo na ausência aparente do seu agente gerador ou no desaparecimento posterior do mesmo (SERVARAJ et al., 2015). Nem todos os fungos contaminantes dos alimentos podem produzir micotoxinas e a contaminação dos alimentos pode se dar no campo, antes e após a colheita, no armazenamento e até no transporte do produto final (BENNETT; KLICH, 2003; SERVARAJ et al., 2015).

A qualidade do leite, com relação aos contaminantes tóxicos, está relacionada diretamente ao tipo e qualidade da alimentação do animal, seguido do metabolismo da micotoxina e sua consequente excreção (JOBIM et al., 2001). O nível de excreção da micotoxina no leite é geralmente baixo e é afetado pelo peso molecular e a característica lipofílica de uma dada toxina. O nível de transporte está também relacionado pelo gradiente de pH entre o plasma sanguíneo e o leite, que varia de acordo com as condições de saúde do animal (YIANNIKOURIS & JOUANY, 2002; KALAC, 2011). A absorção da micotoxina pela glândula mamária pode ocorrer por filtração intracelular, difusão passiva ao redor da membrana celular ou transporte ativo (JOUANY, 2001; YIANNIKOURIS & JOUANY, 2002).

A primeira linha de defesa do animal ruminante saudável, o fluido ruminal, possui uma microbiota bacteriana e protozoária que é efetiva para a proteção da contaminação por alguma micotoxinas, tais como a Zearelonona, Ocratoxina A e

Toxina T2, porém não exerce um efeito protetor sobre outras micotoxinas- Aflatoxina B1, Fumonisinias e Patulina (KIESSLING et al., 1984; OBREMSKI et al., 2009; PRANDINI et al., 2009). Contudo a barreira ruminal pode estar alterada no animal doente, trocas na dieta animal ou altos níveis de contaminação por micotoxinas na sua dieta (PATTONO et al., 2013).

A detecção das micotoxinas é de máxima importância para a saúde humana e animal, assim como para a economia de um país. Os surtos são geralmente sazonais, devido às condições climáticas que favorecem o crescimento fúngico e/ou a produção de micotoxinas pelos mesmos. São considerados como fatores críticos a umidade e a temperatura. Outros fatores, tais como fatores geográficos, suscetibilidade da variedade e condições de armazenamento também influenciam a expressão das micotoxinas por estes fungos toxigênicos, que podem inclusive serem expressas e secretadas simultaneamente no ambiente (GUO et al.,2013).

Do ponto de vista econômico, a presença das micotoxinas causa prejuízo aos produtores, processadores e comerciantes de alimentos e, de forma geral, à economia de um país. As micotoxinas afetam o agronegócio em diversos países, reduzindo ou inviabilizando a exportação de grão e alimentos processados ou não, reduzindo a produção animal e agrícola (LEUNG et al., 2006; GUO et al., 2013).

Do ponto de vista de saúde pública, a Organização Mundial da Saúde estima um percentual ao redor de 40% da redução da expectativa de vida em países pobres cujos índices de presença de micotoxinas na dieta alimentar esteja superior aos limites máximos estipulados (KAWASHIMA, 2004, TOROVIC, 2015).

Por um outro lado, as micotoxinas podem entrar na cadeia alimentar humana e animal de forma direta ou indireta. A contaminação direta, como já salientada anteriormente, ocorre quando o produto, alimento ou ração são contaminados por

um fungo toxigênico, com posterior formação de micotoxinas. A contaminação indireta se dá quando um componente foi contaminado com um fungo toxigênico e mesmo com a eliminação posterior no processamento, as micotoxinas estarão presentes no produto final. A maioria dos alimentos e rações podem permitir o crescimento e o desenvolvimento de fungos toxigênicos tanto durante a produção como no processamento, transporte e o armazenamento (FRISVAD; SAMSON, 1992; SERVARAJ et al. 2015).

O consumo destas toxinas fúngicas através de alimentos contaminados pode ocasionar lesões na pele, sintomas de hepatotoxicidade, nefrotoxicidade, neurotoxicidade, hematotoxicidade ou genotoxicidade, podendo levar, inclusive, o indivíduo a óbito (ZHANG et al. 2015). Podem, ainda, ocasionar efeitos mutagênicos, teratogênicos, carcinogênicos ou imunossupressores (JOINTFAO/WHOEXPERT COMMITTEE ON FOODS ADDITIVES, 2001, ZHAG et al. 2015). O consumo direto por animais pode ocasionar aumento na recusa da ração, baixa conversão alimentar, perda de peso, imunossupressão e diminuição da capacidade de reproduzir, o que gera uma perda econômica (WU, 2004).

Muitos países possuem regulamentos para o controle dos níveis de micotoxinas em diversos alimentos, definindo valores máximos aceitáveis para os mesmos, com a finalidade de reduzir os riscos de transmissão e suas consequências (RASTOGI et al., 2004).

A partir do ano de 2011, o Ministério da Saúde, através da Agência Nacional de Vigilância Sanitária- ANVISA- estabeleceu novos limites para diversos grupos de micotoxinas em alimentos e matérias primas destinados ao consumo humano, tais como Ocratoxinas, Desoxivalenol, Fumonisinias, Tricocetenos, Patulina, Zearalenona

e Alfatoxinas, a maioria até então inexistentes na legislação brasileira (BRASIL, 2011), estando os mesmos listados na tabela 2 (pág. 19).

Tabela 2- Limites máximos tolerados para Micotoxinas em alimentos no Brasil.

Micotoxinas	Alimento	LMT (µg/kg)
<b>Aflatoxina M1</b>	Leite fluído	0,5
	Leite em pó	5
	Queijos	2,5
<b>Aflatoxinas B1, B2, G1, G2</b>	Cereais e produtos de cereais, exceto milho e derivados, incluindo cevada maltada	5
	Feijão	5
	Castanhas exceto Castanha-do-Brasil, incluindo nozes, pistachios, avelãs e amêndoas	10
	Frutas desidratadas e secas	10
	Castanha-do-Brasil com casca para consumo direto	20
	Castanha-do-Brasil sem casca para consumo direto	10
	Castanha-do-Brasil sem casca para processamento posterior	15
	Alimentos à base de cereais para alimentação infantil (lactentes e crianças de primeira infância)	1
	Fórmulas infantis para lactentes e fórmulas infantis de seguimento para lactentes e crianças de primeira infância	1
	Amêndoas de cacau	10
	Produtos de cacau e chocolate	5
	Especiarias: <i>Capsicum</i> spp. (o fruto seco, inteiro ou triturado, incluindo pimentas, pimenta em pó, pimenta de caiena e pimentão-doce); <i>Piper</i> spp. (o fruto, incluindo a pimenta branca e a pimenta preta) <i>Myristica fragrans</i> (noz-moscada) <i>Zingiber officinale</i> (gengibre) <i>Curcuma longa</i> (curcuma). Misturas de especiarias que contenham uma ou mais das especiarias acima indicadas	20
	Amendoim (com casca), (descascado, cru ou tostado), pasta de amendoim ou manteiga de amendoim	20
Milho, milho em grão (inteiro, partido, amassado, moído), farinhas ou sêmolos de milho	20	
<b>Patulina</b>	Suco de maçã e polpa de maçã	50
<b>Ocratoxina A</b>	Cereais para posterior processamento, incluindo grão de cevada	20
<b>Desoxinivalenol (DON)</b>	Trigo integral, trigo para quibe, farinha de trigo integral, farelo de trigo, farelo de arroz, grão de cevada	1000



	Farinha de trigo, massas, crackers, biscoitos de água e sal, e produtos de panificação, cereais e produtos de cereais exceto trigo e incluindo cevada malteada.	750
<b>Fumonisinias (B1 + B2)</b>	Farinha de milho, creme de milho, fubá, flocos, canjica, canjiquinha	1500
	Amido de milho e outros produtos a base de milho	1000
<b>Zearalenona</b>	Farinha de trigo, massas, crackers e produtos de panificação, cereais e produtos de cereais exceto trigo e incluindo cevada malteada.	100
	Arroz beneficiado e derivados	100
	Arroz integral	400
	Farelo de arroz	600
	Milho de pipoca, canjiquinha, canjica, produtos e sub-produtos à base de milho	150
	Trigo integral, farinha de trigo integral, farelo de trigo	200

Fonte: RDC 07/2011 (ANVISA 2011)

### 3.5. Aflatoxinas

Várias micotoxinas contaminam os alimentos, sendo que entre as principais encontram-se as Aflatoxinas. As aflatoxinas são metabólitos secundários, produzidos por algumas cepas de fungos do gênero *Aspergillus*, principalmente das espécies *A. flavus*, *A. parasiticuse* *A. nomis*, os quais podem desenvolver-se naturalmente em produtos alimentícios, como amendoim, milho, feijão, arroz e trigo, entre outros (SCUSSEL, 2004). São conhecidos, atualmente, 17 compostos similares designados pelo termo aflatoxina, porém, os principais tipos de interesse médico-sanitário são identificados como B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub> (HUSSEIN & BRASEL, 2001). Em saúde animal, várias espécies são sensíveis aos seus efeitos tóxicos agudos, mutagênicos, carcinogênicos e teratogênicos, sendo o fígado o principal órgão afetado (HUSSEIN & BRASEL, 2001).

As principais aflatoxinas recebem a denominação por letras, devido à fluorescência emitida pelas mesmas, sendo observadas, sob luz ultravioleta nas cores azul (blue – B) e verde (green – G) (ELLIS et al., 1991).

O *Aspergillus* é um dos principais gêneros fúngicos relacionados aos casos de intoxicação por micotoxinas (OGA, 1996). As espécies *A. flavus*, *A. parasiticus* e mais recentemente *A. nomis*, as principais produtoras das aflatoxinas, são de grande importância na agricultura e na saúde humana e animal, sendo conhecidas por contaminar várias culturas, tanto antes como depois da colheita (RAHIMI,2014). Estas espécies apresentam uma grande afinidade por grãos e sementes de oleaginosas (OGA, 1996). A produção de aflatoxinas, na maior parte das vezes, está associada às condições inadequadas de secagem e armazenamento dos grãos, além de fatores estressantes ao fungo, sendo que produção dos mesmos depende de vários fatores, tais como atividade da água, pH, temperatura e substrato dentre outros fatores (KABAK et al.,2006). Eles são importantes na ocorrência de aflatoxinas em áreas úmidas e tropicais, embora também haja o desenvolvimento das mesmas em áreas temperadas, estando as condições de estresse ao fungo causado pela secura, a transmissão através de insetos vetores e a umidade do solo associados ao desenvolvimento fúngico e consequente produção de aflatoxinas antes da colheita (KALAC,2011).

### **3.5.1. Aflatoxinas – Estrutura Química**

As aflatoxinas apresentam estruturas químicas relacionadas entre si, formando um grupo único de compostos heterocíclicos altamente oxigenados (furocumarinas), representando um núcleo central cumarínico ligado a uma estrutura bi-furanóide sendo que a diferença entre elas é o fato de as Aflatoxinas B (B1 e B2) apresentarem anel ciclopentona e as do grupo G (G1 e G2) um anel lactona em suas moléculas

(GOURAMA & BULLERMAN, 1995). As aflatoxinas que possuem uma dupla ligação no carbono terminal do anel diidrofurano, como a aflatoxina B1, aflatoxina G1 e aflatoxina M1 são mais susceptíveis à ação de agentes oxidantes (HUSSEIN; BRASEL, 2001). A figura 3 abaixo mostra a estrutura química das principais aflatoxinas toxigênicas.

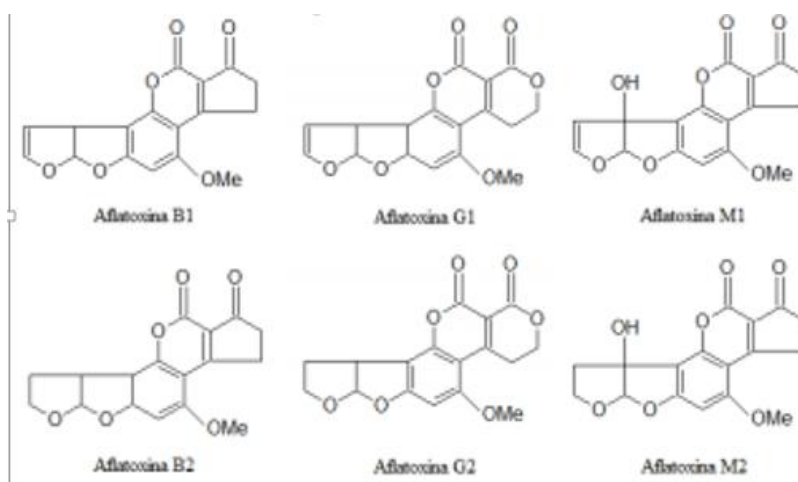


Figura 3: Estrutura química das principais aflatoxinas encontradas em alimentos (Me = CH<sub>3</sub>).

