



Josué Olivo Oliveira do Prado

**NÍVEIS DE AFLATOXINA M1 NO LEITE PRODUZIDO E COMERCIALIZADO NO
COREDE ALTO JACUÍ.**

Dissertação do Curso de Mestrado

Cruz Alta – RS, 2015.

UNIVERSIDADE DE CRUZ ALTA
PRO-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO PESQUISA E EXTENSÃO
MESTRADO PROFISSIONAL EM DESENVOLVIMENTO RURAL

Josué Olivo Oliveira do Prado

**NÍVEIS DE AFLATOXINA M1 NO LEITE PRODUZIDO E COMERCIALIZADO NO
COREDE ALTO JACUÍ.**

Dissertação de Mestrado apresentada
ao Curso de Mestrado Profissional em
Desenvolvimento Rural da
Universidade de Cruz Alta, como
requisito parcial para a obtenção do
Título de Mestre em
Desenvolvimento Rural.

Orientador: Prof. Dr. Lucas Carvalho Siqueira

Cruz Alta – RS, Julho 2015.

UNIVERSIDADE DE CRUZ ALTA
PRO-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO PESQUISA E EXTENSÃO
MESTRADO PROFISSIONAL EM DESENVOLVIMENTO RURAL

**NÍVEIS DE AFLATOXINA M1 NO LEITE PRODUZIDO E COMERCIALIZADO NO
COREDE ALTO JACUÍ.**

Elaborado por

Josué Olivo Oliveira do Prado

Como requisito parcial para obtenção do Mestre
em Desenvolvimento Rural.

Comissão Examinadora:

Prof. Dr. Lucas Carvalho Siqueira _____ UNICRUZ
Prof. Dr^a. Patrícia Wolkmer _____ UNICRUZ
Prof. Dr^a. Aline Alves da Silva _____ UNICRUZ

Cruz Alta, 30 Julho de 2015.

"Investir em conhecimentos rende sempre melhores juros."
Benjamin Franklin

AGRADECIMENTOS

A Deus, por tornar tudo realidade e abençoar de forma contaste todos os passos de nossas vidas.

A minha família, que não mediu esforços para transmitir todos os ensinamentos e condições necessárias para uma vida digna, guiada por educação e muita humildade.

Ao meu Pai, que comemora junto a mim um eterno sonho seu, me ensinando que tudo é possível quando se deseja algo bom. Portanto Pai, saiba que esta vitória também é sua!

A minha Mãe, que tanto batalhou para tornar este sonho realidade, manteve sempre suas palavras com bastante sabedoria e me apoiou em tudo para criar uma pessoa responsável!

A minha irmã, que de forma muito realista, me ensinou a ultrapassar muitos desafios.

A minha Esposa, que com muito AMOR, soube ter sabedoria e paciência em muitos momentos onde a distância persistia em se manter, esta vitória é NOSSA!

A meu filho por nos mostrar que a vida é bela como brincadeira de criança!

Ao meu Orientador Lucas Siqueira, pelos ensinamentos e confiança depositada ao longo de todo curso!

Aos Amigos pelo auxílio nas coletas de dados e parceria em todos os momentos!

As Propriedades que disponibilizaram a coleta das amostras para desenvolvimento do trabalho.

Enfim, a todos que colaboraram de uma forma ou de outra nesta caminhada, muito obrigado a Todos!!!

RESUMO

NÍVEIS DE AFLATOXINA M1 NO LEITE PRODUZIDO E COMERCIALIZADO NO COREDE ALTO JACUÍ.

Autor: PRADO, Josué Olivo Oliveira

Orientador: SIQUEIRA, Lucas Carvalho

A atividade leiteira é a principal fonte de renda das propriedades do COREDE Alto Jacuí – Rio Grande do Sul, onde demonstra ser uma alternativa de ganho mensal rentável. Neste Cenário a qualidade do leite produzido deve ser a principal meta visando a segurança alimentar. O objetivo deste estudo foi avaliar níveis de contaminação por Aflatoxina M1 no leite produzido e comercializado na região do Corede Alto Jacuí. Para tanto, 17 propriedades produtoras de leite representativas da Região Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul, foram selecionadas para no período de 15 de fevereiro e 01 de maio de 2015 fornecerem amostras de leite. As amostras de leite cru foram coletadas dos tanques de expansão após a ordenha dos animais, resfriamento a 4°C e homogeneização. Para quantificação das concentrações da Aflatoxina M1, foram analisadas 3 amostras (em dias alternados) de leite por propriedade. Para a coleta das amostras de leite integral UHT e leite em pó, foram adquiridos caixas de leite (1 litro) de 13 marcas comerciais distintas e 4 latas (500g), comercializadas em estabelecimentos regionais. Todas as amostras foram coletadas em tubos estéreis de 70ml, as quais foram imediatamente congeladas para posteriormente serem enviadas ao laboratório. Verificou-se um nível de contaminação por Aflatoxina M1 em 92 % (47/51), 100% (13/13) e 75% (3/4), em amostras de tanque de expansão, UHT e em pó, respectivamente. Destaca-se que todas as amostras de leite avaliadas apresentaram resultados que atendem as exigências da legislação brasileira vigente. No entanto, apenas 55% (38/68) atendem as exigências da União Européia. Apesar dos resultados satisfatórios em relação ao mercado nacional, tais níveis de contaminação certamente serão uma restrição para futuras exportações deste produto. Conclui-se que das amostras de leite produzidos e do leite comercializado na região do Corede Alto Jacuí, 92 e 94%, respectivamente, está contaminado com Aflatoxina M1. No entanto, todas as amostras atendem os padrões estabelecidos pela legislação nacional vigente.

PALAVRAS-CHAVE: Aflatoxina M1. Fungos. Hepatocarcinogênese. Leite.

ABSTRACT

AFLATOXIN M1 CONTAMINATION LEVELS IN MILK PRODUCED AND COMMERCIALIZED IN THE ALTO JACUÍ REGION

Author: PRADO, Josué Olivo Oliveira

Advisor: SIQUEIRA, Lucas Carvalho

Milk production is the main source of income properties COREDE Alto Jacui - Rio Grande do Sul, which demonstrates to be a profitable monthly gain alternative. In this scenario the quality of milk produced should be the main goal for food security. This study aimed to evaluate Aflatoxin M1 contamination levels in milk produced and commercialized in the Alto Jacuí Region. To this end, 17 dairy family farms representing main milk producers from this region, were selected for the period of February 15 and May 1, 2015 provide milk samples. The presence of up 0,5ppb AFM1 in whole milk powder and was not detected in any of the samples, but only three (23.07%) samples of whole milk and three (75%) of milk powder were within limits tolerated by the European Union. In samples of fresh milk from 17 escalonas properties in three alternate collections totaling 51 samples, all analyzes were within the Brazilian limit 0,5ppb, being the first collection only 10 (58.82%) samples in the second 9 (52, 94%) and in the third 11 (64.7%) were within the boundaries of the European Union 0.05ppb. Although satisfactory results if the performance of an active surveillance of this mycotoxin is necessary in order to provide safety, quality and integrity human health has increased information hepatocarcinogenesis cases worldwide in which Aflatoxin M1 is the known substance by causing this problem.

KEY WORDS: Aflatoxin M1. Fungi. Hepatocarcinogenesis. Milk.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Estruturas químicas da Aflatoxina B1 e Aflatoxina M1.....17
- Figura 2 - Concentração de Aflatoxina M1 em amostras de leite integral UHT comercializado na região do Corede Alto Jacuí.....27
- Figura 3 - Concentração de Aflatoxina M1 em amostras de leite em pó comercializado na região do Corede Alto Jacuí.....27

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Síntese de estudos Nacionais envolvendo pesquisa de Aflatoxina M₁ em amostras de queijo comercializado.21

Tabela 2 - Concentração de Aflatoxina M₁ em amostras de leite cru produzido na região do Corede Alto Jacuí. **Erro! Indicador não definido.**

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AFB1 – Aflatoxina B1

AFM1 – Aflatoxina M1

COREDE – Conselho Regional de Desenvolvimento

DON - Desoxinivalenol

et al. - e outros

FEE. – Fundação econômica e estatística

IARC- International agency for Research on cancer

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

µg /kg- Miligrama por kilograma

Mg/l – Miligrama por litro

ppb – partes por bilhão

ppt – partes por trilhão

UHT. – Ultra High Temperature

Zea: Zearalenona

LISTA DE SÍMBOLOS

° C- graus Celsius

% - porcentagem

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| 1. INTRODUÇÃO | 13 |
| 2. OBJETIVOS | 15 |
| 2.1. Objetivo geral..... | 15 |
| 2.2. Objetivos específicos..... | 15 |
| 3. REVISÃO DE LITERATURA | 16 |
| 3.1. Micotoxinas | 16 |
| 3.2. Pesquisas de aflatoxinas M1 | 20 |
| 4. MATERIAIS E MÉTODOS | 23 |
| 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO | 25 |
| 6. CONCLUSÃO..... | 31 |
| REFERÊNCIAS | 33 |

1. INTRODUÇÃO

O Rio Grande do Sul está entre os três estados mais produtores de leite bovino no Brasil (ANUALPEC, 2014). Dentro do estado, a região do COREDE Alto Jacuí (Noroeste), é construída por 14 municípios, apresenta 9.189 estabelecimentos rurais, nos quais a agricultura familiar representa 78,55% dos estabelecimentos, em um percentual de área que corresponde a apenas 30,55% do total (IBGE, 2006). A matriz produtiva da região é voltada às atividades agrárias, onde na pecuária, destaca-se a produção leiteira, produzindo em torno de 5 milhões litros por dia em 4.100 unidades produtoras (IBGE, 2015).

Por mais que alguns setores do poder público apresentem iniciativas em melhorar as condições de produção de leite no Estado, é sabido que este é carente em recursos humanos, e assim muitos produtores ficam desassistidos. Neste sentido, ressalta-se a importante participação de outros setores, onde os COREDES regionais podem auxiliar de uma forma bastante efetiva, por conhecerem as necessidades, conforme as características de cada região. Vindo de encontro a essa política de diagnósticos, em caráter regional, nosso grupo tem trabalhado em projetos que possibilitem um profundo conhecimento da cadeia láctea regional. Em exemplo disso, cabe mencionar, dentre outros, o projeto “Diagnóstico das unidades de produção leiteira dos municípios da região do COREDE Alto Jacuí – RS”, contemplado pelo edital PROCOREDES VII. Neste estudo evidenciou-se que uma das preocupações dos produtores é a necessidade de um monitoramento regular da qualidade do leite por eles produzido, pois estes sabem que melhorando a qualidade conseguirão maior remuneração (LORENZONI, A.; MERA, C.M.P.; ARALDI, D. F., 2012).

A qualidade do leite está diretamente relacionada com o tipo e a qualidade da dieta dos animais, com o valor nutritivo e a qualidade sanitária de volumosos, conservados como feno e silagem, os ingredientes de ração como grãos também são fundamentais para esta qualidade. Os alimentos utilizados na dieta das vacas leiteiras podem ser infectados por fungos que

produzem micotoxinas, as quais aumentam a incidência de doenças e diminuem a eficiência produtiva (COUNCIL FOR AGRICULTURAL SCIENCE AND TECHNOLOGY, 1989). Além disso, a presença de Aflatoxina M1 (AFM1) em leite e produtos lácteos pode ter implicações negativas para a saúde dos consumidores, particularmente para lactantes e crianças, uma parte da população que tem um consumo mais elevado de leite. Por exemplo, parece existir uma ligação entre o retardo de crescimento em crianças e exposição a micotoxinas (KHLANGWISSET *et al.*, 2011). Ainda, as Aflatoxinas foram declaradas como agentes cancerígenos para os humanos (IARC, 2002).

Além de induzir o câncer no fígado, as aflatoxinas podem ocasionar outros efeitos como cirrose hepática, diminuição da resistência imunológica propiciando surtos de hepatites virais tipo B, estando também associada à Síndrome de Reye, febre, convulsões, vômito, coma, etc (MALLMANN *et al.*, 2007).

Nesse sentido, anualmente, a hepatocarcinogênese (CHC) é diagnosticada em mais de meio milhão de pessoas em todo o mundo sendo apontado como a segunda causa de óbito na espécie humana. Os últimos dados estimados revelam 748.300 novos casos anuais de CHC e 695.900 mortos em consequência a esta doença. Somente na Europa, foram diagnosticados 60.200 novos casos no ano de 2008 (INE, 2012).

Recentemente, o Brasil tem buscado o mercado internacional para comercialização de seus produtos de origem animal. No entanto, a garantia de salubridade destes produtos desde a sua origem até seu processamento é fundamental para viabilizar estas negociações, especialmente, com mercados mais exigentes como o Europeu. Em se tratando de Aflatoxina M1, é importante salientar que atualmente não existem métodos viáveis de retirada desta toxina após a contaminação do leite (JECFA, 2002).

A fim de verificar a necessidade de intervenções e modificações no sistema produtivo e/ou industrial, é fundamental conhecer a realidade das principais cadeias produtivas nacionais. Isso exposto, diante da falta de dados regionais, faz-se necessário estudos que avaliem a presença e os níveis de contaminação por Aflatoxina M1 no leite produzido e comercializado na região do COREDE Alto Jacuí.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Diagnósticar os níveis de Aflatoxina M1 no Leite produzido e comercializado na Região COREDE Alto Jacuí, RS.

2.2. Objetivos específicos

- Pesquisar Aflatoxina M1 no leite cru em propriedades distintas fornecedoras de leite;
- Verificar a presença de Aflatoxina M1 em marcas distintas de leite UHT (Ultra High Temperature) e leite em Pó comercializadas na região;
- Confrontar os níveis de Aflatoxina M1 obtidos com a legislação vigente;
- Propor ações necessárias.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Micotoxinas

As micotoxinas são substâncias tóxicas resultantes do metabolismo secundário de fungos filamentosos, que se desenvolvem naturalmente em produtos utilizados para alimentação humana ou animal, sendo estudadas várias toxinas e cada uma relacionada a determinados sinais clínicos (HUSSEIN; BRASEL, 2001; JOUANY, 2001). Em bovinos leiteiros as principais toxinas estudadas são a *Zearalenona* e *Aflatoxina*. A toxicidade das micotoxinas depende da origem da contaminação (natural ou experimental), da dose e da frequência com que é ingerida, bem como sexo, idade e estágio da vida produtiva do indivíduo (APPLEBAUM *et al.*, 1982; BARRINGER; DOSTER, 2001). Os sinais clínicos podem ser agudos (pouco frequentes em bovinos), podendo levar à óbito, normalmente associado a ingestão de doses geralmente elevadas. Os efeitos crônicos da ingestão de micotoxinas é o resultado de doses menores que provocam diminuição da produção em animais e distúrbios na proliferação celular em mamíferos, incluindo o homem (BENNETT; KLICH, 2003; MURPHY *et al.*, 2006; SHEPHARD, 2008).

Os grãos de cereais utilizados para produção de rações e os volumosos como silagens, feno, pré-secados e pastagens ficam pré-dispostos ao ataque de fungos de vários tipos que ocorre com certas condições, como presença de esporo do fungo, substrato orgânico, níveis adequados de oxigênio, umidade, temperatura e acidez (MOSS, 1991; WHITLOW; HAGLER JUNIOR, 1999). A contaminação pode ser influenciada por algumas práticas comuns na produção agrícola, como a antecipação da colheita que pode afetar reduzindo a ocorrência de infestação dos grãos por insetos e fungos, e conseqüentemente a produção de micotoxinas (LÁZZARI, 1997).