Fonte: HUSSEIN & BRASEL, 2001

### 3.5.2. Biotransformação da aflatoxina B1 em aflatoxina M1

A absorção das aflatoxinas se dá no trato gastrointestinal de vários animais, incluindo o homem, sendo que sua biotransformação se dá no fígado através da ação de enzimas microsossomais relacionadas ao Citocromo P 450 num processo complexo apresentando múltiplas vias, entre as quais a epoxidação e a hidroxilação (NEAL et. Al., 1988). A ativação da AFB1 leva a formação do derivado AFB1-8,9 epóxido, o qual apresenta dois estereoisômeros, a endo-epóxi e a exo-epóxi, sendo esta última a responsável pelos efeitos tóxicos agudos, mutagênicos e carcinogênicos da AFB1 (NEAL et al., 1998; JECFA, 2002). A hidroxilação do

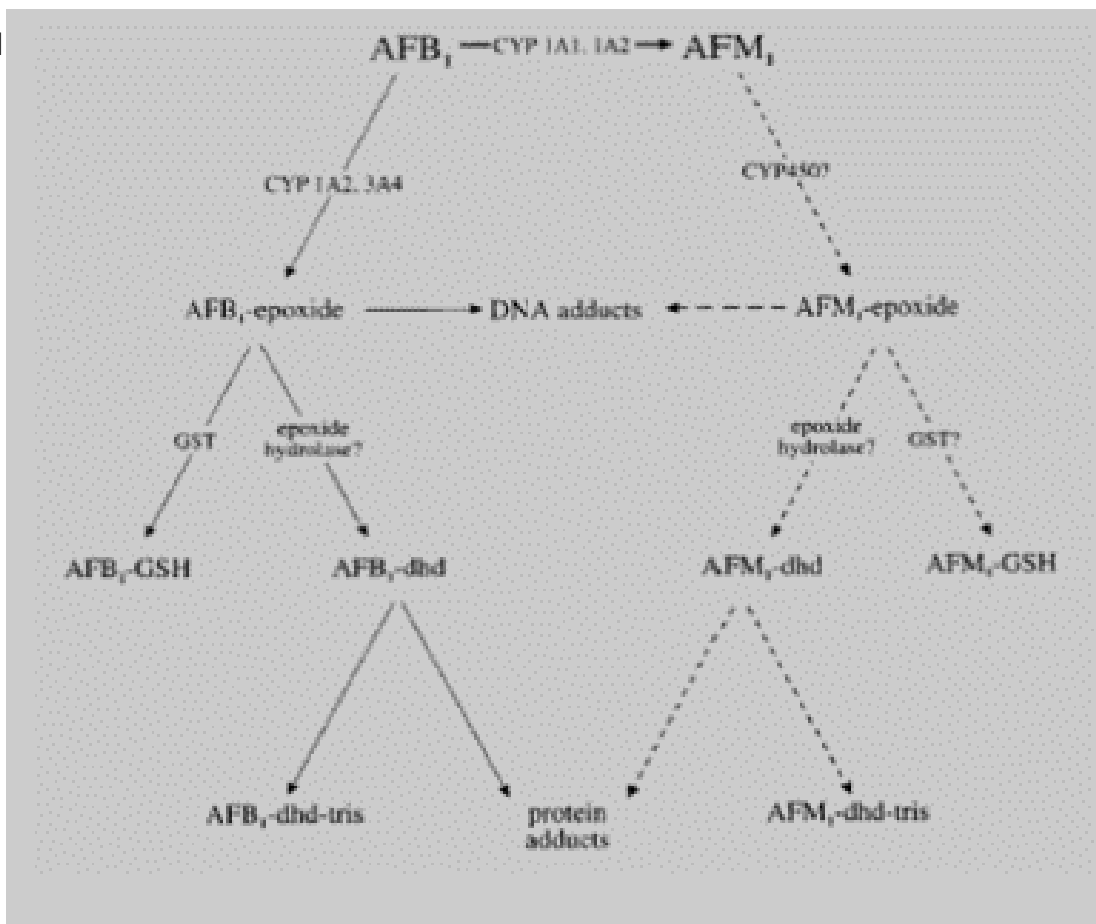
carbono terciário do anel di-furanocumarínico, processo que pode ser reversível ou irreversível, resulta na formação de derivados menos tóxicos e hidrossolúveis, como a AFM1 (NEAL et al., 1998; FALETTO et al., 1998). Devido ao grupo hidroxila formado, este composto é muito solúvel em água, o que possibilita a sua secreção em diversos fluidos corporais, como, por exemplo, o leite (OLIVEIRA; GERMANO. 1997).As aflatoxinas B1 e M1 são análogas em suas estruturas, sendo que a diferença se dá pela presença de uma hidroxila entre os anéis furano, indicando que as vias de transformação podem ser as mesmas, podendo a AFM1 sofrer epoxidação e assim ser ativada para formar derivados mutagênicos (MIDIO, 1999).

A taxa de conversão de AFB1 que é ingerida pelo ruminante e biotransformada em AFM1 é variável, sendo descritos vários níveis de conversão por diversos autores, variando de 0,5 a 5,0 % (CREPPY, 2002; JECFA, 2002; GALLO et al., 2015). Alguns autores citaram valores de até 6,2% (VELDMAN, 1992).Essa variabilidade é atribuída às condições dos animais que ingeriram essa aflatoxina (CREPPY, 2002; GALLO et al., 2015). O consumo de ração contaminada por AFB1 pelo gado leiteiro pode levar à excreção de AFM1 no leite, assim como a ingestão de AFB2 promove a metabolização à AFM2, sendo que parte da AFB1 é degradada no rúmem, resultando na formação de aflatoxicol. A fração restante é absorvida pelo trato digestivo por difusão passiva, sendo biotransformada através da hidroxilação no fígado em AFM1. A AFM1 é então conjugada com o ácido glicurônico e excretada na bile ou transferida para o sistema circulatório, sendo então eliminada na urina ou no leite (FINK-GREMMELES; 2008).

A concentração de AFM1 encontrada no leite está direta e intimamente correlacionada com os níveis de AFB1 ingeridos na ração pelo animal produtor (BAKIRCI, 2001). Níveis de 300 mgc/Kg de AFB1 na ração podem resultar na

excreção de 1 mcg/Kg de AFM1 no leite, podendo ser encontrada no leite entre 12 e 24 horas após a ingestão de ração contaminada com AB1, independente dos níveis, atingindo níveis indetectáveis de 4 a 5 dias após a remoção da ração contaminada (STOLOFF, 1980). Porém, em um recente trabalho produzido por HAN et al. (2013), ao analisar amostras de ração destinado ao gado leiteiro, todas elas com nível de aflatoxina B1 abaixo do limite máximo tolerável pela Comunidade Européia (5,0 mcg/Kg), verificaram que 3 de 200 amostras de leite obtidas dos animais alimentados com esta ração apresentavam níveis de aflatoxina M1 acima do limite máximo permitido (0,05 mcg/L)( HAN et. al., 2013). Achados semelhantes foram encontrados por BATTACONE et al. (2009), levando à conclusão que o achado de limites aceitáveis de aflatoxina B1 nos alimentos para o gado não garantem que os níveis de aflatoxina M1 estejam dentro dos limites normais permitidos (BATTACONE ET. AL., 2009). A figura 4 propõe as principais vias do metabolismo da aflatoxinas

B1



F

Figura 4: Vias do metabolismo de AFB1 e AFM1.

Fonte: NEAL et al., 1998

co. A Aflatoxina B1 (AFB1) é o agente hepatocarcinogênico mais potente conhecido em mamíferos, sendo também a aflatoxina mais frequente. A toxicidade manifesta-se pela mutagenicidade, carcinogenicidade e teratogenicidade, dependendo da dose e tempo de exposição (TURNER et al., 2002). Efeitos agudos causam danos estruturais e funcionais no fígado devido à necrose celular, hemorragia, lesões, fibrose e cirrose. Adicionalmente, desencadeiam imunossupressão, infecção no trato respiratório inferior, hemorragia gastrointestinal, indisposição e febre. Exposição crônica a aflatoxinas pode resultar em câncer hepático, bem como carcinomas em rim, pulmão, cólon e sistema nervoso (BINDER et al., 2007). A toxicidade das aflatoxinas segue a seguinte ordem: B1 > M1 > G1 > B2 > G2 = M2 (JAY, 2005). O fígado é o órgão-alvo da ação das aflatoxinas, e o Carcinoma Hepatocelular, por sua etiologia multifatorial, pode ser influenciado pela co-exposição às aflatoxinas e ao vírus da hepatite B - VHB. Estudos epidemiológicos e modelos em animais têm demonstrado evidências de que estes dois fatores atuam conjuntamente, aumentando o risco de desenvolvimento de Carcinoma Hepatocelular (OLIVEIRA & GERMANO, 1997; TURNER et al., 2002; YANG et al.; 2014).

O mecanismo molecular para a indução do Carcinoma Hepatocelular, induzido por AFB1, tem sido intensamente estudado e demonstrou-se estar associado à mutação específica do códon 249 do p53, um gen supressor tumoral que acredita-se regular a expressão do microRNA (YANG et al., 2014). A exposição às aflatoxinas durante o desenvolvimento intrauterino foi avaliada pela quantificação do aduto aflatoxina-albumina (Af-Alb) em gestantes na Gâmbia, África, onde foi

observado um forte efeito da exposição materna durante a gestação, no crescimento (peso e altura) das crianças durante o primeiro ano de vida (TURNER et al., 2007).

Em revisão publicada por KHLANGWISSET, SHEPHARD E WU (2011), os autores associam o consumo de alimentos contaminados por aflatoxinas, entre outros fatores, ao retardo no crescimento de crianças, especialmente em países da África e da Ásia. Contudo, o mecanismo exato pelo qual aflatoxinas causam prejuízos no desenvolvimento de crianças ainda não está esclarecido. Em geral, ruminantes são menos suscetíveis que outras espécies animais aos efeitos tóxicos associados à exposição a micotoxinas (YANNIKOURIS et.al.; 2002). Isto ocorre devido à capacidade da microbiota ruminal em converter uma série de micotoxinas em compostos menos potentes ou mesmo biologicamente inativos a certos níveis de exposição. O consumo de ração contaminada por AFB1, pelo gado leiteiro, pode levar à excreção de aflatoxina M1 no leite, um produto de biotransformação hepática. A ingestão de aflatoxina B2 (AFB2) promove a metabolização à aflatoxina M2 (AFM2). Segundo Fink-Gremmels (2008), parte da AFB1 é degradada no lúmen, resultando na formação de aflatoxicol. A fração restante é absorvida pelo trato digestivo por difusão passiva, sendo hidroxilada no fígado, em AFM1. Por sua vez, AFM1 é conjugada com ácido glicurônico e excretada via bile ou transferida para o sistema circulatório. A AFM1 circulante pode ser excretada na urina ou no leite.

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

concentração de AFM1 encontrada no leite está altamente correlacionada com o nível de AFB1 na ração (BAKIRCI, 2001).

Estudos realizados com oito rebanhos diferentes, contendo entre uma e dez vacas, indicam que níveis de 300 µg/kg de AFB1 na ração podem resultar em 1 µg/L de AFM1 no leite. AFM1 pode ser encontrada no leite entre 12 e 24 h após a ingestão de AFB1 e atinge níveis não detectáveis de 4 a 5 dias após a remoção da ração contaminada, independente dos níveis iniciais (STOLOFF, 1980). A carcinogenicidade de AFM1 é quase tão elevada quanto à de AFB1 e suas propriedades toxicológicas são comparáveis (CREPPY, 2002). AFM1 foi inicialmente classificada pela International Agency for Research on Cancer - IARC como possivelmente carcinogênica para humanos (Grupo 2B, IARC, 1993), mas foi reclassificada no Grupo 1: agente carcinogênico para humanos (IARC, 2012). Por essa razão, diversos países têm estabelecido limites máximos aceitáveis para presença de AFM1 em leite e produtos lácteos.

A legislação brasileira, através da Resolução RDC nº 7, de 18 de fevereiro de 2011 (BRASIL, 2011), limita a presença de AFM1 a 0,5 µg/kg em leite fluido, 5 µg/kg em leite em pó e 2,5 µg/kg em queijos. A preocupação sanitária acerca da contaminação do leite por AFM1 se deve ao fato de que o leite pode constituir o principal nutriente de crianças em desenvolvimento, estágio mais vulnerável para indução de carcinogênese, assim, a exposição aos carcinógenos inevitáveis deve ser mantida nos menores níveis possíveis. Os efeitos tóxicos e carcinogênicos foram demonstrados em diversas espécies, principalmente nos animais jovens, incluindo os humanos (MIDIO et al., 1999). Existe, como resultante deste fato, uma preocupação muito grande com relação à saúde das crianças, devido ao alto



consumo de leite e produtos derivados, seu baixo peso corpóreo e uma maior susceptibilidade às aflatoxinas (IARC, 2002).