Com uma colheita tardia se pode favorecer a ocorrência de grãos ardidos (com proliferação fúngica) e atacados por insetos, reduzindo os teores de umidade e

comprometendo o grão que será armazenado com fungos aderido na superfície (CAST, 2003). Micotoxinas de maior importância são originadas do fungo *Fusarium* sendo elas a *Desoxinivalenol* (DON), e *Zearalenona* (ZEA), a *Aflatoxina* produzida por fungos *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus* que é eliminada através do leite na forma de *Aflatoxina M₁* com resíduos equivalentes a 1 a 2% do nível existente na dieta merecem uma atenção especial em saúde pública (JOUANY, 2001).

Para formação de Aflatoxinas as condições são muito variadas, sendo a temperatura um dos principais fatores envolvidos nesse processo. Em grãos, a faixa viável para a sua produção situa-se entre 11 e 37°C, sendo que fungos toxigênicos podem infectar os cultivos em crescimento, em pós danos causados por insetos e produzir toxinas antes da colheita, durante e após seu armazenamento (MALLMANN *et al.*, 1994). Períodos de seca durante o cultivo do de cereais e volumosos, temperatura e umidade acima do ideal no armazenamento dos grãos ou rações são fatores importantes na produção de Aflatoxina (KETTERER *et al.*, 1982).

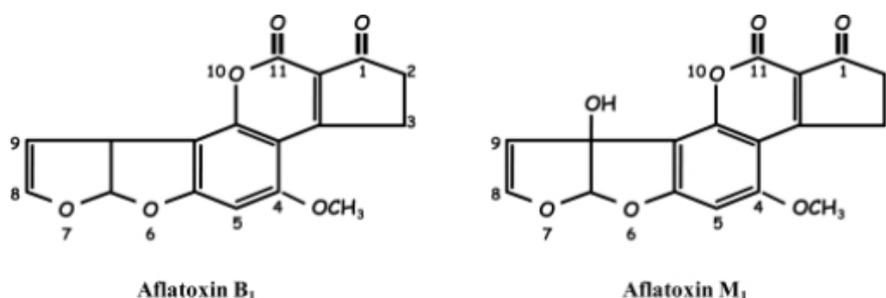
A forma ativada da Aflatoxina B₁ é o composto identificado como 8,9-óxido de Aflatoxina B₁, originado através da epoxidação da dupla ligação do éter vinílico, presente na estrutura bi-furanóide da molécula de Aflatoxina B₁. Este composto é altamente eletrofílico e capaz de reagir rapidamente, através de ligações covalentes, com sítios nucleofílicos de macromoléculas, como ácido desoxirribonucléico (DNA), ácido ribonucléico (RNA) e proteínas, sendo que estas ligações determinam a formação de adutos, os quais representam a lesão bioquímica primária produzida pelas aflatoxinas. A AFB₁-epóxido pode também ser conjugada enzimaticamente com glutathione reduzida, através de glutathione-S-transferases, constituindo importante via de detoxificação deste composto (HAYES, J.D, et al, 1991).

A ligação da AFB₁-epóxido com o DNA modifica a sua estrutura e, conseqüentemente, a sua atividade biológica, originando assim os mecanismos básicos dos efeitos mutagênicos e carcinogênicos da AFB₁, sendo a formação de adutos ocorre através da ligação com guaninas da molécula de DNA, na posição N₇, ao nível do códon 249, do gene supressor de tumores p53, sendo a ocorrência deste tipo de alteração característica de vários carcinomas no homem, sobretudo o hepático (HSIEH, D.P.H.; ATKINSON, D.N.,1991).

Após a ingestão de Aflatoxina B₁ (AFB₁), no processo de biotransformação em animais, como os bovinos, esta sofre uma reação de hidroxilação e transforma-se em Aflatoxina M₁, a qual se conjuga com ácido glicurônico e sulfatos, podendo ser excretada na bile, urina e leite (HUSSEIN; BRASEL, 2001). As Aflatoxinas são absorvidas no trato gastrointestinal e biotransformadas primariamente no fígado por enzimas microsossomais relacionadas ao citocromo P450, essa biotransformação da Aflatoxina B₁ constitui um complexo processo

com múltiplas vias formando derivados responsáveis por efeitos tóxicos agudos, mutagênicos e carcinogênicos (NEAL, 1998) (Figura 1). A Aflatoxina M1 pode ser detectada no leite após 12 a 24 horas da primeira ingestão de ração contaminada com Aflatoxina B1 atingindo níveis máximos após dois dias, e começando a diminuir a partir de quatro e cinco dias da retirada do alimento contaminado (DRAGACCI, 1995).

Figura 1 - Estruturas químicas da Aflatoxina B1 e Aflatoxina M1 (Hussein; Brasel, 2001)



As Aflatoxinas B1 e M₁ são substâncias altamente carcinogênicas mais conhecidas no mundo, relacionado à hepatocarcinogênese, sendo Aflatoxina M1 liberada no leite quando o animal ingere alimento contaminado com Aflatoxina B1, pois a grande variedade de alimentos disponíveis para consumo, o leite destaca-se pela sua rica constituição sendo consumido por bebês, crianças e adultos em todo o mundo (HUSSEIN; BRASEL, 2001). Os sinais clínicos da aflatoxicose são difíceis de serem percebidos e muitas vezes são confundidos com outras doenças geralmente a contaminação se estende por semanas a meses até que seja realizado o diagnóstico (MALLMANN, 2007).

O carcinoma hepatocelular (CHC) é um dos tipos mais comuns de câncer, apresentando, porém, uma acentuada variação geográfica quanto à incidência, com predomínio em alguns países da África, Ásia e Ilhas do Pacífico (PARKIN; STJERNWARD; MUIR, 1984). A ocorrência do carcinoma hepatocelular é maior nos homens do que nas mulheres, predominantemente na faixa etária de 30 a 50 anos, entre os países com maior incidências estão Moçambique, Zimbábwe, Etiópia, China (costa sudoeste) e Taiwan e os países com incidência intermediária incluem Swazilândia, Transkei, Japão e os da parte central e sudoeste da Europa (KEEHN; FRANK-STROMBORG, 1991).

Neal *et al.* (1998), em estudo *in vitro* com células de linhagem humana, propuseram que a elevada citotoxicidade da Aflatoxina M1 estaria relacionada ao fato da mesma não necessitar de ativação metabólica para se ligar às proteínas microssomais, diferentemente da Aflatoxina B1. Cullen *et al.*, (1987) estudaram a influência da ingestão de Aflatoxina M1 e

Aflatoxina B1 no desenvolvimento de câncer em ratos machos durante o período de 20 meses, e verificaram que 95 e 5 % dos animais tratados com alimento contaminado com 50 µg/kg de Aflatoxina B1 e Aflatoxina M1, respectivamente, desenvolveram carcinoma hepático. A presença de carcinoma intestinal foi observada apenas nos animais tratados com a Aflatoxina M1, provavelmente em decorrência da diferença de polaridade entre as duas moléculas de Aflatoxinas, uma vez que a Aflatoxina M1 apresenta baixa absorção pelo trato digestivo, e a retenção dessa toxina no intestino pode favorecer o surgimento do tumor. Bailey *et al.*, (1994) compararam o potencial carcinogênico da Aflatoxina M1 e Aflatoxina B1 em trutas, e também verificaram que a Aflatoxina M1 é um hepatocarcinógeno menos ativo que seu precursor.

Existem evidências que apontam para a susceptibilidade diferenciada indivíduos faixas etárias distintas. Barringer; Doster (2001) descreveram um surto natural de aflatoxicose aguda em bezerros provocado pela ingestão de leite contaminado com Aflatoxina M1. Estes pesquisadores observaram que os animais apresentaram anorexia, pêlos eriçados e perda de peso, ocorrendo morte entre oito a dez dias após o surgimento dos sinais clínicos. A morbidade e mortalidade aproximada do rebanho durante seis semanas foram de 100 e 25%, respectivamente. Na análise bioquímica sérica, observou-se redução do nível de proteínas totais, albumina e globulina, e aumento do nível de bilirrubina total, gama-glutamil transferase e fosfatase alcalina. A histopatologia revelou hepatopatia caracterizada por vacuolização centrolobular e na zona média dos hepatócitos. O teor de Aflatoxina M1 detectado no leite consumido pelos animais foi de 0,05 µg/L e após três dias de suspensão do fornecimento do mesmo, as taxas de morbidade e mortalidade retornaram ao padrão normal estimado para o rebanho.

Os animais que possuem infecção por bactérias *staphylococcus* no úbere apresentam taxa de secreção de Aflatoxina M1 mais elevada que os animais sadios (VELDMAN *et al.*, 1992). As taxas de excreção são mais elevadas em animais de *alta* produção, sendo relacionado a permeabilidade das membranas celulares dos alvéolos das glândulas mamárias, e o estágio de lactação também está relacionado com a passagem de Aflatoxina M1 (VELDMAN, 1992).

Fungos do gênero *Fusarium* destacam-se como um dos mais importantes em termos de perdas globais devido às micotoxicoses, devido a esse gênero ter uma capacidade de produzir uma variedade de micotoxinas, sendo a *Zearalenona* de maior impacto reprodutivo na bovinocultura leiteira (SMITH; SEDDON, 1998). Em grãos de cereais contaminados, o nível de contaminação por *Zearalenona* não deve exceder a 250 ppb na dieta total (HAGLER JUNIOR, 1999). Concentrações acima disso, induzem a respostas estrogênicas em vacas

leiteiras, estando associadas a abortos (WEAVER *et al.*, 1986). Os sinais clínicos de infecção crônica variam desde a menor ingestão de alimento, menor produção de leite, vaginite, aumento de volume uterino, vulva e glândulas mamárias túrgida em novilhas virgens, declínio na taxa de ovulação e ciclos longo. Ainda, em muitos casos, os animais intoxicados apresentam-se aspecto saudável e escore corporal considerado normal, apenas diminuição na performance reprodutiva (WHITLOW *et al.*, 1979; WEAVER *et al.*, 1986).

A ingestão de *Desoxinivalenol* (DON) está associada à menor ingestão de alimento e redução da produção de leite, sendo que o consumo de 500ppb resulta em queda de até 11,3 kg/dia, maiores contagens de células somáticas no leite, menor eficiência reprodutiva, além de uma ampla variedade de desordens no trato gastrointestinal, diarreia abortos e hemorragias (SHARMA, 1993).

3.2. Pesquisas de aflatoxinas M1

A legislação difere dentre países quanto a presença e níveis tolerados em leite e derivados (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION, 2014). Alguns exemplos são citados abaixo, como:

- União Européia (Legislação comum para todos os membros): Leite in natura ou destinado para elaboração de produtos à base de leite: Aflatoxina M1= 0,05 ng/L; Leite, leite em pó, (crianças menores que três anos): M1 = 0,03 µg/kg.

- Estados Unidos: Leite in natura ou destinado para elaboração de produtos à base de leite: Aflatoxina M1= 0,05 ng/L; Leite, leite em pó, (crianças menores que três anos): M1 = 0,03 µg/kg.

- Mercosul:(Legislação comum a todos integrantes) Leite fluido: Aflatoxina M1 = 0,5 µg/L (ppb); leite em pó: Aflatoxina M1 = 5,0 µg/kg (ppb).

- Bulgária: Aflatoxina M1: Produtos de leite fluido = 0,5 µg/kg; Leite em pó = 0,1 ppb; Leite em pó para dietas e alimentos infantis = 0 µg/kg.

- República Tcheca Leite: M1 = 0,5 µg/kg, Alimentos infantis na base de leite: M1 = 0,1 ppb; B1 = 0,1; B2, G1, G2 = 0,2 µg/kg;

- Romênia: Leite e laticínios: M1 = 0 µg/kg;

- Suíça: Leite e produtos: M1 = 0,05 µg/kg, Soro de leite e produtos: M1 = 0,025 µg/kg;

- China: Leite fluido e produtos lácteos (calculados na base de leite fluido): B1 = 0,5 µg/kg;
- Chipre: Leite e laticínios: todas micotoxinas: 0,5 µg/kg;
- Egito: Leite e laticínios: G1, G2, M1, M2 = 1 µg/kg;
- Nigéria: Leite fluido: M1 = 1 µg/kg;
- Argentina: Leite líquido e em pó: M1 = 0,05 µg/kg;
- Uruguai: Leite e produtos lácteos: Aflatoxina M1 = 0,5 µg/kg;
- Barbados: Leite líquido: M1 = 0,05 µg/kg;
- Honduras :Leite e laticínios: M1 = 0,05 µg/kg.

No Brasil, o limite máximo de *Aflatoxina* M1 permitido segue a definição do Mercosul, GMC/ RES. n°56/94, onde estabelece 0,5 µg/L (ppb) em leite líquido e 5,0 µg/L (ppb) para leite em pó (BRASIL, 2002). Estudos em busca de Aflatoxinas em diferentes tipos de queijo também relatam a contaminação com valores diferenciados (Tabela 1).

Tabela 1 - Síntese de estudos Nacionais envolvendo pesquisa de Aflatoxina M₁ em amostras de queijo comercializado.

| Amostras | N* | Amostras positivas | Maior que 0,25µg/kg | Maior valor encontrado µg/kg | Referência |
|-----------------------------|-----------|---------------------------|----------------------------|-------------------------------------|-------------------------|
| Queijo nacional | 58 | 89% | 7% | 0.30 | ILHA et al., (2011) |
| Queijo minas padrão | 24 | 29,2% | 0% | – | OLIVEIRA et al., (2011) |
| Queijo minas frescal | 24 | 25% | 8.3% | – | OLIVEIRA et al., (2011) |
| Queijo parmesão | 88 | 46% | 2% | 0.66 | PRADO et al., (2008) |
| Queijo ralado | 23 | 96% | 26% | 0.54 | PRADO et al., (2001) |

Em pesquisas realizadas em diversas regiões do Brasil para Aflatoxina M₁ no leite, foram analisados várias amostras de leite pasteurizado e cru e foram relatados níveis variados entre as amostras (PRADO *et al.*, 1999). No estado de Minas Gerais os níveis de Aflatoxina M₁ no leite pasteurizado e cru não diferem entre si, mas em 52,8% das amostras de leite analisadas foram positivas, estando dentro do nível permitido, os alimentos analisados destinados para os bovinos não foi encontrado Aflatoxina B₁ (PEREIRA *et al.*, 2005). No estado de São Paulo- Brasil foram analisadas 43 mostras de leite comercializado de diversas regiões sendo 17 (39,5%) positivas para presença de Aflatoxina M₁ das quais 11 (64,7%) apresentaram concentração acima de 0,5 µg/l, limite máximo permitido pela legislação brasileira para presença de M₁ no leite fluido (GONÇALEZ *et al.*, 2005).