### **3.5.3. Efeitos de processamento das aflatoxinas**

Diversos estudos concluem que a AFM1 está associada à fração proteica do leite (caseína), ficando nela retida mesmo após tratamento térmico e nos seus derivados. Conseqüentemente, a concentração de matéria prima, como no leite em pó, leite condensado, queijos e outros, pode aumentar a proporção de AFM1 no produto final, devido à diminuição do teor de água (PITT et al, 2000; JECFA, 2002). No exemplo do queijo, são necessários 10 litros de leite para produzir 1 kg de queijo, daí que se estima a concentração em amostras contaminadas dez vezes os níveis de AFM1 do leite (UNIVATES, 2016). Sendo a AFM1 insolúvel na gordura do leite, no processamento de seus produtos derivados, a desnaturação afeta a distribuição da micotoxina no produto final, ficando a AFM1 retida na fração desnatada (BAKIRCI, 2001).

Em relação aos efeitos dos tratamentos térmicos (pasteurização e processo UHT), na redução de AFM1 os resultados são bastante conflitantes quanto à percentagem de redução ou não dos níveis de AFM1. PEREIRA et al. (2005) encontraram, após pasteurização de suas amostras, uma redução de até aproximadamente 15% nos níveis de AFM1, concluindo que esta redução não foi estatisticamente significativa, concluindo que o tratamento térmico não reduz apreciavelmente a concentração de AFM1. Outros pesquisadores também chegaram a esta mesma conclusão (ROUSSI et al., 2002; MARTINS & MARTINS, 2000; SASSAHARA et al. 2005; GARRIDO et al. 2003; PRADO, 1999; ASSEM et al., 2011). Processamentos como resfriamento e congelamento também não afetaram de modo

significativo a concentração de AFM1(GALVANO, 1996; STOLOFF, 1998). Tratamentos térmicos, por sua vez, não se revelam muito eficaz na detoxificação da AFM1, devido à resistência desta aflatoxina às altas temperaturas (SASSAHARA et al., 2005). Seus pontos de fusão são de 268-269 °C para a Aflatoxina B1 e 244-246° C para a Aflatoxina G1. A Aflatoxina M1 possui um ponto de fusão de 299 ° C, razão pela qual ela é resistente ao processo de pasteurização (SASSAHARA et al.,2005).

Este composto pode ser parcialmente eliminado através de tratamentos físicos ou químicos. Adsorventes, peróxido de hidrogênio e radiação ultravioleta podem ser utilizados, embora não sejam recomendados. A radiação ultravioleta deve ser aplicada com muita cautela, visto que sua utilização em altas intensidades pode alterar as características organolépticas do leite . Estes tratamentos, entretanto, não são de fácil aplicação na indústria, pois sua segurança ainda não foi testada eficazmente, além de gerar um elevado custo, fazendo com que não seja recomendável sua utilização em larga escala (JECFA, 2002).

Devido à alta estabilidade da AFM1, as ações para seu controle devem ser orientadas no sentido da prevenção ou redução da concentração da sua aflatoxina precursora, AFB1, nas rações fornecidas aos ruminantes. A aplicação de boas práticas no campo, na fabricação, no armazenamento e no transporte podem diminuir o risco de contaminação fúngica (CREPPY, 2002; JECFA, 2002; OLIVEIRA; GERMANO, 2003; TAJKARIMI et al., 2008; DASTHI et al., 2009). A redução da concentração de aflatoxina B1 nas rações pode ser obtida com a utilização de tratamentos físicos, como o uso de adsorventes, calor, micro-ondas e luz ultravioleta, bem como de agentes químicos, como a amônia, bissulfito de sódio e hidróxido de sódio. (CREPPY, 2002; JECFA, 2002).

Tem sido demonstrado que o leite produzido durante a estação de calor é sujeito à menor contaminação que o produzido nos meses de mais frio. A maior incidência nesses meses dá devido a estocagem prolongada do alimento para o gado, o que favorece as condições ideais ao crescimento de fungos produtores de aflatoxinas (GHIAZIAN et al., 2007; PENG& CHEN, 2009; DASHTI et al., 2009). Além disso, fatores ambientais como temperatura e umidade, produtos agrícolas utilizados nas pastagens e efeito sazonal em diversos países podem afetar os níveis de contaminação de aflatoxina B1 em alimentos (DASHTI et al., 2009; XIONG et al., 2013) avaliaram amostras contaminadas de leite de vaca por AFM1 durante diferentes estações e observaram que a ocorrência foi significativamente mais alta durante o inverno ( 0,123 µg/L; p<0,05) quando comparadas com outras estações ( primavera 0,029 µg/L; verão 0,032 µg/L; outono 0,032 µg/L; p < 0,05).

BILANDZIC et al.(2010), na Croácia, verificaram que as concentrações de AFM1 no leite de vaca variavam durante as diferentes estações. Níveis significativamente mais altos foram encontrados entre os meses de janeiro e abril (0,036 a 0,059 µg/L), correspondentes ao inverno e primavera do que nos meses entre junho e setembro (0,012 a 0,015 µg/L) correspondente ao verão e outono. A conclusão foi de que este fato se dá pela disponibilidade de pastagens frescas durante a primavera e o verão. Durante os meses de frio, pastagens secas e rações concentradas são frequentemente utilizadas (BILANDZIC et al., 2010). Em amostras de leite cru coletadas em Minas Gerais, PICININ et al. (2013) analisaram os níveis de AFM1 em três diferentes períodos do ano: seco (precipitação pluviométrica de 7,9 mm e temperatura média de 19,3 °C), transição (100,3 mm e 20,3 °C) e chuvoso (187,6 mm e 22,3 °C). Os autores observaram níveis de AFM1 superiores no período seco (0,036 µg/L), seguido pelo período de transição (0,017 µg/L) e período chuvoso

(0,006 µg/L). Os autores justificaram as diferenças em razão da alimentação fornecida aos animais nos diferentes períodos. Durante o período seco, rações suplementares foram fornecidas para o gado em confinamento. Durante o período de transição, o gado era mantido sob confinamento e sob pastoreio. No entanto, durante o período chuvoso, quando os animais são geralmente livres para a pastagem, o risco de contaminação diminuiu (PICINI et.al., 2013).

#### **3.5.4. Aflatoxinas- Legislação**

A ocorrência de Aflatoxina M1 no leite de vacas lactantes é uma questão de saúde pública, pois o leite e seus derivados são altamente consumidos por adultos, crianças e bebês em todo o mundo (GALLO et al., 2015). Devido a isto, muitos países regulamentaram o limite máximo permitido de Aflatoxina M1 no leite (GALLO et al., 2015). No Brasil, o limite máximo de Aflatoxina M1 permitido segue a definição do Mercosul, GM/RES nº 56/94, que estabelece a concentração máxima de 0,5 µg/L(ppb) em leite fluído, 5,0 µg/Kg (ppb) para o leite em pó e 2,5 µg/Kg (ppb) para queijos (BRASIL, 2002; BRASIL, 2011).

Cada país tem tentado estabelecer limites máximos de tolerância para a AFM1. A União Européia adotou o limite de tolerância máximo de 0,05 µg/L para o leite fluído e 0,25 µg/Kg para queijos( EC, 2006). O regulamento técnico do MERCOSUL sobre limites máximos de aflatoxinas em leite estabeleceu os níveis de 0,5 µg/L e 5,0 µg/kg para leite fluído e em pó e 2,5 µg/kg para queijos sendo estes os limites internalizados pelo Brasil (BRASIL, 2011), mesmos valores adotados pelo FDA(FDA,1996). Outros órgãos normativos, como Institute of Standards and Industrial Research of Iran (ISIRI, 2002) e Turkey Food Codex também adotaram estes mesmos valores como limites máximos aceitáveis.

### 3.5.5. Aflatoxina M1 no Brasil e no mundo

Inúmeras pesquisas sobre a incidência de aflatoxina M<sub>1</sub> em leite e produtos lácteos já foram realizadas no Brasil. Devido a sua grande extensão e diversidade climática, foram encontradas uma grande variação na ocorrência (30,7 a 100 %), assim como nos níveis de contaminação (0,0018 a 4,1 µg/L) (OLIVEIRA et al., 2013; PEREIRA et al., 2015).

PEREIRA et al. (2005) detectaram AFM1 em 38 % das amostras de leite pasteurizado com uma média de concentração de 0,059 µg/L, bem abaixo do limite máximo aceitável pela legislação brasileira (0,5 µg/L- BRASIL, 2011). Outro estudo realizado por OLIVEIRA et al. (2013) demonstrou um percentual de 31 % das amostras contaminadas, apresentando níveis entre 1,0 e 4,1 µg/L, bastante acima do limite máximo permitido pela legislação brasileira.

Outros estudos no Brasil detectaram a presença de AFM1 no leite de vaca em 95% das amostras analisadas, com variação de concentração entre 0,01 a 0,2 µg/L (SHUNDO et al., 2009); 40 % das amostras contaminadas, variação entre 0,009 e 0,69 µg/L (JAGER et al., 2013); 24% das amostras contaminadas, com média de 0,680 µg/L (SASSAHARA et al., 2005), tendo estas amostras sido originárias de leite de vaca das regiões sul e sudeste do Brasil

Em estudos mais antigos realizados, verificou contaminação em duas das 38 amostras de leite cru do Estado de Minas Gerais (PRADO et al., 1994). Um estudo demonstrou resultados positivos para 11 das 240 amostras de leite cru analisadas no Estado do Rio Grande do Sul (MALLMANN et al., 1997). Em outro, foi detectada a contaminação em uma das 100 amostras de leite pasteurizado e em nove das 50 amostras de leite cru analisadas no Estado de São Paulo (SABINO et

al., 1989). Vários estudos já foram publicados no mundo, sobre a presença de aflatoxina M1 em queijos, inclusive no Brasil, como pode ser observado nas tabelas 3 e 4, entretanto inexistem informações sobre a presença dessa micotoxina em derivados lácteos como queijos coloniais no Brasil, principalmente no estado do Rio Grande do Sul.

**Tabela 3:** Estudos envolvendo pesquisa de AFM1 em queijos no mundo

<b>Referencia</b>	<b>Ano</b>	<b>Pais</b>	<b>Amostras</b>	<b>Amostra positiva</b>	<b>Maior que LMT* – µg/kg</b>
<b>Barrios et al.</b>	1996	Espanha	35	16 (45%)	-
<b>Pietri et al.</b>	1997	Itália	223	219 (89%)	1 (0,5%)
<b>Elgeberi et al.</b>	2004	Líbano	20	15 (75%)	-
<b>Aycicek et al.</b>	2005	Turquia	220	202 (90%)	
<b>Oruc et al.</b>	2006	Turquia	57	51 (89%)	7 (12%)
<b>Fallah et al.</b>	2009	iran	210	161 (76%)	51 (24%)
<b>Amer &amp; Ibrahim</b>	2010	Egito	150	50 (33%)	0
<b>Fallah et al.</b>	2010	Iran	72	59 (82%)	30 (22%)
<b>Kavi et al.</b>	2011	Turquia	127	36 (28%)	13 (10%)
<b>Fallah et al.</b>	2011	Iran	75	49 (65%)	7 (9%)
<b>Elkak et al.</b>	2012	Líbano	111	75 (67%)	13 (12%)
<b>Tavakoliet et al.</b>	2012	iran	50	30 (60%)	3 (6%)

<b>Anfossiet et al.</b>	2013	Itália	102	84 (83%)	1 (1%)
<b>Santini et al.</b>	2013	Itália	24	10 (42%)	0
<b>Iqbal &amp; Asi</b>	2013	Paquistão	119	93 (78%)	18 (15%)
<b>Temomogullari et al.</b>	2014	Turquia	50	10 (20%)	0
<b>Chavarria et al.</b>	2015	Costa Rica	70	36 (52%)	10 (14%)

\*= LMT: limite máximo tolerado pela União Europeia para AFM1 em queijos= 0,25 µg/kg (EC, 2003).

**Tabela 4:** Estudos envolvendo pesquisas de AFM1 em queijos no Brasil.

<b>Referência</b>	<b>Ano</b>	<b>Amostras</b>	<b>Amostra positiva</b>	<b>Maior que LMT* – µg/kg</b>
<b>Sylos et al.</b>	1996	36	0	0
<b>Prado et al.</b>	2000	75	56 (75%)	20 (27%)
<b>Prado et al.</b>	2001	23	22 (96%)	6 (26%)
<b>Prado et al.</b>	2007	88	40 (46%)	2 (2%)
<b>Iha et al.</b>	2010	58	49 (89%)	4 (7%)
<b>Oliveira et al.</b>	2011	24	6 (25%)	2(8%)

\*=LMT: limite máximo tolerado pela União Europeia para AFM1 em queijos= 0,25 µg/kg (EC, 2003).

Como observado nas tabelas, os estudos realizados no mundo, inclusive o Brasil, demonstram uma diversidade de valores encontrados, mas que referendam um alto índice de contaminação das amostras analisadas- 20% até 90%; os índices

de amostras contaminadas acima do limite máximo aceitável pela União Européia também são variáveis, abrangendo níveis de contaminação de 0,5 % até 27%.

#### **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

##### **4.1. Amostras de queijos**

Foram analisadas amostras de 15 diferentes queijos coloniais adquiridos em estabelecimentos comerciais às margens de rodovias da região do vale do Taquari (Figura 5). O período de coleta das amostras foi entre os meses de setembro de 2016 e janeiro de 2017. Somente foram consideradas amostras de queijos coloniais produzidos pela agricultura familiar local. A quantidade de cada amostra coletada variou entre 200 e 250 gramas, sendo as mesmas colocadas em recipiente térmico com temperatura variando entre 5 e 8°C durante o transporte até o local das análises. Este período de armazenamento não ultrapassou 3 horas. Ao chegar no local das análises- Laboratório de Imunologia da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul - as amostras foram trituradas com o auxílio de um multiprocessador e homogeneizadas em liquidificador. Após foram



embaladas em recipiente plástico estéril e foram colocadas em freezer a  $-20^{\circ}\text{C}$  até o momento das análises.

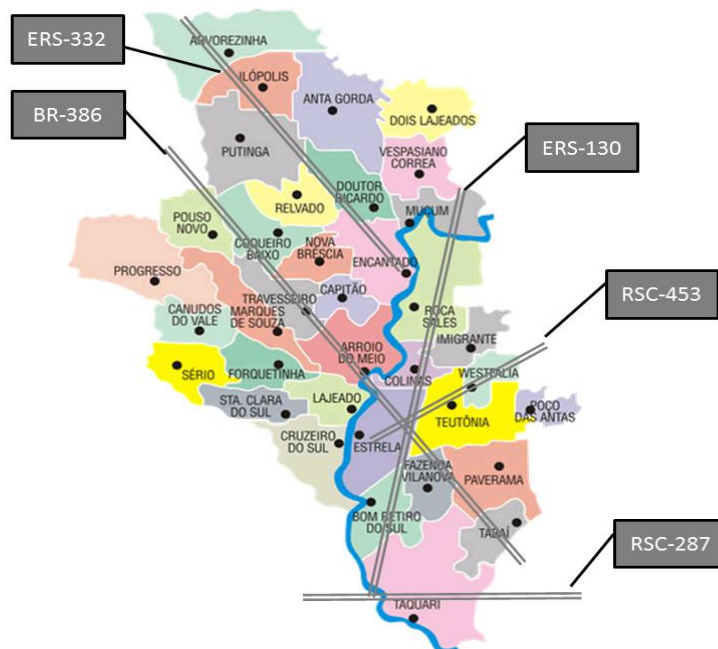


Figura 5. Imagem destacando o Vale do Taquari e as principais rodovias da região. Fonte: Google Mapas - Vale do Taquari/Rodovias.

De acordo com informações obtidas nos locais onde os queijos foram adquiridos, todos eles foram fabricados com leite pasteurizado e com tempo de fabricação inferior a 30 dias. Todas as amostras encontravam-se sob refrigeração a  $4^{\circ}\text{C}$  em refrigeradores comerciais ou domésticos. Os locais onde as amostras foram obtidas encontram-se no anexo 1.

#### 4.2. Critérios de inclusão e exclusão da amostragem

Foram aceitas como amostras todas aquelas que seguiram os seguintes critérios:

- Provenientes da agricultura familiar do vale do Taquari

- Comercializadas em estabelecimentos situados às margens de rodovias do Vale do Taquari.
- Período de fabricação entre primavera e verão
- Prazo de fabricação inferior a 30 dias
- Mantidas sob refrigeração no momento da aquisição
- Não ser produto industrializado

#### **4.3. Método de detecção e quantificação da aflatoxina M1**

A análise quantitativa de Aflatoxina M1 nos materiais foi realizada através do método de ELISA. ( Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), utilizando-se um imunoenensaio competitivo- AGRAQUANT AFLATOXIN M1 SENSITIVE TEST 25/500-COKAQ7-100, Romer Labs Singapore Pte Ltda, conforme protocolo estabelecido por ROMER LABS METHODS (2004). Este kit utiliza um princípio de ELISA competitivo que determina quantitativamente níveis de aflatoxina M1 e é validado para amostras de leite, leite em pó e queijos.

O ensaio é um ELISA direto competitivo, onde anticorpos anti-aflatoxina M1 estão distribuídos na superfície de poços de uma microplaca. Padrões de aflatoxina M1 e amostras são pipetados na placa e misturados com aflatoxina M1 conjugada com uma enzima. Aflatoxina M1 presente nos padrões e amostras competem com o conjugado enzimático (Aflatoxina M1-Peroxidase) pela ligação aos anticorpos anti-aflatoxina M1 distribuídos nos poços da placa. Após etapa de incubação e lavagem, um substrato enzimático é adicionado e ocorre o desenvolvimento de coloração azul. A intensidade de coloração é inversamente proporcional à concentração de aflatoxina M1 presente nos padrões e nas amostras. Após incubação, um reagente

de parada é adicionado, havendo troca de coloração de azul para amarelo. As microplacas são medidas opticamente usando-se um leitor de microplacas com um filtro de absorvância de 450 nm. A densidade ótica das amostras é comparada com a densidade ótica dos padrões e a interpretação dos resultados é realizada. Todas as etapas, desde a preparação das amostras até a determinação da concentração de AFM1 nas amostras seguiram rigorosamente as instruções recomendadas pelo fabricante do kit.

#### **4.4. Material utilizado:**

##### **4.4.1. Componentes do kit Agraquant Aflatoxin M1 Sensitive 25/500 COAK7-100.**

- Microplaca de 96 poços sensibilizada com anticorpos monoclonais anti-AFM1.
- Microplaca não sensibilizada para utilização das diluições de padrões e amostras.
- Seis frascos contendo cada um padrões de AFM1 ( 0, 25, 50, 50, 100, 200 e 500 pg/ml cada) prontos para uso.
- Um frasco de 25 ml contendo conjugado AFM1- Enzima Peroxidase.
- Um frasco de solução cromógena de TMB pronto para uso.
- Um frasco de reagente de parada, composto por ácido sulfúrico 0,5 N.
- Um frasco contendo 25 ml de solução de lavagem concentrada. Necessária diluição 1 parte do tampão para 19 partes de água destilada.
- Estabilidade por 30 dias sob refrigeração.
- Um frasco contendo 200 de diluente de amostras.

#### 4.4.2. Material utilizado não fornecido pelo fabricante do kit:

- Balança semi-analítica (Sartorius, Brasil)
- Frascos graduados de vidro de 100 ml (Pyrex, Brasil)
- Balões de vidro com capacidade para 50 ml ( Pyrex, Brasil)
- Balão de vidro com capacidade para 1 litro (Pyrex, Brasil)
- Tubos de vidro 13x100 mm
- Agitador rotatório
- Vortex- Agitador de tubos Mod 251, Fanem (Fanem do Brasil Ltda., São Paulo, SP,Brasil)
- Sistema de evaporação com fluxo de nitrogênio
- Lavadora automática de placas Aquaris ( Celer, MG, Brasil)
- Leitora automática de placas Polaris ( Celer, MG, Brasil)
- Bomba de vácuo ( Nevoni,SP, Brasil)
- Diclorometano P.A (Merck)
- Metanol PA (Merck)
- N-Hexano P.A.( Merck)
- Tampão PBS (New Prov, Brasil)
- Água destilada ultrapura (Millipore)
- Pipeta multicanal com 8 canais Finnpiptete 8-channel, Thermo Scientific Inc., UK)
- Pipetas monocanal de 100, 200, 500 e 1000 mcl.Finnpiptete, Thermo Scientific Inc, UK)
- Ponteiras plásticas descartáveis
- Papel de filtro Whatman n° 4 (Inlab, Brasil)
- Funis (Pyrex, Brasil)

- Canaletas para dispensação de conjugado, substrato e reativo de parada.

#### **4.5. Preparação da amostra/ extração:**

Conforme instruções do fabricante do kit utilizado para as análises, foram pesados em uma balança semi-analítica 2 g de amostra de queijo dentro de um frasco e adicionados 40 ml de diclorometano. Foi realizada uma extração por 30 minutos por agitação a 260 rpm em um agitador rotatório na temperatura ambiente do laboratório- 22° C. Em seguida, o material foi filtrado em papel filtro Whatman nº 4, recolhida uma amostra de 5 ml em tubo de ensaio e evaporado a 60°C em um evaporador sob fluxo de nitrogênio até secagem.

O resíduo foi ressuspensão, sob agitação em vórtex, com uma mistura de 0,5 ml de PBS, 0,5 ml de metanol e 1,0 ml de hexano. Em um tubo de vidro, foi pipetado 0,4 ml da fase aquosa/metanólica (inferior) de cada amostra e diluídas com 0,6 ml de solução diluente de amostras (fator de diluição 0,4). Logo a seguir, foi realizada a quantificação da AFM1 pelo método de ELISA, conforme instrução do fabricante.

#### **4.6. Teste de ELISA:**

Todos os componentes do kit reagente foram colocados na temperatura ambiente na bancada do laboratório por 30 minutos, com a finalidade de adequação da temperatura, conforme instruções do fabricante. O tampão de lavagem foi previamente preparado em balão de vidro de 1 litro através da pipetagem de 50 ml do tampão de lavagem concentrado e completado até 1 litro com água destilada, estando então pronto para uso.

Em uma placa de diluição não sensibilizada, fornecida junto com os reagentes, foram pipetadas, com o auxílio de uma micropipeta de 8 canais 200 µl do conjugado pronto para uso. Após, utilizando uma micropipeta monocanal, foram pipetados 100

$\mu\text{l}$  dos padrões e de cada amostra em poço correspondente contendo o conjugado. Com o auxílio da micropipeta com 8 canais, o material pipetado foi homogeneizado três vezes através da aspiração e descarte. As ponteiros foram trocadas e, com a mesma micropipeta, foram pipetadas na placa sensibilizada com anti-AFM1 100  $\mu\text{l}$  da mistura padrões-conjugado e amostras-conjugado. A placa foi selada, colocada em uma câmara úmida de vidro e incubada em temperatura ambiente durante 60 minutos em repouso.

Com o auxílio de uma lavadora de Placas, previamente programada para executar 5 ciclos de lavagem, com intervalo de repouso de 20 segundos entre cada lavagem, a placa foi lavada e colocada invertida em papel filtro durante 1 minuto. Mais uma aspiração foi feita com uma bomba de vácuo para a completa secagem dos poços. Após este procedimento, com o auxílio da pipeta multicanal, foram dispensados 100  $\mu\text{l}$  do substrato cromogênico pronto para uso dentro de cada poço, sendo então a placa incubada na temperatura ambiente ao abrigo da luz durante 20 minutos. Após, com o auxílio da mesma micropipeta multicanal, foram dispensados 100  $\mu\text{l}$  do reagente de parada. A coloração azul desenvolvida foi tornada amarela, pela acidificação do sistema. A microplaca foi colocada em um leitor de placas e as Densidades Óticas dos padrões e das amostras foram lidas, utilizando-se um filtro de 450 nm de comprimento de onda e um filtro referência de 630 nm, conforme programação da leitora. Após anotação de todas as densidades óticas dos padrões e das amostras, foi construído um gráfico DO padrão/DO padrão 0 x 100 (percentual de ligação do padrão ao anticorpo presente na placa versus concentração do padrão). O cálculo do percentual de ligação das amostras foi realizado através do mesmo cálculo (DO amostra/DO padrão 0 x 100), plotado no gráfico a as concentrações de AFM1 de cada amostra foram determinadas. Após, devido a

diluição inicial efetuada após o processo de extração, os resultados foram multiplicados pelo fator (x 8) para determinação da concentração em cada amostra, conforme instrução dada pelo fabricante do kit reagente.