Em outro estudo feito para análise de Aflatoxinas B₁ e M₁ em propriedades no estado de São Paulo com leite e concentrados evidenciaram contaminações em ambas os tipos de amostra (OLIVEIRA *et al.*, 2010). Muitas contaminações poderiam ser evitadas com um manejo adequado, seja pela estocagem da ração onde se deve proceder com a limpeza a cada final do estoque no silo, pois durante experimentos ficou evidenciado este manejo com resultados positivos para evitar a contaminação (SASSAHARA *et al.*, 2003).

Estudos feitos no estado do Paraná (SASSAHARA, *et al.*, 2003), analisando a contaminação por Zearalenona e Aflatoxinas em alimentos fornecidos para bovinos leiteiros encontraram 13,6% de amostras positivas e destas mais de 50% acima do limite de 20µg/kg estabelecido pela agência nacional de vigilância sanitária (ANVISA, 2012). Verificou-se maior contaminação de Aflatoxinas em alimentos concentrados e Zearalenona em volumosos. Os autores sugerem que porém que as rações comerciais, mesmo com níveis de garantia dos fabricantes, estão sujeitas à contaminação e recontaminação por fungos, conseqüentemente pelas micotoxinas, ocasionado, principalmente, pelo armazenamento inadequado dos sacos de ração dentro das propriedades. Nos concentrados preparadas nas propriedades encontrou-se maior índice de contaminação por Aflatoxina B₁, com níveis mais elevados da toxina (SASSAHARA *et al.*, 2003).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

O presente estudo foi conduzido em 17 propriedades produtoras de leite tipo B, localizadas em municípios da região Noroeste do Estado do RS, compreendendo amostra representativa do Corede Alto Jacuí, durante o período entre fevereiro a maio de 2015. As propriedades foram selecionadas por possuírem características representativas da Região conforme descrito por Lorenzoni, Araldi e Mera, 2012, ou seja, mão de obra familiar até 20,4 hectares dedicados a produção de leite, com rebanhos de até 40 vacas produtoras de leite em sistemas de semi-confinamento e duas ordenhas diárias. Estas propriedades não recebem assistência técnica regular e não avaliam a matéria prima fornecida aos animais. A média de produção por vaca/dia é de 18,74 litros de leite e por propriedade é de 403,79 litros de leite produzido diariamente.

As propriedades selecionadas para o estudo forneciam o concentrado individualmente em canzís, em duas refeições diárias, sendo que o adsorvente era fornecido em uma única refeição. Nas propriedades a dieta oferecida aos animais constituía-se de concentrado proteico comercial ou concentrado produzido na propriedade, silagem de milho, pastagens cultivadas no outono-inverno: aveia preta (*Avena strigosa*), aveia branca (*Avena sativa*) e azevém (*Lolium multiflorum*); e verão: sorgo (*Sorghum bicolor*) e milheto (*Pennisetum americanum*). O sistema de ordenha era fechado com manejo da ordenha adequado e produção de leite constante durante o ano.

As amostras de leite cru foram coletadas dos tanques de expansão após a ordenha dos animais, resfriamento a 4°C e homogeneização. Todas as análises foram realizadas em laboratórios credenciados pelo MAPA. Para quantificação das concentrações da Aflatoxina M1, foram analisadas três amostras (em dias alternados) de leite por propriedade. Para a coleta das amostras de leite integral UHT (Ultra High Temperature) e leite em pó, foram adquiridos caixas de leite (1 litro) de 13 marcas comerciais distintas e quatro latas (500g), comercializadas em estabelecimentos regionais.

Todas as amostras foram coletadas em tubos estéreis de 70ml, as quais foram imediatamente congeladas para posteriormente serem enviadas ao laboratório. A quantificação de Aflatoxina M1 foi feita em laboratório Credenciado ao MAPA, por Espectrofotometria de Massa (HPLC/MSMS). Os Resultados estão apresentados em micrograma por quilo de leite.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O objetivo geral deste estudo foi avaliar níveis de contaminação por Aflatoxina M1 no leite produzido e comercializado na região do COREDE Alto Jacuí e compara-los com a legislação vigente. De maneira geral (Figura 2, 3 e Tabela 4), verificou-se um nível de contaminação por Aflatoxina M1 em 92% (47/51), 100% (13/13) e 75% (3/4), em amostras de tanque de expansão, UHT (Ultra High Temperature) e em pó, respectivamente. Destaca-se que todas as amostras de leite avaliadas apresentaram resultados que atendem as exigências da legislação brasileira vigente ($0,5\mu\text{g}/\text{kg}$). No entanto, apenas 55% (38/68) atendem as exigências da União Europeia ($0,05\mu\text{g}/\text{kg}$). Apesar dos resultados satisfatórios em relação ao mercado nacional, tais níveis de contaminação certamente seriam uma restrição para futuras exportações deste produto.

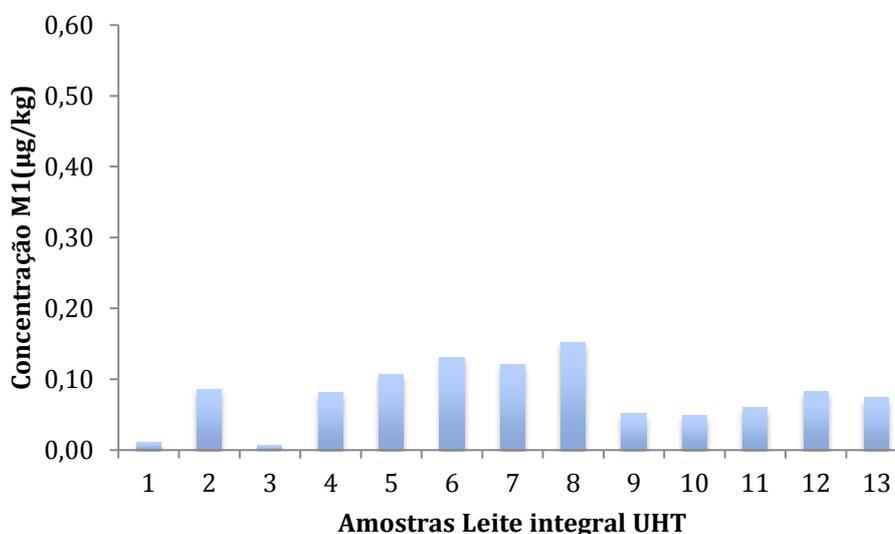
Também em outros estudos apresentaram resultados parecidos como no Irã das 50 amostras de leite analisadas pelo método ELISA, 100% estavam contaminadas por Aflatoxina M1, das quais 62% estavam com níveis acima de $0,05\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ (GHAZANI, 2009). Na Síria, a concentração média encontrada em 126 amostras foi de $0,492\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ das quais 80% ultrapassaram o limite estabelecido pela Comunidade Européia (GHANEM; ORFI, 2009).

Das 13 amostras de leite integral UHT (Ultra High Temperature) comercializadas todas (100%), foram positivas quanto a presença de Aflatoxina M1, com valores obtidos dentro do limite exigidos pela Legislação brasileira ($0,5\mu\text{g}/\text{l}$). No entanto, destas amostras (23,07%) ou seja três estariam de acordo com as exigências da União Europeia de $0,05\mu\text{g}/\text{l}$ (Figura 2).