#### **4.7. Controle de qualidade do kit reagente:**

- Lote utilizado: 710402-1502
- Validade: até março de 2018
- Coeficiente de correlação  $r^2 = -0,9995$  ( -0,985 a -1,000)
- Critério de aceitabilidade: DO padrão 0 > 0,500
- Percentual de recuperação:
- Padrão 50 ppt em triplicata: 41,4 a 54,0 ppt.....82% a 108%
- Padrão 500 ppt: em triplicata: 390,0 a 447,0 .....78% a 90 %
- Amplitude da curva de calibração: 25 a 500 ppt(0,025 a 0,5 mcg/kg)
- Limite mínimo de detecção: 16 ppt (0,016 mcg/kg)
- Acurácia (porcentagem de recuperação) foi entre 61 e 69 % através da utilização de dois diferentes lotes de kits, com amostras em triplicata.
- Precisão (coeficiente de variação %) foi de 6,1 % quando utilizada amostra de 200 ppt em triplicata.
- Reação cruzada com outras aflatoxinas:
  - B1: 88 %
  - B2: 27 %
  - G1: 11,5 %
  - G2: 4,7 %





## 5. RESULTADOS

A tabela 5 apresenta os resultados de AFM1 obtidos em 15 amostras de queijos coloniais. Foi observado que todas as amostras apresentam contaminação por AFM1 em uma faixa de 0,06 µg/kg até 0,56 µg/kg. Quatro das amostras (26,7%) apresentam valores de AFM1 superiores a 0,25 µg/kg, valor máximo estabelecido pela Comunidade Europeia, embora todas as amostras estejam abaixo do limite máximo aceito para queijos no Brasil( 2,5 µg/kg). Os valores de recuperação e coeficiente de variação foram superiores a 70% e inferiores a 20% respectivamente, estando de acordo com os valores estabelecidos pela Regulamentação N° 401/2006 de 23 de fevereiro de 2006 da Commission Regulation- EC (EC, 2006).

**Tabela 5:** Ocorrência de AFM1 em queijos coloniais

Amostra	Níveis de AFM1 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	CV (%)
1	0,072	2,8
2	0,06	2,4
3	0,80	3,0
4	0,06	2,4
5	0,072	2,3
6	0,068	2,7
7	0,560	3,8
8	0,100	2,2
9	0,06	2,9
10	0,08	3,1
11	0,464	4,0
12	0,04	1,9
13	0,72	1,8
14	0,076	2,5
15	0,08	2,1

Média de duplicata; Limite de detecção 0,016  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ; Limite de quantificação: 0,025  $\mu\text{g}/\text{kg}$ .

A incidência de AFM1 nos queijos coloniais analisados foi alta, conforme demonstrado na Tabela 5, pois todas as amostras apresentaram contaminação por esta aflatoxina. Níveis que variaram de 0,04µg/kg a 0,09 µg/kg foram encontradas em 10 amostras (66,7%), uma amostra apresentou níveis entre 0,1 e 0,25 ,µg/kg (6,6%) e 4 amostras apresentaram níveis superiores a 0,25 µg/kg (26,7%). Quando analisamos os valores em relação aos limites máximos estabelecidos pela Comunidade Européia (CE, 2006), concluímos que 4 amostras apresentaram-se impróprias para o consumo humano, porém quando relacionadas aos limites máximos estabelecidos pela legislação brasileira, todas as amostras estariam aptas ao consumo humano.

A figura 6 faz um resumo dos achados neste trabalho.

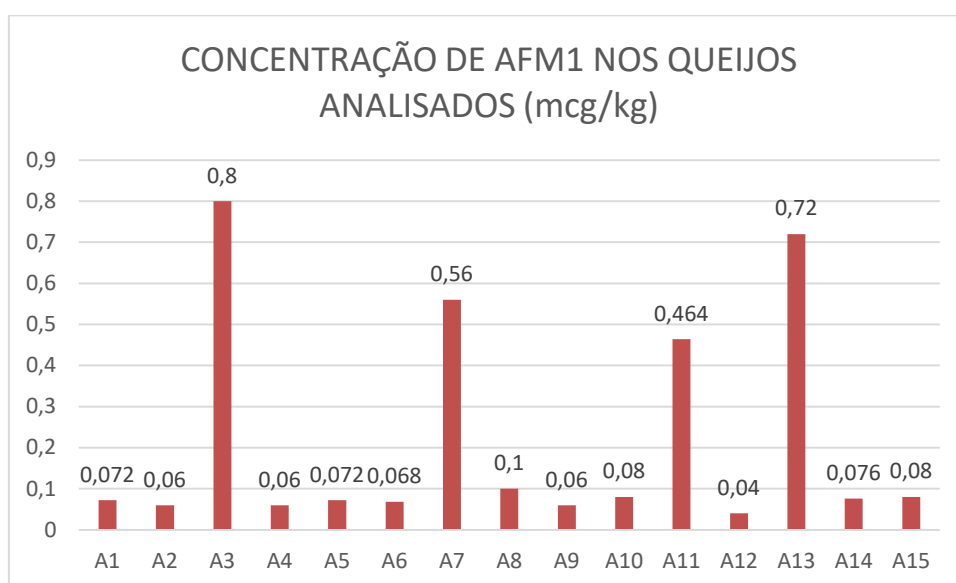


Figura 6: Resultados da avaliação de Aflatoxina M1 em queijos comercializados na região vale do Taquari - RS.

## 6. DISCUSSÃO:

Em nosso trabalho, verificou-se que todas as amostras apresentavam níveis de aflatoxina M1 que variavam de 0,04 a 0,8 µg/kg. Quatro delas (26,7%) apresentaram níveis que excederam o limite máximo tolerável estabelecido pela Comunidade Européia (CE,2006) que é de 0,25 µg/Kg. Quando comparadas ao limite máximo estabelecido pela legislação brasileira (ANVISA,2011), nenhuma delas excedeu aos valores estabelecidos.

De acordo com dados comparativos nos trabalhos realizados no mundo (tabela 3), existe uma diversidade de valores encontrados, onde encontra-se valores de aflatoxina M1 em diversos tipos de queijos oscilando entre achados de 20% até 93% de contaminação. Mais recentemente, em dois trabalhos realizados na Espanha (RUBIO et al., 2011) e no Irã (SHARIFZADEH et al., 2017) foram encontrados valores de aflatoxina M1 em todas as amostras pesquisadas. Quando analisamos as amostras que excederam o limite máximo europeu, encontramos uma variação entre os achados de zero a 24%.

Analisando os dados comparativos entre os achados no Brasil (tabela 4), também encontramos achados semelhantes, que apresentam uma oscilação de níveis de aflatoxina M1 encontrados variando de 25 a 96%, com uma exceção aos trabalhos de Sylos et. al. (1996) que não detectaram a presença de aflatoxina M1 em nenhuma amostra analisada. Os níveis acima do limite máximo europeu apresentaram uma positividade entre 2 e 26%.

Esta discrepância entre os valores encontrados nesses trabalhos provavelmente deve-se à metodologia empregada nas análises. Métodos utilizados, como a Cromatografia em Camada Delgada, Cromatografia Líquida de Alta Eficiência e Imunoensaios tem sido utilizados para a execução destes trabalhos.

Cada método apresenta suas particularidades, principalmente quanto à sensibilidade mínima de detecção. Um trabalho comparativo feito por KOS et al. (2016) apresentou sensibilidades semelhantes entre os métodos. MWANZA et al. (2015) também chegaram a mesma conclusão, porém SHARTZBORD et al. (2017) encontraram uma sensibilidade mínima maior no método de ELISA quando comparado com os demais, referendando um trabalho realizado por SCOTT(1989). Os dados comparativos entre os métodos cromatográficos e o ELISA utilizado são baseados na utilização de testes de ELISA de sensibilidade normal e não os de ultrassensibilidade. A utilização de um imunoenensaio competitivo ultrassensível, que detecta níveis de aflatoxina M1 em partes por trilhão leva a crer que os achados em nosso trabalho se devem a este fato. Também não se pode excluir a possibilidade de encontro de falso resultados positivos, referendados na literatura, como um fator que possa explicar o achado de positividade em todas as amostras analisadas.

Outro fato que justifica os achados discrepantes no Brasil e no mundo pode ser creditado às amostras analisadas. Queijos de diferentes tipos e das mais variadas procedências foram utilizados para a realização dos trabalhos citados. Foram utilizadas amostras obtidas em supermercados e mercados, ao contrário das amostras obtidas para este trabalho, o que indica que estes locais, por serem sujeitos à uma fiscalização mais efetiva, possuem um controle maior dos queijos comercializados ao contrário das amostras deste trabalho, onde a fiscalização é mais vulnerável. A fabricação de diferentes tipos de queijos também pode ser um fator que justifique o encontro de valores tão discrepantes. Em nosso trabalho, queijos oriundos de pequenas propriedades da agroindústria familiar que muitas vezes utiliza o comércio dos mesmos para sua subsistência, além do consumo próprio, torna a fiscalização dos órgãos sanitários mais difícil. Recentes situações de

adulteração do leite e de queijos, exaustivamente comentadas na imprensa nacional, nos levam a crer que a fiscalização realizada nas indústrias de laticínios somente é feita em caráter corretivo e não preventivo.

Os objetivos deste trabalho foram alcançados, visto que não se possui dados na literatura nacional no que diz respeito à análise da presença de aflatoxina M1 em queijos coloniais feitos pelos agricultores de pequenas propriedades rurais, de caráter familiar, onde o processamento dos mesmos vai sendo passado de geração para geração. Os achados sugerem que o encontro de aflatoxina M1 em todas as amostras, mesmo que na sua maioria em níveis muito baixos, que uma fiscalização e orientação na alimentação do gado leiteiro deverá ser efetuada, pois esta cadeia de produção abastece os mercados informais, principalmente em rodovias de grande circulação, resultando em um alto consumo dos mesmos. Pode-se questionar o fato de nenhuma amostra possuir níveis de aflatoxina M1 acima do limite máximo estabelecido pela legislação nacional, fato que liberaria o comércio e o consumo dos queijos coloniais, porém quatro destas amostras possuem níveis que excedem os limites máximos estabelecidos pela União Européia, impedindo até que uma possível exportação dos mesmos possa ser realizada. Ressalta-se que, quanto à possibilidade de exportação para países próximos, como a Argentina ou países com possibilidade de alto consumo como a China, os limites estabelecido por este dois locais (0,5 µg/kg) inviabilizaria a exportação de três (20%) destas amostras.

Como fatores positivos deste trabalho podemos elencar:

1. Ausência de trabalhos relacionados à AFM1 em queijos coloniais
2. Necessidade de uma fiscalização mais efetiva
3. Orientação aos pequenos agricultores

4. Comprometimento do agronegócio frente à exportação
5. Espaço para ampliação da pesquisa AFM1/HBV/HCV /HCC

As limitações impostas a este trabalho foram em relação ao pequeno número de amostras obtidas, além das mesmas serem originárias apenas de uma região que, mesmo sendo o segundo polo leiteiro do estado do Rio Grande do Sul, representa uma pequena amostragem. As informações quando à procedência dos queijos, informação dada pelos comerciantes dos locais onde os mesmos foram adquiridos, foram muito vagas, apenas citando o local onde os mesmos foram produzidos, o que limitaria um rastreamento da cadeia produtiva para uma análise completa. Outro fator limitante foi em relação às amostras que apresentaram níveis muito baixos de aflatoxina M1, que não puderam ser confirmadas por um outro método menos sensível, porém com uma especificidade maior, como a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).

O período de coleta das amostras restringiu-se ao período primavera-verão, não sendo analisadas as variações de concentração das amostras no que diz respeito à sazonalidade.

Cabe a outros trabalhos verificar até que níveis de AFM1 são seguros para a dieta alimentar dos humanos, pois os valores máximos aceitáveis por órgão de fiscalização mundial são variáveis, indicando não haver realmente um valor que garanta o consumo seguro destes alimentos

## 7. CONCLUSÃO

Os resultados da avaliação de aflatoxina M1 nos queijos analisados, provenientes de estabelecimentos comerciais situados às margens de algumas rodovias de grande trafegabilidade que atravessam o vale do Taquari indicam que estes queijos, mesmo que não apresentem níveis de AFM1 acima do limite máximo tolerado pela legislação brasileira, representam um sério risco à saúde de seus consumidores.

Os dados apresentados demonstram a necessidade de um maior controle relacionado à aplicação nas boas práticas na cadeia de produção deste produto, desde a alimentação do gado leiteiro que fornece a matéria prima para a fabricação dos queijos até uma fiscalização mais eficaz nos locais que comercializam este material.

Outro fato relevante deste trabalho foi a comprovação da utilização de um imunoenensaio que permita a detecção de níveis mínimos de AFM1 em materiais onde o processo de extração pode gerar uma perda significativa da sensibilidade da técnica, além de ser um método simples, relativamente barato e aplicável em qualquer laboratório.

”



## 8. REFERÊNCIAS:

- [1] ABIQ. Brazilian Association of the Cheese Industry. Avanços e perspectivas da indústria brasileira de queijos. 2011. Available from: <[http://www.abiq.com.br/abiq\\_entidade.asp](http://www.abiq.com.br/abiq_entidade.asp)>acesso em outubro 2017
- [2] AMER, A.A; IBRAHIM; M.A.E.; 2010; Determination of aflatoxin M<sub>1</sub> in raw milk and traditional cheeses retailed in Egyptian markets. **J Toxicol Environ Health Sci.**;v.2; n. 4: p. 50-53.
- [3] AMIOT, J., 1991; **Ciencia y tecnología de la leche**. Zaragoza: Acribia, Espanha
- [4] ALONSO, V.A. et al., 2013; **Fungi and mycotoxins in silage: an overview**. J. Appl. Microbiol., v.115, n.3, p.637-643.
- [5] ANFOSSI, L.; BAGGIANI, C.; GIOVANNOLI, C., D'ARCO, G.; PASSINI, C.;2012; Occurrence of aflatoxin M<sub>1</sub> in Italian cheese: Results of a survey conducted in 2010 and correlation with manufacturing, production season, milking animals, and maturation of cheese. **Food Control**. ; v.25; n.1; p. 125-130.
- [6] ASSEM, E.; MOHAMAD; A., OULA, E. A.; 2011; A survey on the occurrence of aflatoxin M<sub>1</sub> in raw and processed milk samples marketed in Lebanon. **Food Control**, v. 22; n. 12; p. 1856-1858.
- [7] ATANDA, O; OGUNTUBO, A., ADEJUMO. O., IKEORAH. J., AKPAN. I.; 2007; **Chemosphere**.; Jul;68(8):1455-8.

- [8] AYCICEK, H.; ABDURRAHMAN, A.; SAYGI, S. 2005. Determination of aflatoxin levels in some dairy and food products which consumed in Ankara, Turkey. **Food Control**, Oxford, v. 16, p. 263-266.
- [9] BAKIRCI, I.; 2001; A study on the occurrence of aflatoxin M1 in milk and milk products produced in Van province of Turkey. **Food Control.**, v. 12, p. 41-51.
- [10] BANDO, E. et al. 2007. Biomarcadores para avaliação da exposição humana às micotoxinas. **J. Bras. Patol. Méd. Lab.**, v. 43, n. 3, p.175-180.
- [11] BARRIOS, M. J.; GUALDA, M. J.; CABANAS, J. M.; MEDINA, L. M.; JORDANO, R.; 1996; Occurrence of aflatoxin M1 in cheeses from south of Spain. **Journal of FoodProtection**, Des Moines, v. 59, n. 8, p. 898-900.
- [12] BASKAYA, R.; AYDIN, A.; YILDIZ, A.; BOSTAN, K. 2006. Aflatoxin M1 ; **Medycyna Veterynaryjna**, [S.l.], v. 62, n. 7, p. 778-780.
- [13] BATTACONE, G.; NUDDA, A.; PALOMBA, A.; MAZZETTE ,A.; PULINA, G. 2009. The transfer of aflatoxin M1 in milk of ewes fed diet naturally contaminated by aflatoxins and effect of inclusion of dried yeast culture in the diet. **J Dairy Sci.** v. 92, p. 4997–5004.
- [14] BENNETT, J.W.; KLICH, M. 2003. Mycotoxins. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 16, n. 3, p. 497-516, July.
- [15] BEZERRA, J. R. M. V., 2008. Tecnologia de Fabricação de Derivados de Leite. Guarapuava. **UNICENTRO**. 55 pag.
- [16] BINDER, E.M. et al. 2007. Worldwide occurrence of mycotoxins in commodities, feeds and feed ingredients. **Anim. Feed Sci. Technol.**, v.137, p.265-282.
- [17] BILANDZIC, N; VARENINA, I; SOLOMUN B. 2010. Aflatoxin M1in raw milk in Croatia. **Food Control**; v.21; p. 1279–1281.

- [18] BRASIL. 1996. Ministério da Agricultura e Abastecimento. Portaria nº 146 de 7 de março de 1996. **Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijos**. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 9 de março de 1996.
- [19] BRASIL; 2002. Ministério da Saúde, Resolução RDC nº 274, de 2002. Agência Nacional de Vigilância Sanitária ANVS. **Regulamento técnico Mercosul sobre limites máximos de aflatoxinas admissíveis no leite, no amendoim, no milho**. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 22 de abril de 2002.
- [20] BRASIL; 2006. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Secretaria de Defesa Agropecuária**. Portaria nº 50, de 20 de fevereiro de 2006. Programas de Controle de Resíduos em Carne (Bovina, Aves, Suína e Equina), Leite, Mel, Ovos e Pescado, Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 22 de fevereiro de 2006.
- [21] BRASIL; 2011. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**, RDC nº 7, de 18 de fevereiro de 2011. **Dispõe sobre limites máximos tolerados para micotoxinas em alimentos**. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 19 de fevereiro de 2011.
- [22] CARVAJAL, M.; BOLANÖS, A.; ROJO, F.; MÉNDEZ, I. 2003. Aflatoxin M1 in pasteurized and ultrapasteurized milk with different fat content in Mexico. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.66, n. 10, p. 1885-1892.
- [23] CELSO ET AL. 2004. Presença de *Listeria sp.* Em Queijos Artesanais Tipo Colonial no Rio Grande do Sul. **Veterinária em Foco**, v. 2, n. 2, p 5-14.
- [24] CHAVARRIA, G.; GRANADOS-CHINCHILLA, F.; ALFARO-CASCANTE, M.; MOLINA, A.; 2015; Detection of aflatoxin M1 in milk and sour cream samples from Costa Rica using enzyme-assisted extraction and HPLC; **Food AdditContam.**, Part B, Surveill; n. 8; v. 2; p 128-135.

- [25]CHRISTOFORIDOU,S.;MALISSIOVA, E.;GORTZI, O.;HADJICHRISTODOULOU, C. S.; 2015; Comparative evaluation of ELISA kits' reliability for the aflatoxin M1 determination in goat milk. European **FoodResearch and Technology**; v. 240, n. 4, P.701-706.
- [26] CHU, F. S. Development and use of immunoassays. In: Bhatnagar, D., Lillehoj, E. B., Arora, D. K. 1992. **Handbook of applied mycology**, New York: Marcel and Dekker, p. 93-97, v. 5
- [27] CREPPY, E.E. 2002. Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe. **Toxicol. Lett.**, v. 127, p.19-28.
- [28] CRUZ, L.C.H. Micotoxinas na criação de ruminantes. 2012. Disponível em: <http://pt.engormix.com/MA-pecuaria-corte/administracao/artigos/micotoxinas-criacao-ruminantest1036/124-p0.htm>. Acesso em: 23 jan. 2017.
- [29]DASHTI B, AL-HAMLI S, ALOMIRAH H, AL-ZENKI S, ABBAS AB, SAWAYA W.; 2009. Levels of aflatoxin M1 in milk, cheese consumed in Kuwait and occurrence of total aflatoxin in local and imported animal feed. **Food Control**; v.20; p.686–690.
- [30] DRAGACCI, S.; FREMY, J. M. 1996..Application of immunoaffinity column cleanup to aflatoxin M1 determination and survey in cheese. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 59, n. 9, p. 1011-1013.
- [31] ELGERBI, A. M.; AIDOO, K. E.; CANDLISH, A. A. G.; TESTER, R. F. 2004. Occurrence of aflatoxin M1 in randomly selected North African milk and cheese samples.**FoodAdditives and Contaminants**,London, v. 21, n. 6, p. 592-597.
- [32] ELKAK A.; ATAT, O.E.; HABIB, J.; ABBAS, M.; 2012; Occurrence of aflatoxin M<sub>1</sub> in cheese processed and marketed in Lebanon. **Food Control**.; v. 25; n. 1; p. 140-143.

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

[34]EUROPEAN COMMISSION REGULATION (2001) No 466/2001/EC of 8 March 2001, setting maximum levels for certain contaminants in food stuffs. Official Journal of the European Commission L077: 1–13.

[35] EUROPEAN COMMISSION (EC) REGULATION. Commission regulation. 2006; N° 1881/2006 of 19 December 2006. Setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. *OJ. 2006:2-25*

[36] FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA).2011; **Guidance for Industry: Action Levels forPoisonous or Deleterious Substances in HumanFood and Animal Feed**, Silver Spring: FDA U.S. Food and Drug Administration, 2011. Disponível

em:<<http://www.fda.gov/Food/GuidanceRegulation/GuidanceDocumentsRegulatoryInformation/ / ChemicalContaminantsMetalsNaturalToxinsPesticides/ucm077969.htm>>

Acesso em: outubro de 2017.

[37] FALETTO MB, KOSER PL, BATTULA N, TOWNSEND GK, MACCUBBIN AE, GELBION HV. 1988. Cytochrome P-450 cDNA encodes aflatoxin B1hydroxylase. **J Biol Chem** 263:12187–9.

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

- [38] FALLAH, A. A.; 2010; Aflatoxin M1 contamination in dairy products marketed in Iran during winter and summer. **Food Control**, v.21, n.1, p.1478-1481.
- [39] FALLAH, A. A.; 2011; Seasonal variation of aflatoxin M1 contamination in industrial and traditional Iranian dairy products. **Food Control**, v.22, n.10, p.1653-1656.
- [40] FILHO, R. N. 2012. O Maravilhoso Mundo dos Queijos Especiais. **Superhiper**, p. 60-64.
- [41] FINK-GREMMELS, J., 2008; Mycotoxins in cattle feeds and carry-over to dairy milk: A review. **Food Addit. Contam.**, v. 25, n. 2, p. 172- 180.
- [42] GALLO A, GIUBERTI G, FRISVAD JC, BERTUZZI T, NIELSEN KF. 2015; **Toxins** (Basel). 7(8):3057-111.
- [43] GALVANO, F.; GALOFARO, V.; RITIENI, A.; BOGNANNO, M.; ANGELIS, A. DE; GALVANO, G. 2001. Survey of the occurrence of aflatoxin M1 in dairy products marketed in Italy: second year of observation. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 18, n. 7, p. 644-646.
- [44] GARRIDO, N.S.; IHA, M.H.; SANTOS, O.M.R.; DUARTE, R.M.F. 2003. Occurrence of aflatoxins M1 and M2 in milk commercialized in Ribeirão Preto-SP, Brasil. **Food Additives and Contaminants**, v.20, n.1, p.70-73.
- [45] GHASIAN SA, MAGHSOOD AH, NEYESTANI TR, MIRHENDI SH.; 2007. Occurrence of aflatoxin M1 in raw milk during the summer and winter seasons in Hamadan. Iran ; **J Food Safety**; v. 27; p. 188–198.
- [46] GOURAMA, H.; BULLERMAN, L.B. 1995. *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*: aflatoxigenic fungi of Concern in Food and Feeds. **Journal of Food Protection**, v. 58, n. 12, p. 1995-2004.