UNUSAN (2006) também encontrou valores elevados em 129 amostras de leite UHT (Ultra High Temperature) na Turquia, sendo que 58,1% das amostras estavam contaminadas e destas, 3,2% estavam acima de $0,5\mu\text{g}/\text{k}$. Da mesma forma os resultados apresentados por Tekins e Eken (2008) demonstraram que 67 em cada 100 amostras de leite UHT (Ultra High Temperature) obtidos de cinco cidades turcas continham níveis de Aflatoxina M1 superiores a

0,5 $\mu\text{g.kg}^{-1}$. Kamkar (2005) relatou em seu estudo que 40% das 111 amostras ultrapassaram a 0,05 $\mu\text{g.kg}^{-1}$. Kim *et al.*, (2000) mostrou que a incidência de Aflatoxina M1 foi de 76% em Seul, na Coréia do Sul. Rastogi *et al.*, (2004) analisaram 12 amostras de leite no mercado indiano e encontrou quatro delas contaminadas com Aflatoxina M1. Foram também relatados em estudos a ocorrência de Aflatoxina M1 no leite pasteurizado comercializado em 11 municípios (Astorga, Flórida, Ivaiporã, Londrina, Marialva, Maringá, Nova Esperança, Paranavaí, Querência do Norte, São Jorge do Patrocínio, Umuarama) no estado do Paraná, Brasil onde foram coletadas 82 amostras de leite pelos agentes das Vigilâncias Sanitárias Municipais e do Estado, durante o período de 29/03/2010 a 03/05/2011, as quais nenhuma apresentou resultado positivo para presença de Aflatoxina M1 (SANTOS *et al.*, 2014).

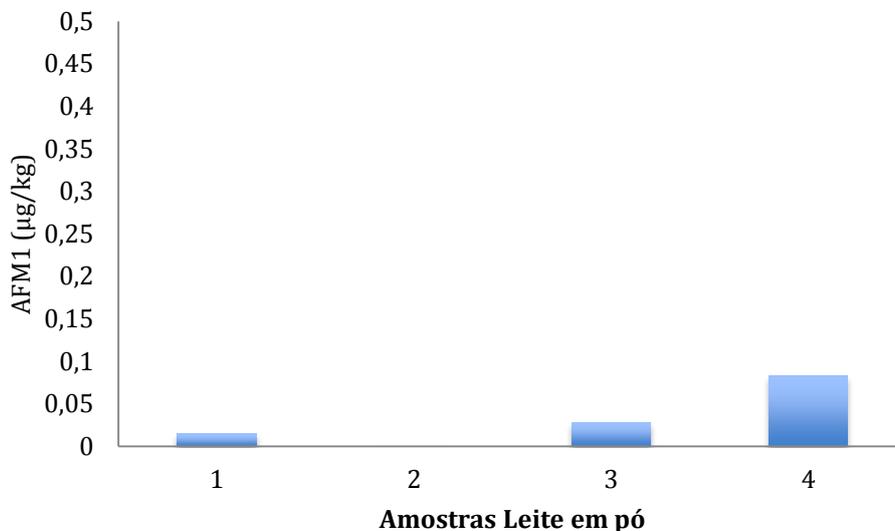
Figura 2- Concentração de Aflatoxina M1 em amostras de leite integral UHT comercializado na região do Corede Alto Jacuí.



Fonte: Autor

Nas quatro amostras de leite em pó analisadas três delas (75%), apresentaram presença de Aflatoxina M1 e uma amostra (25%) não apresentou Aflatoxina M1, sendo todas (100%) das amostras estavam dentro da legislação nacional. E dentro destas análises apenas, três ou seja (75%) atendem a legislação da união européia Aflatoxina M1 0,05 $\mu\text{g/l}$ (Figura 3).

Figura 3 - Concentração de Aflatoxina M1 em amostras de leite em pó comercializado na região do Corede Alto Jacuí.



Fonte: Autor

No leite in natura coletado no tambo das propriedades, totalizando 51 amostras provenientes de 17 propriedades sendo feito em três coletas estabelecidas, sendo na primeira coleta todos estavam dentro do limite brasileiro (100%), sendo destas 10 (58,82%) propriedades estavam dentro do limite da união europeia, e uma (5,88%) propriedade sem presença de Aflatoxina M1 no leite. Na segunda coleta das 17 propriedades (100%) estavam dentro do limite brasileiro, sendo destas, nove (52,94%) propriedades estavam dentro do limite da União Européia e uma (5,88%) propriedade sem presença de Aflatoxina M1 no leite. Na terceira coleta e última todas (100%) estavam dentro dos limites brasileiros, e 11 (64,7%) propriedades dentro do limite da União Européia, e duas (11,76%) propriedades sem presença de Aflatoxina M1 no leite. Com uma média das três análises em todas as propriedades alcançaremos 0,059μg/l de Aflatoxina M1 nos colocando uma situação constrangedora de nosso leite não atingir o limite aceitável pela União Europeia ficando apenas dentro do limite brasileiro (Tabela 2).

Tabela 2 - Concentração de Aflatoxina M1 em amostras de leite cru produzido na região do Corede Alto Jacuí.

| Produtor | Dia 1 | Dia 3 | Dia 5 |
|----------|-------|-------|-------|
| A | 0,045 | 0,062 | 0,063 |
| B | 0 | 0 | 0 |

| | | | |
|-----------|------------|------------|------------|
| C | 0,241 | 0,241 | 0,199 |
| D | 0,059 | 0,073 | 0,036 |
| E | 0,043 | 0,031 | 0,009 |
| F | 0,032 | 0,052 | 0,032 |
| G | 0,007 | 0,006 | 0 |
| H | 0,065 | 0,057 | 0,082 |
| I | 0,02 | 0,021 | 0,017 |
| J | 0,117 | 0,076 | 0,092 |
| L | 0,228 | 0,171 | 0,207 |
| M | 0,078 | 0,086 | 0,072 |
| N | 0,052 | 0,047 | 0,039 |
| O | 0,02 | 0,025 | 0,029 |
| P | 0,014 | 0,013 | 0,011 |
| Q | 0,016 | 0,014 | 0,016 |
| R | 0,032 | 0,041 | 0,036 |
| Média±dpm | 0,063±0,07 | 0,060±0,06 | 0,055±0,06 |

*Valores destacados não atendem exigências da União Europeia

Fonte: Autor

Com estes resultados encontrados depare-se com uma situação onde todas as amostras positivas para presença de Aflatoxina M1 estão dentro do limite aceitável no Brasil pelas normas impostas, mas na sua grande maioria as positivas estão com índices muito além de países mais exigentes como a União Europeia. O leite é muito consumido durante o período que compreende a infância e adolescência do ser humano por ajudar no crescimento e formação óssea, sendo uma fonte de minerais, proteínas e vitaminas, e quando envelhecemos enfrentamos dificuldades em termos de saúde e o consumo de leite e derivados podem ajudar nosso organismo a responder melhor esse desafio, sendo que há uma grande preocupação com relação a saúde pela presença de Aflatoxina M1 no leite.

Para que a presença de Aflatoxina B1 seja controlada a níveis baixos ou eliminada dos alimentos utilizados na dieta dos bovinos leiteiros devemos utilizar técnicas de conservação que iniciam na colheita dos grãos, uso de produtos para conservação de silagens, feno e pré-secados, além de formas de armazenamento ou estocagem de grãos, rações e volumosos evitando a contaminação. Em alimentos contaminados por Aflatoxina B1 sendo esta precursor da Aflatoxina M1, podemos utilizar mecanismos que tentam sequestrar esta toxina durante a

digestão, no qual muito estudado e sendo uma forma encontrada perante este problema o uso de aditivos chamados de adsorventes, que são utilizados em proporções nas dietas, mas as pesquisas buscam cada vez um produto melhor que possa ter maior afinidade com a micotoxina desejada, tendo inúmeras pesquisas publicadas no mundo inteiro com ênfase neste problema.

Em muitas pesquisas realizadas em laboratório buscou-se produtos que retirassem a Aflatoxina M1 do leite mas não houve sucesso pois estas inativaram ou destruíram ingredientes da composição do leite sendo o mesmo alterado com estes produtos tornando impossíveis de serem utilizados em escala industrial. As pesquisas por produtos que possam retirar do leite esta aflatoxina seriam de importância, pois se relacionarmos seria mais fácil de ser utilizado por indústrias de lácteos, mas muitas vezes as pesquisas são demoradas ou requerem custos altos tornando-se uma ferramenta deixada de lado pela indústria.