- [47] GUO, Y.; YUAN, Y.; YUE, T. 2013. Aflatoxin M1 in milk products in China and dietary risk assessment. **J. Food Prot.** May; 76(5): 849-853.
- [48] GÜRBAY, A.; AYDIN, S.; GIRGIN, G.; ENGIN, A. B.; SAHIN, G. 2006. Assessment of aflatoxin M1 levels in milk in Ankara, Turkey. **Food Control**, Oxford, v. 17, p. 1-4.
- [49] HAN, R.W.; ZHENG, N.; WANG, J.Q.; ZHEN, Y.P.; XU ,X.M.; LI, S.L.. 2013. Survey of aflatoxin in dairy cow feed and raw milk in China. **Food Control.** v.34, p.35–39.
- [50] HECK, M.C. et al., 2007; Estimation of children exposure to organochlorine compounds through milk in Rio Grande do Sul, Brazil. **FoodChemistry**, v. 102, p.288-294.
- [51] HU, W. J.; WOYCHIK, N.; CHU, F. S. 1984. ELISA of picogram quantities of aflatoxin M<sub>1</sub> in urine and milk. **J. Food Protect.**, v. 47, p. 126-127.
- [52] HUSSEIN, S.H. & BRASEL, J.M. 2001. Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. **Toxicology**, v.167, p.101-134.
- [53] IBGE., 2016. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Censo Agropecuário 2006. Disponível em: [www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/2016](http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/2016). Acesso em: 12 fev. 2017.
- [54] IBGE., 2017. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Estatística da Produção pecuária, junho de 2013. Disponível em: [www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/producaoagropecuaria/abate-leite-couro-ovos\\_201301\\_publ\\_completa.pdf](http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/producaoagropecuaria/abate-leite-couro-ovos_201301_publ_completa.pdf)>. Acesso em: 12 out. 2017

- [55] IARC. 2012; International Agency for Research on Cancer. **IARC Monogr. Eval. Carcinog. Risks Hum.**, v. 100F,
- [56] IARC.1996; International Agency for Research on Cancer. Some naturally occurring substances: Food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. **IARC Monogr. Eval. Carcinog. Risks Hum.**, v.56, p.19-23.
- [57] IDE, L. P. A.; BENEDET, H. D. 2001. Contribuição ao Conhecimento do Queijo Colonial Produzido na Região Serrana do Estado de Santa Catarina, Brasil. **Ciência e Agrotecnologia**. Lavras, v. 25, n. 5, p. 1351-1358.
- [58] IHA, M. H. et al.; 2011; Occurrence of AFM1 in dairy products in Brazil. **Food Control**, v.22, n.12, p.1971-1974.
- [59] IQBAL, S. Z.; ASI, M. R.; 2013; Assessment of aflatoxin M1 in milk and milk products from Punjab, Pakistan. **Food Control**, v.30, n.1, p.235-239.
- [60] JACKMAN, R. 1985. Determination of aflatoxins by enzyme-linked immunosorbent assay with special reference to aflatoxin M<sub>1</sub> in raw milk. **J. Sci. Food Agric.**, v. 36, p. 685-698.
- [61] JAEGER, A.V.; TEDESCO, M.P.; SOUTO, P.C.M.C.; OLIVEIRA, C.A.F.; 2013; Assessment of aflatoxin M1 intake in São Paulo, Brazil; **Food Control**; v. 22; p. 87-92.
- [62] JAY, J. M. 2005. Microbiologia de alimentos. Porto Alegre: Artmed,
- [63] JOBIM CC, GONCALVES GD, SANTOS GT., 2001. Qualidade sanitária de grãos e de forragens conservadas “versus” desempenho animal e qualidade de seus produtos. In: Simposio Sobre Producao e Utilizacao de Forragens Conservadas, **Anais do Simpósio Sobre Produção e Utilização de Forragens Conservadas**. p 242–61. Maringá, Paraná, Brasil: UEM/CCA/DZO.



- [64] JOINT EXPERT COMMITTEE ON FOOD ADDITIVES(JECFA); 2001; **Safety evaluation of certain food additives and contaminants**. Geneva: World Health Organization. 2001.
- [65] JOINT EXPERT COMMITTEE ON FOOD ADDITIVES(JECFA); 2002; **Safety evaluation of certain food additives and contaminants**. Geneva: World Health Organization. 2002.
- [66] JOUANY JP. 2001. The impact of mycotoxins on performance and health of dairy cattle. In: **Alltech's 17th Annual Symposium**. Proceeding 191–222
- [67] KABAK, B.; DOBSON. A.D.W.; VAR, I. 2006. Strategies to Prevent Mycotoxin Contamination of Food and Animal Feed. A Review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 16, p. 78-88.
- [68] KALAC, P. 2011. The effects of silage feeding on some sensory and health attributes of cow's milk: a review. *Food Chem* 125:307–317.
- [69] KAMBAR, A. 2006. A study on the occurrence of aflatoxin M1 in Iranian Feta Cheese. **Food Control**, Oxford, v. 17, p. 768-776.
- [70] KAMBAR, U. 2005. Aflatoxin M1 contamination of some commercial Turkish cheeses from markets in Kars, Turkey. **Fresenius Environmental Bulletin**, [S.l.], v. 14, n. 11, p. 1046-1049.
- [71] KAVI, K. et al.; 2011; Detection of aflatoxin M1 levels by ELISA in white-brined Urfa cheese consumed in Turkey. **Food Control**, v.22, n.1, p.1883-1886.
- [72] KAWASHIMA, L. M.; 2004; **Micotoxinas em alimentos e bebidas nacionais produzidos e comercializados em diferentes regiões do Brasil**. 110 f. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas, São Paulo, Brasil.

- [73] KHLANGWISET, P.; SHEPHARD, G.S.; WU, F. 2011. Aflatoxins and growth impairment: a review. **Crit. Rev. Toxicol.**, v. 41, n.9, p.740-755.
- [74] KIESSLING K.H.; PETTERSSON, H.; SHOLM, K.; OLSEN, M. 1984. Metabolism of aflatoxin, ochartoxin, zeralenone, and three trichothecenes by intact rumen fluid, rumen protozoa, and rumen bacteria. **Appl Environ Microbiol** v.47, p.1070–1073.
- [75] KIM, E. K.; SHON, D. H.; RYU, D.; PARK, J. W.; HWANG, H. J.; KIM, Y. B. 2000. Occurrence of aflatoxin M1 in Korean dairy products determined by ELISA and HPLC. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 17, n. 1, p. 59-64.
- [76] KOS, J.; JANIĆ HAJNAL, E.; JAJIĆ, I.; KRSTOVIĆ, S.; MASTILOVIĆ, J.; ŠARIĆ, B.; JOVANOVIĆ, P. 2016. Comparison of ELISA, HPLC-FLD and HPLC-MS/MS Methods for Determination of Aflatoxin M1 in Natural Contaminated Milk Samples. **Acta Chim Slov.**; n.63, v.4, p. 747-756.
- [77] LEITEBRASIL; 2013; Após atingir o patamar, preço do leite ainda está alto. . Disponível em: [www.revista.leitebrasil.com.br](http://www.revista.leitebrasil.com.br) . Acesso em: 13 fev. 2016.
- [78] LEUNG, M. C. K.; DIAZ-LLANO, G.; SMITH, T.K. 2006. Mycotoxins in pet food: a review on worldwide prevalence and preventative strategies. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 54, n. 26, p. 9623-9635.
- [79] LÓPEZ, C.; RAMOS, L.; RAMADÁN, S.; BULACIO, L.; PEREZ, J. 2001. Distribution of aflatoxin M1 in cheese obtained from milk artificially contaminated. **International Journal of Food Microbiology** , v.64, p.211-215.
- [80] LUCAS ET AL. 2012. Padrão de Identidade e Qualidade de Queijos Colonial e Prato Comercializados na Cidade de Medianeira-Paraná. **Revista do Instituto Laticínio Cândido Tostes**, v. 67, n 386, p. 38-64.
- [81] MALLMANN, C. A., SANTURIO, J. M., SCHNEIDER, L. G., ALMEIDA, C. A. A., FONTANA, F. Z., POZZOBON, M. C. 1997. Prevalência e sazonalidade da aflatoxina

M<sub>1</sub> no leite produzido e comercializado no município de Santa Maria, RS - Brasil. In: CONGRESSO LATINOAMERICANO DE MICOTOXICOLOGIA, 2, 1997, Maracay. **Programa y resúmenes**. Maracay: Universidad Central de Venezuela/Sociedade Latinoamericana de Micotoxicologia, 1997. p. 91.

[82] MARTINS, M.L. & MARTINS, H.M., 2000. Aflatoxin M1 in raw and ultra high temperature treated milk commercialized in Portugal. **Food Additives and Contaminants**, v.17, n.10, p.871-874.

[83] MARTINS, M. L.; MARTINS, H. M., 2004. Aflatoxin M1 in yoghurts in Portugal. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 91, p. 315-317.

[84] MENEZES, S.S.M.M.; CRUZ, F.T.; MENASCHE, R.; 2010. **Queijo deocoalho e Queijo Artesanal serrano: Identidade de Produtores e Consumidores Associados ao Atributo de Qualidade**. VII Congresso latino-americano de Sociologia Rural. Porto de Galinhas, Brasil.

[85] MERCOSUR. Resoluciones Mercosur /Aflatoxinas. Mercosur - GMC - Res. N°056/94 Incorporada por Resolución MSyAS N° 110 del 4.04.95, Available from [http:// www.maagbagovar/alimentacion/ ml\\_mercosuraflatoxinas\\_56-94\\_php](http://www.maagbagovar/alimentacion/ml_mercosuraflatoxinas_56-94_php). Acesso em outubro de 2017

[86] MIDIO, A. F.; MARTINS, D. I. 2000. Agentes Toxicológicos Contaminantes Diretos de Alimentos. In: Toxicologia de Alimentos. Varela, Cap. 3, p. 61-102

[87] MWANZA, M.; ABDEL-HADI, A.; ALI, A.M.; EGBUTA, M. 2015; Evaluation of analytical assay efficiency to detect Aflatoxyn M1 in milk from selected areas in Egypt and South Africa. **J. Dairy Sci.** 2015, v.98, p. 6660-6668.

- [88] NAKAJIMA, M.; TABATA, S.; AKIYAMA, H.; ITOH, Y.; TANAKA, T. ; SUNAGAWA, H. ; TYONAN, T. ; YOSHIZAWA, T.; KUMAGAI, S. 2004. Occurrence of aflatoxin M1 in domestic milk in Japan during the winter season. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 21, n. 5, p. 472-478.
- [89] NEAL, G. E. 1998. Participation of Animal Biotransformation in Mycotoxin Toxicity. **Revue de Médecine Veterinaire**. v. 149, n. 6, p. 555-560.
- [90] NOVINSKI, C.O.; 2013; **Composição de micotoxinas e bromatologia de silagens de milho em silos de grande porte utilizando imagens em infravermelho**. 2013. 85f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, Brasil.
- [91] OBREMSKI K, ZIELONKA L, GAJECKA M, JAKIMIUK E, GAJECKI M. 2009. Mycotoxins - dairy cattle breeding problem. A case report. **Bull Vet Inst Pulawy**. v. 53, p.221–224.
- [92] OGA, S. 1996. **Fundamentos de toxicologia**. 2.ed. São Paulo: Atheneu, 1996. 474p.
- [93] OLIVEIRA, C. A. F.; GERMANO, P. M. L.; BIRD, C.; PINTO, C. A. 1997. Immunochemical assessment of aflatoxin M1 in milk powder consumed by infants in São Paulo, Brazil. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 14, n. 1, p. 7-10.
- [94] OLIVEIRA, C.A.F.; GERMANO, P.M.L. 1997. Aflatoxinas: Conceito Sobre Mecanismos de Toxicidade e seu Envolvimento na Etiologia do Câncer Hepático Celular. *Revista de Saúde Pública*, v. 31, n. 4, p. 417-424.
- [95] OLIVEIRA, C. A. F. et al., 2011; Survey of aflatoxin M1 in cheese from the North-east region of São Paulo, Brazil. **Food Additives and Contaminants**, v.4, n.1,p.57-60.

- [96] OLIVEIRA, C.P. *et al.*; 2013; Aflatoxin M1 occurrence in ultra high temperature (UHT) treated fluid milk from Minas Gerais/Brazil. **Food Control.**, v.30, n.1, p.90-92
- [97] ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD. 1983. **Micotoxinas**. Washington. (Critérios de Salud Ambiental, 11).
- [98] ORUC, H. H.; CIBIK, R.; YILMAZ, E.; KALKANLI, O. 2006. Distribution and stability of aflatoxin M1 during processing and ripening of traditional white pickled cheese. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 23, n. 2, p. 190-195.
- [99] PATTONO, D.; GROSSO, A.; STOCCO, P.P.; PAZZI, M.; ZEPPA, G. 2013. Survey of the presence of patulin and ochratoxin A in traditional semi-hard cheeses. **Food Control**, v. 33, p. 54–57.
- [100] PENG KY; CHEN CY.; 2009. Prevalence of Aflatoxin M1 in Milk and Its Potential Liver Cancer Risk in Taiwan. **J Food Prot**; v. 72; p. :1025–1029.
- [101] PEREIRA, M. L., TOLEDO, M. C. F. 1995. Micotoxinas: impacto na saúde humana e animal e sua detecção pelo método de ELISA. **Cad. Téc. Esc. Vet. UFMG**, n. 13, p. 5-27.
- [102] PEREIRA, M.M.G.; CARVALHO, E.P.; PRADO, G.; ROSA, C.A.R.; VELOSO, T.; SOUZA L.A.F.; RIBEIRO, J.M.M.; 2005; Aflatoxinas em alimentos destinados a bovinos e em amostras de leite da região de Lavras, Minas Gerais – Brasil; **Cienc. Agrotec.**; v. 29: p. 106–112
- [103] PERRY, K. S. P. 2004. Queijos: Aspectos Químicos, Bioquímicos e Microbiológicos. **Química Nova**, v. 27, n. 2, p. 293-300. Belo Horizonte, Brasil.
- [104] PICININ, L.C.A.; 2013; **Resíduos de produtos de uso veterinário e contaminantes em leite. 2013**. 172f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil.