O Brasil é um país em desenvolvimento que se busca o crescimento do setor leiteiro com incremento na produção e exportação de seus produtos. Como evidenciado no presente estudo, a presença de contaminantes podem se tornar restritivos a expansão do mercado consumidor. São necessários ajustes na cadeia produtiva, na produção de alimento (desde a colheita, armazenamento e beneficiamento) na assistência técnica aos produtores (escolha de matérias primas e uso adequado de adsorventes) e no controle por parte das indústrias e órgãos responsáveis, pois a composição dos alimentos se relaciona com saúde pública.

6. CONCLUSÃO

Nas condições avaliadas neste estudo, das amostras de leite produzidos e do leite comercializado na região do Corede Alto Jacuí, 92 e 94%, respectivamente, está contaminado com Aflatoxina M1. No entanto, todas as amostras atendem os padrões estabelecidos pela legislação nacional vigente que estabelece 0,5 µg/L (ppb) em leite fluído e 5,0 µg/L (ppb) para leite em pó, sendo que para obtermos leite de qualidade devemos ter assistência técnica na atividade, melhorando as práticas agrícolas relacionadas aos alimentos colhidos e armazenados que são fornecidos aos bovinos de leite, evitando a contaminação por aflatoxinas, as quais ficam de difícil controle pois a região do COREDE Alto Jacuí apresenta as condições climáticas mais variadas possíveis no momento do ciclo da planta, colheita e armazenamento.

REFERÊNCIAS

APPLEBAUM, R.S.; MARTH, E.H. Inactivation of aflatoxin M1 in milk using hydrogen peroxide and hydrogen peroxide plus riboflavin or lactoperoxidase. **Journal of food protection**. v. 45, p. 557-560, 1982.

ASHBELL, G. *et al.* The effect of temperature on the aerobic stability of wheat and corn silage. **Journal Industrial Microbiology & Biotechnology**, New York, v. 28, p. 261- 263, 2002.

BAILEY, G.S.; PRICE, R.L.; PARK, D.L.; HENDRICKS, J.D. Effect of ammoniation of aflatoxin B1 contaminated cottonseed feedstock on the aflatoxin M1 content of cows' milk and hepatocarcinogenicity in the trout bioassay. **Fd Cosmet Toxicol**, v. 32, n. 8, p. 707-715, 1994.

BARRINGER, S.; DOSTER, W.R. Case report-suspected M1 aflatoxicoses on a western dairy calf ranch. **The Bovine Practitioner**, v. 35, n. 2, p. 126-130, 2001.

BENNETT, J. W.; KLICH, M. Mycotoxins. **Clin. Microbiol. Rev.** v.16, n.3, p. 497–516, 2003.

BORREANI, G.; TABACCO, E.; ANTONIAZZI, S.; CAVALLARIN, L. Zearalenone contamination in farm maize silage. *Ital. Journal of Animal Science*, v.4, p.162–165, 2005.

BRASIL. 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 Republica Federativa do Brasil**, Brasília DF, 16 outubro 2002.

CAST - Council for Agricultural Sciences and Technology - Task Force Report. **Mycotoxins: risks in plant, animal, and human systems**. Ames, Iowa. n.139, 191p., 2003.

CULLEN, J.M., RUEBNER, B.H., HSIEH, L.S., HYDE, D.M., HSIEH, D.S.P. Carcinogenicity of dietary aflatoxin M1 in male fisher rats compared to aflatoxin B1. **Cancer Res**, v. 47, p. 1913- 1917, 1987.

DAWSON, K.A.; EVANS, J. AND KUDUPOJE, M. Understanding the adsorption characteristics of yeast cell wall preparations associated with mycotoxin binding. In: Biotechnology in the Feed Industry, 22. Nottingham. **Proceedings of Alltech's 22nd Annual Symposium**. Nottingham University Press. Nottingham. p.169-181, 2006.

DRAGACCI *et al.* Use of immunoaffinity chromatography as a purification step for the determination of aflatoxin M1 in cheeses. **Food Additives and Contaminants**, v. 12, n. 1, p. 59-65, 1995.

EUROPEAN COMMISSION (EC). Commission Regulation n.2174/2003 of 12 December 2003 amending Regulation (EC) n° 466/2001 as regards aflatoxins. **Official Journal of the European Community**, 12 dec. 2003. L326, p.12-15.

EUROPEAN COMMISSION 2003. Commission Directive of 31 October 2003 amending Annex I to Directive 2002/32/EC of the European Parliament and of the Council on undesirable substances in animal feed (Text with EEA relevance), 2003/100/EC. **Official Journal of the European Communities** L285, 33–37.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. Worldwide Regulations for Mycotoxins, 1995. **A Compendium**, Roma, n. 64, p.9-20, 1996.

GARON, D.; RICHARD, E.; SAGE, L.; BOUCHART, V.; POTTIER, D.; LEBAILLY, P. Mycoflora and multimycotoxin detection in corn silage: Experimental study. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** v. 54, p.3479–3484, 2006.

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

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

GONÇALEZ, E.; FELICIO, J.D.; PINTO, M.M.; ROSSI, M.H.; NOGUEIRA, J.H.C., MANGINELLI, S. Ocorrência de aflatoxina M1 em leite comercializado em alguns municípios do estado de São Paulo. **Arq. Inst. Biol.** v.72, n.4, p.435-438, 2005.

HAGLER, W. M.; MIROCHA, C. J. PATHRE, S. V. Identification of the naturally occurring isomer of zearalenol produced by *Fusarium roseum* 'Gibbosum' in rice culture. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.37, n.5, p.849-853, 1979.

HAYES, J.D.; JUDAH, D.J.; MCLELLAN, L.I.; NEAL, G.E. Contribution of the glutathione-S-transferases to the mechanisms of resistance to aflatoxin B₁. **Pharmacol. Ther.**, 50: 443-72, 1991.

HSIEH, D.P.H.; ATKINSON, D.N. Bisfuranoid mycotoxins: their genotoxicity and carcinogenicity. **Adv. Exp. Med. Biol.**, 283: 525-32, 1991.

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

IARC, International Agency for Research on Cancer (1993). Aflatoxins. Some naturally occurring substances: Food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. **IARC Monograph on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans**, (Vol. 56, pp. 245–395), IARC, Lyon, France: World Health Organization.

IARC, International Agency for Research on Cancer (2002). Aflatoxins. **IARC Monograph on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans**, 82, 171, IARC, Lyon, France: World Health Organization.

IBGE disponível em: **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**.

www.ibge.gov.br/.../producaoagropecuaria/abate-leite-couro-ovos_2014 Acesso em: 5/7/2015

ILHA, M. H. *et al.* Occurrence of AFM1 in dairy products in Brazil. **Food Control**, Oxford, v.22, n.12, p.1971-1974, 2011.

INE. **Óbitos pela causa tumor maligno do fígado e das vias biliares intra-hepáticas do CID 10: Resultados 2002-2011**. Lisboa. 2012.

JECFA- JOINT FAO/WHO EXPORT COMMITTEE ON FOOD ADDITIVES. Evaluation of certain mycotoxins in food: **fifty-sixty report of the joint Fao/who expert committee on food additives**, Geneva; Who, 62p. 2002.

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

Khlangwiset, P., Shephard, G. S., & Wu, F. (2011). Aflatoxins and growth impairment: a review. **Critical Reviews in Toxicology**, v.41, n.9, p.740–755.

KEEHN, D.M.; FRANK-STROMBORG, M. A worldwide perspective on the epidemiology and primary prevention of liver cancer. **Cancer Nursing**. v.14, n.4, p.163-174, 1991.

KETTERER P.J., BLANEY B.J., MOORE C.J., MCINNES I.S. & COOK P.W. Field cases of aflatoxicosis in pigs. **Aust. Vet. J.** v. 59, p.113-117, 1982.

LAZZARI, F. A. Umidade, fungos e micotoxinas na qualidade de sementes, grãos e rações. 2. ed. Curitiba: **Ed. do Autor**, 1997.

LORENZONI, A.; MERA, C.M.P.; ARALDI, D. F., **DIAGNÓSTICO DAS UNIDADES DE PRODUÇÃO LEITEIRA DOS MUNICÍPIOS DO COREDE ALTO JACUÍ – RS**. Cruz Alta ; Gráfica **UNICRUZ**, 2012.

MALLMANN, C. A., SANTURIO J. M. & WENTZ I. Aflatoxinas - Aspectos clínicos e toxicológicos em suínos. **Ciência Rural**, Santa Maria, 24; p. 635-643, 1994.

MALLMANN, C. A.; DILKIN, P. Micotoxinas e micotoxicoses em suínos. Santa Maria: **Sociedade Vicente Palotti**, 238p, 2007.

MARCIA SASSAHARA; ERIKA KUBOTA YANAKA; DAISY PONTES NETTO
Ocorrência de aflatoxina e zearalenona em alimentos destinados ao gado leiteiro na Região Norte do Estado do Paraná; **Ciências Agrárias**, Londrina, v. 24, n. 1, p. 63-72, jan./jun. 2003.

MOSS, M. O. The environmental factors controlling mycotoxin formation. In: SMITH, J. E.; HENDERSON, R. S. **Mycot. and Animal Foods**. Boca Raton: CRC Press, 1991.

MURPHY, P.A.; HENDRICH, S.; LANDGREN, C.; BRYANT, C.M. Food Mycotoxins: An Update. **J. Food Scien.** v.71, n.5, p.51-65, 2006.

NEAL, G.E. Participation of animal biotransformation in mycotoxin toxicity. **Revue de Médecine Vétérinaire**, Toulouse, v.149, n.6, p.555-560, 1998.

OLIVEIRA C.A.F. *et al.* Survey of aflatoxin M₁ in cheese from the North-east region of São Paulo, Brazil. **Food Additives and Contaminants**, London, v.4, n.1, p.57-60, 2011.

OLIVEIRA C. A. F; *et al.*; Determinação de aflatoxina B₁ em rações e aflatoxina M₁ no leite de propriedades do Estado de São Paulo **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, vol.30, supl.1, maio 2010.

PARKIN, D.M.; STJERNESWARD, J.; MUIR, C.S. Estimatives of the worldwide frequency of twelve major cancers. **Bulletin world health organization**, v. 62, n. 2, p.163-182, 1984.

PEREIRA M.A.G. *et al.*; Aflatoxinas em alimentos destinados a bovinos e em amostras de leite da região de Lavras, Minas Gerais – Brasil **Ciênc. agrotec.**, Lavras, v. 29, n. 1, p. 106-112, jan./fev. 2005.

PRADO, G. *et al.* Occurrence of aflatoxin M₁ in Parmesan cheese in Minas Gerais, Brazil. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.32, n.6, p.1906-1911, 2008.

PRADO, G.; OLIVEIRA, M.S.; ABRANTES, F.M.; SANTOS, L.G.; SOARES, C.R.; VELOSO, T. Ocorrência de aflatoxina M₁ em leite consumido na cidade de Belo Horizonte –

Minas Gerais / Brasil – agosto/98 a abril/99. **Ciência Tecnologia de Alimentos** v.19, n.3, p. 420-423, 1999.

PRADO, G.; OLIVEIRA, M.S.; CARVALHO, E.P.; VELOSO, T.; SOUSA, L.A.F.; CARDOSO, A.C.F. Aflatoxina M1 em queijo prato e parmesão determinada por coluna de imunoafinidade e cromatografia líquida. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**. v. 60, n. 2, p. 147-151, 2001.

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

KIM, E. K.; SHON, D. H.; RYU, D.; PARK, J. W.; HWANG, H. J.; KIM, Y. B. 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, 2000.

RAMOS, A.J., HERNANDEZ, E. Prevention of aflatoxicosis in farm animals by means of hydrated sodium calcium aluminosilicate addition to feedstuffs: a review. **Anim Feed Sci Technol**, v.65, p.197-206, 1997.

RASTOGI, S.; DWIVEDI, D. P.; KHANNA, K. S.; DAS, M. Detection of aflatoxin M1 contamination in milk and infant milk products from Indian markets by ELISA. **Food Control**, Guildford, v. 15, n. 4, p. 287-290, 2004.

SANTIN, E.; MAIORKA, A.; ZANELLA, I.; MAGON, L. Micotoxinas do *Fusarium* spp na avicultura comercial. **Ciênc. Rural**. v.31, n.1, p.185-190, 2000.

SANTOS, A.L.; BANDO, E.; JUNIOR, M.M.; Ocorrência de aflatoxina M1 em leite bovino comercializado no estado do Paraná, Brasil. **Ciências Agrárias**, Londrina, v. 35, n. 1, p. 371-374, jan./fev. 2014

SANTURIO, J.M. Micotoxinas e Micotoxicoses na Avicultura. **Rev. Bras. Cienc. Avic.** v.2, n.1, p.01-12, 2000.

SHARMA, R.P. Immunotoxicity of mycotoxins. **J. Dairy Sci.**, v. 76, p. 892-897, 1993.

SHEPHARD, G.S. Impact of mycotoxins on human health in developing countries. **Food Add. Contam.** v.25, n.2, p.146–151, 2008.

SINDIRAÇÕES.Disponível em:

<http://sindiracoes.org.br/wpcontent/uploads/2015/05/boletim-informativo-do-setor_maiio-2015versaoportugues_final.pdf>. Acesso em: 20 jun. 2015.

SMITH, T.K., MACDONALD, E.J., HALAD, S. Current concepts in feed-borne mycotoxins and the potential for dietary prevention of mycotoxicoses. In: **Alltech's 17th Annual Symposium**. Proceedings, p.183-189, 2001.

SMITH, T. K., SEDDON, I. R. Synergism demonstrated between Fusarium mycotoxins. **Feedstuffs**, 22 de junho 1998, p.12-17, 1998.

TEKINS, K. K.; EKEN, H. S. Aflatoxin M1 levels in UHT milk and kashar cheese consumed in Turkey. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 46, n. 10, p. 3287- 3289, 2008.

UNUSAN, N. Occurrence of aflatoxin M1 in UHT milk in Turkey. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 44, n. 11, p. 1897-1900, 2006.

WEAVER, G. A.; KURTZ, H. J.; BEHRENS, J. C.; ROBINSON, T. S.; SEGUIN, B.E.; BATES, F.Y.; MIROCHA, C.J. Effect of zearalenone on the fertility of virgins dairy heifers. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v.47, n. 6, p.1395-1397, 1986.

WHITLOW, L. W.; HAGLER JUNIOR, W. M. Mycotoxins in dairy cattle. In: MOLIN, R; VALENTINI, M. L. **Simpósio Sobre Micotoxinas em Grãos**. São Paulo: Fundação Cargil, p. 151-181, 1999.

VELDMAN, A. *et al.* Carry-over of aflatoxin from cows' food to milk. **Animal Production**, Bletchley, n. 55, p. 163-168, 1992.

YOUSEF, A. E.; MARTH, E. H. Use of ultraviolet energy to degrade aflatoxin M1 in raw or heated milk with and without added peroxide. **Journal of Dairy Science**. Champaign, v. 69 p. 2243-2247, 1985.