- [105] PIETRI, A.; BERTUZZI, T.; BERTUZZI, P.; PIVA, G.; 1997; Aflatoxin M1 occurrence in samples of Grana Padano cheese; **Food Addit. Contam.**; n. 14; v. 4; p. 341-344.
- [106] PITT, J. I. et al. 2000. Mycotoxins and toxigenic fungi. 2000. **Medical Mycology**, London, v. 38, n. 1, p. 41-46.
- [107] PRADO, G.; NICÁCIO, M.A.S.; LARA, M.A.; 1994; Incidência de aflatoxina M1 em leite cru e em leite em pó no estado de Minas Gerais, Brasil; **Higiene Alimentar**; v. 8; n. 32; p. 34-36
- [108] PRADO, G.; OLIVEIRA, M.S.; LIMA, A.S.; MOREIRA, A.P.A. 2007. Occurrence of aflatoxin M1 in parmesan cheese consumed in Minas Gerais, Brazil. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 32, n. 6.
- [109] PRADO, G.; OLIVEIRA, M. S.; CARVALHO, E. P.; VELOSO, T.; SOUZA, L. A. F.; CARDOSO, A. C. F. 2001. Aflatoxina M1 em queijo prato e parmesão determinada por coluna de imunoafinidade e cromatografia líquida. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 60, n. 2, p. 147-151.
- [110] PRADO, G.; OLIVEIRA, M. S.; PEREIRA, M. L.; ABRANTES, F. M.; SANTOS, L. G.; VELOSO, T.; 2000. Aflatoxin M1 in samples of “Minas” cheese commercialized in the city of Belo Horizonte –Minas Gerais, Brazil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 20, n. 3, p. 398-400.
- [111] PRANDINI, A.; TANSINI, G.; SIGOLO, S.; FILIPPI, L.; LAPORTA, M.; PIVA, G. 2009. On the occurrence of aflatoxin M1 in milk and dairy products. **Food Chem Toxicol** 47:984–91.
- [112] RAHIMI, E.; 2014; Survey of the occurrence of aflatoxin M1 in dairy products marketed in Iran; **Toxicol Ind Health**. ;30(8):750-4.

- [113] RASTOGI, S.; DWIVEDI, P.D.; KHANNA, S.K.; DAS, M. 2004. Detection of Aflatoxin M1 contamination in milk and infant milk products from Indian markets by Elisa. **Food Control**, v.15, p.287–290.
- [114] ROMERO, A.C. et al. 2010. Occurrence of AFM1 in urine samples of a Brazilian population and association with food consumption. **Food Control.**, v.21, p.554-558
- [115] ROUSSI, V.; GOVARIS, A.; VARAGOULI, A.; BOTSOGLOU, N. A. 2002. Occurrence of aflatoxin M1 in raw and market milk commercialized in Greece. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 19, n. 9, p.863-868.
- [116] RUBIO, R.; LICÓN, C.C.; BERRUGA, M.I.; MOLINA, M.P.; MOLINA, A.; 2011; Short communication: Occurrence of aflatoxin M1 in the Manchego cheese supply chain; **J. Dairy Sci.**; n. 94; v. 6; p. 2775-2778.
- [117] SABINO, M.; PURCHIO, A.; ZORZETTO, M. A. P.; 1989; Variations in the levels of aflatoxin in cows milk consumed in the city of São Paulo, Brazil. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 6, n. 3, p. 321-326.
- [118] SANTINI, A.; RAIOLA, A.; FERRANTELLI, V.; GIANGROSSO, G.; MACALUSO, A.; BOGNANNO, M.; GALVANO, F.; RITIENI, A.; 2013; Aflatoxin M1 in raw, UHT milk and dairy products in Sicily, Italy.; **Food Addit Contam. Part B Surveill**, v. 6; n. 3; p. 181-186.
- [119] SCOTT, P.M. 1989. Methods for determination of aflatoxin M1 in milk and milk products--a review of performance characteristics. **Food Addit Contam.** n. 6, v. 3, p. 283-305.
- [120] SASSAHARA, M.; PONTES NETTO, D.; YANAKA, E.K. 2005. Aflatoxina occurrence in foodstuff supplied to dairy cattle and aflatoxin M1 in raw milk in the North of Parana state. **Food and Chemical Toxicology**, v.43, n.6, p.981-984.

- [121] SHARIFZADEH, A ; GHASEMI-DEHKORDI, P ; FOROUGHI, M ; MARDANPOUR-SHAHREKORDI, E , RAMAZI, S; 2017 ; Levels of contamination of aflatoxin M1 in cheeses sold in the province of Isfahan, Iran. **Osong Public Health Res Perspect.** n. 8, v. 4, p. 260-263.
- [122] SCHWARTZBORD, J.; SEVERE, L.; BROWN, D. 2017. Detection of trace aflatoxin M1 in human urine using a commercial ELISA followed by HPLC. **Biomarkers.** v.22, n.1, p.1-4.
- [123] SCUDAMORE, K.A.; LIVESE, C.T.; 1998; Occurrence and significance of mycotoxins in forage crops and silage: a review. **J. Sci. Food Agric.**, v. 77, p.1-17.
- [124] SCUSSEL, V.M.; 2004; Aflatoxin and food safety: Recent south American perspectives (Review); **Journal of Toxicology - Toxin Reviews**; V. 23, n. 2-3, P. 179-216.
- [125] SHUNDO, L; NAVAS, S.A.; LAMARDO, L.C.A.; RUVIERI, V.; SABINO, M.; 2009; Estimate of aflatoxin M1 exposure in milk and occurrence in Brazil. **Food Control**, v. 20, p.655–657.
- [126] SOUZA, S. V. C.; VARGAS, E. A.; JUNQUEIRA, R. G. 1999. Eficiência de um kit de ELISA na detecção e quantificação de aflatoxina M1 em leite e investigação da ocorrência no estado de Minas Gerais. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 19, n. 3, p.401-405.
- [127] SRIVASTAVA, V. P.; BU-ABBAS, A.; ALAA-BASUNY; AL-JOHAR, W.; AL-MUFTI, S.; SIDDIQUI, M. K. J. 2001. Aflatoxin M1 contamination in commercial samples of milk and dairy products in Kuwait. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 18, n. 11, p.993-997.



- [128] SERVARAJ., J.N.; WANG, Y.; ZHOU, L.; ZHAO, Y.; XING, F.; DAI, X.; LIU, Y. 2015; Part A- Chem. Anal. Control Expo Risk Assess. **Food Addit Cont.** n. 12(4): 440-452.
- [129] SERVIÇO BRASILEIRO DE APOIO À MICRO E PEQUENAS EMPRESAS-SEBRAE. 2016. Queijos Nacionais, setembro 2016. **Informe técnico.**
- [130] SERVIÇO BRASILEIRO DE APOIO À MICRO E PEQUENAS EMPRESAS-SEBRAE. 2008. **Queijos Nacionais**, setembro 2008. Informe técnico
- [131] STEINHART, C.E.; DOYLE, M.E.; COCHRANE, B.A. 1996. **Food safety** . New York: Marcel Dekker, p.376-394
- [132] STOLOFF, L.; WOOD, G.; CARTER, L.; 1980 ;Aflatoxin M1 in manufactured dairy products produced in the United States in 1979; **J Dairy Sci.** ; n. 64(12):2426-2430.
- [133] SYLOS, C. M.; RODRIGUEZ AMAYA, D. B. 1996. Estudo comparativo de métodos para determinação de aflatoxina M<sub>1</sub>. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, v. 56, p. 87-97.
- [134] SYLOS, C.M.; RODRIGUEZ-AMAYA, D.B.; CARVALHO, P.R.N.; 1996; Occurrence of aflatoxin M1 in milk and dairy products commercialized in Campinas, Brazil. **Food Addit Contam**; v.13; n. 2; p. 169-172.
- [135] TAJKARIMI M, ALIABADI-SH F, NEJAD AS, POURSOLTANI H, MOTALLEBI AA, MAHDAVI H.; 2008. Aflatoxin M1 contamination in winter and summer milk in 14 states in Iran. **Food Control**; v. 19; p. 1033–1036
- [136] TAVAKOLI, H. R. et al.; 2012; Occurrence of aflatoxin M1 in white cheese samples from Tehran, Iran. **Food Control**, Oxford, v.23, n.1, p.293-295.

- [137] TEKINSEN, K. K.; TEKINSEN, O. C. 2005. Aflatoxin M1 in white pickle and Van otlu (herb) cheeses consumed in southeastern Turkey. **Food Control**, Oxford, v. 16, p. 565- 568.
- [138] TEMAMOGULLARI, F.; KANICI, A.; 2014; Short communication: Aflatoxin M1 in dairy products sold in Sanliurfa, Turkey; **Journal Dairy Science**; v. 97; n.1; p 162-165.
- [139] TOROVIC, L. 2015. Aflatoxin M1 in processed milk and infant formulation and corresponding exposure of adult population in Serbia in 2013-2014; **Food AdditContam. Part B Surveill** ; 8(4) 235-44.
- [140] TURNER, P.C. et al. 2002. The role of aflatoxins and hepatitis viruses in the etiopathogenesis of hepatocellular carcinoma: a basis for primary prevention in Guinea-Conakry, West Africa. **J. Gastroenterol. Hepatol.** v.17, p.441-448.
- [141] UNIVATES, 2016. **Banco de Dados Regional (BDR): Perfil socioeconômico do Vale do Taquari**. Disponível em:  
[http://www.univates.br/files/files/univates/bdr/Perfil\\_VT\\_Setembro\\_2016.pdf](http://www.univates.br/files/files/univates/bdr/Perfil_VT_Setembro_2016.pdf). Acesso em: 20 de set. de 2017
- [142] VELDMAN, A. 1992. Effect of sorbentia on carry-over of aflatoxin from cow feed to milk. **Milchwissenschaft.** v. 47, p. 777–80.
- [143] XIONG, JL; WANG, YM; MAC, MR, LIU JX.; 2013. Seasonal variation of aflatoxin M1 in raw milk from the Yangtze River Delta region of China. **FoodControl**; v.34: p.703–706.
- [144] YANG, W. et al. 2014. Genome-wide miRNA-profiling of aflatoxin B1-induced hepatic injury using deep sequencing. **Toxicol. Lett.**, v.226, n.2
- [145] YIANNIKOURIS A, JOUANY JP. 2002. Mycotoxins in feeds and their fate in animals: a review. **Anim. Res.** n.52, p. 81–99.

- [146] YAROGLU, T.; ORUC, H. H.; TAYAR, M. 2005. Aflatoxin M<sub>1</sub> levels in cheese samples from some provinces of Turkey. **Food Control**, Oxford, v. 16, p. 883-885.
- [147] YEH, F.S. *et al.*; 1988; Hepatitis B virus, aflatoxins, and hepatocellular carcinoma in Southern Guangxi, China. **Cancer Res.**, v.49,p.2506-9, 1989
- [148] ZAFFARI, C. B. 2007. Qualidade Bacteriológica de Queijos Artesanais Comercializados em Estradas do Litoral Norte do Rio Grande do Sul, **Brasil. Ciência Rural**, v. 37, n. 3, p. 862-867.
- [149] ZHANG, J.; ZHENG, N.; LIU, J.; LI, F.D.; WANG, J.Q. 2015 .Aflatoxin B1 and Aflatoxin M1 induced cytotoxicity and DNA damage in differentiated and undifferentiated CACO-2 Cell. **Food Chem Toxicol.** n. 83, p. 54-60.

## **9. ANEXOS:**

### **1. LOCAIS DE COLETA DAS AMOSTRAS:**

**Amostra 1- Glória, BR 386, Km 360, origem Marques de Souza- Produtor 1**

**Amostra 2- Glória, BR 386, Km 360, origem Marques de Souza- Produtor 2**

**Amostra 3- Progresso, BR 386, Km 332, origem Progresso**

**Amostra 4- Marques de Souza, BR 386, Km 318, origem Espumoso**

**Amostra 5- Marques de Souza, BR 386- Km 318, origem Forqueta**

**Amostra 6- Marques de Souza, BR 386- Km 317, origem Marques de Souza**

**Amostra 7- Teutônia, RS 128, Km 17, origem Harmonia**

**Amostra 8- Imigrante, RS 128, Km 25, origem Imigrante**

**Amostra 9- Fazenda Vilanova, BR 386, Km 295 , origem Garibaldi**

**Amostra 10- Tabaí, BR 386, Km 285- origem Paverama**

**Amostra 11- Tabaí, BR 386, Km 284- origem Morro Azul**

**Amostra 12- Tabai, BR 386, Km 284- origem Barro Vermelho**

**Amostra 13- Tabai, BR 386, Km 285- origem Tabai**

**Amostra 14- Coxilha Velha, BR 386, Km 276- origem Taquari- Produtor 1**

**Amostra 15- Coxilha Velha, BR 386, Km 276- origem Taquari- Produtor 2**